

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CARACTERIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES ENVOLVIDAS NA RESISTÊNCIA DE  
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* À ESTREPTOMICINA E SUA  
RELAÇÃO COM O SISTEMA DE EFLUXO

Fernanda Sá Spies

Porto Alegre, março de 2007

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CARACTERIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES ENVOLVIDAS NA RESISTÊNCIA DE  
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* À ESTREPTOMICINA E SUA  
RELAÇÃO COM O SISTEMA DE EFLUXO

Fernanda Sá Spies

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Arnaldo Zaha

Co-orientadora: Maria Lúcia Rossetti

Porto Alegre, março de 2007

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi realizado em três instituições distintas: na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos; na Universidade Federal do Rio Grande (FURG), no laboratório de Micobactérias e também na Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), especialmente no Centro de Desenvolvimento e Científico e Tecnológico (CDCT).

Este trabalho teve o financiamento do edital PADCT 06/2005 da FEPPS e também teve o apoio financeiro na forma de bolsa da CAPES.

**Certeza**

**De tudo, ficaram três coisas:**

**A certeza de que estamos sempre começando...**

**A certeza de que precisamos continuar...**

**A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...**

**Portanto devemos:**

**Fazer da interrupção um caminho novo...**

**Da queda um passo de dança...**

**Do medo, uma escada...**

**Do sonho, uma ponte...**

**Da procura, um encontro...**

**Fernando Pessoa**

## Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Arnaldo Zaha pela oportunidade e confiança que depositou em mim nestes dois anos. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pelo carinho, paciência e dedicação na orientação deste trabalho.

À Dra. Maria Lucia Rossetti pela co-orientação, oportunidade, confiança e incentivo na realização deste curso de Mestrado.

Ao Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva por acreditar em mim desde o início da minha formação acadêmica, pelo incentivo, interesse e grande ajuda na realização deste trabalho.

A FEPPS, em especial ao CDCT e ao laboratório de bacteriologia da tuberculose, pela excelente infra-estrutura na qual foi realizado o trabalho.

Ao laboratório de micobactérias da FURG, também pela ótima infra-estrutura onde pode ser realizada parte deste trabalho.

A todas as colegas e amigas do CDCT-FEPPS (mulherada!!) pelo excelente convívio, amizade, estímulo, ajuda...

As colegas Cíntia Costi, Tatiana Gregianini e Elis Costa pela grande ajuda com o sequenciamento de DNA.

A colega e amiga Cristine Igansi pela grande ajuda com as problemáticas análises estatísticas.

A colega Patrícia Cafrune pela ajuda e ensinamentos sobre as técnicas de genotipagem, pela parceria em momentos de descontração e pela amizade.

À Marta Osório pela ajuda com as cepas.

As amigas do laboratório da FURG, Ana Bárbara e Daniela Ramos por cuidarem muito bem das minhas cepas, pela ajuda e pela continuação do meu trabalho quando eu não podia estar em Rio Grande.

Aos secretários do PPGBM pelo grande auxílio que me deram em várias ocasiões sempre com muita dedicação e bom humor.

As grandes amigas (espero que para toda a vida!!) e colegas de mestrado (Carol, Deise, Pri, Vanessa e Fran) pela descontração nas horas necessárias, pelas jantãs, viagens e conversas amigas. Obrigada pela cumplicidade, amizade e carinho.

Aos meus queridos pais pelo incentivo e apoio que sempre esteve presente e ao amor incondicional. Amo vocês.

A minha querida irmã que sempre me ajudou quando precisei, pelo computador emprestado quando eu estava em Rio Grande e pela paciência nos meus momentos de exaltação.

Ao meu, agora, “namorado”, pelo companherismo e compreensão sempre presentes desde o início desta caminhada.

À CAPES pelo suporte financeiro

A todos que de alguma maneira e em algum momento contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1. Apresentação .....	15
1.2. Tuberculose e <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	16
1.2.1. Um breve histórico .....	16
1.2.2. Epidemiologia .....	19
1.2.3. Características gerais.....	20
1.2.4. Transmissão .....	21
1.2.5. Controle e tratamento.....	21
1.3. Resistência .....	23
1.3.1. Fatores associados com o desenvolvimento da resistência .....	23
1.3.2. Resistência aos antimicrobianos .....	23
1.3.3. Resistência do <i>M. tuberculosis</i> aos antimicrobianos .....	24
1.3.3.1. Resistência inata.....	24
1.3.3.2. Resistência adquirida .....	24
1.3.4. Mecanismo de ação e resistência das drogas de primeira linha.....	25
1.3.4.1. Estreptomicina.....	25
1.3.4.1.1. Mecanismo de ação .....	25
1.3.4.1.2. Mecanismo de resistência .....	26
1.3.4.2. Rifampicina .....	29
1.3.4.2.1. Mecanismo de ação .....	29
1.3.4.2.2. Mecanismo de resistência .....	29
1.3.4.3. Isoniazida .....	30
1.3.4.3.1. Mecanismo de ação .....	30
1.3.4.3.2. Mecanismo de resistência .....	30
1.3.4.4. Etambutol .....	31
1.3.4.4.1. Mecanismo de ação .....	31
1.3.4.4.2. Mecanismo de resistência .....	31
1.3.4.5. Pirazinamida.....	31
1.3.4.5.1. Mecanismo de ação .....	31
1.3.4.5.2. Mecanismo de resistência .....	32
1.4. Efluxo e a resistência aos antimicrobianos .....	33
2. OBJETIVOS .....	39
2.1. Objetivo geral .....	39
2.2. Objetivos específicos .....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	40
3.1. Tipo de estudo.....	40
3.2. Local de desenvolvimento do estudo.....	40
3.3. Seleção das amostras .....	40
3.4. Critérios de inclusão .....	40
3.5. Numero amostral.....	41
3.6. Cultura de <i>M. tuberculosis</i> .....	41
3.7. Determinação Concentração Mínima Inibitória com inibidores de efluxo.....	41
3.8. Extração de DNA .....	43
3.9. Amplificação dos genes de interesse .....	44

3.10. <i>Primers</i> utilizados .....	44
3.11. Condições da Reação em Cadeia da Polimerase .....	46
3.12. Análise dos fragmentos amplificados .....	46
3.13. Purificação dos fragmentos amplificados .....	46
3.14. Sequenciamento de DNA.....	47
3.15. Precipitação dos produtos para o sequenciamento .....	47
3.16. Análise das seqüências obtidas .....	47
3.17. Análise estatística .....	48
3.18. Genotipagem dos isolados .....	48
3.18.1. Spoligotyping .....	49
3.18.1.1. <i>Primers</i> .....	49
3.18.1.2. Reação de amplificação .....	49
3.18.1.3. Hibridização dos produtos da PCR e Detecção .....	49
3.18.2. DRE-PCR .....	50
3.18.2.1. <i>Primers</i> .....	50
3.18.2.2. Reação de amplificação .....	50
3.18.2.3. Detecção dos fragmentos amplificados por PCR.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
4.1. Perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> .....	52
4.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória .....	52
4.3. Padronização das condições de amplificação por PCR para os genes <i>rpsL</i> e <i>rrs</i> .....	57
4.4. Análises das seqüências .....	58
4.5. Frequência de mutações .....	61
4.6. Genotipagem .....	63
4.7. Comparação entre concentração Mínima Inibitória e mutações .....	65
4.7.1. CMI e a presença ou ausência de mutações .....	65
4.7.2. Diminuição do efluxo e as mutações .....	69
4.7.3. Análise estatística.....	71
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
7. ANEXOS .....	83



## LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ABC	<i>ATP Binding Cassete</i>
ANOVA	Análise da Variância
ATP	Adenosina Tri-fosfato
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
BCG	Bacilo de Calmette Guérin
BLAST	<i>Basic Local Aligment Search Tool</i>
°C	Graus Celcius
CCCP	carbonil cianide 3-clorofenilhidrazona
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxinucleosídeos trifosfatos
DOTS	<i>Direct Observed Therapy Strategy</i>
DRE-PCR	<i>Double-Repetitive-Element PCR</i>
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EMB	Etambutol
ETH	Etionamida
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
FQ	Fluoroquinolonas
FURG	Fundação Universidade Federal do Rio Grande
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
INH	Isoniazida
LACEN- RS	Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul
KCl	Cloreto de potássio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MDR	Multidroga Resistente
M	Molar
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compounds Extrusion</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MP	Método das Proporções
min	Minuto
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
µg	Micrograma
µl	Microlitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nt	Nucleotídeo
OADC	Ácido oléico, albumina, dextrose e catalase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido p-aminosalicílico
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PCT	Programa de Controle da Tuberculose
PEG	Polietilenoglicol
pmol	Picomol
POA	Ácido Pirazinóico
PZA	Pirazinamida
PZAse	Pirazinamidase
<i>ram</i>	<i>ribossomal ambiguity</i>
REMA	<i>Resazurin Microtiter Assay</i>
RMP	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
mRNA	RNA mensageiro
tRNA	RNA transportador
rpm	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
RND	<i>Resistance-Nodulation-Cell Division</i>
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
seg	Segundos
SM	Estreptomicina
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberculose
TE	Tris + EDTA
TEB	Tris-Borato EDTA
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultravioleta
ver	Verapamil
WHO	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil desde 1979.....	22
<b>Tabela 2</b> - Mutações já descritas nos genes <i>rrs</i> e <i>rpsL</i> .....	28
<b>Tabela 3</b> - Mecanismo de ação, genes envolvidos na resistência, CMI e alvos das drogas de primeira linha .....	33
<b>Tabela 4</b> - Evidência indireta da ação do sistema de efluxo ou acumulação de drogas antituberculose em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	37
<b>Tabela 5</b> - Perfil de susceptibilidade dos isolados segundo o método das proporções ..	52
<b>Tabela 6</b> - Resultados da CMI somente na presença de meio 7H9 .....	53
<b>Tabela 7</b> - Resultados do método das proporções, CMI e sequenciamento dos isolados discordantes entre o método das proporções e a CMI.....	54
<b>Tabela 8</b> - Isolados que diminuíram a CMI na presença de inibidor.....	55
<b>Tabela 9</b> - As mutações encontradas nos genes <i>rpsL</i> e <i>rrs</i> e número de isolados que possuem essas mutações .....	58
<b>Tabela 10</b> - Mutações encontradas em isolados que possuíam várias mutações.....	60
<b>Tabela 11</b> - Frequência das mutações encontradas no estudo .....	61
<b>Tabela 12</b> - Frequência de mutação encontrada quando se analisa o gene.....	63
<b>Tabela 13</b> - Grupos formados pelas técnicas de genotipagem .....	64
<b>Tabela 14</b> - CMI dos isolados com muitas mutações .....	66
<b>Tabela 15</b> - Isolados sem mutação nos genes <i>rpsL</i> e <i>rrs</i> porém resistentes a estreptomicina pela CMI .....	69
<b>Tabela 16</b> - Comparação entre a presença ou ausência de mutações e o resultado da CMI.....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Incidência estimada de tuberculose no mundo em 2000 .....	19
<b>Figura 2</b> - Fórmula da estreptomicina .....	25
<b>Figura 3</b> – Esquema da microplaca para determinação da CMI.....	42
<b>Figura 4</b> – Foto da microplaca no dia de leitura.....	43
<b>Figura 5</b> - Localização dos <i>primers</i> utilizados na amplificação de fragmentos dos genes <i>rpsL</i> e <i>rrs</i> de <i>M. tuberculosis</i> .....	45
<b>Figura 6</b> - Gel de agarose 1,5% mostrando o tamanho dos fragmentos que são amplificados na PCR.....	57
<b>Figura 7</b> - Comparação entre isolado com mutação no códon 43 do gene <i>rpsL</i> e outro sem essa mutação .....	59

## RESUMO

### **Caracterização das mutações envolvidas na resistência de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* à estreptomina e sua relação com o sistema de efluxo**

O *Mycobacterium tuberculosis* é intrinsecamente resistente a diversos antimicrobianos. Esta resistência é devida, principalmente, ao envelope hidrofóbico da célula bacteriana que atua como uma barreira efetiva para diversos compostos. Outros determinantes da sua resistência intrínseca incluem enzimas hidrolíticas e bombas de efluxo de drogas. A resistência adquirida em isolados clínicos de *M. tuberculosis* é principalmente devida a mutações em genes que codificam alvos para os fármacos ou em seus ativadores. Apesar disso, um número entre 5–30% das cepas resistentes não têm caracterizado o seu mecanismo de resistência, considerando-se o sistema de efluxo como uma das possibilidades para esta resistência. O efluxo é o resultado da atividade de proteínas transportadoras envolvidas na extrusão de substâncias (incluindo todas as classes de relevantes antimicrobianos clínicos) de dentro da célula para o meio externo. O principal objetivo deste trabalho foi comparar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) em condições de diferentes tratamentos (presença e ausência de inibição do sistema de efluxo) e os resultados obtidos com o seqüenciamento dos genes *rpsL* e *rrs*. Para isso foram testados 79 isolados de *M. tuberculosis*, destes, 43 (54%) isolados apresentaram mutações; 38 (48%) diminuíram a CMI na presença de inibidores do sistema de efluxo, sendo que isso ocorreu tanto em isolados resistentes ou sensíveis, mutados ou não-mutados. Em três isolados resistentes a estreptomina não foram identificadas alterações nos genes *rpsL* e *rrs* e na presença de inibidores do sistema de efluxo a resistência foi diminuída. A diminuição da CMI nesses isolados resistentes, embora sem mutação, indica uma possível participação do sistema de efluxo. Nas cepas mutadas, o mecanismo de efluxo, estaria aumentando a tolerância do isolado à concentração da droga. Estas últimas possuiriam dois mecanismos de resistência atuantes (mutação nos genes alvo do fármaco e superexpressão das proteínas de membrana responsáveis pelo efluxo de drogas).

## ABSTRACT

### **Characterization of mutations involved in resistance to streptomycin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and its relation with the efflux system**

*Mycobacterium tuberculosis* is naturally resistant to many antimicrobials. This resistance is due mainly to the hydrophobic cell envelope acting as an effective permeability barrier for many compounds. Other determinants ones of its intrinsic resistance include hydrolytic enzymes and efflux pumps of drugs. The acquired resistance in clinical isolates of *M. tuberculosis* is mainly due to mutations in genes that encode targets for drugs substances or in their activators. Even so, in 5-30% of the resistant strains the resistance mechanism is not known and the efflux system has been considered as one of the possibilities for this resistance. Efflux is the result of the activity of transport proteins involved in extrusion of substances (including all classes of clinically relevant antimicrobials) from the interior of the cells into the external environment. The main goal of this study is to compare the Minimal Inibitory Concentration (MIC) in different conditions (with or without efflux system inhibitors) and the sequencing data of the *rpsL* and *rrs* genes. For that we have analyzed 79 *M. tuberculosis* isolates, and from these, 43 (54%) presented mutations; 38 (48%) decreased the MIC in presence of efflux system inhibitors. This decrease in MIC occurred in resistant or sensitive isolates, with or without mutations. Three resistant isolates did not present any mutations in *rpsL* and *rrs* genes and in presence of efflux system inhibitors the resistance decreased. The decrease of MIC in these resistant isolates, although without mutation, indicates participation of the efflux system. In the mutated isolates the efflux system could increase the tolerance to drug concentration. In these isolates two resistance mechanisms must be acting (mutation on the drug target genes and over-expression of membrane proteins responsible for the drug efflux).

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Apresentação

A quimioterapia moderna tem exercido um papel fundamental no controle da tuberculose, muito pelo fato da vacina disponível (BCG) apresentar baixa eficácia para evitar a enfermidade. Assim, o correto tratamento assume o duplo papel de além de curar o enfermo, evitar a transmissão do bacilo.

Apesar de o tratamento existente ter sucesso na maioria dos casos, essa doença ainda ocorre em todo o mundo. Atualmente, casos de isolados resistentes a uma das drogas utilizadas no tratamento têm sido reportados em todos os países, e a taxa de tuberculose multidroga resistente é alta em alguns deles.

Para melhor combater a tuberculose é necessário entender melhor o mecanismo de funcionamento e resistência das drogas utilizadas no tratamento, bem como, desenvolver novas drogas mais eficientes.

Somente um número limitado de drogas é ativa frente ao agente etiológico da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis*, uma vez que, ele é naturalmente resistente a muitos antibióticos, devido, principalmente, ao envelope altamente hidrofóbico, que atua como uma barreira para muitos compostos. Muitos determinantes do potencial de resistência são codificados pelo genoma, como por exemplo, as bombas de efluxo de drogas.

A resistência às drogas adquirida pelo *M. tuberculosis* se desenvolve, principalmente, por mutações em genes alvo dos fármacos ou em genes que codificam ativadores dos pró-fármacos. No caso da estreptomicina, estudada neste trabalho, onde 70% dos isolados resistentes possuem alterações nos genes *rpsL* e *rrs*, mas 1/3 dos isolados resistentes não apresentam mutações nesses genes. Esta droga foi a primeira a ser utilizada no tratamento e, hoje em dia, é utilizada em casos de resistência ou intolerância aos fármacos empregados no esquema de tratamento número um.

Acredita-se que para a estreptomicina, assim como para outros fármacos, esse percentual de isolados que são resistentes, mas que não possuem mutações nos genes descritos como de resistência, possam ter um outro mecanismo que gere essa resistência. Um desses mecanismos apontados em diferentes estudos e descoberto como causador de

resistência em vários gêneros bacterianos é o efluxo de drogas. Esse mecanismo é responsável pela extrusão de substâncias tóxicas (incluindo antibióticos) do meio intracelular para o extracelular e pode conferir à bactéria um mecanismo intrínseco que favorece a sobrevivência em um ambiente hostil, onde, bactérias que superexpressem esse sistema podem ser selecionadas sem a aquisição de novo material genético.

Neste trabalho buscou-se estudar isolados clínicos de *M. tuberculosis*, caracterizando o seu perfil de susceptibilidade a estreptomicina frente ao método da Concentração Mínima Inibitória utilizando resazurina como indicador de viabilidade celular e inibidores clássicos do sistema de efluxo para tentar evidenciá-lo. Ainda dentro dos objetivos está a realização do seqüenciamento dos genes relacionados com a resistência à estreptomicina (*rpsL* e *rrs*) e a comparação dos resultados obtidos entre eles.

Na seção de revisão bibliográfica abordam-se, de forma resumida, as referências sobre a história da doença, sua epidemiologia, transmissão, tratamento, características gerais do bacilo, formas de resistência, o mecanismo de ação e resistência dos fármacos de primeira linha, principalmente a estreptomicina, assim como uma visão geral sobre o mecanismo de efluxo. Na seção de materiais e métodos foram detalhadas as condições de como o trabalho foi desenvolvido. Os resultados obtidos através dos experimentos realizados neste trabalho foram discutidos, tendo como base a interpretação da literatura atual disponível.

## **1.2. Tuberculose e *Mycobacterium tuberculosis***

### **1.2.1. Um breve histórico**

Há cerca de 5000 a.C. o homem domesticou o gado e estabeleceu as modificações ambientais que propiciaram as condições adequadas para o aparecimento de algumas enfermidades infecciosas. A tuberculose (TB) provavelmente tenha surgido nessa época. Acredita-se que o ancestral do bacilo causador da doença tenha passado dos bovinos ou caprinos para o homem (Clark, 1962; Daniel *et al*, 1994; Taylor *et al*, 1999; Gómez i Prat & Souza, 2003).

A existência de tuberculose na era pré-colombiana foi sugerida por deformidades compatíveis com tuberculose óssea encontradas em esqueletos de pessoas que viveram na região de Ohio em 1275, tendo sido confirmada recentemente mediante análise do DNA



obtido de lesões pulmonares típicas da tuberculose encontradas em múmias do Peru, que datam do ano 1000 (Daniel, 2000; Salo, 1994; Gómez i Prat & Souza, 2003).

O aumento da incidência da tuberculose começou lentamente, junto com o crescimento da densidade populacional. A infecção se expandiu por todo o mundo, como resultado das viagens dos exploradores europeus, que, infectados, disseminavam o bacilo por vários lugares (Daniel, 2000).

A demonstração formal de que a tuberculose era uma doença contagiosa foi feita em 1865 por Jean Antoine Villemin (Beck, 2000) e em 1882 o microbiologista alemão Robert Koch publicou um artigo que fazia referência ao descobrimento de Villemin (Daniel, 2006). Neste artigo, Robert Koch descreveu o agente etiológico da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch, e demonstrou que esse microrganismo era a causa da doença (Kaufmann, 2003). Essa descoberta deu a Robert Koch o Prêmio Nobel da medicina em 1905. Os conhecimentos sobre o *Bacillus anthracis* e o *Mycobacterium tuberculosis* serviram para a elaboração do notório Postulado de Koch (Bloom & Murray, 1992).

Ainda em 1882, Paul Ehrlich descobriu que o bacilo da tuberculose tinha a propriedade de resistir à descoloração por uma solução de álcool-ácido. Ehrlich propôs então um método de coloração que mais tarde foi melhorado por Franz Ziehl e modificado novamente por Friedrich Neelsen, resultando no método de coloração conhecido por Ziehl-Neelsen (Beck, 2000). Essa técnica é um método laboratorial que ainda é usado para o diagnóstico da tuberculose (Silva *et al*, 2003).

No início do século XX, a busca de uma terapia eficiente ou de uma vacina protetora fazia parte do conjunto de esforços que a comunidade científica realizava para controlar a tuberculose. Como resultado disso, em 1906 Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram uma vacina de uma cepa de *M. bovis* com virulência atenuada (Daniel, 2006).

No século que se segue com a descoberta de Koch testemunhou-se um firme declínio da tuberculose devido ao exame de raio-X em massa, o desenvolvimento da quimioterapia, programa de imunização com BCG, melhorias nas condições socioeconômicas e a pasteurização do leite. Estas novas tecnologias determinaram uma sensível redução do número de casos de tuberculose nos países economicamente

desenvolvidos. Entretanto, no final do século XX, houve um aumento no número de casos da doença, mesmo nas regiões economicamente desenvolvidas, culminando com a tuberculose sendo considerada uma emergência global em 1993, pela Organização Mundial da Saúde (Taylor *et al*, 2003).

As razões identificadas inicialmente para este aumento foram: epidemia do HIV, o crescimento da pobreza nas grandes áreas metropolitanas e o aumento da imigração (Raviglione, 2003). Cabe salientar que a tuberculose jamais deixou de ser um problema de saúde pública nas regiões em desenvolvimento, onde as condições socioeconômicas são muitas vezes piores do que aquelas observadas na Europa do século XIX (Silva, 2003).

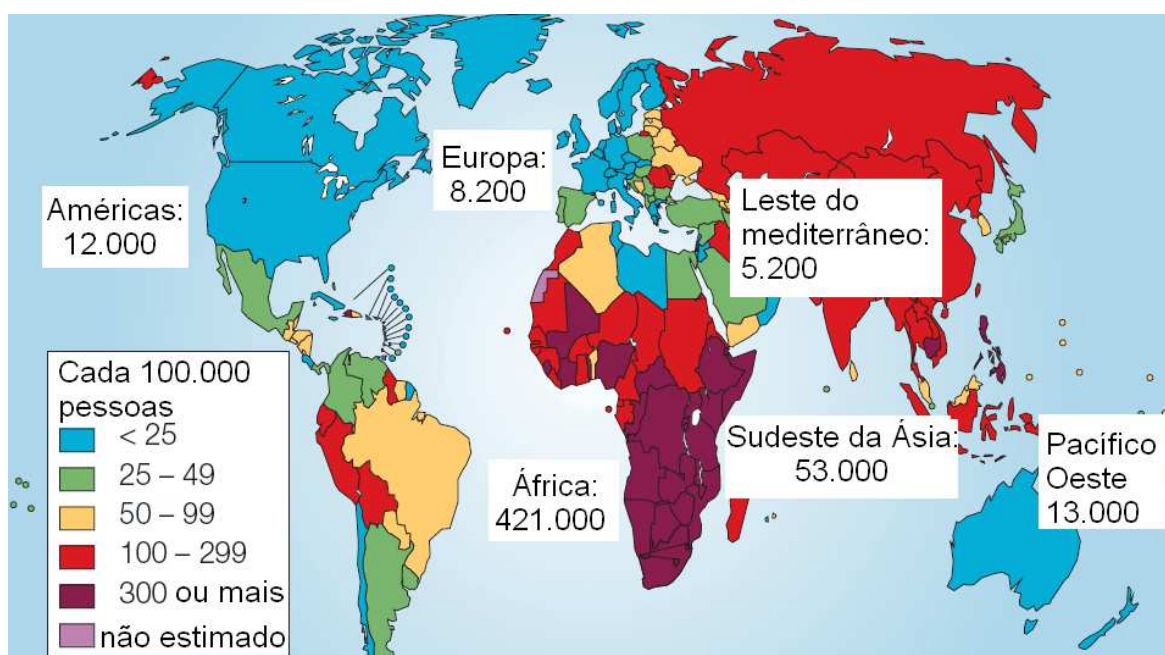
Embora a tuberculose possa ser considerada uma doença reemergente em alguns países europeus e nos Estados Unidos, no Brasil ela não é um problema de saúde pública emergente e tampouco reemergente. Ela é um problema presente desde muito tempo. E para melhor controlar a TB no Brasil, em 1927 foi aplicada, pela primeira vez, a vacina BCG oral em recém-nascidos. A partir da década de 40 começa a utilização de tuberculostáticos: estreptomicina (SM), a partir de 1948; ácido paramino-salicílico (PAS), a partir de 1949 e isoniazida (INH), a partir de 1952. A partir da década de 60 começa efetivamente a utilização de esquemas terapêuticos padronizados (Ruffino-Netto, 2002).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) solicitou a todos os países para focarem suas taxas de cura em 85% e para expandirem seus serviços para detectar mais casos de TB. Em 1994 foram lançados cinco elementos essenciais para o controle da TB: comprometimento governamental; diagnósticos através de baciloscopia; padronização e implantação da quimioterapia de curto tempo; estabelecimento da estratégia do tratamento diretamente observado (*Direct observed treatment strategy*, DOTS); um sistema eficiente de abastecimento de drogas; um sistema que reportasse os casos e permitisse avaliação dos resultados do tratamento (Raviglione, 2003).

O primeiro monitoramento global com respeito ao tratamento foi feito pela OMS em 1997. Este estudo mostrou que, em 1995, somente 11% de todos os casos estimados foram tratados através do programa DOTS e a taxa de cura estava em 78% (Raviglione, 1997).

### 1.2.2.Epidemiologia

Atualmente, a tuberculose está presente em todo o mundo (Figura 1), sendo que o maior número de casos ocorre nas regiões do sudeste da Ásia e do sub-Saara Africano, onde chega a alcançar cerca de 700 casos por 100.000 habitantes. A maior taxa de mortalidade ocorre na região da África, devido a maior incidência de pessoas com AIDS. Casos de isolados resistentes a uma das drogas utilizadas no tratamento têm sido reportados em todos os países, e a taxa de tuberculose multidroga resistente é alta em alguns deles, especialmente aqueles pertencentes à antiga União Soviética e China (Onyebujoh & Rook, 2004).



**Figura 1: Incidência estimada de tuberculose no mundo em 2000. A incidência estimada de casos de TB/HIV é mostrada em cada região. Adaptado de Onyebujoh & Rook (2004).**

Sabe-se que cerca de 95% dos casos de TB ocorrem no mundo em desenvolvimento, onde ocorrem 98% dos óbitos. Em 22 países encontram-se 80% dos casos estimados para o mundo, entre os quais, o Brasil ocupava o 10º lugar em 1997 (Ruffino-Neto, 2002). Sete anos depois, em 2004, o Brasil passou a ocupar o 16º lugar nessa classificação (BRASIL, 2006).

O programa DOTS foi implementado no Brasil e tem mostrado que o controle da tuberculose pode ser eficiente se integrado com o sistema de saúde primário. Esse programa, em 1999, acompanhava 7% da população e em 2003 passou a acompanhar 34%. Cerca de 75% dos casos acompanhados no período de 2000-2003 foram tratados com sucesso. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o Brasil, em 2003, teve uma incidência de todos os casos de 60/100.000 e de novos casos de 27/100.000, a prevalência é de 90/100.000. O coeficiente de mortalidade é de 8/100.000 e a porcentagem de casos multidroga resistente é de 0,9%. A taxa de notificação de novos casos chega a 25% para mulheres entre 25-34 anos e a quase 60% para homens entre 45-54 anos. É interessante lembrar que as taxas de caso/notificação têm tido falhas por muitos anos no Brasil. Esses dados se mantêm em 2004 (WHO, 2004a; WHO 2004b, BRASIL, 2006).

### 1.2.3. Características gerais

O *Mycobacterium tuberculosis*, pertencente à família Mycobacteriaceae, é um dos componentes do complexo *M. tuberculosis*, junto com outros cinco membros: *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti*, *M. africanum* e *M. canetti*. Todos os membros desse complexo são bactérias de multiplicação lenta com um tempo de geração perto de 24 horas e levam de 3 a 4 semanas para formar colônias em meios de cultura sólidos (Cole, 2002). O *M. tuberculosis* possui um genoma rico em C+G (Cole et al., 1998), é um patógeno intracelular e sua parede tem baixa permeabilidade, já que possui uma estrutura e composição rica em lipídeos (De Rossi et al, 2006).

O *M. tuberculosis* tem a capacidade de entrar em períodos de latência com uma atividade metabólica limitada, dificultando a ação dos antimicrobianos, contribuindo para a natureza crônica da doença e impondo um regime de tratamento longo. Além disso, existem, numa mesma infecção, populações de bacilos de comportamentos diferentes em função de sua localização e atividade. Assim, os bacilos presentes nas cavidades pulmonares multiplicam-se de forma ativa em um ambiente aeróbio, os bacilos do interior dos macrófagos, o fazem em um ambiente microaerofílico, que induz a latência, e os bacilos que se encontram no interior da lesão caseosa têm, ocasionalmente, um ciclo replicativo. Por outro lado, se o *M. tuberculosis* pode multiplicar-se nos tecidos, onde a penetração dos antibióticos é fácil, no material caseoso a penetração dos antibióticos é

mais difícil. Os fármacos antituberculosos apresentam um perfil de atividade diferenciado frente a cada uma dessas localizações e populações, e é necessário assegurar-se de que o tratamento prescrito seja ativo contra todas elas (Coll, 2003).

O estado de dormência, no qual o bacilo permanece quiescente sem infectar os tecidos, pode ser resultado da ação de mediadores celulares da resposta imune que podem conter, mas não erradicar a infecção. Quando a imunidade diminui, as bactérias dormentes reativam-se, causando a deflagração da doença, mesmo décadas após a infecção inicial (Cole, 1998).

#### **1.2.4. Transmissão**

A tuberculose é transmitida por aerossóis de pacientes com doença pulmonar ativa, quando um adequado número de bactérias nas vias aéreas são externalizadas através da respiração ou tosse, sendo que a inalação de poucos organismos já pode causar a infecção. Entretanto, na maioria dos indivíduos a infecção mantém-se latente, podendo, inclusive, durar por toda a vida. Justamente por isso, um terço da população mundial encontra-se infectada com *M. tuberculosis* sem apresentar sintomas. No entanto, a chance de uma pessoa previamente infectada com HIV desenvolver tuberculose é de 10% em cada ano de vida, enquanto que, a de uma pessoa não infectada com este vírus é de 5-10% em toda a vida (Onyebujoh & Rook, 2004).

A doença cavitária, onde existe uma lesão necrótica granulomatosa que causa erosão dos brônquios, expelindo milhões de bactérias nas vias aéreas, é fortemente associada com aumento da transmissão (Flynn & Chan, 2005).

#### **1.2.5. Controle e Tratamento**

O controle das enfermidades infecciosas em geral está relacionado à melhoria das condições sócio-econômicas da população, melhoria dos sistemas de saúde, programas de vacinação e implantação de um tratamento eficaz. No caso da tuberculose, onde a vacina disponível (BCG) apresenta baixa eficácia para evitar a enfermidade, o correto tratamento assume o duplo papel de curar o enfermo e evitar a transmissão do bacilo, na medida em que ao curar o paciente, rompe-se a cadeia de transmissão (Petrini & Hoffner, 1999).

O tratamento da TB é realizado com cinco drogas de primeira linha: Isoniazida (INH), Rifampicina (RMP), Pirazinamida (PZA), Etambutol (EMB) e Estreptomicina (SM) (Zhang, 2005).

No Brasil, o tratamento atual tem duração de seis meses e consiste de duas fases. A primeira é a fase intensiva que dura dois meses, com três drogas (INH, RMP e PZA) ministradas diariamente. Durante a fase de continuação (quatro meses), INH, RMP são administradas diariamente. A duração do tratamento aumenta para nove meses quando a PZA não é empregada durante a fase intensiva. O EMB e SM são utilizados para tratamento de pacientes com intolerância para um dos outros fármacos ou infectados por cepas resistentes (Cole & Telenti, 1995). Os esquemas de tratamento adotados no Brasil desde 1979 estão resumidos na tabela 1.

**Tabela 1. Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil desde 1979.**

<i>Esquemas de Tratamento da TB</i>		
Sem tratamento anterior, casos novos de todas as formas exceto meningoencefalite	<b>Esquema 1</b>	2 meses: RMP / INH / PZA 4 meses: RMP / INH
Com tratamento anterior, casos de retratamento em recidivas ou retorno após abandono do esquema 1	<b>Esquema 1</b> <b>Reforçado</b>	2 meses: RMP / INH / PZA 4 meses: RMP / INH / EMB
<b>Meningoencefalite tuberculosa</b>	Esquema 2	2 meses: RMP / INH / PZA
Casos de meningite tuberculosa		7 meses: RMP / INH
Falência do esquema 1 ou esquema 1 reforçado e casos de falência do 1, 1R ou 2	Esquema 3	3 meses: SM / ETH / PZA 9 meses: ETH / EMB

**ETH, etionamida; EMB, etambutol; SM, estreptomicina; PZA, pirazinamida; RMP, rifampicina. Adaptado de Brasil, 2002**

Devido às características do bacilo, somente um número limitado de drogas é ativa contra *M. tuberculosis*. Dessa forma, a resistência às drogas é um problema maior do que para outros gêneros bacterianos (Aínsa *et al*, 2001).

### **1.3. Resistência**

#### **1.3.1. Fatores associados com o desenvolvimento da resistência**

Os fatores que afetam negativamente o Programa de Controle da Tuberculose (PCT) incluem a deficiência na implementação e manutenção de um esquema terapêutico padronizado, a escassez no fornecimento dos fármacos em áreas com recursos inadequados. A instabilidade política e o uso de fármacos de baixa qualidade são preocupações adicionais. O desenvolvimento da resistência pode ser, também, devido a uma escolha inapropriada do esquema terapêutico, algumas vezes por desconhecimento de um tratamento anterior, ausência de esquemas terapêuticos padronizados e erros, como a prescrição de um único fármaco (WHO, 1997; Espinal, 2001).

Outro fator muito importante é a não adesão do paciente ao tratamento prescrito, o que, frequentemente, é uma fonte de isolados resistentes às drogas. O tratamento tem uma duração de 6 meses, considerada longa se comparada com o tratamento de outras infecções bacterianas como *Helicobacter pylori* e infecções por pneumococos, cujo tratamento não dura mais de uma ou duas semanas (Zhang, 2005).

O desenvolvimento de resistência pelos microrganismos é uma resposta evolucionária à pressão seletiva dos antibióticos. De modo geral, os microrganismos vêm desenvolvendo inúmeros mecanismos de resistência que impossibilitam a ação dos medicamentos (McKeegan *et al*, 2003).

#### **1.3.2. Resistência aos antimicrobianos**

As bactérias usam um grande número de estratégias relacionadas com a resistência às drogas. Essas podem ser resumidas em cinco categorias (Nikaido, 1998; Zhang & Telenti, 2000):

- 1) Degradação ou inativação de drogas, quando o microrganismo produz enzimas que destroem a droga ativa, *e.g.*: a inativação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como a penicilina, é mediada por penicilinasas que catalisam a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico;
- 2) Modificação do alvo da droga ou nos ativadores dos pró-fármacos ocorre quando o microrganismo altera a estrutura alvo da droga ou que ativaria este fármaco, *e.g.*: *rpoB* e resistência à rifampicina;
- 3) Modificação de vias metabólicas envolvidas na ativação da droga, quando o microrganismo desenvolve uma via metabólica alterada que transpassa a outra reação necessária para a ativação da droga, *e.g.*: *katG* e resistência a INH;
- 4) Envoltório celular como uma barreira à entrada de drogas, ocorre quando a célula *per se* é uma barreira à entrada de drogas ou quando o microrganismo altera sua permeabilidade, diminuindo a permeabilidade às drogas, aparentemente devido a uma mudança na membrana externa, *e.g.*: parede celular da *Pseudomonas*;
- 5) Mecanismos de efluxo, o microrganismo desenvolve resistência, pois, proteínas de membrana causam a extrusão de drogas, *e.g.*: *TetC* em *Escherichia coli*.

### **1.3.3. Resistência do *M. tuberculosis* aos antimicrobianos**

#### **1.3.3.1. Resistência Inata**

O *M. tuberculosis* é naturalmente resistente a muitos antibióticos, devido, principalmente, ao envelope altamente hidrofóbico, que atua como uma barreira para muitos compostos. Muitos determinantes do potencial de resistência são também codificados pelo genoma. Isso inclui enzimas hidrolíticas ou modificadoras de drogas como as  $\beta$ -lactamases e acetil-aminoglicosídeo-transferases e bombas de efluxo de drogas (Cole, 1998).

#### **1.3.3.2. Resistência adquirida**

A resistência adquirida às drogas pelo *M. tuberculosis* desenvolve-se, principalmente, por mutações em genes alvo dos fármacos ou em genes que codificam ativadores dos pró-fármacos. As mutações desenvolvem-se espontaneamente devido à taxa



natural de mutação do DNA genômico, sendo selecionadas por sub-dosagem. A resistência à isoniazida e estreptomicina desenvolve-se a uma taxa de  $10^{-7}$ , enquanto que a resistência a rifampicina desenvolve-se, frequentemente, a uma taxa de  $10^{-9}$ . Isso implica que cada paciente com tuberculose pode abrigar bacilos que são separadamente resistentes a drogas antituberculosas. Por essa razão, tuberculose deve ser tratada com terapia multidroga (Gillespie, 2002). Nenhum plasmídeo ou transposon transmissível conferindo resistência foi identificado neste microrganismo (Riska *et al*, 2000).

Não se conhece uma alteração genética capaz de dar origem ao fenótipo de multiresistência. O fenótipo multidroga resistente (MDR) observado em isolados clínicos deve-se à aquisição seqüencial de mutações em diferentes genes. A detecção precoce da resistência aos fármacos antituberculosos é essencial para o correto controle da tuberculose resistente (Coll, 2003).

### 1.3.4. Mecanismo de ação e resistência das drogas de primeira linha

#### 1.3.4.1. Estreptomicina

##### 1.3.4.1.1. Mecanismo de ação

A SM, um antibiótico aminoglicosídeo de largo espectro, foi o primeiro antibiótico disponível para o controle da tuberculose e seu uso em monoterapia logo levou ao surgimento de mutantes resistentes (Cole & Telenti, 1995). A fórmula da estreptomicina pode ser visualizada na figura 2.

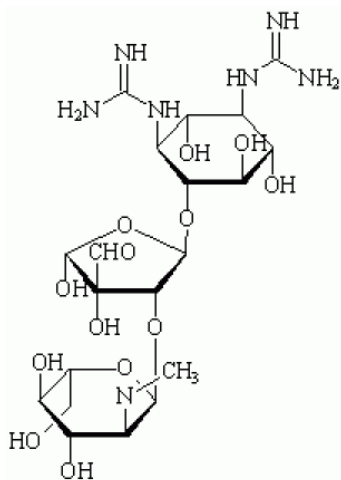


Figura 2: Fórmula da estreptomicina. Adaptado de Zhang, 2005.

Com o advento de novas e melhores drogas (RMP e INH) houve o decréscimo do uso da estreptomicina, mas um aumento no número de cepas resistentes, nos dias atuais, fez com que a SM retomasse seu papel importante na terapia (Ruiz *et al*, 2002).

O local de sua ação é na subunidade menor do ribossomo (30S), especificamente na proteína S12 e no RNA ribossômico (rRNA) de 16S. Ela bloqueia a tradução do RNA mensageiro (mRNA) em seu início, tanto na incorporação de novos aminoácidos na cadeia polipeptídica como na facilitação de uma revisão ineficiente pelo ribossomo (Sander & Böttger, 1999; Zhang & Telenti, 2000).

Como a SM estabiliza a fase *ram* (*ribosomal ambiguity*, esquemas de pareamento alternativos durante a síntese protéica ou *error-prone*), seria de se esperar que ela aumentasse a ligação inicial de tRNA não-cognatos (incorretos) e afetasse também a revisão pelo ribossomo. Mutações em S12 levam ao fenótipo de hiperacurácia, um fenótipo fraco manifesta resistência à estreptomicina e um fenótipo forte (múltiplas mutações) leva a dependência à estreptomicina. No caso de dependência a estreptomicina a fase *ram* estaria tão desestabilizada que a estreptomicina poderia ajudar a estabilizá-la e, assim, a restaurar o processo de tradução (Carter *et al*, 2000).

#### **1.3.4.1.2. Mecanismo de resistência**

O mais freqüente mecanismo de resistência à SM é a aquisição de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos via plasmídeos ou transposons (Mingeot-Leclercq *et al*, 1999). Mas, em *M. tuberculosis*, não foi identificada a difusão horizontal de material genético nem a ação de enzimas modificadoras. Em *M. tuberculosis* o mecanismo conhecido de resistência aos aminoglicosídeos consiste na alteração do alvo sobre o qual atuam como consequência de mutações cromossômicas (Zhang & Telenti, 2000).

O principal sítio de mutação é o gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal S12, em que ocorrem mutações resultando na substituição de um único aminoácido. Um segundo mecanismo da resistência ocorre por alterações no gene que codifica o rRNA 16S (*rrs*) (Finken *et al*, 1993).

É interessante lembrar que a maioria das eubactérias tem várias cópias do operon de genes de rRNA, enquanto que em *M. tuberculosis* e outras micobactérias de multiplicação

lenta existe somente um. Logo, em *M. tuberculosis* uma mutação única pontual já pode provocar resistência (Coll, 2003).

O mapeamento dessas mutações revelou que essas ocorrem em regiões conservadas do gene. Para o gene *rpsL* elas ocorrem preferencialmente nos codons 43 (AAG→AGG; K→R) e 88 (AAG→CAG; K→Q; AAG→AGG; K→R) e as mutações no códon 93 (GTG→ATG; V→M) e 9 (CGC→CAC; →R→H) ocorrem num número menor de cepas (Brzostek *et al*, 2004; Méier *et al*, 1996; Sreevatsan *et al*, 1996; Fukuda *et al*, 1999).

Para o gene *rrs* as mutações já descritas ocorrem nas posições: 461 C→T, 627 C→G, 523 A→C, 522 C→T, 526 C→T, 491 C→T, 512 C→T, 513 A→T, 798 C→T, 877 G→A, 904 A→G, 906A→C (Brzostek *et al*, 2004; Méier *et al*, 1996; Sreevatsan *et al*, 1996). As mutações que já foram descritas tanto para o gene *rrs* quanto para o gene *rpsL* podem ser visualizadas na tabela 2.

**Tabela 2 - Mutações já descritas nos genes *rpsL* e *rrs*.**

Mutações em <i>rpsL</i>	Mutações em <i>rrs</i>	Referência
88 (AAG→CAG; K→Q)	491 C→T 512 C→T 904 A→G	Méier <i>et al</i> (1994)
43 (AAG→AGG; K→R)	522 C→T	Méier <i>et al</i> (1996)
88 (AAG→CAG; K→Q)	523 A→C 526 C→T	
43 (AAG→AGG; K→R)	491 C→T; 877 G→A	Sreevatsan <i>et al</i> (1996)
88 (AAG→CAG; K→Q)	512 C→T; 798 C→T	
93 (GTG→ATG; V →M)	513 A→T; 904 A→G	
9 (CGC→CAC;R→H)	906 A→C	
43 (AAG→AGG; K→R)		Fukuda <i>et al</i> (1999)
88 (AAG→CAG; K→Q)		
88 (AAG→AGG; K→R)		
121 (AAA→AAG; K→K)		Siddiqi <i>et al</i> (2002)
	491 C→T	Victor <i>et al</i> (2001)
9 ( CGC→CAC; R→H)	461 C→T	Brzostek <i>et al</i> (2004)
40 ( T→I)	627 C→G	
43 (AAG→AGG; K→R)	906 A→T	
88 (AAG→CAG; K→Q)		
88 ( AAG→AGG; K→R)		
93 (GTG→ATG; V→M)		
98 (ATC→ATT; I→I)		
43 (AAG→AGG; K→R)	189 G→A 426 G→T 491 C→T 1238 T→C	Ramaswamy <i>et al</i> (2004)
43 (AAG→AGG; K→R)	513 A→T 516 C→T	Tracevska <i>et al</i> (2004)

Quando é determinada a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de um isolado, esta pode ser relacionada com a alteração genética presente no mesmo. Mutações que afetam o gene *rpsL* produzem um alto nível de resistência, CMIs > 500µg/ml; já as mutações no gene *rrs* produzem uma resistência de nível intermediário, com CMIs entre 50-500 µg/ml (Coll, 2003, Méier *et al*, 1996). Em aproximadamente um terço das cepas resistentes existe um nível de resistência baixo e não se detectam alterações nos genes *rrs* e *rpsL*. Nessas cepas supostamente ocorre um mecanismo que altera a permeabilidade ou acumulação como forma de justificar a resistência (Sander & Böttger, 1999; Silva, 2001; Riska, 2000).

### **1.3.4.2. Rifampicina**

#### **1.3.4.2.1. Mecanismo de ação**

É um Ansamycin lipofílico, sendo um agente antimicrobiano de largo espectro que se difunde rapidamente através do envelope hidrofóbico da célula. A RMP interfere na transcrição do ácido ribonucléico (RNA) (Cole, 1995; Zhang & Telenti, 2000).

A inibição da transcrição acontece porque a RMP se fixa na subunidade  $\beta$  da RNA polimerase e além de um efeito bactericida sobre as células de *M. tuberculosis* metabolicamente ativas, a RMP também possui uma ação esterilizante excelente frente às bactérias em estado de latência. Por isso, a RMP fez com que a terapia frente a tuberculose fosse reduzida de 12-18 meses para 9 meses (Zhang, 2005).

#### **1.3.4.2.2. Mecanismo de resistência**

As micobactérias adquirem resistência a RMP por mutações em uma região bem definida de 81 pares de bases (27 códons) da região central do gene que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (*rpoB*). Mais de 95% das cepas resistentes a RMP possuem mutações nessa região. Este fato facilitou o desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção rápida da resistência a RMP (Cole & Telenti, 1995).

Mas em 5-10% das cepas resistentes a RMP não é relatado mutações no gene *rpoB*, e nessas cepas é possível que ocorra uma variação no número e atividade de bombas de efluxo (Viveiros *et al*, 2003).

### **1.3.4.3. Isoniazida**

#### **1.3.4.3.1. Mecanismo de ação**

A INH é ativa somente frente aos bacilos em replicação ativa, ela é uma pró-droga que requer a ativação pela enzima catalase-peroxidase da bactéria para gerar vários radicais reativos, que então atuam em diversos alvos no bacilo. O alvo mais conhecido é a via de síntese do ácido micólico da parede celular, onde pelo menos duas enzimas *InhA* e *KasA* têm sido identificadas como alvo da inibição pela INH ( Zhang, 2005).

A INH tem múltiplos efeitos no bacilo da tuberculose e não é tarefa simples localizar com precisão qual é o alvo mais essencial, cuja inibição levará à morte da célula (Zhang & Telenti, 2000).

#### **1.3.4.3.2. Mecanismo de resistência**

Isolados clínicos freqüentemente perdem a atividade das enzimas catalase-peroxidase e desenvolvem resistência a INH. Mutações no gene *katG* que codifica a enzima catalase-peroxidase reduzem ou eliminam a habilidade de ativar a pró-droga INH. Esse gene está localizado numa região altamente variável do genoma contendo seqüências de DNA repetitivo que podem ser a causa da instabilidade desta região e podem contribuir para a alta freqüência de mutações em *katG* em cepas resistentes a INH (Zhang & Telenti, 2000).

Uma enzima envolvida na síntese do ácido micólico da parede celular que é codificada por *inhA* é provavelmente o principal alvo da INH. Mutações na região codificadora ou promotora do *inhA* estão relacionadas com resistência a INH em baixos níveis. Alterações no gene *kasA*, que codifica uma enzima relacionada com a síntese de lipídeos, também têm sido encontradas em cepas resistentes a INH (Rossetti *et al*, 2002)

Mas 20-30% de todas as mutações nos genes *katG* e *inhA* não são associadas com resistência a isoniazida, indicando que nesses isolados a resistência pode ocorrer por indução de bombas de efluxo (Viveiros, 2003) e/ou outros genes podem estar envolvidos na resistência a INH (Rossetti *et al*, 2002).

#### **1.3.4.4. Etambutol**

##### **1.3.4.4.1. Mecanismo de ação**

O EMB inibe a biosíntese da parede da célula micobacteriana. EMB é ativo somente contra bactérias em multiplicação ativa. O EMB afeta a biossíntese de lipoarabinomanano e arabinogalactano (importantes polissacarídeos da parede celular micobacteriana). Ele atua inibindo a associação das arabinotransferases com a membrana, causando a acumulação de ácidos micólicos e a morte da célula (Aínsa *et al*, 2001).

##### **1.3.4.4.2. Mecanismo de resistência**

A resistência a EMB ocorre, na maioria das cepas, por mutações no operon *embCAB* que codifica arabinosil transferases, que estão relacionadas com a síntese de componentes da parede celular (Coll, 2003).

Mutações em *embB*, identificadas em mais de 65% dos isolados clínicos são associadas com alto nível de resistência. Baixos níveis de resistência, achado em 35% das cepas de *M. tuberculosis* resistentes a EMB, não apresentam mutações no gene *embB* (Zhang & Telenti, 2000).

#### **1.3.4.5. Pirazinamida**

##### **1.3.4.5.1. Mecanismo de ação**

A PZA tem a habilidade de inibir a população de bacilos semidormentes residindo num meio ácido, que não são efetivamente mortos por outra droga antimicrobiana. Por esta droga possuir atividade frente a bacilos semidormentes, a adição deste no esquema de tratamento da tuberculose fez com o tratamento fosse reduzido de 9 para 6 meses (Scorpio *et al*, 1997).

A PZA é uma pró-droga que requer a ativação ou conversão para sua forma ativa, forma ácida, ácido pirazinóico (POA) pela ação da enzima bacteriana pirazinamidase (PZase) de um *M. tuberculosis* suscetível (Zhang, 2005).

A PZA entra no bacilo através de difusão passiva e é convertida pela PZase citoplasmática em POA que, então, sai da célula através de difusão passiva e deficiente

mecanismo de efluxo. Uma vez que POA está fora da célula, se o pH extracelular é ácido uma pequena porção de POA se tornará um conjugado em forma ácida sem carga que atravessa a membrana facilmente. O influxo de POA facilitado é mais forte do que o fraco efluxo, causando a sua acumulação nas células de *M. tuberculosis*. O POA protonado leva prótons para dentro da célula e isso pode causar eventualmente acidificação do citoplasma. Dessa forma, POA atuaria inibindo enzimas vitais para o microrganismo. Em um pH neutro ou alcalino, pouco POA é encontrado no bacilo da tuberculose, porque 99,9% deste ficarão na forma ânion que não entra na célula facilmente. O alvo do POA ainda é obscuro, existindo várias hipóteses de alvos celulares para ele (Zhang & Telenti, 2000).

#### **1.3.4.5.2. Mecanismo de resistência**

Cepas resistentes a PZA possuem usualmente defeito na atividade da enzima PZase, e há uma boa correlação entre resistência a PZA e perda de atividade dessa enzima.

Mutações no gene que codifica a PZase (*pncA*) são, em grande parte, responsáveis pelo mecanismo de resistência a PZA, ocorrendo em 72 a 97% das cepas resistentes. No entanto, existem cepas resistentes a PZA sem alterações no gene *pncA* e nestas cepas a resistência deve-se a outros mecanismos relacionados com a permeabilidade e o efluxo (Coll, 2003).

Um resumo do mecanismo de ação, alvos e genes envolvidos na resistência das drogas de primeira linha pode ser visto na tabela 3.



**Tabela 3: Mecanismo de ação, genes envolvidos na resistência, CMI e alvos das drogas de primeira linha. Adaptado de Zhang (2005).**

<b>Droga (ano de descobrimento)</b>	<b>CMI (µg/ml)</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>alvos</b>	<b>Genes envolvidos na resistência</b>
Estreptomicina (1944)	2-8	Inibição da síntese protéica	Proteína ribossomal S12 e rRNA 16S	<i>rpsL</i> e <i>rrs</i>
Isoniazida (1952)	0,01-0,2	Inibição da síntese de ácidos micólicos da parede celular e outros múltiplos efeitos no DNA, lipídeos, carboidratos e metabolismo de NAD	Múltiplos alvos	<i>katG</i> <i>inhA</i> <i>ndh</i>
Rifampicina (1966)	0,05-0,5	Inibição da síntese de RNA	Subunidade β da RNA polimerase	<i>rpoB</i>
Pirazinamida (1952)	20-100	Rompimento do transporte da membrana e depleção da energia	Metabolismo de energia da membrana	<i>pncA</i>
Etambutol (1961)	1-5	Inibição da síntese de arabinogalactano da parede celular	Arabinosyl transferase	<i>embCAB</i>

#### **1.4. Efluxo e resistência aos antimicrobianos**

Embora o envoltório da célula micobacteriana seja uma barreira efetiva de permeabilidade, ela sozinha não consegue impedir o influxo, e conseqüente acúmulo, de substâncias tóxicas. Além disso, o volume da célula bacteriana é pequeno e uma determinada droga tem sua concentração equilibrada entre o interior da bactéria e o meio extracelular de forma relativamente rápida (Nikaido, 2001).

Nas bactérias, a permeabilidade da membrana e a ação de mecanismos de transporte ativo previnem o acesso de certas drogas aos seus alvos intracelulares. Isso

constitui um mecanismo geral de resistência às drogas capaz de diminuir a sensibilidade a uma variedade de estruturas de drogas e compostos tóxicos. A resistência devido ao efluxo é caracteristicamente dependente de energia, seja aquela gerada pela força motora do próton ou da hidrólise de ATP (Silva, 2001).

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras envolvidas na extrusão de substâncias tóxicas (incluindo todas as classes de antibióticos relevantes) de dentro da célula para o meio externo. Essas proteínas são encontradas em células procarióticas e eucarióticas (Nikaido, 1998; Paulsen, 2003; Webber & Piddock, 2003).

A presença de bombas de efluxo confere à bactéria um mecanismo intrínseco que favorece a sobrevivência em um ambiente hostil (presença de antibióticos) e bactérias que superexpressam bombas de efluxo podem ser selecionadas sem a aquisição de novo material genético (Webber & Piddock, 2003).

Os genes que codificam as bombas de efluxo multidroga resistente são, na sua maioria, constituintes normais dos genomas bacterianos. Alguns desses genes podem ter um alto nível de expressão constitutiva (resistência intrínseca aos antibióticos) e isso ocorre devido à aquisição de mutações em genes regulatórios (Lomovskaya *et al*, 2001).

A análise do genoma de mais de 100 organismos (<http://www.membranetransport.org/>) revelou que as bombas de efluxo são ubíquas na natureza, constituindo uma média de mais de 10% de transportadores de um organismo (Paulsen, 2003; Webber & Piddock, 2003).

As bombas podem ser específicas para um substrato ou podem transportar uma ampla gama de componentes de estrutura diferente (incluindo antibióticos de múltiplas classes). Portanto, essas bombas podem estar associadas com resistência múltipla a drogas (MDR) (Webber & Piddock, 2003; Lomovskaya & Watkins, 2001).

As bombas de efluxo bacterianas pertencem a cinco famílias: duas delas são superfamílias antigas, conhecidas como superfamília *ATP Binding Cassete* (ABC) e *Major Facilitator Superfamily* (MFS). As outras três são famílias menores e evolutivamente mais recentes: *Small Multidrug Resistance* (SMR); *Resistance-Nodulation-Cell Division* (RND) e *Multidrug and Toxic Compounds Extrusion* (MATE) (De Rossi *et al*, 2006).

Os membros das famílias MFS, SMR, RND e MATE são transportadores secundários, energizados pela força motora do fluxo de prótons, em contraste com o ATP

que é utilizado como doador de energia para membros da família ABC de bombas de efluxo multidroga (De Rossi *et al.*, 2002; Nikaido, 1998; Webber & Piddock, 2003).

Fisiologicamente, os compostos transportados por transportadores MFS incluem açúcares simples, oligossacarídeos, drogas de diferentes estruturas químicas, aminoácidos, nucleosídeos, metabólitos do ciclo de Krebs e uma grande variedade de ânions e cátions inorgânicos (De Rossi *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 2000; Saier *et al.*, 1998).

Análises do genoma de *M. tuberculosis*, utilizando ferramentas de bioinformática, identificaram 16 ORFs (*open reading frames*, fases abertas de leitura) que codificam possíveis bombas de efluxo pertencentes à família MFS (De Rossi *et al.*, 2002). Também foram identificados 15 genes que codificam possíveis proteínas transmembrana preditas como sendo pertencentes a superfamília RND (De Rossi *et al.*, 2006) e de acordo com similaridades estruturais, em torno de 2,5% do genoma de *M. tuberculosis*, codifica genes de transportadores da família ABC (Braibant *et al.*, 2000). Mas apenas poucos transportadores têm sido caracterizados e demonstrados como envolvidos na resistência às drogas em *M. tuberculosis* (De Rossi *et al.*, 2006).

Em geral, as bombas de efluxo de drogas conferem baixos níveis de resistência, em contraste com os altos níveis de resistência conferidos por mutações em genes que codificam os alvos primários desses agentes (De Rossi *et al.*, 2002). De fato, mesmo a superexpressão de uma bomba de efluxo com espectro ampliado para múltiplas drogas pode não conferir alto nível de resistência. Entretanto, embora o significado clínico imediato desta resistência seja pequeno, a diminuição da concentração intracelular de antibiótico permite à bactéria sobreviver até que sejam selecionadas mutantes com alterações moleculares que podem determinar níveis de resistência clinicamente significativos (Webber & Piddock, 2003; Nikaido, 1998; Martinez & Baquero, 2000).

Por outro lado, um alto nível de resistência pode não ocorrer como resultado da atividade de uma única bomba de efluxo, e, de fato, uma possível associação da superexpressão desses genes entre isolados clínicos resistentes não pode ser ignorada. A resistência intrínseca de certas espécies a antibióticos pode também ser devida à atividade de diversas bombas de efluxo (Webber & Piddock, 2003).

Estudos mostram que quando as bombas de efluxo são inibidas por seus inibidores, o desempenho das drogas pode ser significativamente melhorado. É esperado que a inibição de bombas de efluxo: (i) diminua o nível da resistência intrínseca; (ii) reverta

a resistência adquirida significativamente; e (iii) diminua a frequência de emergência de mutantes altamente resistentes (Lomovskaya *et al*, 2001; Marquez, 2005)

O estudo das bombas de efluxo tem seguido duas estratégias principais. Na primeira delas, estas proteínas têm sido caracterizadas individualmente por clonagem e expressão dos genes em micobactérias de multiplicação rápida, especialmente o *Mycobacterium smegmatis*, cepa mc<sup>2</sup>155. Alguns destes estudos têm mostrado que o mecanismo de transporte ativo de drogas pode estar envolvido na resistência intrínseca ou adquirida às drogas (Viveiros *et al*, 2003; Takiff *et al*, 1996). Nesse contexto já foram caracterizadas algumas bombas de efluxo em *M. tuberculosis*, que conferem resistência a tetraciclina (Tap) (Ainsa *et al*, 1998), aminoglicosídeos e tetraciclina (P55) (Silva *et al*, 2001), tetraciclina, eritromicina, etambutol, norfloxacin, estreptomicina, cloramfenicol e antraciclina (DrrAB) (Choudhuri *et al*, 2002), rifampicina e ofloxacin (Rv1258c) (Siddiqi *et al*, 2004), ciprofloxacina (Rv2686c-Rv2687-Rv2688c) (Pasca *et al*, 2004).

Na segunda estratégia os estudos têm utilizado uma abordagem indireta procurando caracterizar o efluxo como mecanismo relacionado à resistência intrínseca e adquirida em micobactérias. Nestes experimentos foram utilizadas substâncias, tais como verapamil, reserpina e o ionóforo carbonil cianide 3-clorofenilhidrazona (CCCP), que atuam como inibidores dos sistemas de efluxo, e observando uma maior acumulação de droga ou uma diminuição dos níveis de resistência (Levy, 1992; Markham, 1999; Choudhuri *et al*, 1999; Banerjee *et al*, 1996, Poole, 2000). Na tabela 4 pode ser visualizado um resumo de alguns trabalhos que evidenciaram indiretamente a ação do sistema de efluxo em *M. tuberculosis*.

**Tabela 4 - Evidência indireta da ação do sistema de efluxo ou acumulação de drogas antituberculose em *Mycobacterium tuberculosis*. Adaptado de De Rossi *et al*, 2006.**

Droga	Evidencia	hipotese	Referências
INH	Resistência a INH pode ser induzida gradualmente; reserpina diminui a resistência induzida a INH	Bombas de efluxo induzidas por INH podem estar envolvidas no efluxo de INH	Viveiros <i>et al</i> (2002)
RMP	Aumento na acumulação da RMP na presença de reserpina; revertido por glicose	Sugere a dependência ativa de energia no efluxo da RMP	Piddock <i>et al</i> (2000)
	RMP induz a expressão de Rv1258c em um isolado clínico de <i>M. tuberculosis</i> resistente a RMP, ofloxacina, INH e minomicina	Contribuição de bombas de efluxo na resistência a RMP	Siddiqi <i>et al</i> (2004)
FQ	CCCP e reserpina não afetaram os níveis de resistência as FQ	Bombas de efluxo provavelmente não estejam envolvidas na resistência as FQ	Piddock & Ricci (2001)
	Ofloxacina induz a expressão de Rv1258c em isolado clínico de <i>M. tuberculosis</i> resistente a RMP, ofloxacina, INH e minomicina	Contribuição de bombas de efluxo na resistência a ofloxacina	Siddiqi <i>et al</i> (2004)

O verapamil ( $C_{27}H_{38}N_2O_4$ ) é um bloqueador de canais de cálcio utilizado como princípio ativo de fármacos para hipertensão, pois tem a capacidade de relaxar vasos sanguíneos (veias e artérias), diminuindo a pressão sanguínea, o que reduz o esforço para o coração bombear o sangue de retorno. Também é utilizado no tratamento de angina (dor no peito) e para controlar alguns tipos de batimentos cardíacos irregulares (<http://www.drugs.com/verapamil.html>). O verapamil tem sido utilizado como bloqueador de transportadores de drogas, causando a inibição do sistema de efluxo e aumentando a concentração intracelular da droga, provocando a morte da célula bacteriana (Banerjee, 1996; Markham & Neyfakh, 1996).

O CCCP vem sendo utilizado em estudos por dispersar o gradiente próton-motor das membranas, por despolarizar a membrana energizada (Ainsa *et al*, 1998, Pasça *et al*,

2004, Levy, 1992), inibindo assim as bombas de efluxo que utilizam a força do próton-motor. Sua elevada toxicidade o torna inviável para o uso terapêutico (Díaz, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Caracterizar as mutações envolvidas na resistência de isolados clínicos de *M. tuberculosis* à estreptomicina e sua relação com o sistema de efluxo.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Sequenciar as regiões dos genes *rss* e *rpsL*, envolvidas com resistência à estreptomicina em isolados clínicos de *M. tuberculosis*;
- Avaliar a relação do efluxo como possível base molecular da resistência à estreptomicina em isolados clínicos de *M. tuberculosis* utilizando inibidores clássicos do sistema de efluxo;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória de cepas de *M. tuberculosis* frente à estreptomicina utilizando a técnica de microdiluição com resazurina (REMA).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Tipo de estudo**

O estudo foi realizado com isolados clínicos de *M. tuberculosis* selecionados por conveniência, de acordo com a disponibilidade e viabilidade da cultura dos mesmos. Para este estudo foi determinada a Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos isolados clínicos na presença e ausência de inibidores clássicos do sistema de efluxo (CCCP e verapamil), sempre com a estreptomicina adicionada ao meio. Os resultados dessa análise foram comparados com os dados de seqüência dos genes *rrs* e *rpsL*.

#### **3.2. Local de desenvolvimento do estudo**

O estudo foi realizado no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CDCT da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul – FEPPS/RS, em Porto Alegre e no laboratório de Micobactérias da Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

#### **3.3. Seleção das Amostras**

Foram considerados elegíveis para esse estudo os isolados de *M. tuberculosis* originários de pacientes com tuberculose resistentes e sensíveis à estreptomicina das cidades de Rio Grande e Porto Alegre, além de cepas de diversas regiões pertencentes ao Instituto de Medicina Tropical da Antuérpia (Bélgica). Todos estes isolados clínicos fazem parte do banco de cepas dos diversos laboratórios de referência e atualmente encontram-se estocadas no Laboratório de Micobactérias da FURG.

#### **3.4. Critérios de Inclusão**

Foram incluídos neste estudo os isolados de *M. tuberculosis* que apresentavam resistência e sensibilidade à SM pelo Método das Proporções (MP).



### **3.5. Número Amostral**

Neste estudo foram utilizados 79 isolados de *M. tuberculosis*.

### **3.6. Cultura de *M. tuberculosis***

Os isolados de *M. tuberculosis* foram cultivados em meio Ogawa e incubados a 37°C de 4 a 6 semanas. Posteriormente eram mantidos por aproximadamente 3 meses na geladeira antes de serem repicados. Todos os isolados foram estocados em tampão de Soerensen, 20 % de glicerol a -70°C.

### **3.7. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) com inibidores de efluxo**

Para a determinação da CMI foi utilizado o método REMA (*Resazurin Microtitre Assay*) (Palomino *et al*, 2002), que consiste numa diluição em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em U utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular.

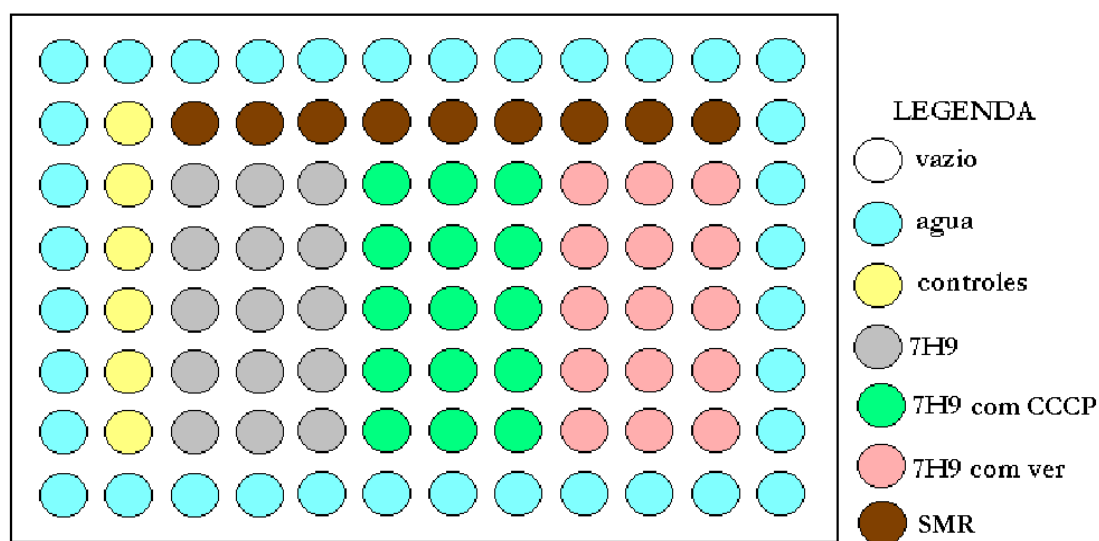
Os isolados foram multiplicados em meio líquido 7H9 OADC, em agitador automático de tubos a 37°C por uma semana. Após, foram colocadas pérolas de vidro nesses tubos que, então, foram agitados no vórtex. Posteriormente, foi preparado um tubo com uma turbidez semelhante ao tubo número 1 da escala de McFarland (tubo A), o que equivale aproximadamente a  $3,0 \times 10^8$  bactérias por ml, esse tubo tem o intuito de padronizar a quantidade do inóculo que será utilizada. O inóculo colocado nas placas tinha uma diluição de 1:25 do tubo A em outro tubo (tubo B), previamente preenchido com 7H9 OADC.

As cavidades externas da microplaca foram preenchidas com água destilada, para evitar a rápida evaporação do meio líquido na estufa. As placas continham uma coluna de controles, onde o controle do meio teve como objetivo certificar a esterilidade deste, e o controle da cepa, certificar que o inóculo estava viável.

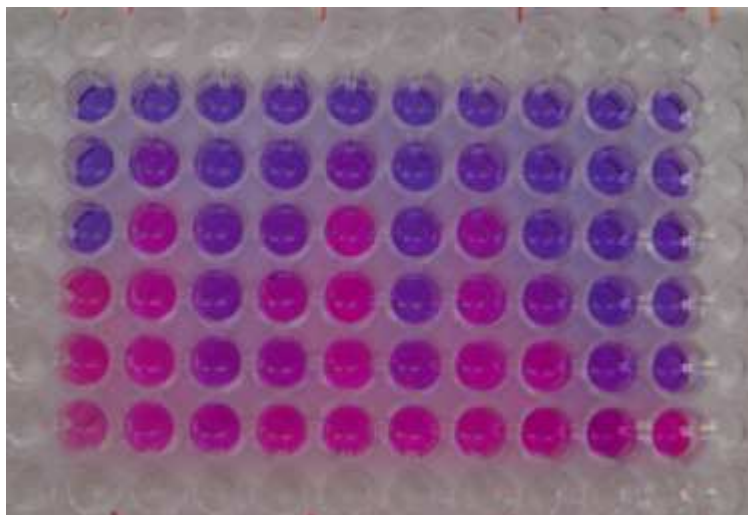
Em cada placa foram testadas os isolados com 100 µl de meio 7H9 OADC em uma coluna, 100 µl de meio 7H9 OADC e verapamil 100mM em outra coluna e 100 µl de meio 7H9 OADC e CCCP 5mM em outra coluna. Após foram adicionados 100 µl de

estreptomicina (utilizada nas concentrações de 250 µg/ml até 7,8 µg/ml e 8 µg/ml até 0,25 µg/ml) nos primeiros poços e realizada a diluição seriada 1:2 em cada coluna. Em seguida foram colocados 100 µl dos inóculos nos devidos poços.

Depois de preparadas, as placas foram tampadas e colocadas na estufa a 37°C durante cinco dias. No quinto dia foram adicionados 25 µl de Resazurina em cada poço. A leitura era então realizada dois dias depois. A Resazurina é um indicador de oxidação-redução, possui cor azul e a permanência dessa cor indica que não houve multiplicação bacteriana, a mudança do azul para o rosa indica a redução da substância e conseqüente multiplicação da bactéria. Estudos têm demonstrado que ainda não foi detectada nenhuma interação da resazurina com alguma droga ou produto químico (Banfi *et al*, 2003). Na figura 3 encontra-se um esquema de como a microplaca é utilizada no teste da CMI, e na figura 4 encontra-se uma foto da microplaca no dia de leitura.



**Figura 3 – Esquema da microplaca para determinação da CMI**



**Figura 4 – Foto da microplaca no dia de leitura.**

### **3.8. Extração de DNA**

O DNA genômico foi isolado conforme metodologia descrita por Van Soolingen *et al* (1994).

De um cultivo de *M. tuberculosis* em meio sólido foram retiradas todas as colônias com ajuda de palito estéril e colocadas em um tubo de 1,5 ml com 400 µl de TE. Após essas colônias foram inativadas durante 30 min a 80°C e depois foi adicionado 50µl de lisozima 10 mg/ml e incubado pelo menos 1 h a 37°C (preferencialmente toda a noite). Após adicionar 70µl de SDS 10% e 5µl de solução de proteinase K a 10 mg/ml, colocar no vórtex durante 3 minutos e incubar a 65°C durante 10 min, adicionar 100 µl de NaCl 5M, adicionar 100µl de solução de CTAB/ NaCl (10% CTAB e 4% NaCl) e colocar no vórtex até obter um aspecto leitoso e incubar 10 min a 65°C, após adicionar 750µl de clorofórmio/ álcool isoamílico e colocar no vórtex durante 10 segundos e depois centrifugar a 12000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min e passar o sobrenadante a um tubo novo e adicionar 0,6 volumes de isopropanol e deixar a -20°C por pelo menos 30 minutos. Após centrifugar a 12000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos e eliminar o isopropanol virando o tubo, adicionar etanol 70% gelado e misturar suavemente várias vezes e centrifugar a temperatura ambiente a 12000 rpm por 5 min, verter o tubo para dispensar o sobrenadante, esperar secar completamente e ressuspender em 20 µl de TE 1X. O DNA extraído era mantido a 4°C por dois dias para suspensão completa e em seguida estocado a -20°C.

### 3.9. Amplificação dos genes de interesse

As principais alterações moleculares descritas para os genes *rrs* e *rpsL*, relacionadas com a resistência a estreptomicina, foram analisadas por seqüenciamento do DNA.

As seqüências selecionadas e os *primers* basearam-se nas regiões gênicas identificadas como responsáveis, por vários autores, pela resistência a estreptomicina. A reação de PCR para amplificar as seqüências dos genes *rrs* e *rpsL* de isolados de *M. tuberculosis* (acesso no GenBank NC 000962) foi realizada utilizando-se os *primers* descritos por Tracevska *et al* (2004).

### 3.10. Primers utilizados

Foram amplificadas duas regiões do gene *rrs* (número de acesso no GenBank X52917) que possuem mutações associadas a resistência, a região 530 que gerou um fragmento de 238 pares de bases e a região 912 que gerou um fragmento também de 238 pares de bases (Tracevska *et al*, 2004) (figura 5).

Já com o gene *rpsL* (número de acesso no GenBank L08011) houve uma amplificação de uma única região interna com 306 pares de bases (Fukuda *et al*, 1999) (figura 5).

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados foram os seguintes:

#### Gene *rpsL*

rpsL1            5'CCAACCATCCAGCAGCTGGT    leitura direta  
rpsL2            5'ATCCAGCGAACCGCGGATGA    leitura reversa

#### Gene *rrs*

rrs530-1 5'GATGACGGCCTTCGGGTTGT    leitura direta  
rrs530-2 5'TCTAGTCTGCCCGTATCGCC    leitura reversa  
rrs912-1 5'GTAGTCCACGCCGTAAACGG    leitura direta  
rrs912-2 5'AGGCCACAAGGGAACGCCTA    leitura reversa

## Gene *rpsL*

781560 atg **rpsL1** **ccaacccatccagcagctgg**ccgcaagggctcgtcgggacaag  
781605 atcagtaaggtcaagaccgcggtctgaagggcagcccgcagcgt  
781650 cgtgggtgatgcacccgcgtgtacaccaccactccgaagaagccg  
781695 aactcggcgcttcggaaggttgcgccgctgaagttgacgagtcag  
781740 gtcgaggtcacggcgctacattcccggcgagggccacaacctgcag  
781785 gagcactcgatgggtgctgggtgcgcggcggccgggtgaaggacctg  
781830 cctgggtgtgcgctacaaga**tcacccgcggttcgctggat**acgcag  
**rpsL2**  
781875 ggtgtcaagaaccgcaaacaggcacgcagccgttacggcgctaag  
781920 aaagagaagggctga

## Fragmento do gene *rrs*

5343 acgggaggcagcagtggggaatatgcaaatgggcgcaagcctgatgcagcgacgccg  
**rrs530-1**  
5403 gtgggg**gatgacggccttcgggtgt**aaacctctttcaccatcgacgaaggtccgggttc  
5463 tctcggattgacggtaggtggagaagaagcaccggccaactacgtgccagcagccgcggt  
5523 aatacgtaggggtgcgagcgttgtccggaattactgggcgtaagagctcgtaggtggttt  
**rrs530-2**  
5583 gtcgctgttctcgtgaaatctcacggcttaactgtgagcgtgcg**ggcgatacgggcagac**  
5643 **taga**gtactgcaggggagactggaattcctgggtgtagcgggtggaatgcgcagatatcagg  
5703 aggaacaccgggtggcgaaggcgggtctctgggcagtaactgacgctgaggagcgaaagcg  
**rrs912-1**  
5763 tggggagcgaacaggattagataacctg**gtagtcacgcccgtaaacgg**tgggtactaggt  
5823 gtgggtttccttcttgggatccgtgcccgtagctaacgcattaagtaccccgcctgggga  
5883 gtacggccgcaaggctaaaactcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcggcgagca  
5943 tgtggattaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctgggtttgacatgcacaggacgcg  
**rrs912-2**  
6003 tctagaga**taggcgttcccttgtggcct**gtgtgcaggtggtgcatggctgtcgtcagctc  
6063 gtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttgtctcatgttgccag

**Figura 5: Localização dos primers utilizados na amplificação de fragmentos dos genes *rpsL* e *rrs*, de *M. tuberculosis*.**

### 3.11. Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações foram realizadas em um termociclador (MiniCycler<sup>TM</sup> – Hot Bonnet PTC – 150/MJ Research) obedecendo as seguintes temperaturas e tempos: desnaturação inicial a 92°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 64°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min.

A PCR para amplificar o fragmento do gene *rpsL* foi padronizada utilizando-se 100 ng de DNA de *M. tuberculosis*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 2,5 U Taq DNA polimerase, 40 pmol de cada *primer* (*rpsL1* e *rpsL2*), em um volume total de 50 μl.

A PCR para amplificar o fragmento do gene *rrs* foi padronizada utilizando-se 100 ng de DNA de *M. tuberculosis*, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 2,5 U Taq DNA polimerase, 40 pmol de cada *primer* (*rrs530-1* e *rrs530-2* / *rrs912-1* e *rrs912-2*), em um volume total de 50 μl. Cada par de *primers* foi amplificado em tubos diferentes.

### 3.12. Análise dos fragmentos amplificados

A detecção do produto amplificado foi feita em gel de agarose 1,5%, preparado com TEB 1X e corado com brometo de etídio e visualizados em um transluminador de U.V. O marcador de peso molecular utilizado durante as corridas eletroforéticas foi o 100 pb DNA Ladder (Gibco-BRL).

### 3.13. Purificação dos fragmentos amplificados

Após a amplificação e checagem, os produtos foram purificados, para retirada de excesso de *primers*, pelo método PEG (Neisseria MLST home page, <http://pubmlst.org/neisseria/mlst-info/nmeningitids/pcr.shtml>), que consiste de: transferir o conteúdo dos tubos de PCR para tubos de 1,5 ml, adicionar e misturar 60 μl de PEG 8000/2,5M NaCl. Incubar por 15 minutos a 37°C e, após esse tempo, centrifugar na velocidade máxima por 10 minutos e descartar o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Adicionar 500 μl de etanol 70% e centrifugar novamente na velocidade máxima por 5 minutos, após descartar o sobrenadante e secar no termobloco a 90°C por 2-4 minutos. E então

ressuspender em 30 µl de água. Manter a 4°C por dois dias para suspensão completa e em seguida armazenar a -20°C.

### **3.14. Seqüenciamento de DNA**

A reação do PCR para o seqüenciamento foi realizada utilizando-se BigDye® Terminator Sequencing Standard Version 1.1 (Applied Biosystems). Para um volume de 10µl (uma reação) foram usados 0,5 µl do BigDye®; 1,5 µl de tampão para diluição 5X (Applied Biosystems); 0,55 µl do primer (3,2 pmol/µl) e 7,45 µl de produto amplificado purificado. As condições da reação foram as seguintes: 96°C por 10 segundos (desnaturação), 50°C por 5 segundos para anelamento dos *primers*, 60°C por 4 minutos para extensão, totalizando 40 ciclos.

### **3.15. Precipitação dos produtos para seqüenciamento**

Os produtos da reação PCR-BigDye foram precipitados com a adição de 30µl de isopropanol 75%. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, essa mistura era centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos a 20°C. O sobrenadante era desprezado e era adicionado a cada poço da placa 50 µl de etanol 75%, era feita uma agitação e após a placa era centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 20°C. Após esta placa era invertida em papel toalha para a retirada do sobrenadante e submetida a secagem em um bloco quente por 10 minutos a 60°C. Pode ser armazenada a -20°C e quando o seqüenciamento era realizado, cada poço da placa era eluído com 10 µl de formamida, após era colocada no termociclador por 3 minutos a 95°C para desnaturação das fitas e depois rapidamente no gelo até ser colocada no seqüenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

### **3.16. Análise das seqüências obtidas**

As seqüências obtidas foram visualizadas no programa Chromas Lite 2.01, que permite a visualização de arquivos dos cromatogramas (gráficos) gerados pelo seqüenciador automático da Applied Biosystems.

A seqüência encontrada para cada isolado era comparada (alinhada) com a seqüência do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, utilizando-se os programas BLAST®

(Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI/Blast) que alinha a seqüência fornecida com seqüências depositadas no GenBank ou era utilizado o programa ClustalW para alinhamento da seqüência fornecida com uma seqüência padrão.

Para a análise das seqüências também foram usados os programas PREGAP4 e GAP4 do pacote STADEN. Estes programas possibilitam o alinhamento das seqüências e a visualização dos possíveis locais de mutação, além de excluir as regiões contendo seqüências que não tenham boa qualidade e fornecer um valor de qualidade para cada base presente no eletroferograma (valor de phred). O valor mínimo de phred foi de 20 para a sequencia ser considerada de boa qualidade. As seqüências geradas no sequenciador foram comparadas com as seqüências da cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv (número de acesso no GenBank L08011 para o gene *rpsL* e X52917 para o gene *rrs*).

### **3.17. Análise Estatística**

Para análise dos resultados foi utilizado o programa SPSS versão 13.

Para a verificação da diferença entre a presença e ausência de inibidor e essa relação com as mutações encontradas, seria utilizado a análise da variância (ANOVA), Porém a amostra não foi coletada aleatoriamente, uma vez que foi dada preferência para isolados caracterizados como resistentes pelo método das proporções. Sendo assim, os dados não apresentavam distribuição normal, e não se desejava transformá-los, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Este teste serve para comparar duas ou mais populações quanto à tendência central dos dados. Um valor estatisticamente significativo, não indica quais grupos diferem, para ser identificada essa diferença deve ser realizado outro teste. Neste caso foi escolhido o teste de Qui-Quadrado, onde os tratamentos foram testados dois a dois.

### **3.18. Genotipagem dos isolados**

Todos os isolados que apresentaram as mesmas alterações genômicas foram tipificados pelas técnicas de spoligotyping e DRE-PCR.



### 3.18.1. Spoligotyping

A técnica foi realizada conforme padronizado por Kamerbeek *et al* (1997) e está descrita nas etapas a seguir:

#### 3.18.1.1. Primers:

Os *primers* DRa e DRb anelam nas extremidades da seqüência DR visando amplificar as seqüências espaçadoras entre duas DRs ( Kamerbeek *et al*, 1997).

DRa: ( 5'biotinilado) 5' GGTTTTGGGTCTGACGAC 3'

DRb: 5' CCGAGAGGGGACGGAAAC 3'

#### 3.18.1.2. Reação de amplificação

As reações foram realizadas com aproximadamente 100 ng de DNA, 20 pmol de cada um dos *primers*, 200 µM de desoxiribonucleosídeos trifosfato (Invitrogen), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). As amplificações pela PCR foram realizadas em um termociclador ( Mini Cycler – MJ Research) sob as seguintes condições: 1 ciclo a 96°C por 3 min, 20 ciclos a 96°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 30 seg e um ciclo final a 72°C por 5 min.

#### 3.18.1.3. Hibridização dos produtos da PCR e Detecção

Os produtos amplificados foram hibridizados com um conjunto de 43 oligonucleotídeos imobilizados em uma membrana comercial previamente preparada, cada um correspondendo a uma das seqüências únicas dos espaçadores dentro do locus DR (Isogen, bioscience BV, Holanda).

Para hibridização, 40 µl dos produtos da PCR foram diluídos em 140 µl de SSPE 2X (0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 0,36 M NaCl, 2mM EDTA – pH 7,4) – SDS 1% e desnaturados. As amostras diluídas foram aplicadas em canais paralelos de um *miniblotter* (Isogen, BioscienceBV, Holanda), de modo que ficassem perpendiculares as linhas de oligonucleotídeos previamente imobilizados. A hibridização foi realizada por 60 min a 60°C em forno giratório (Hybaid Instruments, Holbrook, NY), e a membrana foi lavada 2

vezes em 250 ml de SSPE 2X SDS 0,5% por 10 min a 60°C. Em seguida foi incubada com um conjugado de estreptavidina-peroxidase diluído (1:4000) por 50 min a 42°C. A membrana foi lavada 2 vezes com 250 ml SSPE 2X SDS 0,5% por 10 min a 42°C e 2 vezes com 250 ml SSPE 2X por 5 min a temperatura ambiente.

A detecção foi realizada pela sensibilização de um filme auto-radiográfico através de uma reação de quimioluminescência, utilizando o Kit ECL™(Amersham Biosciences, Inglaterra).

### **3.18.2. DRE-PCR**

A técnica foi baseada naquela descrita por Friedman *et al* (1995), com algumas modificações (Cafrune, 2003).

#### **3.18.2.1. Primers:**

Os *primers* Ris1 e Ris2 anelam nas extremidades direita e esquerda, respectivamente do *IS6110*. Os *primers* Pntb1 e Pntb2 anelam nas extremidades direita e esquerda, respectivamente, do PGRS conforme descrito por Friedman *et al*, 1995.

Ris 1- 5' GGCTGAGGTCTCAGATCAG

Ris 2- 5' ACCCCATCCTTTCCAAGAAC

Pntb1- 5' CCGTTGCCGTACAGCTG

Pntb2- 5' CCTAGCCGAACCCCTTG

#### **3.18.2.2. Reação de amplificação**

As reações foram realizadas com 150 ng de DNA, 50 pmol de cada um dos 4 *primers*, 200 µM de desoxiribonucleosídeos trifosfato ( Invitrogen™ Life technologies), 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5U de Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen™ Life technologies) e DMSO 6%. As amplificações pela PCR foram realizadas em um termociclador (Mini Cycler- MJ Research) sob as seguintes

condições: 1 ciclo a 94°C por 10 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min, 56°C por 2 min, 72°C por 2 min e 1 ciclo final a 72°C por 7 min.

### **3.18.2.3. Detecção dos fragmentos amplificados por PCR**

Após uma eletroforese de 40 min a 40 volts e 2hs e 30 min a 100 volts, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etideo, sob iluminação ultravioleta. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o 100 pb ladder (Invitrogen™ Life technologies).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Perfil de susceptibilidade dos isolados de *M. tuberculosis*:

Para este trabalho foram selecionados inicialmente 80 isolados de *M. tuberculosis* resistentes e sensíveis à estreptomicina pelo método das proporções. Um isolado teve seu cultivo contaminado e foi retirado do estudo. Dos 79 isolados estudados, 57 foram caracterizados como resistentes pelo método das proporções, 17 foram considerados sensíveis e em 5 isolados não foi determinado o seu perfil de resistência pelo método das proporções. A tabela 5 mostra a distribuição do perfil de susceptibilidade desses isolados.

**Tabela 5: Perfil de susceptibilidade dos isolados segundo o método das proporções.**

Susceptibilidade	Número de isolados
Resistentes a SMR	57
Sensíveis a SMR	17
Não determinado	5
TOTAL	79

### 4.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A Concentração Mínima Inibitória foi realizada com a diluição seriada de estreptomicina em diferentes concentrações (250; 125; 62; 31; 15; 8; 4; 2; 1; 0,5 e 0,25 µg/ml) a três diferentes meios de cultura (7H9), um deles era somente o próprio meio de cultura 7H9, outro era 7H9 + verapamil (inibidor do sistema de efluxo) e outro era 7H9 + CCCP (inibidor do sistema de efluxo). Foram encontrados isolados resistentes e sensíveis a todos os valores testados pela CMI, esses valores encontrados na CMI para os isolados quando se utilizou apenas a estreptomicina junto ao meio de cultura podem ser visualizados na tabela 6.

**Tabela 6: Resultados da CMI somente na presença de meio 7H9. CMI  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$  = isolado resistente à estreptomicina.**

Método	Concentrações de estreptomicina em $\mu\text{g/ml}$										
	>250	125	62	31	15	8	4	2	1	0,5	0,25
57 resistentes	26	2	3	3	2	6	4	9	1	1	
17 sensíveis					2	3	4	4	1		3
5 ND							1	1	2		1
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>

De acordo com a CMI, 47 isolados foram considerados resistentes à estreptomicina e 32 foram considerados sensíveis.

Com o resultado desses dois tipos de teste de sensibilidade foi possível a comparação entre eles. Pode-se notar que dos 17 isolados que foram considerados sensíveis pelo método das proporções, cinco foram considerados resistentes pela CMI (CMI  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$ ), todos os outros isolados (12) apresentaram resultados concordantes nos dois testes. Cabe ressaltar que os isolados que diferiram a CMI entre os dois testes ficaram perto dos valores que separam os resistentes dos sensíveis.

Dos 57 isolados considerados resistentes pelo método das proporções, 42 deles também foram considerados resistentes pela CMI e os 15 restantes considerados como sensíveis pelo CMI. Quando seqüenciados, não apresentaram mutações nos genes *rpsL* e *rrs*, indicando que possivelmente, neste caso, a CMI indicou o perfil de susceptibilidade mais confiável do que o método das proporções (tabela 7). Cabe ressaltar que não se pode excluir a possibilidade de ter havido algum engano no teste das proporções ou que ele tenha sido mal executado.

**Tabela 7: Resultados do método das proporções, CMI e seqüenciamento dos isolados discordantes entre o método das proporções e a CMI. R=resistente à estreptomicina e CMI  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$  = isolado resistente à estreptomicina.**

Isolados*	Método proporções	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
3	R	4
1001	R	4
F516	R	4
MA20	R	4
MA4	R	2
1097	R	2
MA16	R	2
F507	R	2
F514	R	2
RS-70484-LA	R	2
RS-80034-SP	R	2
RS-80360-LA	R	2
RS-00059-LA	R	2
20	R	1
F510	R	0,5

**\*todos esses isolados quando seqüenciados não apresentaram mutações.**

Todos os isolados que não tiveram seu perfil de resistência determinado anteriormente a este estudo pelo método das proporções apresentaram-se sensíveis à estreptomicina pela CMI.

A concordância entre os testes foi de 73%, foram utilizados 74 isolados (os isolados que não tiveram o seu perfil de susceptibilidade testado para o método das proporções foram excluídos). Para este cálculo foram incluídos apenas os 42 isolados que eram resistentes nos dois métodos e os 12 isolados que foram considerados sensíveis nos dois métodos.

Em outro estudo, Montoro *et al* (2005) colocam a concordância geral entre o teste REMA e o método das proporções, para as drogas estreptomicina, etambutol, isoniazida e rifampicina, como sendo de 88,2%. Para Palomino *et al* (2002) a concordância entre os dois métodos para as drogas rifampicina e isoniazida é de 99%. Ao testar drogas de segunda linha Martin *et al* (2003) encontrou completa concordância entre os resultados para monossulfato de kanamicina, ácido *para*-aminosalicílico e ofloxacina, e de 150 isolados

analisados encontrou 1 discordante para ethionamida e 3 resultados discordante para o sulfato de capreomicina.

Quando foram acrescentados separadamente os inibidores do sistema de efluxo (verapamil e CCCP) ao meio de cultura obtem-se os resultados apresentados na tabela 8.

**Tabela 8 - Isolados que diminuíram a CMI na presença de inibidor. SM= estreptomicina, SM/ver=estreptomicina + verapamil e SM/CCCP= estreptomicina + CCCP.**

CMI (µg/ml)			
isolados	SM	SM/ver	SM/CCCP
RS-80045-SP	>250	125	>250
43	>250	62,5	125
RS-00043-LA	>250	62,5	>250
RS-344	250	62,5	250
F518	>250	62,5	>250
F513	>250	62,5	>250
RS-90037-SP	31,25	8	31,25
MA17	15,6	2	15,6
RS-350	31,5	8	15,6
RS-00004-SP	62,5	8	62,5
F506	31,25	8	31,25
MA7	15,6	2	15,6
MA11	8	2	8
03093-SP	8	2	2
F517	8	1	4
3	4	<0,25	1
MA20	4	1	4
MA5	4	1	4
MA13	4	1	4
RS-80360-LA	2	0,5	2
MA4	2	0,5	2
MA16	2	0,5	2
F514	2	0,5	0,5
20	1	<0,25	1
Isolados com diferença de apenas 1 diluição			
CMI (µg/ml)			
isolados	SM	SM/ver	SM/CCCP
F521	62,5	31,25	62,5
RS-80014-SM	62,5	62,5	31,25

F505	15,6	8	15,6
5312	15,6	8	15,6
41071	4	2	2
5056	2	1	1
58	8	8	4
MA8	8	4	4
F519	8	4	8
1001	4	2	4
5338	4	2	4
RS-80034-SP	2	1	2
RS-00059-LA	2	1	2
MA6	1	0,5	1

Dos 79 isolados, 38 (48%) diminuíram a CMI na presença de inibidores do sistema de efluxo e em 41 (52%) isolados não houve diferença entre os três tipos de tratamento (somente meio de cultura, meio de cultura com verapamil e meio de cultura com CCCP). A visualização de todos os resultados, inclusive dos isolados que não tiveram nenhuma alteração de CMI na presença dos inibidores, pode ser feita no anexo 1.

Pode-se notar que dos 38 isolados que diminuíram a CMI na presença de inibidores, em vinte e quatro deles existe uma diferença significativa entre os tratamentos (com e sem inibidor), devido à diminuição da CMI em duas ou mais casas de diluição, logo, pode-se inferir que as bombas de efluxo, quando inibidas por verapamil ou CCCP, tornaram o isolado em questão mais sensível a estreptomicina.

Já em quatorze isolados, a diminuição de CMI ocorreu em apenas uma casa de diluição, isso poderia ser uma variação experimental do teste utilizado ou realmente essas bombas estariam agindo fracamente.

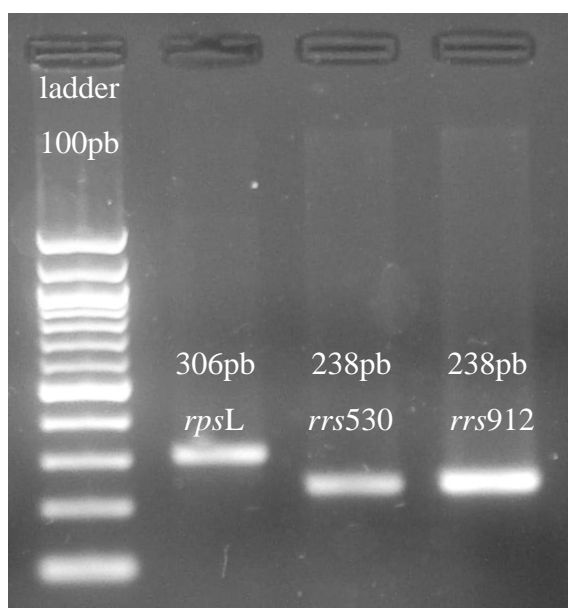
Cabe ressaltar que os diferentes inibidores utilizados causam diminuições distintas na CMI. Pode-se observar que a presença do inibidor verapamil é capaz de causar uma diminuição da CMI maior do que o CCCP.

Isso reflete o diferente mecanismo de ação desses dois compostos, o CCCP atua desacoplando o gradiente de prótons, logo, opera somente sobre as bombas de efluxo movidas pela força do próton-motor (Díaz, 2003). Enquanto que o inibidor verapamil por outro lado atua bloqueando o efluxo por inibir os transportadores de drogas em geral (Banerjee *et al*, 1996).



### 4.3. Padronização das condições de amplificação por PCR para os genes *rpsL* e *rrs*

Para que o sequenciamento possa ser realizado é necessária uma amplificação inicial do fragmento de interesse. Para isso, foram usados os *primers* *rpsL1* e *rpsL2* para amplificar uma região interna com 306 pares de bases do gene *rpsL* e os primers *rrs530-1* e *rrs530-2* e *rrs912-1* *rrs912-2* para amplificar dois fragmentos do gene *rrs*, ambos gerando um fragmento de 238 pares de bases (figura 6).



**Figura 6:** Gel de agarose 1,5% mostrando o tamanho dos fragmentos que são amplificados na PCR. Na 1ª canaleta encontra-se o marcador de peso molecular de 100pb, na 2ª encontra-se a amplificação do gene *rpsL*, na 3ª e na 4ª do gene *rrs*.

A reação de amplificação da PCR foi inicialmente realizada segundo Brzostek *et al* (2004), onde a reação de amplificação da PCR era obtida segundo o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. As condições da PCR foram sendo testadas de várias maneiras até a obtenção de fragmentos fortes, mas sem a presença de bandas inespecíficas.

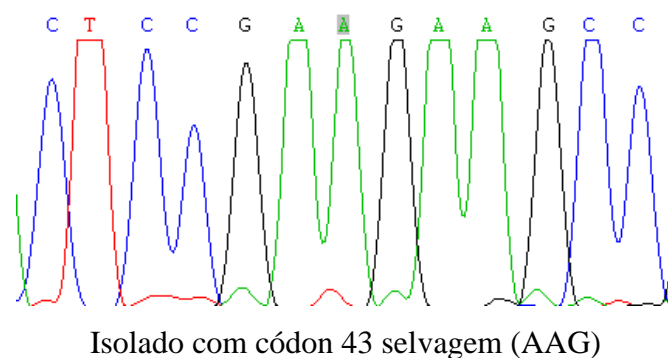
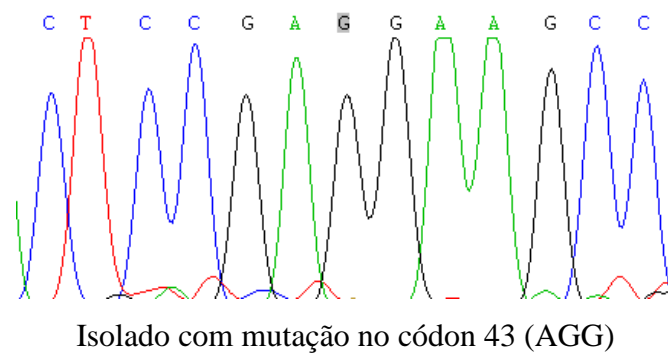
Para isso foi necessário o aumento da temperatura de anelamento, que por fim, ficou em 64°C (inicialmente era 60°C) e ocorreu também a diminuição da concentração de MgCl<sub>2</sub> na reação da PCR, inicialmente foi testado com 3 mM e essa quantidade foi diminuída posteriormente para 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> para o gene *rpsL* e 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> para o gene *rrs*.

#### 4.4. Análises das seqüências

Regiões definidas dos genes relacionados com a resistência à estreptomicina (*rpsL* e *rrs*) de todos os isolados foram seqüenciadas. Quarenta e três isolados apresentaram mutações de troca de bases nesses genes e 36 isolados não apresentaram mutações (Tabela 9). Todas as mutações encontradas tinham o valor de phred acima de 20, ou seja, a qualidade da seqüência onde as mutações foram identificadas era boa. Na figura 7 podem ser visualizados dois isolados, um deles apresenta a mutação mais encontrada neste trabalho (códon 43 do gene *rpsL*) e outro apresenta o gene selvagem.

**Tabela 9: As mutações encontradas nos genes *rpsL* e *rrs* e número de isolados que possuem essas mutações. \* olhar tabela 10**

Número de isolados	Mutação
19	43 (AAG-AGG) K-R
4	88 (AAG – CAG) K – Q e 491 C→ T
3	(mutação silenciosa) 81 (CTG- TTG) L- L e 905 A→ G
3	516 C→ T
3	513 A→ C
1	513 A→T
1	426 G→ C
8	muitas mutações*
1	muitas mutações/461 C→T*
36	Sem mutações



**Figura 7 - Comparação entre isolado com mutação no códon 43 do gene *rpsL* e outro sem essa mutação.**

De todos os isolados com mutações, 19 deles possuíam um única mutação exclusivamente no gene *rpsL* e todos esses possuíam mutação no códon 43, onde existe a troca de AAG – AGG, trocando o aminoácido lisina (K) pelo aminoácido arginina (R). Oito isolados apresentaram uma única mutação em *rrs*, essas mutações eram as seguintes: 516 C→T, 513 A→C, 513 A→T e 426 G→C; sete isolados apresentaram uma mutação em *rpsL* e também uma em *rrs*, as mutações eram as seguintes: códon 88 do gene *rpsL*, onde existe a troca de AAG - CAG, trocando o aminoácido lisina (K) pelo aminoácido glutamina (Q), e no códon 491 do gene *rrs*, trocando o nucleotídeo C→T; e uma mutação silenciosa no códon 81, causando a troca de CTG-TTG sem trocar o aminoácido Leucina (L) e 905 A→G do gene *rrs* e nove isolados tiveram muitas mutações.

Nesses nove isolados com diversas mutações, 7 deles possuíam 21 mutações no gene *rpsL* com a troca de somente 2 aminoácidos, logo 19 mutações encontradas nesse isolado são silenciosas. Outro isolado possuía 22 mutações e também a troca de 2 aminoácidos iguais aos do primeiro grupo. Outro isolado possuía 14 mutações no gene

*rpsL* e uma no gene *rrs*, sendo que somente uma mutação no gene *rpsL* causava alteração de aminoácido, as outras 13 mutações eram silenciosas. Essas mutações encontram-se na Tabela 10.

**Tabela 10: Mutações encontradas em isolados que possuíam várias mutações. Mutações em vermelho são as que acarretam a troca no aminoácido.**

Isolados		
5312, 41071, 41075, 4809, 41069, 41097, 5029	124	5056
*Mutações encontradas em <i>rpsL</i> : códon, aminoácidos		
12 CGT-CGC R-R	12 CGT-CGC R-R	
13 CGG-CGC R-R		
16 ATC-GTC I-V	16 ATC-GTC I-V	
17 AGT-GCC S-A	17 AGT-GCC S-A	
		17 AGT-GGC S-G
23 GCT-GCC A-A	23 GCT-GCC A-A	
	24 CTG-CTC L-L	24 CTG-CTC L-L
30 CGT-CGC R-R	30 CGT-CGC R-R	30 CGT-CGC R-R
32 GGT-GGC G-G	32 GGT-GGC G-G	32 GGT-GGC G-G
41 ACT-ACC T-T	41 ACT-ACC T-T	41 ACT-ACC T-T
	47 TCG-TCC S-S	
	48 GCG-GCT A-A	
52 GTT-GTC V-V	52 GTT-GTC V-V	52 GTT-GTC V-V
53 GCC-GCT A-A		
57 TTG-CTG L-L	57 TTG-CTG L-L	57 TTG-CTG L-L
59 AGT-AGC S-S	59 AGT-AGC S-S	59 AGT-AGC S-S
61 GTC-GTT V-V	61 GTC-GTT V-V	
	63 GTC-GTG V-V	
64 ACG-ACC T-T		64 ACG-ACC T-T
65 GCG-GCC A-A	65 GCG-GCC A-A	65 GCG-GCC A-A
	67 ATT-ATC I-I	67 ATT-ATC I-I
	71 GGC-GGA G-G	
		78 TCG-TCC S-S
83 CGC-CGT R-R	83 CGC-CGT R-R	
	84 GGC-GGT G-G	
85 GGC-GGT G-G		
86 CGG-CGT R-R		
91 CCT-CCC P-P	91 CCT-CCC P-P	91 CCT-CCC P-P
93 GTG-GTC V-V		
94 CGC-CGG R-R	94 CGC-CGG R-R	94 CGC-CGG R-R
		<i>rrs</i> 461 C→T

Os isolados que possuem inúmeras mutações no gene *rpsL* poderiam ter, primariamente, mutações nos genes *mut*. Esses genes são envolvidos no reparo de mutações no DNA e quando alterados resultam em um aumento na frequência de mutações (Rad *et al*, 2003).

#### 4.5. Frequência de mutações

A frequência de todas as mutações encontradas neste estudo pode ser vista na tabela 11.

**Tabela 11: Frequência das mutações encontradas no estudo. \* olhar tabela 10**

Mutação encontrada	Número de isolados( frequência de mutação)
43 (AAG-AGG) K-R	19 (44%)
88 (AAG-CAG) K -Q e 491 C-T	4 (9%)
81 (CTG-TTG) L-L e 905 A- G	3 (6,9%)
516 C→T	3 (6,9%)
513 A→C	3 (6,9%)
513 A→T	1 (2%)
426 G→C	1 (2%)
Muitas mutações*	8 (18,6%)
muitas mutações/461 C→T*	1 (2%)
TOTAL	43 (100%)

As mutações nos códons 43 e 88 são descritas por muitos autores como sendo as mutações mais comuns. Fukuda *et al* (1999) encontraram 78% dos isolados resistentes à estreptomicina com mutação nesse gene e em 22% dos isolados foi identificada a mutação no códon 88. No trabalho de Sreevatsan *et al* (1996) 54% dos isolados resistentes tinham mutação no códon 43 ou no 88. Um outro estudo realizado por Brzostek *et al* (2003) chegou à conclusão que a mutação mais freqüente encontrada era a mutação no códon 43 (30,7%) e em segundo lugar estava a mutação no códon 88.

Sreevatsan *et al* (1996) encontraram um isolado que possuía mutação no códon 43 do gene *rpsL* e também na posição 798 C→T do *rrs*. Meier *et al* (1996) descobriram um outro isolado que possuía mutação no códon 88 do gene *rpsL* e na posição 904 A→G no gene *rrs*. Nesse estudo ocorreu o mesmo fato de cepas que possuíam mutações tanto em

*rpsL* quanto em *rrs*, como os isolados que tinham mutações em: 88 AAG – CAG - K – Q e 491 C → T e também os que possuíam mutações em 81 (CTG – TTG) L- L e 905 A → G. Nesses isolados poderia estar ocorrendo uma mutação compensatória, restaurando o *fitness* da bactéria.

A mutação na posição 905 A → G, ainda não havia sido descrita, somente as mutações ao seu redor, 904 A → G e 906 A → C, haviam sido descritas por Sreevatsan *et al* (1996). As mutações 513 A → T já haviam sido encontradas em outros isolados por Sreevatsan *et al* (1996) e Tracevska *et al* (2004), este último também já havia descrito a mutação na posição 516 C → T. A mutação em 461 C → T já havia sido descrita por Brzostek *et al* (2004), e as mutações 426 G → T e 491 C → T foram descritas por Ramaswamy *et al* (2004). E a mutação silenciosa 81 (CTG-TTG) L-L ainda não havia sido descrita.

Sobre os isolados que apresentam múltiplas mutações, Brzostek *et al* (2004) também encontraram dois isolados (classificados como pertencentes a família Beijing) que possuíam múltiplas mutações nos genes *rpsL* e *rrs*. Segundo os autores, as seis mutações encontradas no gene que codifica o rRNA 16S (*rrs*) eram localizados a jusante e a montante do *loop* 530 e provavelmente essas mutações representem variações polimórficas. O mesmo isolado possuía ainda 18 mutações silenciosas e seis substituições de aminoácidos no gene *rpsL*. O outro isolado possuía 16 mutações silenciosas no gene *rpsL*.

Nos isolados aqui descritos existe, na grande maioria, mutações silenciosas e três mutações com troca de aminoácidos que ainda não haviam sido descritas. No códon 16 existe a troca de ATC-GTC, trocando o aminoácido isoleucina (I) pelo aminoácido valina (V) e no códon 17 onde existe a troca de AGT-GCC, trocando o aminoácido serina (S) por alanina (A) e a troca de AGT-GGC, trocando o aminoácido serina (S) por glicina (G).

Quando analisamos o gene mutado como um todo, sem importar a mutação (tabela 12), temos a frequência de mutação somente no gene *rpsL* de 63% e de mutações somente no gene *rrs* em 18,6% dos isolados, os dois genes mutados na mesma cepa perfazem 18,6%. Esses dados encontrados vêm de encontro ao que outros autores já conhecem, onde alterações no gene *rpsL* são detectadas em 52-61% dos isolados e mutações no gene *rrs*

são observadas em 8-24% dos isolados (Traveska *et al*, 2004; Sreevatsan *et al*, 1996; Morris *et al*, 1995; Heym *et al*, 1994; Finken *et al*, 1993).

**Tabela 12: Frequência de mutação encontrada quando se analisa o gene.**

Gene mutado	Número de isolados
<i>rpsL</i>	27 (63%)
<i>Rrs</i>	8 (18,6%)
<i>rpsL</i> e <i>rrs</i>	8 (18,6%)
TOTAL	43

#### 4.6. Genotipagem

Os isolados que apresentaram as mesmas mutações e também os nove isolados que apresentaram muitas mutações foram analisadas por duas técnicas de genotipagem, *spoligotyping* e DRE-PCR, a fim de verificar a possível existência de agrupamentos clonais entre as amostras. As fotos tanto da membrana do *spoligotyping*, quanto dos géis do DRE-PCR encontram-se no anexo 2. Na tabela 13 encontram-se agrupados os resultados destes testes de genotipagem.

**Tabela 13: Grupos formados pelas técnicas de genotipagem. \* olhar tabela 10**

Seqüenciamento	Grupos	cepas		
43 (AAG – AGG) K-R	Grupo A	7	RS-355	F509
		71	02053-C	F515
	Grupo B	F508	F522	
		MA9	MA12	
	Não agrupados	MA10	F524	1115
		MA14	F525	F523
		RS-90245-LA	F512	RS-80045-SP
88 (AAG-CAG) K-Q e 491 C→T	Grupo C	43	RS-344	F521
		RS-00043-LA		
81 (CTG-TTG) L-L e 905 A→G	Grupo D	0005-SM	17	00010-B
516 C→ T	Grupo E	F520	F513	F518
513 A→ C	Não agrupados	RS-80014-SM	MA17	RS-90037-SP
muitas mutações*	Grupo F	5312	41071	41097
		41075	5029	41069
		4809		
	Não agrupado	124/93		
muitas mutações/ 461 C→T*	Não agrupado	5056		

Não foi possível fazer o spoligotyping de alguns isolados com muitas mutações. Eles provavelmente possuem alguma diferença (menor número de cópias ou até mesmo mutações) na região onde os *primers* anelam ou amplificam, já que a amplificação dessa região fica fraca e o *spoligotyping* de algumas amostras tornar-se de difícil visualização. Mesmo assim, o DRE-PCR foi feito e nele pode-se evidenciar claramente os grupos formados, vide anexo 2.

Ao todo foram formados seis grupos pelas técnicas de genotipagem. Dos 19 isolados com mutação no códon 43 do gene *rpsL* havia, segundo o spoligotyping e o DRE-



PCR, a formação de um grupo com oito isolados e um outro grupo com dois isolados, os outros isolados não são classificados como sendo relacionados segundo os testes. Portanto, teríamos 11 isolados geneticamente distintos para essa mutação.

Quatro isolados que apresentam a mutação no códon 88 do gene *rpsL* e na posição 491 do gene *rrs* foram classificados como pertencentes a um único grupo pelas técnicas de genotipagem; o mesmo ocorreu com os isolados com as mutações 81 (CTG-TTG) L-L e 905 A- G e 516 C→ T, onde as técnicas de *spoligotyping* e o DRE-PCR mostraram haver apenas um grupo entre os isolados possuidores da mesma mutação, logo, classificaram esses isolados como sendo clones. Uma possível interpretação para a existência e distribuição desses clones nas cepas resistentes à estreptomicina seria que pacientes que possuem cepas resistentes a drogas são mais difíceis de serem curados e, logo, contaminam mais pessoas (Krüüner *et al*, 2001).

Para os isolados que apresentaram muitas mutações, as técnicas de *spoligotyping* e DRE-PCR repartiram os nove isolados em um grupo com sete isolados que possuíam as mesmas mutações identificadas pelo seqüenciamento; e dois isolados ficaram separados, não formando nenhum grupo, esses também foram considerados geneticamente distintos pelo seqüenciamento.

#### **4.7. Comparação entre Concentração Mínima Inibitória e mutações**

O principal objetivo deste trabalho foi comparar a CMI em condições de diferentes tratamentos (presença e ausência de inibição do sistema de efluxo) e os resultados obtidos com o seqüenciamento de regiões dos genes *rpsL* e *rrs* relacionados com a resistência à estreptomicina. Na tabela apresentada no anexo 1 encontram-se todos os isolados com seus valores de CMI e os dados do seqüenciamento.

##### **4.7.1. CMI e a presença ou ausência de mutações**

Sabe-se que as alterações genéticas em genes alvo dos fármacos (*rpsL* e *rrs*, no caso da estreptomicina) causam resistência às drogas adquirida pelo *M. tuberculosis*. Foram encontrados neste trabalho 43 isolados com mutação em *rpsL* ou em *rrs* ou em ambos os genes. Todos os isolados com até duas mutações identificadas, ao todo são 34

isolados, são considerados resistentes pela CMI. Existe entre os isolados com mutações identificadas um grupo que possui muitas mutações, ao todo são 9 isolados, e destes 3 apresentam um baixo nível de resistência à estreptomicina e 6 isolados são considerados sensíveis pelo CMI.

Existem isolados com uma taxa elevada de mutação espontânea, apresentando inúmeras mutações, e sendo considerados sensíveis ou com uma resistência em baixo nível à estreptomicina pelo CMI (tabela 14) e sem ser classificados como sendo da família Beijing, segundo a técnica de *spoligotyping* (ver anexo 2).

**Tabela 14: CMI dos isolados com muitas mutações. SM= estreptomicina; ver= verapamil. \* ver tabela 10**

isolados	C SM	M SM/ver	I SM/CCCP	seqüenciamento
41075	8	8	8	muitas mutações*
4809	8	8	8	muitas mutações*
41097	4	4	4	muitas mutações*
5029	2	2	2	muitas mutações*
41069	2	2	2	muitas mutações*
124/93	2	2	2	muitas mutações*
5312	15,6	8	15,6	muitas mutações*
41071	4	2	2	muitas mutações*
5056	2	1	1	muitas mutações/461 C→T*

Esses isolados que apresentam inúmeras mutações não foram capazes de tornarem-se altamente resistentes às drogas. Eles apresentam, na sua maioria, mutações silenciosas: de 19 -22 mutações no gene *rpsL* e apenas duas delas provocam troca de aminoácido na cadeia polipeptídica, em outro isolado de 14 mutações apenas 1 troca aminoácido e mais uma mutação ocorre no gene *rrs*.

A mutação no gene *rrs* que ocorre na cepa 5056 na posição 461 C→T, segundo Brzostek *et al* (2004), provavelmente não é associada com a resistência, e sim é um polimorfismo natural que não é responsável pela resistência a estreptomicina. Assim como outro polimorfismo 491 C→T, é encontrado em isolados sensíveis à estreptomicina e não provoca resistência às drogas (Ramaswamy *et al*, 2004; Victor *et al*, 2001).

As mutações silenciosas que ocorrem em *rpsL*, podem não estar envolvidas com a resistência a estreptomicina (Brzostek *et al*, 2004).

Já as mutações identificadas, que causam a troca de aminoácido, curiosamente, não estão entre as mutações consideradas por muitos autores como sendo as mais comuns e associadas com a alta resistência às drogas (como as nos códons 43 e 88), e ainda não foram descritas como determinantes da resistência à estreptomicina.

Werngren & Hoffner (2003) afirmam que um aumento na taxa de mutações espontâneas não é responsável pela associação do genótipo Beijing com a resistência a múltiplas drogas, ou seja, um aumento na taxa de mutações espontâneas não aumenta a habilidade dos isolados em adquirir resistência às drogas.

Segundo Carter *et al* (2000) mutações em S12 (*rpsL*) podem levar a um fenótipo de hiperacurácia e um fenótipo fraco (frequentemente resultado de inúmeras mutações) leva a dependência a estreptomicina. Nos mutantes dependentes da estreptomicina a fase *ram* (*ribosomal ambiguity*, esquemas de pareamento alternativos durante a translação ou *error-prone*) está extremamente desestabilizada e a estreptomicina pode ajudar a estabilizar essa fase e a restaurar tradução.

Brzostek *et al* (2004) encontrou dois isolados que possuíam múltiplas mutações nos genes *rpsL* e *rrs* (citado anteriormente) e, provavelmente, segundo o autor, essas mutações representem variações polimórficas e não estejam associadas com a resistência às drogas.

Dentre os isolados resistentes à estreptomicina, um grupo em especial merece atenção, pois apresenta uma mutação silenciosa no códon 81 (CTG – TTG) mantendo o aminoácido leucina (L). Os isolados que a possuem são resistentes à estreptomicina, e todos também têm uma outra mutação no gene *rrs* (905 A → G), e se essa mutação sozinha pode causar resistência, torna-se complexa a avaliação nesses isolados. Alguns autores já encontraram mutações silenciosas em códons do gene *rpsL* : Brzostek *et al* (2004) encontraram uma mutação no códon 98 ( ATC → ATT; Ile → Ile) e classificaram esses isolados como possuindo alto nível de resistência à estreptomicina; Siddiqi *et al* (2002) acharam uma mutação no códon 121 (AAA → AAG; Lys → Lys) em 8 isolados e também os consideraram como resistentes a estreptomicina. Talvez, nesse caso, a base molecular causadora dessa resistência possa ser outra.

Dos 36 isolados sem mutação identificados pelo seqüenciamento, apenas 3 foram considerados resistentes pela CMI, os outros foram considerados sensíveis pelo teste.

Méier *et al* (1996), afirmam que diferentes resultados de CMIs são associados a isolados com alteração genética idêntica. Mas mesmo assim, Podemos separar os isolados em grupos de acordo com o resultado obtido na CMI (somente meio de cultura) e as mutações encontradas nos genes *rpsL* e *rrs* (Coll, 2003, Méier *et al*, 1996, Tracevska *et al*, 2004).

Neste trabalho esses elementos puderam ser observados, já que 19 isolados possuíam somente mutação em *rpsL* e seus CMIs eram todos acima de 250µg/ml (valor máximo testado), com a exceção de um com CMI de 125µg/ml. Haviam sete isolados com mutação concomitante nos dois genes, e seus CMIs eram acima de 250 µg/ml em quatro isolados, de 250 µg/ml em um, 125 em mais um e de 62,5 µg/m em um isolado. Oito isolados possuíam mutações em *rrs*, destes 3 possuíam CMIs acima de 250 µg/ml, um possuíam CMI de 62,5 µg/ml, dois de 31,25 µg/ml e dois de 15,6 µg/ml. Haviam três isolados resistentes a estreptomicina que não possuíam mutação em nenhum dos genes seqüenciados neste trabalho. Nove isolados possuíam muitas mutações e seis são sensíveis à estreptomicina, sendo três resistentes em baixo nível.

Podemos observar a existência de três isolados que não possuíam alterações genéticas em *rpsL* e *rrs* (tabela 15), dois deles considerados resistentes pelo método das proporções (RS-0004-SP e F506) e todos considerados resistentes pela CMI somente com meio e estreptomicina.

Nesses isolados, na presença do CCCP, não foi observada uma diminuição da resistência, mas quando foi adicionado o verapamil ao meio, a CMI dos isolados diminuiu. Logo, pode-se inferir que essa substância estaria inibindo a ação de bombas que fazem extrusão de estreptomicina.

No ensaio sem o inibidor, a bomba de efluxo estaria causando à saída da estreptomicina da célula e possibilitando a bactéria a sobreviver em concentrações extracelulares maiores da droga em questão.

O CCCP atua bloqueando somente as bombas de efluxo movidas pela força do próton-motor. Logo, se ele não foi capaz de diminuir a resistência, possivelmente as bombas que utilizam a energia do próton-motor (famílias MFS, SMR, RND e MATE) não

estejam, neste momento, transportando drogas ou, quiçá, elas não estejam superexpressadas nesses isolados. Possivelmente esteja sendo utilizado por essas cepas o ATP como doador de energia para a movimentação das bombas de efluxo.

Análises do genoma de *M. tuberculosis* e pesquisas de homologia de bombas de efluxo presentes em outros organismos revelaram a presença de pelo menos 26 transportadores da família ABC que ocupam uma porcentagem significativa do genoma deste organismo (Braibant *et al*, 2000).

**Tabela 15: Isolados sem mutação nos genes *rpsL* e *rrs* porém resistentes a estreptomicina pela CMI.**

		C	M	I	
Método					
Isolado	Proporções	SM	SM/ver	SM/cccp	sequenciamento
RS-00004-SP	R	62,5	8	62,5	sem mutação
F506	R	31,25	8	31,25	sem mutação
MA7	S	15,6	2	15,6	sem mutação

Como pode ser visto, em geral, as bombas de efluxo de drogas conferem baixos níveis de resistência, em contraste com os altos níveis de resistência conferidos por mutações em genes que codificam os alvos primários desses agentes. (De Rossi *et al.*, 2002).

#### 4.7.2. Diminuição do efluxo e as mutações

Dos 41 isolados que não diminuíram a CMI na presença de inibidor, 28 (68%) deles possuíam mutações nos genes caracterizados como de resistência à estreptomicina. E 13 (32%) dos isolados não possuíam mutações nesses mesmos genes.

Dos 38 isolados que diminuíram a CMI na presença de inibidor, 15 (39%) deles possuíam mutações nos genes *rpsL* e *rrs* e 23 (61%) não possuíam mutações nesses genes (tabela 16).

**Tabela 16: Comparação entre a presença ou ausência de mutações e o resultado da CMI.**

	Isolados que NÃO diminuíram a CMI na presença de inibidor	Isolados que diminuíram a CMI na presença de inibidor
Mutados	28 (68%)	15 (39%)
Não-mutados	13 (32%)	23 (61%)
Total	41	38

Pode-se observar que a diminuição da CMI na presença de inibidores do sistema de efluxo ocorre mais em isolados sem alterações genéticas. Geralmente os isolados com alterações genéticas são altamente resistentes e não parecem possuir um mecanismo de efluxo atuante.

Dos 19 isolados com altos níveis de resistência que possuíam mutação no códon 43 do gene *rpsL* apenas 1 diminuiu a CMI na presença de inibidores, os que tinham mutação no códon 81 (CTG- TTG) L- L e 905 A→ G, nenhum diminuiu a CMI na presença desses inibidores. Já os que tinham mutação em 88 (AAG- CAG) K-Q e 491 C→ T , 513 A→C e 513 A→T, todos diminuíram a CMI na presença de inibidores.

Lomovskaya *et al* (1999) descrevem para *Pseudomonas aeruginosa* que a deleção dos genes que codificam bombas de efluxo aumenta a susceptibilidade a fluoroquinolonas até mesmo em isolados contendo mutações em genes que codificam alvos das fluoroquinolonas como *gyrAB* e *parCE* e que seria esperado que inibidores de bombas de efluxo tenham o mesmo efeito.

Na verdade, o fato de possuir essas bombas de efluxo confere à bactéria um mecanismo intrínseco que favorece a sobrevivência em um ambiente como, por exemplo, a presença de antibióticos e as bactérias capazes de superexpressar essas bombas de efluxo poderiam ser selecionadas sem a aquisição de novo material genético. Isso pode estar ocorrendo com esses isolados sem mutação nos genes de resistência a estreptomicina, mas que possuem um mecanismo de efluxo atuante (verificado pela diminuição da CMI quando adicionado um inibidor do sistema de efluxo).

E vários autores identificaram que posteriormente essa bactéria conseguiria sobreviver até que sejam selecionadas mutantes com alterações moleculares que podem

determinar níveis de resistência clinicamente significativos. (Webber & Piddock, 2003; Nikaido, 1998; Martinez & Baquero, 2000). Como pode ter sido o que já ocorreu com os isolados que possuem mutação e mesmo assim conservam o mecanismo de efluxo agindo, esses isolados só conseguiram sobreviver e desenvolver até ser alcançada e depois selecionada essa mutação graças ao sistema de efluxo atuante.

Após esse evento evolutivo a bactéria continuaria com os dois mecanismos que a ajudam a sobreviver em ambientes com presença de antibióticos. Esse mecanismo pode ser evidenciado em isolados resistentes e sensíveis, com e sem alteração genética. Como pode ser evidenciado neste trabalho ao ser adicionado ao meio um inibidor de bombas de efluxo.

Corroborando com o que foi anteriormente exposto, Lomovskaya *et al* (2001) confirmaram que a inibição de bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa* pode significativamente melhorar o desempenho clínico das fluoroquinolonas. É esperado que a inibição de bombas de efluxo: (i) diminua o nível da resistência intrínseca; (ii) reverta resistência adquirida significativamente; e (iii) diminua a frequência de emergência de mutantes altamente resistentes.

#### **4.7.3. Análise estatística**

Para a análise estatística foi feito o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (dados não apresentaram distribuição normal) para comparar os tipos de tratamento (somente meio de cultura, meio+ verapamil e meio + CCCP). O teste foi aplicado em três tipos de grupos distintos: todos os isolados estudados, somente os isolados que apresentaram mutações e somente os que não apresentaram mutações, estes últimos com o objetivo de verificar a contribuição da presença ou ausência das mutações no resultado da diminuição da CMI pelos inibidores do sistema de efluxo.

Todos os testes tiveram significância estatística (valor de  $p < 0,001$ ), conclui-se então que existe diferença entre os tratamentos, mas não se sabe quais deles diferem. Então para que as diferenças entre os grupos fossem identificadas, os tratamentos foram testados dois a dois e, para isso, foi realizado o teste de Qui-Quadrado.

Todos os valores de  $p$  obtidos foram de  $p < 0,001$  (exceção dos isolados sem mutações no seguinte tratamento: smr x smr/ver  $p < 0,005$ ), em todos os testes o valor  $p$  apresentou significância estatística.

Com isso conclui-se que os inibidores do sistema de efluxo (verapamil e CCCP) realmente causaram uma diminuição da CMI identificável estatisticamente, tanto nos isolados que possuíam mutações quanto nos que não as possuíam.



## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem conhecer um pouco melhor o mecanismo de resistência da estreptomicina em *M. tuberculosis*. Os achados em relação ao sistema de efluxo indicam que ele pode atuar tanto em cepas clinicamente resistentes ou sensíveis, mutadas ou não mutadas e que em torno de 48% dos isolados apresentam esse mecanismo atuante e que ele poderia ser atenuado com a presença de um inibidor do sistema de efluxo.

O uso de inibidores de efluxo, tais como o verapamil e o CCCP, permite uma avaliação indireta da relação do efluxo com a resistência, que mesmo sem identificar as bombas envolvidas sinaliza para a relação deste mecanismo com a resistência.

Nesse trabalho foram encontrados isolados resistentes à estreptomicina sem alterações nos genes considerados como de resistência, onde, na presença de inibidores do sistema de efluxo a resistência foi diminuída, podendo aqui o mecanismo de efluxo ser o responsável pela resistência.

Este estudo colaborou para caracterizar novas mutações que podem estar envolvidas na resistência a estreptomicina, como também caracterizar mutações que podem não estar envolvidas nesta resistência. Dessa forma podendo auxiliar no diagnóstico da resistência micobacteriana.

Os achados em relação aos isolados resistentes à estreptomicina demonstram que as mutações que ocorrem são exclusivamente de troca de bases, como já havia sido descrito na literatura. E que existem isolados que possuem muitas mutações e não pertencem à família Beijing e apresentam fenótipo de baixa resistência ou sensibilidade a estreptomicina. Podemos concluir, com isso, que nem sempre um aumento na taxa de mutações espontâneas aumenta a habilidade dos isolados em adquirir resistência às drogas.

Nesse caso, seria interessante continuar essa linha de pesquisa para avaliar se os isolados que possuem inúmeras mutações nos genes *rpsL* e *rrs* também as possuem em outros genes de resistência a outras drogas utilizadas no tratamento da tuberculose, como, por exemplo: Isoniazida e *katG*, *inhA* e *ndh*; Rifampicina e *rpoB*; Pirazinamida e *pncA*. Ou até mesmo seqüenciar os genes *mut*, que são genes envolvidos no reparo de mutações no DNA que quando alterados resultam em um aumento na frequência de mutações.

A continuação da linha de pesquisa iniciada neste trabalho é importante, pois é interessante conhecer também o *fitness* desses isolados, principalmente os que possuem

muitos clones e também dos que possuem alta resistência à estreptomicina, especialmente quando se fala da mutação no códon 43 onde já foi descrito como aumentado o *fitness* de outros gêneros bacterianos. Bem como, estudar a expressão e identificação das bombas de efluxo que foram caracterizadas indiretamente aqui.

A partir dos resultados deste trabalho pode-se entender melhor os mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *M. tuberculosis*, sendo o efluxo um deles. Esse conhecimento pode auxiliar o desenvolvimento de novos fármacos capazes de superar este mecanismo de resistência, atuando como antimicrobiano *per se* ou como inibidor da resistência, agindo, desta forma, como um adjuvante dos antimicrobianos disponíveis.

O monitoramento das alterações que ocorrem nos isolados de *M. tuberculosis* resistentes é de grande importância para um laboratório que segue uma linha de pesquisa em resistência micobacteriana, pois permite avaliar novos alvos dos fármacos, consequentemente auxiliando para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e no controle da TB.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aínsa J A, Martin C, Gicquel B (2001) Molecular approaches to tuberculosis. *Mol Microbiol* 42 (2): 561-570.

Aínsa J A, Blokpoel M C J, Otal I, Young D B, De Smet K A L, Martin C (1998) Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 180 (22): 5836-5843.

Banerjee S K, Bhatt K, Rana S, Misra P, Chakraborti P K (1996) Involvement of an efflux system in mediating high level of Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 362-368.

Banfi E, Scialino G, Monti-Bragadin C (2003) Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 52: 796-800.

Beck R W (2000) A chronology of microbiology. ASM, Washington, DC.

Bloom B R and Murray C J (1992) Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257:1055-1064.

Braibant M, Gilot P, Content J (2000) The ATP binding cassette(ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev* 24: 449-467.

BRASIL (2002) Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª edição. Rio de Janeiro, FUNASA/CRPHF/SNPT.

BRASIL (2006) [www.who.int/tb/publication/global\\_report/2006/pdf/bra.pdf](http://www.who.int/tb/publication/global_report/2006/pdf/bra.pdf) (02 de outubro de 2006).

Bruce A, Bray D, Lewis J, Ralf M, Roberts K, Watson J (1997). *Biologia Molecular da Célula*. 3ª ED. Artes Médicas, Porto Alegre.

Brzostek A, Sajduda A, Sliwinski T, Augustynowicz-Kopéc E, Jaworski A, Zowolska Z, Dziadek J (2004) Molecular characterisation of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain isolated in Poland. *Int J Tuberc Lung Dis* (8): 1032-1035.

Cafrune P I (2003) *Epidemiologia Molecular da Tuberculose no Interior do Rio Grande do Sul*. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular.

Carter A P, Clemons W M, Brodersen D E, Morgan-Warren R J, Wimberly B T, Ramakrishnan V (2000) Functional Insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407: 340-348.

Choudhuri B S, Sen S, Chakrabarti P (1999) Isoniazid accumulation in *Mycobacterium smegmatis* is modulated by proton motive force-driven and ATP-dependent extrusion systems. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 682-684.

Choudhuri B S, Bhakta S, Barik R, Basu J, Kundu M, Chakrabarti P (2002) Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP binding cassette) transporter encoded by the genes *drvA* and *drvB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* 367:279-285.

Clark G (1962) *World Prehistory*. Cambridge University Press, Cambridge.

Cole S T, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S V, Eiglmeier K, Gas S, Barry III C E, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail M A, Rajandream M A, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston J E, Taylor K, Whitehead S, Barrell B G (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393 (1): 537-544.

Cole S T and Telenti A (1995) Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J Suppl* 20: 701s-713s.

Cole S T (2002) Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 148: 2919-2928.

Coll P (2003) Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21 (6): 299-308.

Daniel T M, Bates J H, Downes K A (1994) History of tuberculosis. In B. R. Bloom [ed]: 13-14.

Daniel T M (2000) The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: Can we figure them out? *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 395-400.

Daniel T M (2006) The history of tuberculosis. *Respir Med* 100(11):1862-1870.

De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni, Silva P E A, Martin C, Aínsa J A, Gugliera P, Riccardi G (2002) The multidrug transporters belonging to major facilitator Superfamily (MFS) in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med* 8 (11): 714-724.

De Rossi E, Aínsa J A, Riccardi G (2006) Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* 30: 36-52.

Díaz P S (2003) Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap* 16 (2): 172-187.

Espinal M A, Laserson K, Camacho M, Fuscheng Z, Kim S J, Tlali E, Smith I, Suarez P, Antunes M L, George A G, Martin-Casabona N, Simelane P, Weyer K, Binkin N, Raviglione M C (2001) Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. *Int J Tuberc Lung Dis* 5 (10):887-893.

Finken M, Krischner P, Meier A, Wrede A, Bottger E C (1993) Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* 9: 1239-1246.

Flynn J L and Chan J (2005) What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol* 13 (3): 98-102.

Friedman C R, Stoeckle M Y, Johnson Jr W D, Riley L W (1995) Double-repetitive-element PCR method for subtyping *M. tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 33:1383-1384.

Fukuda M, Koda H, Ohno H, Yang B, Hirakata Y, Maesaki S, Tomono K, Tashiro T, Kohno S (1999) Relationship between genetic alteration of the *rpsL* gene and streptomycin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Antimicrob Chemother* 43, 281-284.

Gillespie H S (2002) Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2): 267-274.

Gomez i Prat J and Mendonça de Souza S M F (2003) Prehistoric Tuberculosis in América: Ading Coments to a literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (1) 151-159.

Henderson P J F, Hoyle C K, Ward A (2000) Expression, purification and properties of multidrug efflux proteins. *Biochem Soc Trans* 28 (4): 513-517.

Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, Jacobs Jr W R, van Embden J D A, Grosset J H, Cole S T (1994) Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: A molecular study. *Lancet* 344: 293-298.

Honoré N and Cole S T (1994) Streptomycin resistance in *Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother* 38 (2): 238-242.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Sooligen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J D A (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 35: 907-914.

Kaufmann S H E (2003) A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis* 83: 86-90.

Krüüner A, Hoffner S E, Sillastu H, Danilovits M, Levina K, Svenson S B, Ghebremichael S, Koivula T, Källenius G (2001) Spread of Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis in Estonia. *J of Clinical Microbiology* 39 (9): 3339-3345.

Levy S B (1992) Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 36 (4): 695-703.

Lomovskaya O and Watkins W (2001) Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3(2): 225-236.

Lomovskaya O, Warren M S, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee V J (2001) Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45:105-116.

Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren M S, Boyer E, Chamberland S, Lee V J (1999) Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1340-1346.

Markham P N (1999) Inhibition of the Emergence of Ciprofloxacin Resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the Multidrug Efflux Inhibitor Reserpine. *Antimicrob Agents Chemother* 43 (4): 988-989.

Markham P N and Neyfakh A (1996) Inhibition of the Multidrug Transporter NorA Prevents emergence of Norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 40 (11): 2673-2674.

Marquez B (2005) Bacterial efflux and efflux pumps inhibitors. *Biochimie* 87: 1137-1147.

Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino J C (2003) Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. *Antimicrob Agents Chemother*, Nov: 3616–3619

Martinez J L and Baquero F (2000) Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (7): 1771–1777.

McKeegan KS, Borges-Walmsley M I, Walmsley A R (2002) Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends Microbiol* 10(10 Suppl):S8-14.

Méier A, Kirschner P, Bange F C, Vogel U, Böttger E C (1994) Genetic alterations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38 (2): 228-233.

Meier A, Sander P, Schaper K J, Böttger E C (1996) Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 40 ( 11): 2452-2454.

Mingeot-Leclercq M P, Glupczynski Y, Tulkens P M (1999) Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* Apr: 727-737.

Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino J C (2005) Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 55: 500–505.

Morris S, Bai G H, Suffys P, Portillo-Gomez L, Fairchok M, Rouse D (1995) Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Disease* 171: 954-960.

Neisseria MLST home page: <http://pubmlst.org/neisseria/mlst-info/nmeningitids/pcr.shtml>, (15 de dezembro de 2006).

Nikaido H (1998) Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr Opin Microbiol* 1: 516-523.

Nikaido H (2001) Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Cell Dev Biol* 12: 215-223.

Onyebujoh P and Rook G A W (2004) Tuberculosis. *Nature reviews/microbiologia*. Vol 2: 930-932.

Palomino J C, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F (2002) Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (8): 2720-2722.

Pasca M R, Gugliera P, Arcesi F, Bellinzoni, De Rossi E, Riccardi G (2004) Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, na ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (8): 3175-3178.

Pasca M R, Gugliera P, De Rossi E, Zara F, Riccardi G (2005) *mmpL7* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Is Responsible for Isoniazid Efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (11): 4775-4777.

Paulsen I (2003) Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr Opin Microbiol* 6: 446-451.

Petrini B and Hoffner S (1999) Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. *Int J Antimicrob Agents* 13: 93-97.

Piddock L J V, Williams K J, Ricci V (2000) Accumulation of rifampicin by *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 45: 159-165.

Piddock L J and Ricci V (2001) Accumulation of five fluoroquinolones by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. J Antimicrob Chemother 48: 787-791.

Poole K (2000) Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and Mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 44 (10): 2597-2599.

Rad M E, Bifani P, Martin C, Kremer K, Samper S, Rauzier J, Kreiswirth B, Blazquez J, Jouan M, van Soolingen D, Gicquel B (2003) Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. Emerg Infect Dis 9(7): 838 - 845.

Ramaswamy S V, Dou S, Rendon A, Yang Z, Cave M D, Graviss E A (2004) Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. J Med Microbiol 53: 107-113.

Raviglione M C, Dye C, Schmidt S, Kochi A (1997) Assessment of worldwide tuberculosis control. Lancet 350: 624-629.

Raviglione M C (2003) The TB epidemic from 1992 to 2002. Tuberculosis 83: 4-14.

Rede TB (<http://www.redetb.usp.br/index2p.htm>), acessado dia 10/10/06.

Riska P F, Jacobs W R, Alland D (2000) Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. Int Tuberc Lung Dis 4(2): 54-60.

Rossetti M L R, Valim A R M, Silva M S N, Rodrigues V S (2002) Tuberculose resistente: revisão molecular. Rev Saúde Pública 36 (4): 525-532.

Ruffino-Netto A (2002) Tuberculose: a calamidade negligenciada. Rev Soc Bras Med Trop 35 (1): 51-58.

Ruiz P, Rodríguez-Cano F, Zerolo F J, Casal M (2002) La estreptomicina como fármaco de segunda línea em la quimioterapia de la tuberculosis. Rev Esp Quimioterap 16 (.2): 188-194.

Saier M H, Paulsen I T, Sliwinski M K, Pao S S, Skurray R A, Nikaido H (1998) Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. FASEB J 12: 265-274.

Salo W L, Aufderheide A C, Buikstra J, Holcomb T A 1994 Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. Proc Natl Acad Sci USA 91: 2091-2094.



Sander P and Böttger E C (1999) Mycobacteria: Genetics of resistance and implications for treatment. *Chemotherapy* 45: 95-108.

Scorpio A, Collins D M, Whipple D, Cave D Bates J, Zhang Y (1997) Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J Clin Microbiol* 32: 106-110.

Siddiqi N, Shamim M, Hussain S, Choudhary R K, Ahmed N, Prachee, Banerjee S, Savithri G R, Alam M, Pathak N, Amin A, HAnief M, Katoch V M, Sharma S K, Hasnain S E (2002) Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in North India. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2): 443-450.

Siddiqi N, Das R, Pathak N, Banerjee S, Ahmed N, Katoch V M, Hasnain S E (2004) *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. *Infection* 32: 109-111.

Silva P E A, Bigi F, Santangelo M P, Romano M I, Martín C, Cataldi A, Aínsa J A (2001) Characterization of P55, a Multidrug Efflux Pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (3): 800-804.

Silva P E A, Montañes C M, Aínsa J A (2003) Tuberculose: história e perspectivas atuais. *Vitalle* 15(1): 71-78.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer K, Willaims D L, Kreiswirth B N, Musser J M (1996) Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother* 40 (4): 1024-1026.

Takiff H E, Cimino M, Weisbrod T, Martinez R, Delgado M B, Salazar L, Bloom B R, Jacobs W R (1996) Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 93: 362- 366.

Taylor G, Goyal M, Legge A J, Shaw R J, Young D (1999) Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from medieval human remains. *Microbiology* 145 (4): 899-904.

Taylor G M, Stewart G R, Cooke M, Chaplin S, Ladva S, Kirkup J, Palmer S, Young D B (2003) Koch's Bacillus – a look at the first isolate o *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology* 149: 3213–3220.

Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, Marga O, Skenders G, Baumanis V (2004) Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 155: 830-834.

Van Soolingen D, De Hass P E W, Hermans P W M, Van Embden J D A (1994) DNA Fingerprinting of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Methods Enzymol* 235:196-204.

Verapamil (<http://www.drugs.com/verapamil.html>), (1 de outubro de 2006).

Victor T C, van Rie A, Jordaan A M, Richardson M, van der Spuy G D, Beyers N, van Helden P, Warren R (2001) Sequence polymorphism in deeply rooted within an evolutionary clad and is not associated with streptomycin resistance. *J Clin Microbiol* 39(11): 4184-4186.

Viveiros M, Portugal I, Bettencourt R, Victor T C, Jordaan A M, Leandro C, Ordway D, Amaral L (2002) Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2804–2810.

Viveiros M, Leandro C, Amaral L (2003) Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int J Antimicrob Agents* 22: 274-278.

Webber M A and Piddock L J (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 51: 9-11.

Werngren J and Hoffner E S (2003). Drug-Susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate. *J Clin Microbiol* 41: 1520-1524.

WHO. World Health Organization (1997) Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1994-1997. (WHO/TB/97.229). Geneva, Switzerland.

WHO. World Health Organization. (2002) [http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF\\_Files/BR\\_2002\\_Detailed.pdf](http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/BR_2002_Detailed.pdf). ( 28 de julho de 2005).

WHO. World Health Organization. (2003) [http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF\\_Files/BR\\_2003\\_Brief.pdf](http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/BR_2003_Brief.pdf). (28 de julho de 2005).

WHO. World Health Organization (2004A). [www.who.int/globalatlas/predefinedreports/tb/pdf\\_files\\_2002\\_detailed.pdf](http://www.who.int/globalatlas/predefinedreports/tb/pdf_files_2002_detailed.pdf). ( 28 de julho de 2005).

WHO. World Health Organization (2004B). [www.who.int/globalatlas/predefinedreports/tb/pdf\\_files\\_2003\\_brief.pdf](http://www.who.int/globalatlas/predefinedreports/tb/pdf_files_2003_brief.pdf). ( 28 de julho de 2005).

Zhang Y and Telenti A (2000) Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington D.C.

Zhang Y (2005) The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 529-564.

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1

Tabela com todos os resultados de CMI e seqüenciamento obtidos no estudo. A tabela encontra-se dividida entre os isolados que diminuíram a CMI na presença de inibidores do sistema de efluxo e os isolados onde não foi observada essa diminuição.

Legenda: BEL = Bélgica, POA = LACEN-Porto Alegre, RG = Rio Grande.

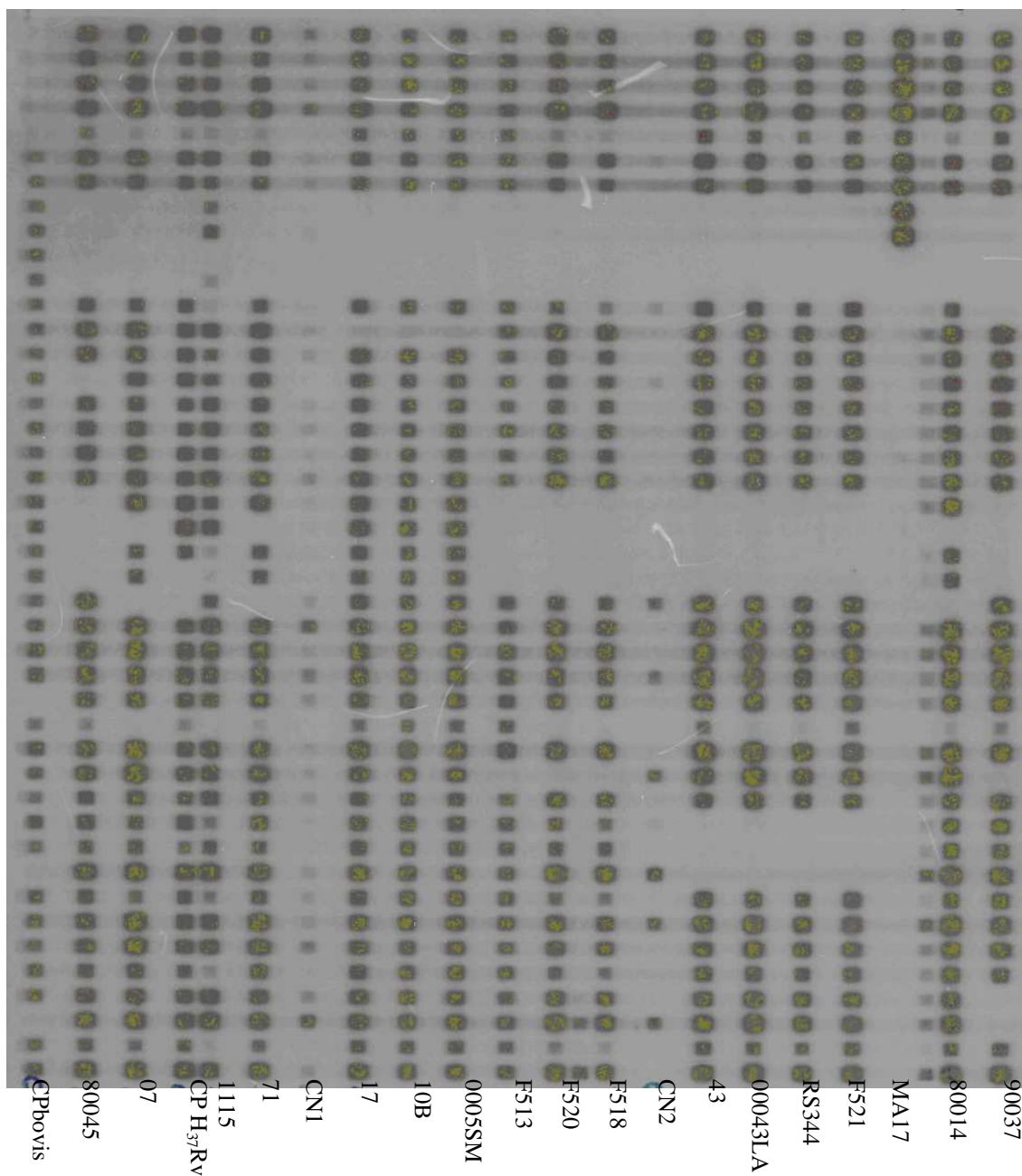
<b>Isolados que NÃO diminuíram a CMI na presença de inibidor</b>					
Cepas	origem	Sm	sm/ver	sm/cccp	seqüenciamento
7	POA	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG ) K-R
1115	POA	>250	>250	>250	43 (AAG-AGG) K-R
71	POA	>250	>250	>250	43 (AAG-AGG) K-R
MA9	BEL	>250	>250	>250	43 (AAG-AGG) K-R
MA10	BEL	>250	>250	>250	43 (AAG-AGG) K-R
F515	POA	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG) K-R
MA14	BEL	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG) K-R
02053-C	POA	>250	>250	>250	43 (AAG-AGG) K-R
RS-90245-LA	POA	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG) K-R
RS-355	POA	>250	>250	>250	43 (AAG-AGG) K-R
F508	POA	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG) K-R
F509	POA	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG) K-R
F522	POA	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG) K-R
F523	POA	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG) K-R
F524	POA	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG) K-R
F525	POA	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG) K-R
F512	POA	>250	>250	>250	43 (AAG – AGG) K-R
MA12	BEL	125	125	125	43 (AAG-AGG) K-R
0005-SM	POA	>250	>250	>250	81 (CTG-TTG) L-L e 905 A→ G
00010-B	POA	>250	>250	>250	81 (CTG-TTG) L-L e 905 A→ G
17	POA	125	125	125	81 (CTG-TTG) L-L e 905 A→ G
F520	POA	>250	>250	>250	516 C→ T
41075	POA	8	8	8	muitas mutações
4809	POA	8	8	8	muitas mutações
41097		4	4	4	muitas mutações
5029		2	2	2	muitas mutações
41069	POA	2	2	2	muitas mutações
124/93	RG	2	2	2	muitas mutações
F504	POA	8	8	8	sem mutação
F516	POA	4	4	4	sem mutação
4336	POA	2	2	2	sem mutação
1097	POA	2	2	2	sem mutação
RS-70484-LA	POA	2	2	2	sem mutação
F507	POA	2	2	2	sem mutação
162		1	1	1	sem mutação
259/99		1	1	1	sem mutação

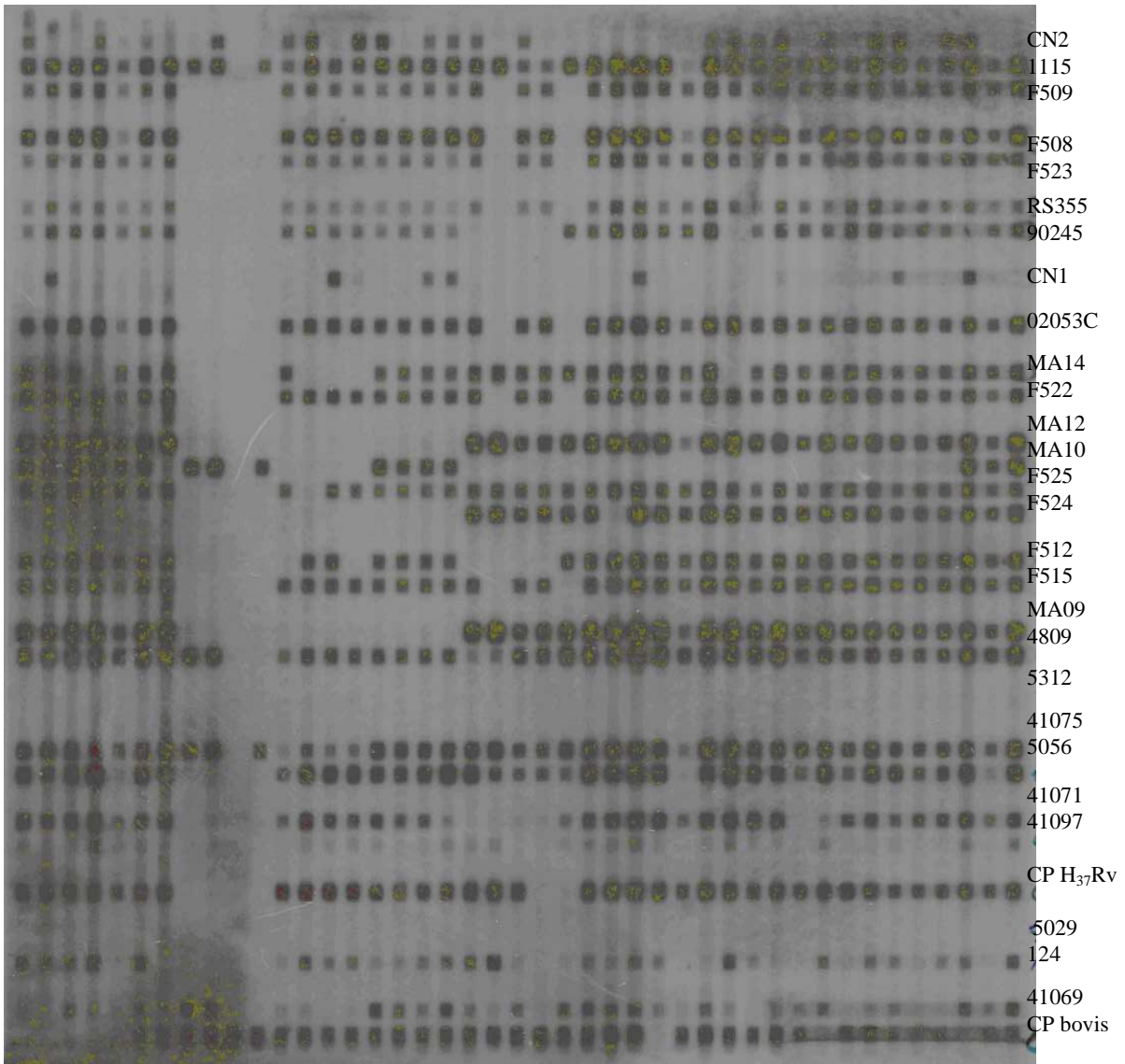
F510	POA	0,5	0,5	0,5	sem mutação
137	RG	<0,25	<0,25	<0,25	sem mutação
MA3	BEL	<0,25	<0,25	<0,25	sem mutação
464/00		<0,25	<0,25	<0,25	sem mutação
MA15	BEL	<0,25	<0,25	<0,25	sem mutação
<b>Isolados que diminuíram a CMI na presença de inibidor</b>					
cepas		sm	sm/ver	sm/cccp	Sequenciamento
RS-80045-SP	POA	>250	125	>250	43 (AAG-AGG) K-R
43	POA	>250	62,5	125	88 (AAG-CAG) K-Q e 491 C→T
RS-00043-LA	POA	>250	62,5	>250	88 (AAG-CAG) K-Q e 491 C→T
RS-344	POA	250	62,5	250	88 (AAG-CAG) K-Q e 491 C→T
F521	POA	62,5	31,25	62,5	88 (AAG-CAG) K-Q e 491 C→T
F518	POA	>250	62,5	>250	516 C→T
F513	POA	>250	62,5	>250	516 C→T
RS-80014-SM	POA	62,5	62,5	31,25	513 A→C
RS-90037-SP	POA	31,25	8	31,25	513 A→C
F505	POA	15,6	8	15,6	513 A→T
MA17	BEL	15,6	2	15,6	513 A → C
RS-350	POA	31,5	8	15,6	426 G→C
5312	POA	15,6	8	15,6	muitas mutações*
41071	POA	4	2	2	muitas mutações*
5056	POA	2	1	1	muitas mutações/461 C→T*
RS-00004-SP	POA	62,5	8	62,5	sem mutação
F506	POA	31,25	8	31,25	sem mutação
MA7	BEL	15,6	2	15,6	sem mutação
58	POA	8	8	4	sem mutação
MA8	BEL	8	4	4	sem mutação
MA11	BEL	8	2	8	sem mutação
03093-SP	POA	8	2	2	sem mutação
F517	POA	8	1	4	sem mutação
F519	POA	8	4	8	sem mutação
1001	POA	4	2	4	sem mutação
3	POA	4	<0,25	1	sem mutação
MA20	BEL	4	1	4	sem mutação
5338		4	2	4	sem mutação
MA5	BEL	4	1	4	sem mutação
MA13	BEL	4	1	4	sem mutação
RS-80034-SP	POA	2	1	2	sem mutação
RS-80360-LA	POA	2	0,5	2	sem mutação
MA4	BEL	2	0,5	2	sem mutação
MA16	BEL	2	0,5	2	sem mutação
RS-00059-LA	POA	2	1	2	sem mutação
F514	POA	2	0,5	0,5	sem mutação
MA6	BEL	1	0,5	1	sem mutação
20	POA	1	<0,25	1	sem mutação

## ANEXO 2

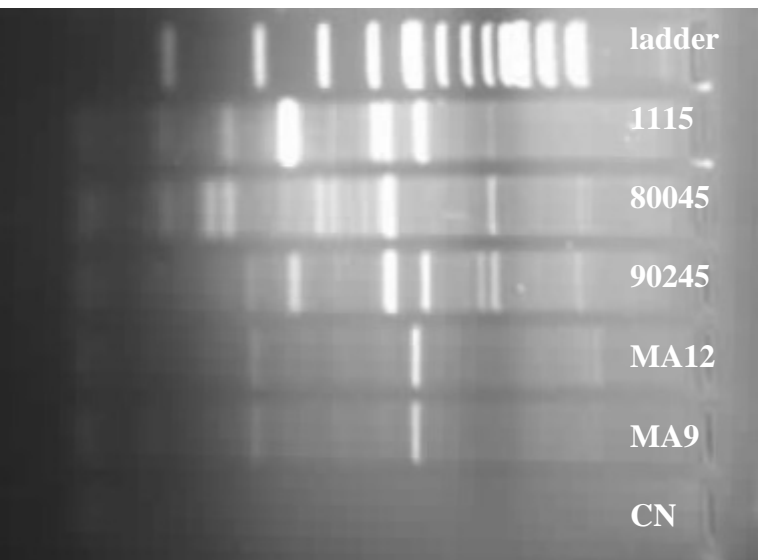
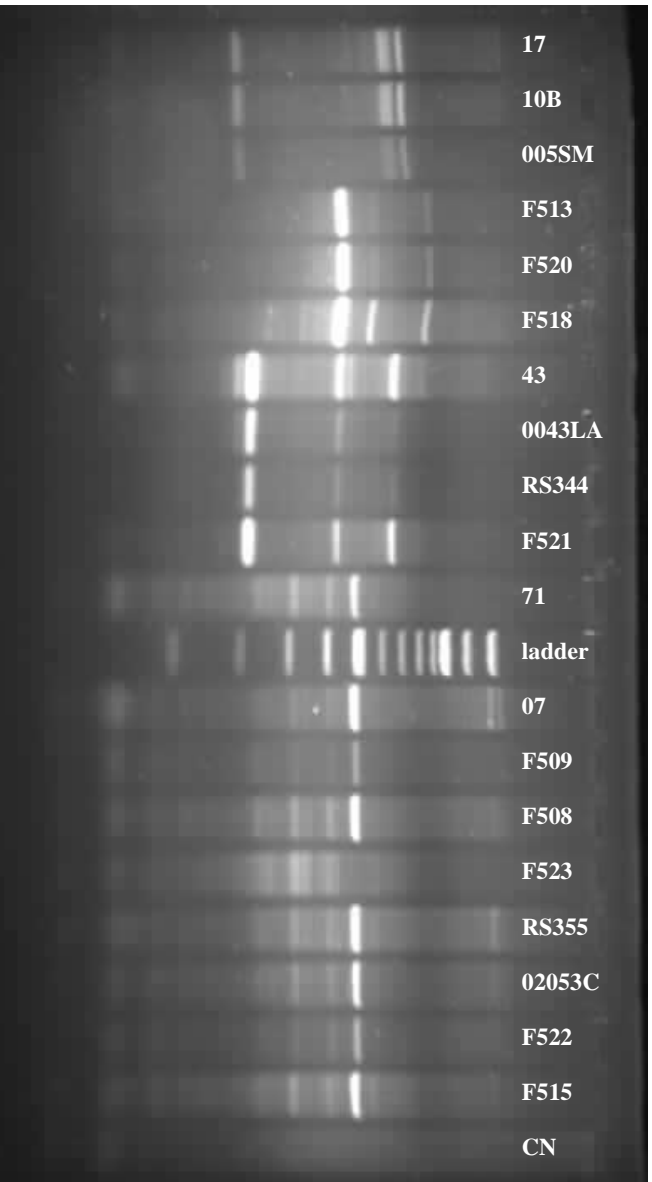
Genotipagem dos isolados, pelas técnicas de spoligotyping e DRE-PCR.

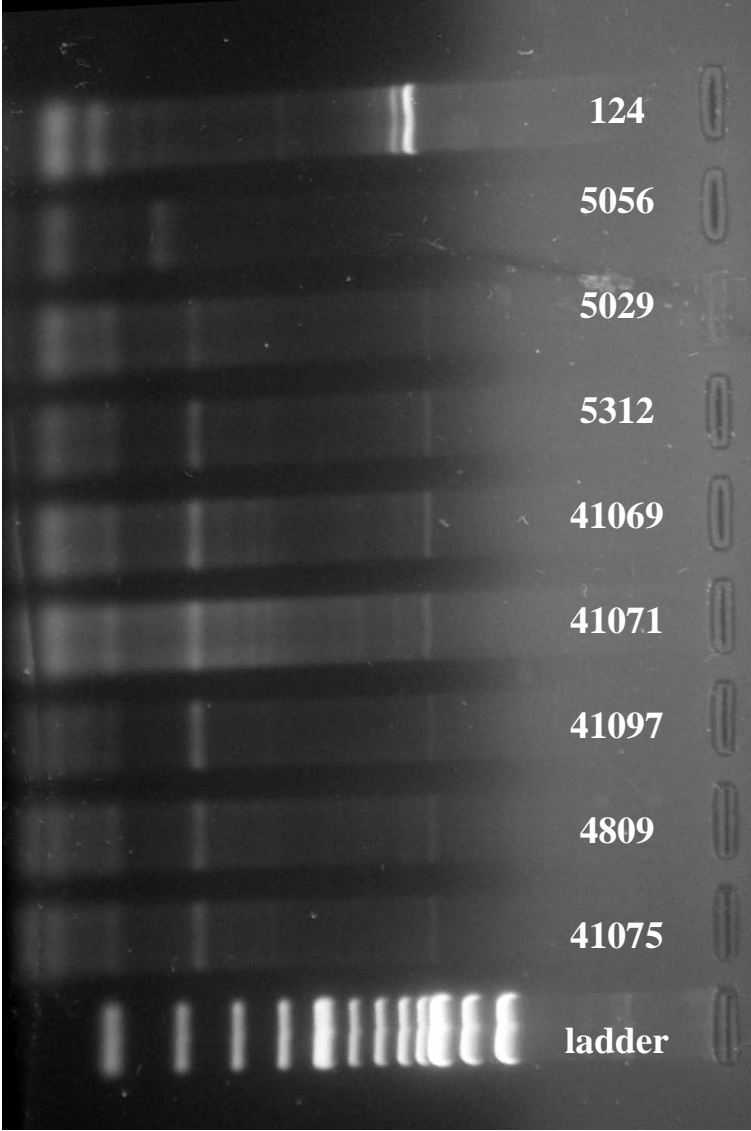
Membranas do *spoligotyping* dos isolados que possuíam as mesmas mutações e dos que apresentaram muitas mutações.





Géis do DRE-PCR dos isolados que apresentaram o mesmo perfil no *spoligotyping*.







### ANEXO 3

Lista dos aminoácidos e os códons no código genético. Adaptado de Bruce *et al*, 1997.

A	Ala	Alanina	GCA	GCC GCG GCU
C	Cys	Cisteína	UGC	UGU
D	Asp	Ácido Aspartico	GAC	GAU
E	Glu	Ácido Glutâmico	GAA	GAG
F	Phe	Fenilalanina	UUC	UUU
G	Gly	Glicina	GGA	GGC GGG GGU
H	His	Histidina	CAC	CAU
I	Ile	Isoleucina	AUA	AUC AUU
K	Lys	Lisina	AAA	AAG
L	Leu	Leucina	UUA	UUG CUA CUC CUG CUU
M	Met	Metionina	AUG	
N	Asn	Asparagina	AAC	AAU
P	Pro	Prolina	CCA	CCC CCG CCU
Q	Gln	Glutamina	CAA	CAG
R	Arg	Arginina	AGA	AGG CGA CGC CGG CGU
S	Ser	Serina	AGC	AGU UCA UCC UCG UCU
T	Thr	Treonina	ACA	ACC ACG ACU
V	Val	Valina	GUA	GUC GUG GUU
W	Trp	Triptofano	UGG	
Y	Tyr	Tirosina	UAC	UAU