

Márick Rodrigues Starick

Avaliação dos níveis transcricionais de genes codificantes para bombas de efluxo em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes ou não à isoniazida

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na área de concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Bazzo

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Starick, Márick Rodrigues

Avaliação dos níveis transcricionais de genes codificantes para bombas de efluxo em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes ou não à isoniazida / Márick Rodrigues Starick ; orientadora, Maria Luiza Bazzo, 2017.
131 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Bombas de Efluxo. 4. Expressão gênica. 5. Isoniazida. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Dedico este trabalho a todos aqueles que morreram e ainda morrem devido às insuficiências do SUS, em especial ao meu filho Kepler e meu avô José Geraldo. De maneira semelhante, dedico este trabalho às populações de baixa renda que sofrem com a ameaça da tuberculose, e aos meus avós Willibald e Ana (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

A Deus

A cada Starick que da terra ao livro me moldaram forte e insana, em especial ao meu pai Henrique, minha mãe Lucimar, minhas irmãs Mêrick, Milena e Morgana. Aos amigos distantes Liliane e Wosley. Aos amigos próximos, Marcos, Mariane, Fernanda, Felipe, Lisleia e Clarice. Ao Josué Jonas de Lima, pela dedicação, amizade, amor, aconselhamento, proteção, ensinamentos, pela consciência política e social, pela inspiração e pela paciência.

À professora Maria Luiza Bazzo, pela oportunidade de voltar à academia e por servir de inspiração aos que sonham alto; bem como ao Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia – LBMMS, Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Aos parceiros atuantes no desenvolvimento deste projeto, sem os quais não seria possível a execução deste: Letícia Muraro Wildner, Clarice Iomara Silva, Marcos André Schorner, Mara Cristina Scheffer e Manoela Valmorbida.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias (CCA), UFSC na pessoa do Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari e Dr. Gustavo HF Klabunde

Ao Prof. Dr. André Avila Ramos, do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas (CCB), UFSC.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), fundação vinculada ao Ministério da Educação (MEC), Governo Brasileiro, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Departamento de Análises Clínicas, CCS, UFSC.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial à Rosalba Otilia Zeferino Testi Ferreira.

RESUMO

A Tuberculose (TB) é uma doença causada por bactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estimou-se que em 2015, 10,4 milhões de pessoas desenvolveram TB mundialmente e 1,4 milhões morreram em decorrência da doença. No Brasil, foram registrados em 2015, 1027 casos de TB resistente aos fármacos. A isoniazida é um dos fármacos mais efetivos no tratamento da TB. Os principais mecanismos de resistência à isoniazida estão relacionados a mutações nos genes que codificam o ativador do fármaco (gene *katG*) e o alvo deste (gene *inhA*). Mutações nos genes *katG* e *inhA* são responsáveis por aproximadamente 75% dos casos de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida, no entanto, em 25% dos casos, tais mutações não são encontradas. Acredita-se que a superexpressão de proteínas do tipo bombas de efluxo sejam responsáveis por este percentual. O aumento na atividade de efluxo resulta na redução das concentrações intrabacterianas do fármaco, o que pode propiciar a sobrevivência de uma subpopulação bacteriana exposta ao constante estresse causado pelas concentrações subinibitórias do fármaco. Durante esta exposição, mutantes com alterações gênicas que favoreçam a resistência podem ser selecionados, possibilitando o estabelecimento de uma população resistente que se torna clinicamente significativa. Sendo assim, objetivou-se com o presente estudo, avaliar os níveis de expressão dos genes que codificam para bombas de efluxo *mmr*, *jefA*, *efpA*, *bacA* e *rrrA* em isolados clínicos de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de susceptibilidade à isoniazida. Os isolados foram categorizados em três grupos: 1. isolados susceptíveis à isoniazida; 2. isolados susceptíveis à isoniazida provenientes de pacientes com baciloscopia positiva ao quarto mês de tratamento e 3. isolados com monorresistência primária à isoniazida. Os resultados obtidos por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real foram comparados entre os grupos e em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv. Para os genes *jefA*, *efpA* e *rrrA* não foi observada diferença significativa nos níveis de expressão entre os grupos. Desta forma, não foi possível estabelecer uma relação entre os níveis de expressão desses genes e o fenótipo de resistência apresentado pelos isolados. Para os genes *mmr* e *bacA* foi encontrada relação significativa entre os níveis basais de expressão e o fenótipo de monorresistência à isoniazida. O gene *mmr*, o qual codifica para proteínas da família *Small Multidrug Resistance*, apresentou valores de expressão basal aumentados nos isolados com monorresistência primária

à isoniazida quando comparados aos isolados susceptíveis, sugerindo que este gene possa estar relacionado com a resistência à isoniazida. Os níveis de expressão basal do gene *bacA* nos isolados susceptíveis foram superiores aos níveis encontrados nos isolados com monorresistência primária à isoniazida, sugerindo que níveis reduzidos de expressão do gene *bacA* possam estar relacionados com a resistência à isoniazida. Os níveis de expressão basal de *bacA* observados em 83,3% dos isolados clínicos, tanto monorresistentes quanto susceptíveis foram menores que os níveis observados na cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv. O gene *bacA* codifica para transportadores do tipo ABC e atua na captação de vitamina B12.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*. Monorresistência. Isoniazida. Bombas de Efluxo. Proteínas transportadoras de membrana. Expressão gênica. RT-qPCR. Efluxo de fármacos. Resistência a fármacos. Genes de *M. tuberculosis*.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a disease caused by bacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. According to the World Health Organization, in 2015, an estimated 10.4 million people developed TB worldwide and 1.4 million died from the disease. In Brazil, 1,027 cases of drug-resistant TB were recorded in 2015. Isoniazid is one of the most effective drugs in the treatment of TB. The major mechanisms of resistance to isoniazid are related to mutations in the genes that encode the drug activator (*katG* gene) and the drug target (*inhA* gene). Mutations in *katG* and *inhA* genes account for approximately 75% of isoniazid-resistant *M. tuberculosis* cases; however, in 25% of cases, such mutations are not found. It is believed that overexpression of efflux proteins accounts for this percentage. The increase in efflux activity results in the reduction of intrabacterial drug concentrations, which may lead the survival of a bacterial subpopulation exposed to constant stress of subinhibitory drug concentrations. During this exposition, mutants with alterations in genes that favor resistance can be selected, allowing the establishment of a resistant population that becomes clinically significant. Therefore, the aim of this study was to evaluate the expression levels of efflux pumps genes *mmr*, *jefA*, *efpA*, *bacA* and *drmA* in clinical isolates of *M. tuberculosis* with different isoniazid susceptibility profiles. The isolates were divided into three groups: 1. isoniazid-susceptible isolates, 2. isoniazid-susceptible isolates from patients with positive bacilloscopy after four months of treatment, and 3. isoniazid-resistant isolates. The results obtained using the Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction technique were compared between the groups and in relation to the reference strain *M. tuberculosis* H37Rv. For the *jefA*, *efpA* and *drmA* genes, no significant difference in expression levels was observed between groups. Therefore, it was not possible to establish a relationship between the expression levels of these genes and the resistance phenotype of the isolates. For the *mmr* and *bacA* genes, a significant relationship was found between the expression levels and the isoniazid-monoresistant phenotype. The *mmr* gene, which encodes proteins from the Small Multidrug Resistance family, presented increased baseline expression values in isolates with primary isoniazid monoresistance, when compared to susceptible isolates, suggesting that this gene may be related to isoniazid resistance. Basal expression levels of the *bacA* gene in susceptible isolates were higher than levels found in isolates with primary isoniazid monoresistance, suggesting that reduced levels of the *bacA* gene may be

related to isoniazid resistance. The basal expression levels of *bacA* observed in 83.3% of clinical isolates, both isoniazid-mono-resistant and susceptible, were lower than the levels observed in the reference strain *M. tuberculosis* H37Rv. The *bacA* gene codes for ABC type transporters and acts on the uptake of vitamin B12.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. Monoresistance. Isoniazid. Efflux Pumps. Membrane Transport Proteins. Gene Expression. RT-qPCR. Drug Efflux. Drug resistance. *M. tuberculosis* genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do granuloma.....	266
Figura 2 – Representação esquemática do envelope celular de <i>M. tuberculosis</i>	28
Figura 3 – Coeficientes de incidência da tuberculose: estimativas referentes a 2015.	29
Figura 4 – Bombas de efluxo em <i>M. tuberculosis</i>	43
Figura 5 – Agrupamento das amostras com base nos perfis de sensibilidade à isoniazida e baciloscopia.	500
Figura 6 – Análises comparativas empregadas no estudo.	522
Figura 7 – Fluxograma dos procedimentos realizados.	533
Figura 8 – Representação dos cálculos envolvidos no método do C_q comparativo.	666
Figura 9 – Concentração, pureza e integridade das amostras de RNA do presente estudo.	677
Figura 10 – Curvas de dissociação dos produtos gerados pelos iniciadores referentes aos genes alvo <i>jefA</i> , <i>efpA</i> , <i>mmr</i> , <i>bacA</i> e <i>drrA</i>	69
Figura 11 – Curvas de dissociação dos produtos gerados pelos iniciadores referentes aos genes de referência <i>polA</i> , <i>sigA</i> e <i>rrs</i>	70
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos gerados nas reações de RT-qPCR dos genes alvo e genes normalizadores.	711
Figura 13 – Software LinRegPCR: determinação da eficiência por poço de reação.	722
Figura 14 – Níveis de expressão basal dos genes <i>jefA</i> , <i>efpA</i> e <i>drrA</i> nos grupos 1, 2 e 3.	744

Figura 15 – Níveis de expressão basal dos genes <i>mmr</i> e <i>bacA</i> nos grupos 1, 2 e 3.....	755
Figura 16 – Níveis de expressão relativa dos genes <i>jeqA</i> , <i>efpA</i> , <i>mmr</i> , <i>bacA</i> e <i>drrA</i> em relação à cepa de referência <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, distribuídos em relação ao gene (colunas) e aos grupos (linhas).	766
Figura 17 – Perfil de expressão relativa do gene <i>mmr</i> em relação à cepa de referência <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	777
Figura 18 – Perfil de expressão relativa do gene <i>jeqA</i> em relação à cepa de referência <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	78
Figura 19 – Perfil de expressão relativa do gene <i>efpA</i> em relação à cepa de referência <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	78
Figura 20 – Perfil de expressão relativa do gene <i>bacA</i> em relação à cepa de referência <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	79
Figura 21 – Perfil de expressão relativa do gene <i>drrA</i> em relação à cepa de referência <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de eficiência, coeficiente de correlação (R^2) e temperatura de dissociação..... 722

Tabela 2 – Genes candidatos a normalizadores *rrs*, *polA* e *sigA*: valores *M-value* para os genes e suas combinações, gerados pelo programa *geNorm*..... 733

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Esquemas de tratamento preconizados pelo PNCT/MS para adolescentes e adultos.	37
Quadro 2 – Tratamento utilizado e desfecho dos casos incluídos no presente estudo.	511
Quadro 3 – Genes codificadores de bombas de efluxo avaliados.	522
Quadro 4 – Iniciadores utilizados para análise da expressão basal de genes por RT-qPCR.	600

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP-binding Cassette</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
BrEt	Brometo de Etídio
CCD	Controle de contaminação por DNA
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cDNA	DNA complementar
CG	Citosina + Guanina
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
C _q	Ciclo de quantificação
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromide
ddNTP	Didesoxirribonucleotídeo Trifosfato
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EUA	Estados Unidos da América
GTC	Tiocianato de Guanidina
HBCs	<i>High Burden Countries</i>
IE	Inibidor de bombas de efluxo
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MIC	Concentração Inibitória Mínima (do inglês, <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MRA	<i>Microplate Resazurin Assay</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrose, catalase
OMS	Organização Mundial de Saúde (do inglês, <i>World Health Organization - WHO</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PNCT/MS	Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde
PT	Prova tuberculínica
RHZE	R (rifampicina), H (isoniazida), Z (pirazinamida) e E (etambutol)

RNA	Ácido Ribonucleico
RND	<i>Resistance Nodulation Division</i>
RT	Transcrição Reversa
	Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase
RT-qPCR	Quantitativa em Tempo Real (do inglês <i>Quantitative Real-time PCR</i>)
SDGs	Metas de Desenvolvimento Sustentável (do inglês, <i>Sustainable Development Goals</i>)
SDS	Dodecyl Sulfato de Sódio
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
TB	Tuberculose
TB-MDR	TB-multirresistente (do inglês, <i>TB-multi-drug-resistant</i>)
TB-XDR	TB extensivamente resistente
TDO	Tratamento Diretamente Observado
TMH	Hélice Transmembrana (do inglês, <i>Transmembrane Helix</i>)
TS	Teste de sensibilidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1	TUBERCULOSE	25
2.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
2.3	EPIDEMIOLOGIA	28
2.4	DIAGNÓSTICO	31
2.5	TRATAMENTO	34
2.5.1	Isoniazida e rifampicina: mecanismo de ação	39
2.6	RESISTÊNCIA	40
2.7	BOMBAS DE EFLUXO	41
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	49
4.2	AMOSTRAGEM	49
4.3	DESENHO DO ESTUDO	51
4.4	CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i>	53
4.5	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL	54
4.6	TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE RNA COM ENZIMA DNase I	57
4.7	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA TOTAL	57
4.8	SÍNTESE DE cDNA	58
4.9	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (<i>PRIMERS</i>) E FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS	59
4.10	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-QPCR)	61
4.11	ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES APÓS A RT-QPCR	62
4.12	ANÁLISE DAS EFICIÊNCIAS DAS REAÇÕES DE RT- QPCR	63
4.13	DETERMINAÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA	64
4.14	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>jefA</i> , <i>efpA</i> , <i>mmr</i> , <i>bacA</i> E <i>drrA</i>	65
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5	RESULTADOS	67

5.1	ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES, EFICIÊNCIA DA REAÇÃO DE RT-qPCR E ESCOLHA DOS GENES DE REFERÊNCIA	67
5.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES ALVO <i>jefA</i> , <i>efpA</i> , <i>mmr</i> , <i>bacA</i> E <i>drrA</i>	73
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÕES	95
8	LIMITAÇÕES	97
9	EXPECTATIVAS	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE A – METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE RNA DE <i>M. tuberculosis</i> EMPREGADAS NO PRESENTE ESTUDO QUE DISPENSAM O USO DE EQUIPAMENTO <i>BEAD BEATER</i>	117
	APÊNDICE B – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>jefA</i>, <i>efpA</i>, <i>mmr</i>, <i>bacA</i> E <i>drrA</i> NOS ISOLADOS DO PRESENTE ESTUDO, EXPRESSOS EM $2^{-\Delta CQ} (X10^{-4}) \pm D$	123
	APÊNDICE C – NÍVEIS DE EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES <i>jefA</i>, <i>efpA</i>, <i>mmr</i>, <i>bacA</i> E <i>drrA</i> NOS ISOLADOS DO PRESENTE ESTUDO, EM RELAÇÃO À CEPA DE REFERÊNCIA <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	125
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO PELO COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA COM SERES HUMANOS/UFSC ...	127
	ANEXO B – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS REFERENTES AO BRASIL PUBLICADOS PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, <i>GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT</i> 2016	131

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), as quais são transmitidas por via aérea. Em valores estimados, a TB afetou 10,4 milhões de pessoas mundialmente em 2015. Nesse mesmo ano, foram diagnosticados e registrados no Brasil 63.189 casos novos de TB; sendo que a incidência no estado de Santa Catarina foi de 23,1/100 mil habitantes, porém, sua capital, Florianópolis, apresentou coeficiente de incidência 77,92% acima dos valores estaduais. Em 2014 foram registrados no Brasil, 4.374 óbitos decorrentes da infecção por TB (BRASIL, 2016; WHO, 2016).

Quando tratada adequadamente, a TB é curável em aproximadamente 100% dos casos não resistentes aos fármacos antimicobacterianos (BRASIL, 2011a). Porém, a emergência global de casos de TB resistente se torna um grande desafio à efetividade do tratamento, dificultado as ações empregadas no controle e eliminação da TB (MACHADO et al., 2016). No Brasil, foram registrados em 2015, 1027 casos de TB resistente aos fármacos antimicobacterianos (BRASIL, 2016).

O surgimento da resistência aos fármacos geralmente encontra-se associado a ocorrência de mutações espontâneas em genes alvo para fármacos ou em domínios regulatórios. Populações mutantes ocasionalmente podem vir a ser selecionadas por falhas no tratamento subsequente (PUTMAN; VAN VEEN; KONINGS, 2000; SOMOSKOVI; PARSONS; SALFINGER, 2001). Mutações no gene *rpoB* estão presentes em mais de 90% dos casos de TB resistente à rifampicina (LI et al., 2015). As mutações mais frequentemente associadas a resistência à isoniazida encontram-se nos genes *katG* e *inhA*, além destas, mutações nos genes *aphC*, *ndh* e *ahpC-oxvR* têm sido relacionadas com resistência à isoniazida (ZHANG et al., 1992; BANERJEE et al., 1994; SILVA et al., 2003; LOUW et al., 2009). Em relação a resistência à isoniazida, mutações nos genes *katG* e *inhA* são responsáveis por aproximadamente 75% dos casos de *M. tuberculosis* resistente, no entanto, em 25% dos casos, não é possível justificar esta resistência com base nas mutações descritas anteriormente (GUO et al., 2006; PRIM et al., 2015); nestes casos, outros mecanismos podem estar envolvidos, como por exemplo, a atuação de sistemas de efluxo (NIKAIDO, 1998; LOUW et al., 2009).

O aumento na atividade de bombas de efluxo que promovam a extrusão de fármacos resulta na redução das concentrações intrabacterianas deste, o que pode favorecer a sobrevivência de uma subpopulação bacteriana exposta ao constante estresse promovido pelas concentrações subinibitórias do fármaco. Durante esta exposição, mutantes com alterações em genes que favoreçam a resistência podem ser selecionados, acarretando estabelecimento de uma população resistente (MARTINEZ; BAQUERO, 2000; VIVEIROS et al., 2002; WEBBER; PIDDOCK, 2003; SRIVASTAVA et al., 2010).

Várias bombas de efluxo têm sido caracterizadas no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, algumas delas associadas ao efluxo da isoniazida, como Rv1218c-Rv1217c, Rv1456c- Rv1457c- Rv1458, bacA, Rv1747, pstB, mmr, Rv0849, efpA, p55, Rv1258c, jefA, MMP17 e iniBAC (NIKAIDO, 1998; VIVEIROS; LEANDRO; AMARAL, 2003; ROSSI; AÍNSA; RICCARDI, 2006; LOUW et al., 2009; VIVEIROS et al., 2010; GUPTA et al., 2010a, 2010b; SILVA et al., 2011, 2016; MACHADO et al., 2012, 2016; CALGIN et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013; COELHO et al., 2015; KANJI et al., 2016b). Gupta e colaboradores (2010a) observaram que a resistência mediada por bombas de efluxo é mais comumente associada à isoniazida e ao etambutol do que a outros fármacos.

Acredita-se que o estudo da expressão de genes que codificam para proteínas de membrana do tipo bombas de efluxo pode ajudar a elucidar os casos de resistência não explicados por mutações (MACHADO et al., 2012). Isolados com monorresistência primária à isoniazida e isolados susceptíveis à isoniazida provenientes de pacientes que apresentaram baciloscopia positiva após o quarto mês de tratamento podem apresentar níveis superiores de expressão de genes que codificam para bombas de efluxo quando comparados aos isolados susceptíveis à isoniazida? Com base neste questionamento, o presente trabalho foi desenvolvido no intuito de avaliar a relação entre os níveis de expressão basal de cinco genes codificantes para bombas de efluxo e a monorresistência primária à isoniazida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TUBERCULOSE

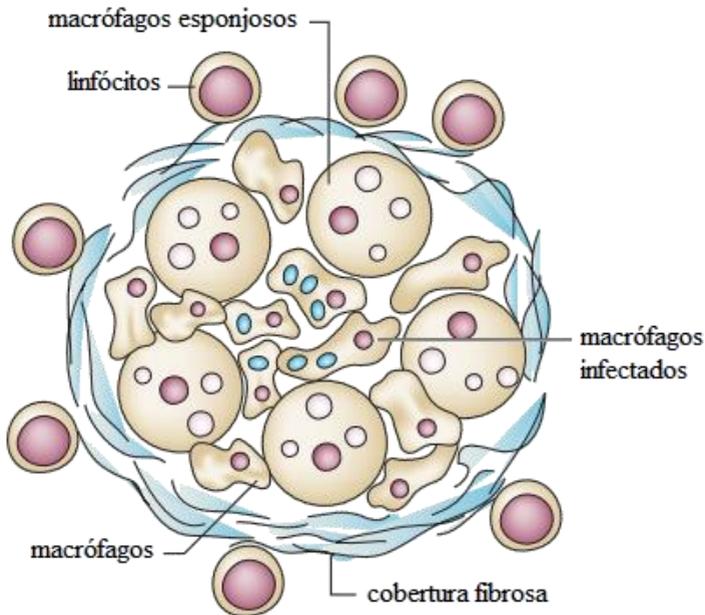
O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) é caracterizado por espécies bacterianas que apresentam 99,9% de similaridade de nucleotídeos e sequências idênticas na região 16S rRNA, mas diferem amplamente em termos de hospedeiro, fenótipos, patogenicidade e epidemiologia. Pertencem a este complexo as espécies patogênicas *M. tuberculosis* (principal representante do complexo), *M. microti*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. orygis* e a estirpe não virulenta *M. bovis* BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) (BODDINGHAUS et al., 1990; BROSCH et al., 2002; VAN INGEN et al., 2012; CDC, 2013a).

A TB é caracterizada como doença infectocontagiosa de evolução crônica que tipicamente acomete os pulmões (TB pulmonar), mas pode também afetar outros sítios anatômicos (TB extrapulmonar) ou ocorrer de forma disseminada (TB disseminada). A TB pulmonar é a mais relevante no âmbito da saúde pública, pois é esta forma (quando bacilífera) a responsável pela cadeia de transmissão da doença. O agente etiológico da TB é transmitido por via aérea, através de gotículas de 1 a 5 µm de diâmetro, produzidas pelo indivíduo portador de TB pulmonar ativa (indivíduos bacilíferos) ao tossir, espirrar ou falar. Quando inaladas, tais gotículas se depositam nos alvéolos pulmonares, local onde se iniciará o processo da doença caso o bacilo consiga sobreviver às defesas primárias do indivíduo e multiplicar-se principalmente no interior dos macrófagos alveolares (EDWARDS; KIRKPATRICK, 1986; PANDOLFI et al., 2007; BRASIL, 2011a; NUNES-ALVES et al., 2014).

O estágio inicial da infecção se caracteriza pela ação da resposta imune inata, envolvendo o recrutamento de células inflamatórias ao sítio infeccioso. Posteriormente, os bacilos são carregados ao linfonodo, onde os antígenos micobacterianos são apresentados principalmente por células dendríticas, induzindo a proliferação de células T antígeno-específicas; inicia-se então a resposta adaptativa. As células T efetoras migram ao sítio infeccioso e em combinação com outros leucócitos estimulam a formação do granuloma ou tubérculo; o granuloma é o remodelamento do sítio infeccioso em uma massa celular formada ao centro por macrófagos infectados circundados por macrófagos

esponjosos e outros fagócitos mononucleados, cobertos por linfócitos em associação com uma cobertura fibrosa de colágeno e outros componentes da matriz extracelular (Figura 1). O granuloma é a estrutura responsável pela contenção da infecção. Embora não elimine o bacilo, a resposta imune é capaz de controlar a infecção, tornando o indivíduo assintomático, estado referido como TB latente (EDWARDS; KIRKPATRICK, 1986; RUSSELL, 2007; HORSBURGH; RUBIN, 2011; NUNES-ALVES et al., 2014).

Figura 1 – Estrutura do granuloma.



Fonte: Russell (2007).

Após a infecção, somente uma pequena proporção de pessoas (10%) irá desenvolver a doença (TB primária), sendo que a probabilidade de desenvolver TB é maior entre pessoas infectadas pelo HIV (TIEMERSMA et al., 2011; NUNES-ALVES et al., 2014). Cerca de 5 a 10% dos indivíduos portadores de TB latente irão desenvolver TB ativa ao longo da vida, caracterizando a TB pós-primária (BARRY et al., 2009; NUNES-ALVES et al., 2014). Estima-se que um terço da população mundial seja portadora de TB latente, representando um reservatório em potencial da doença (WHO, 2014a).

2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

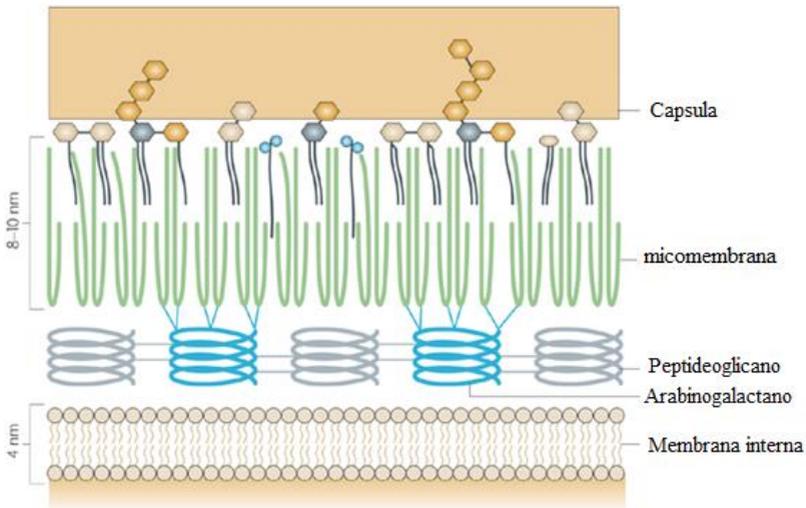
As micobactérias são bacilos não esporulados, imóveis, aeróbios e não encapsulados (PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007; LAWN; ZUMLA, 2011).

O primeiro genoma micobacteriano a ser sequenciado¹ e disponibilizado à comunidade acadêmica revelou a composição de 4.411.529 pares de base (pb) com um conteúdo de citosina + guanina (CG) de 65,6%, que é relativamente constante ao longo do genoma (Cole et al., 1998). Tal genoma codifica, aproximadamente, 4000 proteínas e 50 moléculas de RNA (BOTTAI et al., 2014). Neste cenário, destaca-se o fato de que 8% do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv codifica proteínas envolvidas no metabolismo lipídico. Este achado ressalta a importância destas proteínas para a sobrevivência de *M. tuberculosis*, um patógeno intracelular obrigatório, que se protege com um envelope celular rico em lipídios (BRENNAN; NIKAIDO, 1995; BRENNAN, 2003; KAUR et al., 2009; BOTTAI et al., 2014).

A parede celular de *M. tuberculosis* é majoritariamente composta por um complexo de três diferentes estruturas, ligadas covalentemente: peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos (Figura 2). A camada composta pelos ácidos micólicos é hidrofóbica e de baixa fluidez, denominada micomembrana. A camada externa da micomembrana contém vários lipídios livres, como os glicolipídeos fenólicos, lipídeos ptiocerol dimicocerosato, dimicoliltreose, sulfolipídeos e fosfatidilinositol manosídeos, os quais estão intercalados com os ácidos micólicos. A maioria destes lipídeos é específica para micobactérias. A camada externa do envelope celular, uma espécie de cápsula, contém majoritariamente polissacarídeos (glucanas e arabinomanana) (BRENNAN; NIKAIDO, 1995; BRENNAN, 2003; ABDALLAH et al., 2007). Os ácidos micólicos produzidos por *M. tuberculosis* são os maiores ácidos graxos identificados na natureza e correspondem de 30% a 40% do peso seco do envelope celular bacteriano. Estima-se que este envelope (membrana externa) meça de 9 a 10 nm, sendo mais espesso do que qualquer outra membrana procariota ou eucariota (BRENNAN; NIKAIDO, 1995).

¹ Sequenciamento do genoma completo da estirpe de *M. tuberculosis* H37Rv, por Cole e colaboradores, em 1998.

Figura 2 – Representação esquemática do envelope celular de *M. tuberculosis*.



Fonte: Abdallah e colaboradores (2007).

M. tuberculosis se divide a cada 15-20 horas, taxa considerada extremamente baixa quando comparada a outras bactérias. Esta baixa taxa de replicação e a habilidade de persistir em estado latente resultam na necessidade de tratamentos de longa duração (LAWN; ZUMLA, 2011).

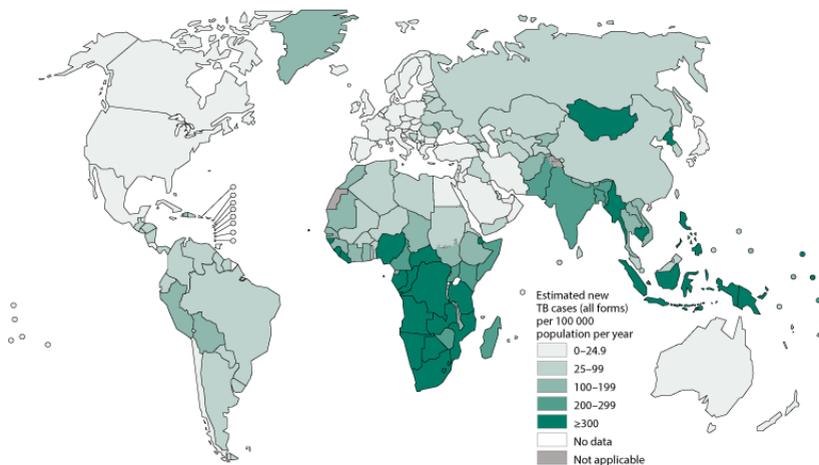
2.3 EPIDEMIOLOGIA

A TB ocorre mais comumente entre os homens e afeta principalmente adultos em idade economicamente ativa (WHO, 2014a; GUPTA et al., 2012); em 2015 a TB foi a nona causa de morte mais frequente mundialmente (WHO, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, do inglês *World Health Organization* -WHO), estimou-se que em 2015 10,4 milhões de pessoas tenham desenvolvido TB no mundo (56% homens, 34% mulheres e 10% crianças) (Figura 3). Esta estimativa é maior que a publicada no ano anterior, a qual calculava 9,6 milhões de casos novos em 2014. Oficialmente, foram reportadas às autoridades 6,1 milhões de casos novos de TB em 2015, o que deixa uma lacuna de 4,3 milhões de casos entre a incidência estimada e a notificação realizada. Foi estimado

1,4 milhão de mortes por TB mundialmente, entre pessoas HIV-soronegativo. Pessoas vivendo com HIV/Aids computaram 1,2 milhões (11%) dos casos novos; 0,4 milhões de mortes foram registradas neste grupo (WHO, 2015, 2016).

Figura 3 – Coeficientes de incidência da tuberculose: estimativas referentes a 2015.



Fonte: WHO (2016).

Legenda: Estimativa dos casos novos de tuberculose (forma pulmonar e extrapulmonar) por 100.000 habitantes.

O ano de 2015 marcou o encerramento do documento adotado pelas Nações Unidas “*The Millennium Development Goals*” e sua substituição pelo documento “Metas de Desenvolvimento Sustentável” (*Sustainable Development Goals – SDGs*), o qual prevê novas metas mundiais para o controle da TB, que visam reduzir, até 2030, 90% das mortes por TB e 80% do coeficiente de incidência comparando-se às estimativas de 2015 (WHO, 2016). Todas as metas² propostas pelo documento *The Millennium Development Goals* foram cumpridas pelo Brasil (WHO, 2015). Ainda em 2015 foram definidas pela OMS três novas listas de países com alta carga de tuberculose (*High Burden Countries – HBCs*): 1) 30 países com a maior carga de TB; 2) 30 países com o maior número de casos TB-multirresistente (TB-MDR); 3) 30

² Reduzir a incidência e reduzir pela metade as taxas de mortalidade e prevalência da TB em relação aos dados de 1990, com prazo até 2015.

países com maior incidência de coinfeção TB/HIV. Os países citados nas listas HBCs são responsáveis por 87-92% da carga mundial de TB (WHO, 2016).

No cenário internacional, o Brasil encontra-se citado nas listas relacionadas à carga de TB e coinfeção TB/HIV. Entre 2005 e 2014, foram registrados no Brasil, uma média de 70 mil casos novos e 4.400 mortes por tuberculose, por ano. O coeficiente de incidência de tuberculose passou de 38,7/100 mil habitantes em 2006 para 30,9/100 mil habitantes em 2015, o que corresponde a uma redução de 20,2%. Em 2014, o coeficiente de mortalidade da TB no Brasil foi de 2,2/100 mil habitantes (4.374 óbitos) (BRASIL, 2016; WHO, 2016) (Anexo B).

O Estado de Santa Catarina apresentou, em 2015, incidência inferior aos valores nacionais, com um coeficiente de 23,1/100 mil habitantes; dados referentes ao ano de 2014 revelaram um coeficiente de mortalidade de 0,9/100 mil habitantes (BRASIL, 2016). De acordo com dados publicados pela Diretoria de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina, referentes ao ano de 2014, as regiões de saúde de Foz do Rio Itajaí, Grande Florianópolis, Nordeste, Carbonífera e Laguna possuem os maiores coeficientes de incidência do estado, o que é explicado pelo crescimento populacional aliado à exclusão social, aumento de populações mais expostas a riscos, baixos níveis de desenvolvimento socioeconômico e insatisfatórias condições de assistência à saúde, diagnóstico e tratamento de sintomáticos respiratórios (DIVE, 2016).

No panorama estadual, a capital do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, apresentou em 2015, coeficiente de incidência de 41,1/100 mil habitantes, índice 77,92% acima da incidência estadual; em 2014, o coeficiente de mortalidade registrado na capital foi de 1,3/100 mil habitantes (BRASIL, 2016). Dados locais referentes a 2014 divulgados no Boletim epidemiológico do Município de Florianópolis (2015) informaram incidência de tuberculose de 53,3% no município.

Em 2015, 68,9% dos casos novos de TB no Brasil foram testados para HIV, revelando um percentual de 9,7% de coinfeção TB/HIV. A região Sul apresentou o maior percentual de coinfectados (17,3%) bem como suas capitais – Porto Alegre-RS (25,2%), Curitiba-PR (21,5%) e Florianópolis-SC (21,2%). O percentual de coinfeção TB-HIV em todo o estado de Santa Catarina é de 17,4%. Em 2015, Santa Catarina e Rio Grande do Sul apresentaram os maiores percentuais de coinfeção TB-

HIV em casos de retratamento (35,4 e 35,3%, respectivamente) (BRASIL, 2016).

Mundialmente, o coeficiente de incidência da TB vem decaindo 1,5% ao ano (entre 2014 e 2015) e a taxa de mortalidade caiu 47% entre 1990 e 2015. No entanto, o número de óbitos permanece inaceitavelmente alto, tendo em vista que a maioria das mortes pode ser evitada (WHO, 2015; UNITED NATIONS, 2015). Entre 2000 e 2015, 49 milhões de vidas foram salvas com a implementação de melhores técnicas e/ou ampliação do acesso ao diagnóstico, além do tratamento efetivo, especialmente no que se refere ao Tratamento Diretamente Observado (TDO) (WHO, 2016).

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico-epidemiológico da TB se baseia na análise dos sinais e sintomas apresentados pelo paciente. Febre, perda de peso e sudorese noturna são considerados sintomas constitucionais da TB; demais sintomas estão associados ao sítio da infecção. O sintoma mais comumente reportado em TB pulmonar é a tosse persistente por 2 a 3 semanas, que pode ser produtiva (com formação de muco) ou não, e pode vir acompanhada de sangue (hemoptise) (BRASIL, 2011a; LAWN; ZUMLA, 2011; TB CARE I, 2014).

A pesquisa bacteriológica, por meio da baciloscopia e cultura, é de extrema importância para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento da TB (BRASIL, 2008).

A baciloscopia é o método mais comumente utilizado mundialmente para diagnóstico da TB, no qual a amostra é corada e a presença numérica do bacilo é determinada com o auxílio de microscópio (WHO, 2004). O método de coloração mais empregado é o de Ziehl-Neelsen, que utiliza o princípio da álcool-ácido resistência da bactéria. A parede celular de *M. tuberculosis* é composta por uma grande quantidade de lipídios, entre eles os ácidos micólicos, que possuem alta capacidade de fixar o corante fucsina (corante vermelho), gerando a característica tintorial de resistência à descoloração por soluções álcool-ácidas; os bacilos são então designados como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR). Devido ao caráter hidrofóbico da parede celular, a penetração da fucsina é favorecida pelo calor. O BAAR retém a fucsina, enquanto as outras estruturas na amostra se coram pelo segundo corante utilizado, o azul de metileno. A utilização do método

de coloração Ziehl-Neelsen é recomendada pelo Ministério da Saúde para todos os laboratórios que realizam o diagnóstico da TB pulmonar (BRASIL, 2008). As características tintoriais aliadas às características morfológicas auxiliam no diagnóstico e controle do tratamento da TB. A presença de BAAR em uma amostra de escarro associada aos sintomas de tosse, perda de peso e presença de infiltrado pulmonar na radiografia de tórax, são evidências de TB ativa (KONEMAN et al., 2001). Para o acompanhamento da evolução dos casos de TB pulmonar, recomenda-se a realização mensal da baciloscopia de controle, sendo indispensáveis as baciloscopias do segundo, quarto e sexto meses, durante o esquema básico de tratamento. Quando realizada corretamente, a baciloscopia é capaz de detectar 60% a 80% dos casos de TB pulmonar. A baciloscopia possui como desvantagem a baixa sensibilidade quando comparada à cultura. Além disso, tal método não é capaz de prover diferenciação entre as espécies do CMTB ou identificar resistência aos antimicrobianos (BRASIL, 2011a).

A cultura é o exame laboratorial que propicia a multiplicação e o isolamento de bacilos do CMTB, permitindo posteriormente a identificação da espécie micobacteriana, a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TS) e realização de técnicas moleculares, especialmente as de genotipagem. A cultura apresenta elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico de doenças causadas por micobactérias, sendo considerada *padrão-ouro* para o diagnóstico da TB. Os meios sólidos Lowenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh são os mais utilizados para realização da cultura, por apresentarem baixos custos e índices de contaminação. Os meios sólidos apresentam como desvantagem o elevado tempo de detecção do crescimento bacteriano, que varia entre 14 a 30 dias, podendo se estender por até oito semanas (BRASIL, 2008, 2011a; WHO, 2014a). A cultura em meio líquido, monitorada por sistema informatizado, reduziu o tempo de detecção de positividade da amostra para 14 dias, aproximadamente. Sistemas comerciais como o BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, EUA) monitoram o crescimento bacteriano em caldo Middlebrook 7H9 modificado a partir de sensores que detectam a redução do oxigênio induzida por bactérias presentes no meio (TORTOLI et al., 1999). Devido aos elevados custos, a utilização destes sistemas é recomendada pelo Ministério da Saúde brasileiro, a laboratórios que recebem um grande volume de amostras clínicas, como hospitais e laboratórios de referência (BRASIL, 2008). A realização da

cultura com identificação da espécie e TS são indicadas aos casos de TB que tiveram contato com portadores de TB resistente, pacientes em retratamento, imunodeprimidos, pacientes que apresentaram baciloscopia positiva ao final do 2º mês de tratamento, pacientes que apresentaram falência ao tratamento e pacientes que se enquadram em situações de risco ao surgimento de TB resistente (profissionais de saúde, população de rua, população carcerária, entre outros) (BRASIL, 2011a).

Os avanços nas metodologias de diagnóstico da TB possibilitaram a utilização de testes moleculares rápidos para diagnosticar a TB e a TB resistente. Métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que têm como objetivo detectar a presença do DNA de *M. tuberculosis*, vêm sendo cada vez mais utilizados. No entanto, os testes moleculares também possuem limitações, relacionadas à complexidade da extração do DNA, da amplificação e detecção, e das preocupações de biossegurança pela manipulação de *M. tuberculosis* (WHO, 2014b). O sistema Xpert® MTB/RIF (Cepheid, EUA), lançado em 2014, simplifica a realização dos testes moleculares, ao ponto que integra e automatiza os processos requeridos à realização da reação em cadeia da polimerase: preparação da amostra, amplificação e detecção. Este sistema é capaz de detectar *M. tuberculosis*, bem como mutações que conferem resistência à rifampicina, através de três iniciadores específicos e cinco sondas moleculares, as quais asseguram alta especificidade ao teste (WHO, 2014b). As limitações do sistema Xpert® MTB/RIF consistem na impossibilidade deste em diferenciar bacilos viáveis de bacilos mortos, o que inviabiliza sua utilização no monitoramento da resposta ao tratamento. Além disso, o teste não é capaz de diferenciar as espécies do CMTB (NTCA; APHL, 2016).

Ferramentas adicionais ao diagnóstico da TB incluem exames de imagem, como a radiografia de tórax, que permite diferenciar imagens sugestivas de tuberculose de outras doenças. No entanto, a especificidade deste método é moderada, além de permitir variações observacionais. Exames histopatológicos são também utilizados como ferramenta complementar ao diagnóstico da tuberculose pulmonar e extrapulmonar (WHO, 2004; ANVISA, 2011).

A prova tuberculínica (PT) é um exame complementar ao diagnóstico de infecção latente por *M. tuberculosis*; tal prova avalia a resposta imune celular do indivíduo a antígenos de *M. tuberculosis*

inoculados por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo. Após 48 a 72 horas, mede-se o maior diâmetro transverso da área do endurecido palpável e o resultado é registrado em milímetros. Resultados falso-positivos podem ocorrer em indivíduos que tiveram contato com outras espécies do CMTB ou que foram vacinados com BCG (MENZIES, 1999; BRASIL, 2011a). Embora outros ensaios tenham sido desenhados para o diagnóstico da TB latente, como por exemplo, IGRA (*interferon-gamma release assays*) a PT é a mais utilizada por ser mais barata e apresentar sensibilidade melhor ou igual ao IGRA (HERRERA et al., 2011).

2.5 TRATAMENTO

Em 2015, Brasil, China, Filipinas e Federação Russa apresentaram as maiores coberturas de tratamento³ (>80%) entre os 30 países citados na lista HBC referente à carga de TB; o percentual de cobertura de tratamento brasileiro foi de 87%. Em 2014, o percentual de cura dos casos novos de TB pulmonar com confirmação laboratorial no Brasil foi de 74,2%; no entanto, o percentual de abandono do tratamento neste grupo foi de 11%; Santa Catarina apresentou percentual de cura e abandono de 73,3% e 9,1%, respectivamente; os percentuais atribuídos à capital do estado, Florianópolis, foram 58,3% para cura e 14,4% para abandono do tratamento. Entre os casos de retratamento de TB pulmonar com confirmação laboratorial, a situação é também desfavorável; a porcentagem de cura nacional foi de 51,6%, com percentual de abandono de 26,1%; no estado de Santa Catarina, 54,3% destes casos evoluíram para cura e 18,8% abandonaram o tratamento; em Florianópolis os percentuais de cura e abandono foram de 37,9% e 20,7%, respectivamente (BRASIL, 2016; WHO, 2016).

Sem tratamento a mortalidade por TB é alta. Em estudos da história natural da TB pulmonar realizados em indivíduos com baciloscopia positiva e soronegativos ao HIV, cerca de 70% morreram em 10 anos. Entre os casos com cultura positiva e baciloscopia negativa, 20% morreram em 10 anos (TIEMERSMA et al., 2011).

³ Cobertura de tratamento: número de casos novos e de recidiva detectados e tratados, por ano, dividido pela incidência estimada no ano, expressa em percentual.

Quando tratada a TB é curável em aproximadamente 100% dos casos não resistentes aos antimicrobianos, desde que seja estabelecida a associação medicamentosa recomendada, com doses corretas, adequada operacionalização do tratamento e adesão. Tem-se como prioridade o tratamento dos casos bacilíferos, a fim de interromper a cadeia de transmissão da doença (BRASIL, 2011a). O tratamento não deve ser interrompido, exceto quando determinado por criteriosa revisão clínica e laboratorial (LOPES, 2006).

Os medicamentos utilizados para o tratamento da TB no Brasil são classificados em cinco grupos: 1. Fármacos orais de primeira linha: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida; 2. Fármacos injetáveis: estreptomicina (1º linha), Amicacina, Canamicina e Capreomicina (2º linha); 3. Fluoroquinolonas: Ofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina; 4. Medicamentos orais de segunda linha: Terizidona ou Cicloserina, Etionamida ou Protionamida e Ácido Paraminossalisílico (PAS); e 5. Medicamentos de baixa eficácia ou não recomendados para uso de rotina: Clofazimina, Linezolida, Amoxicilina/Clavulanato, Tiacetazona, Imipenem, isoniazida em altas doses e Claritromicina.

A definição dos esquemas terapêuticos fundamenta-se na busca por uma combinação de fármacos que tenham atividade bactericida precoce, capazes de prevenir a seleção de bacilos resistentes e que possuam atividade esterilizante. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT/MS) revisou em 2009 o protocolo de tratamento da TB no Brasil, referente aos esquemas adotados para indivíduos com idade igual ou superior a 10 anos (adolescentes e adultos), e definiu novos esquemas: esquema básico, esquema para meningoencefalite, esquema para TB monorresistente, TB polirresistente, TB multirresistente (TB-MDR ou do inglês *TB-multi-drug-resistant*), TB extensivamente resistente (TB-XDR) e esquemas especiais (hepatopatias, gravidez, intolerância aos fármacos, entre outros) (Quadro 1). A TB-MDR se caracteriza pelo fenótipo simultaneamente resistente à rifampicina e isoniazida ou resistente à rifampicina e isoniazida e outro fármaco de primeira linha; enquanto que a TB-XDR apresenta resistência à isoniazida, rifampicina, a qualquer fluoroquinolona e no mínimo a qualquer uma das drogas injetáveis de segunda linha (WHO, 2006; FIOCRUZ, 2008; BRASIL, 2009, 2011a, 2011b; GEMAL; DALCOLMO, 2011).

O acréscimo do etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do esquema básico foi também uma alteração realizada pelo PNCT/MS. Esta decisão foi embasada nos resultados apresentados pelo II Inquérito Nacional de Resistência aos Medicamentos anti-TB, realizado entre 2007 e 2008, que preliminarmente mostrou o aumento da resistência primária à isoniazida de 4,4% para 6,0% e o da resistência primária à isoniazida associada à rifampicina, de 1,1% para 1,4%, quando comparado aos resultados do I Inquérito Nacional, realizado entre 1995 e 1997. Assim, a apresentação farmacológica do esquema básico de tratamento passou a ser, na fase intensiva, com quatro fármacos (RHZE) em comprimidos com dose fixa combinada: R (rifampicina), H (isoniazida), Z (pirazinamida) e E (etambutol), seguida da fase de manutenção do tratamento, composta por dois fármacos (RH), utilizados por quatro meses (BRASIL, 2009, 2011a).

Quadro 1 – Esquemas de tratamento preconizados pelo PNCT/MS para adolescentes e adultos.

Situação	Esquema de tratamento	Medicamentos	Acompanhamento
Casos novos: TB pulmonar e extrapulmonar	Esquema básico	2RHZE/4RH	Baciloscopia de controle - mensal
TB meningoencefálica	Esquema para meningoencefalite	2RHZE/7RH + corticosteróide	Diversos
Retratamento: recidiva, retorno após abandono	Esquema básico – até o resultado dos exames	2RHZE/4RH	Cultura, identificação da espécie e TS
Falência terapêutica	Esquema utilizado até então – até o resultado dos exames	2RHZE/4RH	Verificar adesão ao tratamento, cultura, identificação da espécie e TS
Condições especiais: hepatopatias, intolerância, gestação, entre outros.	Esquema básico ou esquema alternativo	De acordo com avaliação clínica e laboratorial	AST, ALT, entre outros
TB monorresistente	Resistência à H	2RZES/4RE	Baciloscopia, cultura, análise clínica e radiológica
TB monorresistente	Resistência à R	2HZES/10HE	Baciloscopia, cultura, análise clínica e radiológica
TB polirresistente	Resistência à H + Z	2RESO/7REO	Baciloscopia, cultura, TS, análise clínica e radiológica
TB polirresistente	Resistência à H + E	2RZSO/7RO	Baciloscopia, cultura, TS, análise clínica e radiológica
TB polirresistente	Resistência à R + Z	3HESO/9HEO	Baciloscopia, cultura, TS, análise clínica e radiológica
TB polirresistente	Resistência à R + E	3HZSO/12HO	Baciloscopia, cultura, TS, análise clínica e radiológica
TB polirresistente	Resistência à H + Z + E	3RSOT/12ROT	Baciloscopia, cultura, TS, análise clínica e radiológica
TB multirresistente	TB-MDR	2S ₃ ELZT/4S ₃ ELZT/12ELT	Baciloscopia, cultura, TS, análise clínica e radiológica
TB extensivamente resistente	TB-XDR	Esquema individualizado	Baciloscopia, cultura, TS, análise clínica e radiológica

R - rifampicina, H - isoniazida, Z – pirazinamida, E – etambutol, S – estreptomicina, O – ofloxacina, L – levofloxacina, T – terizidona, TS – teste de sensibilidade, AST - aspartato transaminase, ALT - alanina transaminase. O número que antecede a sigla do medicamento refere-se à duração do tratamento em meses. O número subscrito refere-se à frequência semanal, quando o uso não for diário. Esquema para pacientes menores de 10 anos: 2RHZ/4RH.

Fonte: Adaptado de Brasil (2009, 2011a, 2011b); Gemal, Dalcolmo (2011).

Pacientes sem histórico de tratamento anterior ou riscos de apresentar resistência e que demonstraram melhora clínica após 15 dias de tratamento são considerados não infectantes (BRASIL, 2011a). Recomenda-se a realização de baciloscopia com periodicidade mensal para todos os casos diagnosticados de TB. Para os casos de retratamento, o PNCT/MS recomenda a solicitação de exames de cultura, identificação da espécie do CMTB, TS e utilização do esquema básico de tratamento até que os resultados dos exames sejam obtidos. Os casos com evolução para falência terapêutica devem ser avaliados quanto ao histórico terapêutico, adesão ao tratamento e resultado do TS; com base nesta análise, adota-se o esquema terapêutico mais adequado. Classifica-se como falência terapêutica, casos com baciloscopia persistentemente positiva ao final do tratamento, casos com baciloscopia fortemente positiva ao início do tratamento sem alteração da baciloscopia até o quarto mês de tratamento e casos com positividade inicial, seguida de negativação e nova positividade por dois meses consecutivos após o quarto mês de tratamento. Em caso de monorresistência à R ou H identificada na fase de manutenção do esquema básico, poderá ser considerada a manutenção deste esquema com prorrogação da segunda fase do tratamento para sete meses (Quadro 1). A composição dos esquemas individualizados para o tratamento dos casos de TB-XDR não é padronizada e requer criteriosa avaliação por parte de profissionais com experiência no manejo de casos de resistência. Paciente em tratamento com o esquema básico que apresentarem duas baciloscopias negativas, uma durante a fase de acompanhamento e outra ao final do tratamento, são considerados curados. Nos casos TB-MDR, o critério de cura consiste na negativação de três culturas, realizadas a partir do 12º mês de tratamento (12º, 15º e 18º) (BRASIL, 2009, 2011a; WHO, 2011, 2015; CDC, 2013b).

O Tratamento Diretamente Observado (TDO), parte da estratégia *Direct Observed Treatment Short-Course* (DOTS), é um mecanismo de controle da TB, recomendado pela OMS, que visa ampliar a adesão do paciente ao tratamento e prevenir o surgimento de isolados resistentes aos fármacos, reduzindo os casos de abandono e aumentando a probabilidade de cura. Através do TDO, todos os casos diagnosticados de TB passam a ser acompanhados por um profissional de saúde treinado que supervisione a tomada da medicação, durante todo o

tratamento. Além dos medicamentos, o serviço de saúde passa a oferecer ao paciente, estratégias de reabilitação social, psicológica e outras demandas que se fizerem necessárias, afim de que a adesão ao tratamento não seja comprometida. Os indicadores epidemiológicos nacionais apontam para a necessidade de ampliação do controle da tuberculose, sobretudo no que diz respeito aos percentuais de cura e abandono dos casos novos e de retratamento. A adoção do TDO pelas autoridades brasileiras se mostrou eficiente; segundo dados publicados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, entre 2001 e 2014, a cada incremento de 20% na cobertura dos programas Estratégia Saúde da Família (ESF) e TDO, houve uma redução no coeficiente de incidência nacional de 3,8% e 0,7%, respectivamente (FIOCRUZ, 2008; BRASIL, 2011a, 2016; WHO, 2016).

2.5.1 Isoniazida e rifampicina: mecanismo de ação

Isoniazida e rifampicina são os medicamentos de maior poder bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis*, sendo ativos contra todas as populações sensíveis a estes, seja de localização intracavitária, nos granulomas ou intracelulares (WHO, 2006; FIOCRUZ, 2008; BRASIL, 2011a).

A isoniazida (hidrazida do ácido isonicotínico) é uma pró-droga que requer ativação pela enzima micobacteriana catalase-peroxidase, codificada pelo gene *KatG* (ZHANG et al., 1992). Após ativação, a isoniazida se associa a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), formando um complexo que se liga e inibe a proteína micobacteriana *inhA*, codificada pelo gene *inhA*. *InhA* é uma proteína enoil-ACP (*acil carrier protein*) redutase NADH-dependente envolvida na síntese e alongamento de ácidos graxos e biossíntese do ácido micólico. A morte celular subsequente a inibição de *inhA* se dá pela acumulação intracelular de ácidos graxos de cadeia longa e pela redução da biossíntese dos ácidos micólicos (VILCHÈZE; JACOBS, 2007).

A rifampicina atua na inibição da transcrição micobacteriana, demonstrando atividade esterilizante mesmo em populações bacilares em fase estacionária de crescimento. O fármaco se liga à β subunidade da enzima micobacteriana RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, impossibilitando o alongamento da molécula de RNA quando esta

atinge 2-3 nucleotídeos de comprimento (HARTMANN et al., 1967; CAMPBELL et al., 2001).

2.6 RESISTÊNCIA

Em 2015, estimou-me mundialmente a ocorrência de 480.000 casos novos de TB-MDR e 100.000 casos de TB resistente à rifampicina (TB-RR); do total de casos estimados, 3,9% eram referentes a casos novos e 21% referentes a casos de retratamento. O número de óbitos estimados por TB-MDR/TB-RR foi de 250.000. Estimou-se que 9,5% dos casos de TB-MDR possuíam TB-XDR (WHO, 2016). Em 2015 foram registrados no Brasil 1027 casos de TB resistente aos fármacos, dos quais 46,3% eram referentes a monorresistência, 43% a TB-MDR, 7% a polirresistência, 0,8% a TB-XDR e 2,8% com resistência indefinida (BRASIL, 2016).

A resistência aos fármacos antimicobacterianos é classificada em resistência primária e resistência adquirida (ou secundária). A resistência primária é verificada em pacientes nunca tratados com fármacos antimicobacterianos, os quais adquiriram a infecção por bacilos previamente resistentes. A resistência adquirida é observada em pacientes com TB inicialmente identificada como susceptível, que, no entanto, após exposição aos fármacos, se torna resistente. Os principais fatores relacionados ao surgimento da resistência adquirida são: a utilização de esquemas de tratamento inadequados, o uso irregular dos medicamentos por má adesão e dificuldade de acesso aos fármacos (MITCHISON, 1998; DALCOLMO; ANDRADE; PICON, 2007; BRASIL, 2011a).

M. tuberculosis é intrinsecamente resistente à maioria dos antimicrobianos; esta resistência é geralmente atribuída à sua parede celular relativamente impermeável, a qual proporciona uma barreira a compostos nocivos, resistência ao dano e limita a captação de fármacos (BRENNAN; NIKAIDO, 1995; PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007). Porinas distribuídas na membrana celular de *M. tuberculosis* medeiam a difusão de nutrientes hidrofílicos. Além destas porinas, *M. tuberculosis* possui a OmpATb, uma porina de baixa atividade que é essencial para a sobrevivência do microrganismo no ambiente acidificado dentro dos fagossomos dos macrófagos (NIEDERWEIS, 2003). Aliados à permeabilidade seletiva da parede celular, sistemas de efluxo contribuem para a resistência a compostos nocivos por meio da

extrusão, impedindo que estes compostos atinjam seus alvos. A concentração intracelular de um dado composto resulta da combinação entre permeabilidade e efluxo (NIKAIDO, 2001).

A resistência aos fármacos em *M. tuberculosis* não pode ser adquirida por transferência horizontal de genes (ZAINUDDIN; DALE, 1990). Sendo assim, a resistência surge a partir de mutações espontâneas e subsequente seleção de mutantes resistentes. Alterações genéticas específicas (mutação, inserção ou deleção) irão modificar a estrutura da proteína alvo dos fármacos, consequentemente influenciando a eficiência destes (LOUW et al., 2009). As mutações cromossômicas são a principal causa do surgimento de resistência aos antimicrobianos, com a multirresistência sendo consequência do acúmulo sequencial de mutações espontâneas nos genes que codificam tanto o alvo para o fármaco quanto para enzimas envolvidas na sua ativação (SOMOSKOVI; PARSONS; SALFINGER, 2001). Mais de 90% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina possuem no mínimo uma mutação no gene *rpoB*. Em relação aos isolados resistentes à isoniazida, 50-94% possuem no mínimo uma mutação no gene *katG*, 10-35% possuem no mínimo uma mutação no gene *inhA* e 10-40% possuem no mínimo uma mutação no gene *oxyR-ahpC* (LI et al., 2015).

A resistência à rifampicina ocorre quase sempre devido a mutações pontuais no gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase micobacteriana, alvo deste fármaco (TELENTI et al., 1993). A isoniazida é uma pró-droga e requer ativação pela enzima catalase-peroxidase (KatG); seu alvo molecular é a enzima InhA, envolvida na síntese do ácido micólico. Os principais mecanismos de resistência à isoniazida são a ocorrência de mutações nos genes que codificam o seu ativador (gene *katG*) e alvo (gene *inhA*). A mutação mais frequentemente encontrada no gene *katG* ocorre no códon 315, a qual acarreta substituição de uma serina por uma treonina (ZHANG et al., 1992; SILVA; PALOMINO, 2011). A resistência à isoniazida também tem sido associada à mutações nos genes *ndh* e *oxyR-ahpC* (VILCHÈZE; JACOBS, 2007).

2.7 BOMBAS DE EFLUXO

Células procaríotas e eucariotas possuem um arranjo de sistemas transportadores em sua membrana citoplasmática, envolvidos em funções vitais como a absorção de nutrientes essenciais, excreção de

compostos tóxicos e manutenção da homeostase celular. Análises comparativas das sequências de aminoácidos de várias proteínas de transporte têm possibilitado a identificação de classes e famílias de transportadores (PAULSEN; BROWN; SKURRAY, 1996).

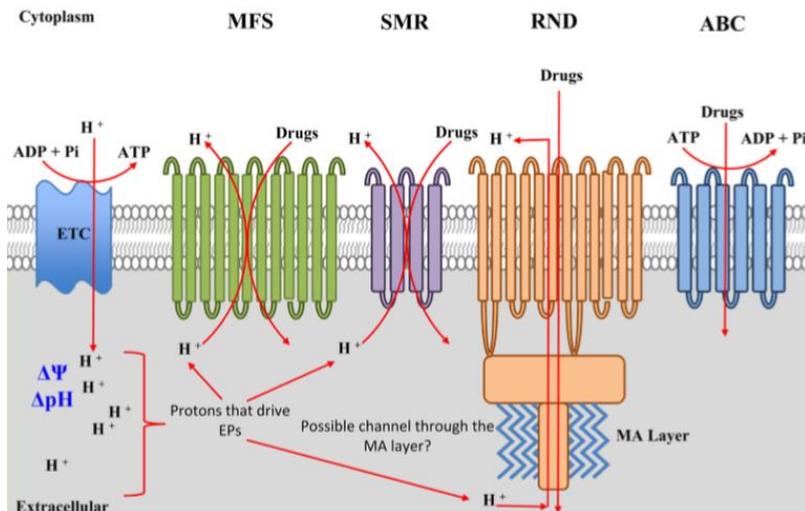
As proteínas transportadoras de membrana são classificadas em duas classes principais: Transportadores secundários e Transportadores do tipo ABC (*ATP-binding Cassette*) (PUTMAN; VAN VEEN; KONINGS, 2000).

Os canais de transporte de elétrons (do inglês *electron transport chain* – ETC) micobacterianos são responsáveis por gerar um gradiente de prótons transmembrânico (ΔpH), resultando em um potencial de membrana ($\Delta\psi$); ΔpH e $\Delta\psi$ constituem a força motriz de prótons (do inglês *proton motive force* – PMF). Os transportadores secundários utilizam o gradiente eletroquímico de prótons H^+ e íons sódio da membrana celular para promover a extrusão (a partir da PMF) (Figura 4) (BLACK et al., 2014). Com base na estrutura primária e secundária, os transportadores secundários são subdivididos em famílias: família dos Facilitadores Majoritários (*Major Facilitator Superfamily* - MFS), família Resistência-nodulação-divisão celular (*Resistance Nodulation Division* - RND), família de Extrusão de Multidrogas e Compostos Tóxicos (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion* - MATE) e família *Small Multidrug Resistance* (SMR) (MARQUEZ, 2005). As bombas de efluxo (do inglês *efflux pumps* – EPs) da família MFS são proteínas de membrana constituídas por 12 a 14 regiões transmembranas e as EPs da família SMR possuem de 4 a 6 domínios transmembrânicos. As proteínas de membrana da família RND se associam com outras proteínas para formar um complexo de multisubunidades que alcança tanto as membranas internas quanto externas; é possível que em micobactérias tais proteínas se associem com a camada de ácidos micólicos (do inglês *mycolic acid layer* – MA layer). Algumas proteínas da família MATE são dependentes da PMF enquanto outras atuam via influxo de sódio (Figura 4) (BLACK et al., 2014).

Os transportadores do tipo ABC utilizam a energia proveniente da hidrólise do ATP para ejetar compostos (Figura 4) (NIKAIDO, 1998, 2001; BLACK et al., 2014). Em *M. tuberculosis*, 2,5% do genoma total é destinado à codificação de transportadores do tipo ABC. A superfamília ABC comporta 52 subfamílias de transportadores responsáveis pela captação e extrusão de uma grande variedade de

substratos, incluindo drogas, açúcares, aminoácidos, íons metálicos e peptídeos (SILVA et al., 2011).

Figura 4 – Bombas de efluxo em *M. tuberculosis*



Fonte: Black e colaboradores (2014).

Mutações nos genes *katG* e *inhA* são responsáveis por aproximadamente 75% dos casos de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida. No entanto, em 25% dos casos não foram identificadas mutações que expliquem o fenótipo resistente (GUO et al., 2006). Acredita-se que o aumento na expressão de genes que codificam bombas de efluxo possa estar envolvido em alguns casos de resistência (LOUW et al., 2009; MACHADO et al., 2012).

Em geral, o aumento da atividade de sistemas de efluxo confere baixo grau de resistência a antibióticos, contrastando com a resistência de alto grau conferida pelas mutações nos genes que codificam alvos primários dos antibióticos (DE ROSSI et al., 2002). O aumento na atividade de efluxo resulta na redução das concentrações intrabacterianas do fármaco, o que pode propiciar a sobrevivência de uma subpopulação bacteriana exposta a constante estresse em decorrência de concentrações subinibitórias do fármaco. Durante esta exposição, mutantes com alterações em genes que favorecem a resistência podem ser selecionados, possibilitando o estabelecimento de uma população resistente que se torna clinicamente significativa (MARTINEZ; BAQUERO, 2000; VIVEIROS et al., 2002; WEBBER;

PIDDOCK, 2003; SRIVASTAVA et al., 2010). Algumas bombas de efluxo são específicas para certas famílias de antibióticos, enquanto que outras atuam na extrusão de um amplo espectro de compostos estruturalmente não relacionados e esta é uma característica bem conhecida das chamadas bombas de efluxo multidroga (GUPTA et al., 2010a; CALGIN et al., 2013).

Prim (2014) avaliou 92 isolados de *M. tuberculosis* quanto à base molecular da resistência à isoniazida e/ou rifampicina, por meio do sequenciamento parcial dos genes associados à resistência. Os resultados revelaram que, dos 91 isolados de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida, 23 (25,3%) não apresentaram mutações nos genes associados a esta resistência, a saber, os genes *katG*, *inhA* e *ahpC*. Dos 54 isolados resistentes à rifampicina, apenas três (5,5%) não apresentaram mutações no gene *rpoB* (PRIM, 2014).

Em 1998, Cole e colaboradores sequenciaram o genoma completo da cepa *M. tuberculosis* H37Rv, a cepa de referência. A partir deste sequenciamento criou-se a base de dados TubercuList, que fornece informações detalhadas e atualizadas sobre o genoma de *M. tuberculosis* (LEW et al., 2011). De acordo com as informações fornecidas pela base de dados TubercuList e a revisão bibliográfica realizada, é atribuída a vários genes possível função de codificação de proteínas de efluxo bem como sua atuação no surgimento da resistência (DORAN et al., 1997; VIVEIROS et al., 2002; CAMUS et al., 2002; JIANG et al., 2008; LOUW et al., 2009; GUPTA et al., 2010a, 2010b; HAO et al., 2011; MACHADO et al., 2012, 2016; RODRIGUES et al., 2012, 2013; CALGIN et al., 2013; BLACK et al., 2014; CHO et al., 2014; LI et al., 2015; COELHO et al., 2015; GARIMA et al., 2015; KANJI et al., 2016b).

Conhecer o papel do efluxo na resistência aos antimicobacterianos em *M. tuberculosis* se faz necessário uma vez que a sua inibição pode contribuir para melhorar a eficácia do tratamento antimicrobiano e agir diretamente na supressão da atividade fisiológica da bactéria (SILVA et al., 2016).

O gene *jefA* (Rv2459) foi identificando como provável codificador da proteína de efluxo *jefA*, membro da família MFS. As espécies *M. ulcerans* e *M. vanbaalenii* demonstraram proteínas com sequências similares a *jefA*. Análises de predição mostraram que *jefA* possui 14 hélices transmembranas (TMHs), sugerindo sua localização e atuação como proteína integral de membrana. A literatura sugere que os

aminoácidos que formam as TMHs 1, 8 e 11 participam na especificidade ao etambutol e os TMHs 2, 7 e 10 atuam na especificidade à isoniazida. O aumento na transcrição de *jeftA* resulta na elevação da resistência ao etambutol e à isoniazida, por um mecanismo de extrusão que contribui para o desenvolvimento da resistência a estes fármacos (GUPTA et al., 2010b).

A bomba *efpA*, codificada pelo gene *efpA* (Rv2846c), pertencente à família MFS, que possui 529 aminoácidos e peso molecular de 55,670 Da. Análises de predição indicaram que *efpA* possui 14 hélices transmembranas, localizadas no interior da membrana de *M. tuberculosis*. (DORAN et al., 1997). Em estudo realizado por Doran e colaboradores (1997) não foi possível relacionar a função de *efpA* como mediador de resistência a antibióticos e antissépticos, os estudos foram realizados em espécies de micobactérias de crescimento lento e crescimento rápido. Deleção do gene *efpA* em *M. smegmatis* resultou em aumento na susceptibilidade à acriflavina, brometo de etídio e fluoroquinolonas. No entanto, esta deleção também resultou em redução na susceptibilidade à rifampicina, isoniazida e cloranfenicol, tal achado demonstra que resultados contraditórios podem ser encontrados em estudos envolvendo diferentes espécies de micobactérias (LOUW et al., 2009). Tem sido demonstrado que a exposição de isolados resistentes de *M. tuberculosis* frente à isoniazida resultou em indução da expressão de *efpA* (WILSON et al., 1999). No entanto, a relação entre esta indução e o mecanismo de resistência permanece questionável (LOUW et al., 2009).

Mmr é uma bomba de efluxo descrita inicialmente por De Rossi e colaboradores (1988) e é a única proteína da família SMR caracterizada em *M. tuberculosis*. Quando sobre-expressa em *M. smegmatis* é capaz de conferir resistência a tetrafenilfosfônio (TPP), ao Brometo de Etídio, a Eritromicina, a Acriflavina, a Safranina O e a Pironina Y. O gene *mmr* está presente nas espécies *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* (DE ROSSI et al., 1998). Em presença de Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) e Verapamil, a Concentração Inibitória Mínima (MIC) de isolado geneticamente modificado que superexpressava *mmr* foi reduzida drasticamente em relação aos compostos Acriflavina, safranina O e Brometo cetiltrimetil-amônio (CTAB), indicando que esta bomba é dependente da força motriz de prótons para executar sua função, como

indicado para as proteínas da família SMR (DE ROSSI et al., 1998; RODRIGUES et al., 2013).

A proteína *bacA* é um transportador primário do tipo ABC codificada pelo gene *bacA* (Rv1819c). *bacA* é uma proteína de membrana associada à manutenção de infecções crônicas em diversas interações patógeno-hospedeiro. Domenech e colaboradores (2009), inativaram o gene *bacA* em *M. tuberculosis* e observaram que a inativação não afetou a susceptibilidade a detergentes, pH ácido e zinco, indicando que a deleção deste gene não acarretou em comprometimento da integridade da membrana. Quando ratos foram infectados com este mutante não foi observado impacto no estabelecimento da infecção, porém foi observado um profundo efeito na manutenção da infecção crônica (DOMENECH et al., 2009). Embora *bacA* não pareça contribuir diretamente para o efluxo dos fármacos ou efluxo de componentes da parede celular; ela possivelmente está envolvida no transporte de certos peptídeos antimicrobianos importantes em determinar a progressão da infecção no hospedeiro (SILVA et al., 2011). Em 2013, Gopinath e colaboradores estabeleceram o papel essencial do gene *bacA* na captação da vitamina B12. Por ser um transportador da família ABC, *bacA* está envolvida na captação de nutrientes e secreção de peptídeos, lipídeos, íons e agente tóxicos (GOPINATH et al., 2013). Foram identificados como substratos da proteína *bacA* os peptídeos antimicrobianos e a isoniazida (JIANG et al., 2008).

O gene *drrA*, compõe o *operon* de resistência à doxorrubicina, *drr*, o qual codifica as proteínas *drrABC*, pertencentes à família ABC. A proteína *drrA* tem sido descrita como uma bomba de efluxo ativa, envolvida no efluxo da doxorrubicina em *M. smegmatis*. A principal função fisiológica das proteínas *drr* em *M. tuberculosis* parece estar associada ao transporte de lipídeos complexos para o exterior da célula. O *operon drr* se encontra localizado no *cluster* dos 13 genes envolvidos na biossíntese e transporte dos lipídios ptiocerol dimicocerosato (PDIMs) do citoplasma para a parede celular. Os PDIMs atuam na permeabilidade da parede celular de *M. tuberculosis* e são um fator de virulência bacteriano, sobretudo durante os primeiros estágios da infecção, quando os bacilos se deparam com a resposta imune via macrófagos (CAMACHO et al., 2001; CHOUDHURI et al., 2002; SILVA et al., 2016). As proteínas *drrA* e *drrB* estão relacionadas à resistência a fármacos hidrofóbicos (CHOUDHURI et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de expressão de genes que codificam para algumas bombas de efluxo em isolados clínicos de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de susceptibilidade à isoniazida.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar e comparar os níveis basais de expressão de cinco genes codificantes para bombas de efluxo em isolados clínicos de *M. tuberculosis* susceptíveis à isoniazida, com monorresistência primária à isoniazida e em isolados susceptíveis à isoniazida, porém provenientes de pacientes com baciloscopia positiva após o quarto mês de tratamento com o esquema básico.

Relacionar os níveis basais de expressão de cinco genes codificantes para bombas de efluxo em isolados clínicos de *M. tuberculosis* ao perfil de susceptibilidade à isoniazida apresentados por estes isolados.

Quantificar e comparar os níveis de expressão de cinco genes codificantes para bombas de efluxo em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv em isolados clínicos de *M. tuberculosis* susceptíveis à isoniazida, com monorresistência primária à isoniazida e em isolados susceptíveis à isoniazida, porém provenientes de pacientes com baciloscopia positiva após o quarto mês de tratamento com o esquema básico.

Relacionar os níveis de expressão relativa à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv de 5 genes codificantes para bombas de efluxo em isolados clínicos de *M. tuberculosis* ao perfil de susceptibilidade à isoniazida apresentados por estes isolados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/UFSC em 10/03/2014 sob número 25716113.7.0000.0121, como parte dos objetivos secundários da pesquisa “Avaliação da influência da deleção RDRio e da concentração inibitória mínima na falência da resposta ao tratamento de primeira linha de tuberculose pulmonar: uma coorte prospectiva de dois anos na Grande Florianópolis/SC”, desenvolvida pela Doutoranda Mara Cristina Scheffer, sob orientação da Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo (Anexo A).

4.2 AMOSTRAGEM

Trinta isolados clínicos de *M. tuberculosis* e a cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv foram obtidos a partir do banco de bactérias do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS), laboratório integrante ao Departamento de Análises Clínicas (ACL), Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras foram isoladas de culturas realizadas a partir do escarro coletado no momento do diagnóstico, sendo assim, os isolados foram obtidos anteriormente a introdução da terapêutica. Os isolados foram mantidos em água sob congelamento a -20°C até o início dos experimentos.

Os resultados dos perfis de sensibilidade aos fármacos antituberculose foram fornecidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de Santa Catarina. Os perfis de sensibilidade foram obtidos com a metodologia automatizada em sistema comercial BACTEC™ MGIT™ 960 *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (Becton Dickinson, EUA). Os resultados da baciloscopia foram fornecidos pelos laboratórios das unidades de saúde que realizaram o diagnóstico da doença.

Os isolados foram agrupados com base nos resultados da baciloscopia de controle do segundo e quarto meses e teste de sensibilidade (TS) aos fármacos. Os agrupamentos encontram-se descritos na Figura 5.

Figura 5 – Agrupamento das amostras com base nos perfis de sensibilidade à isoniazida e baciloscopia.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<ul style="list-style-type: none"> • Suscetível à isoniazida. • Baciloscopia: negativa após o segundo mês de tratamento com o esquema básico. • Amostragem: 10 isolados (nº 1 ao 10) 	<ul style="list-style-type: none"> • Suscetível à isoniazida. • Baciloscopia: positiva após o quarto mês de tratamento com o esquema básico. • Amostragem: 10 isolados (nº 11 ao 20) 	<ul style="list-style-type: none"> • Monorresistência primária à isoniazida • Amostragem: 10 isolados (nº 21 ao 30)

Fonte: a autora

Os isolados foram avaliados quanto a susceptibilidade à isoniazida e aos demais fármacos utilizados no tratamento de primeira linha.

As informações sobre o tratamento utilizado e desfecho dos casos foram obtidas por meio da análise dos registros dos pacientes, fornecidos pelo Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) da cidade de São José e Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Florianópolis, ambos situados no estado de Santa Catarina (Quadro 2).

Quadro 2 – Tratamento utilizado e desfecho dos casos incluídos no presente estudo.

Identificação do isolado	Grupo	Tratamento utilizado	Desfecho do caso
1	G1	2RHZE/4RH	Evolução para cura
2	G1	2RHZE/4RH	Evolução para cura
3	G1	2RHZE/7RH (paciente diabética)	Evolução para cura
4	G1	2RHZE/4RH	Evolução para cura
5	G1	2RHZE/4RH	Evolução para cura
6	G1	2RHZE/4RH	Evolução para cura
7	G1	2RHZE/4RH	Evolução para cura
8	G1	2RHZE/4RH	Evolução para cura
9	G1	2RHZE/4RH	Evolução para cura
10	G1	2RHZE/4RH	Evolução para cura
11	G2	2RHZE/7RH	Evolução para cura
12	G2	2RHZE/7RH	Evolução para cura
13	G2	2RHZE/7RH	Evolução para cura
14	G2	2RHZE/16RH	Abandono
15	G2	2RHZE/7RH	Evolução para cura
16	G2	2RHZE/4RH	Evolução para cura
17	G2	2RHZE/2RH	Abandono
18	G2	2RHZE/abandono 30 dias/4RH	Evolução para cura
19	G2	2RHZE/7RH (retratamento)	Evolução para cura
20	G2	2RHZE/7RH	Evolução para cura
21	G3	2RHZE/2RH (retratamento)	Abandono
22	G3	2RZES/6RE	Evolução para cura
23	G3	2RZES/6RE	Evolução para cura
24	G3	2REL/4RE	Evolução para cura
25	G3	2RHZE/7RH	Evolução para cura
26	G3	2RHZE/4RH	Evolução para cura
27	G3	2REL/?RE	Abandono
28	G3	2RZES/2RE (retratamento)	Abandono
29	G3	2RHZE/7RH	Evolução para cura
30	G3	2RHZE/7RH	Evolução para cura

Os valores numéricos posicionados em frente aos esquemas de tratamento referem-se à duração do tratamento, em meses. R – rifampicina; H – isoniazida; Z – pirazinamida; E – etambutol; S – estreptomicina; L – levofloxacina.

Fonte: Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) da cidade de São José e Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Florianópolis, Santa Catarina.

4.3 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal observacional descritivo com isolados de *M. tuberculosis*, divididos em três grupos, como descrito na seção 5.2. Os isolados foram avaliados quanto à expressão de cinco

genes codificantes para proteínas de membrana do tipo bombas de efluxo (Quadro 3). Os resultados obtidos foram avaliados por meio da comparação entre os diferentes grupos (Figura 6 A). As amostras foram também avaliadas quanto à expressão relativa à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv, cepa susceptível aos antimicobacterianos empregados no tratamento da TB, a qual teve seu genoma inteiramente sequenciado e disponibilizado (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000962.3> sob o número NC_000962.3) (Figura 6 B).

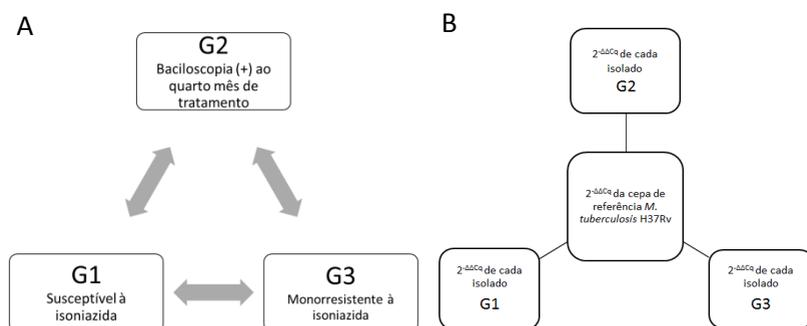
Quadro 3 – Genes codificadores de bombas de efluxo avaliados.

Nome do Gene	Número Rv	Sequência de referência NCBI	Família da Proteína Codificada
<i>jefA</i>	Rv2459	NC_000962.3	Major Facilitator Superfamily (MFS)*
<i>efpA</i>	Rv2846c	NC_000962.3	Major Facilitator Superfamily (MFS)*
<i>mmr</i>	Rv3065	NC_000962.3	Small Multidrug Resistance (SMR)*
<i>bacA</i>	Rv1819c	NC_000962.3	ATP-Binding Cassette (ABC)**
<i>draA</i>	Rv2936	NC_000962.3	ATP-Binding Cassette (ABC)**

*Proteínas transportadoras de membrana pertencentes à classe dos Transportadores Secundários. **Proteínas transportadoras de membrana da classe Transportadores do Tipo ABC. Número Rv: Número atribuído às Sequências Codificadoras (CDS - Coding DNA Sequence) do genoma de *M. tuberculosis*.

Fonte: a autora.

Figura 6 – Análises comparativas empregadas no estudo.

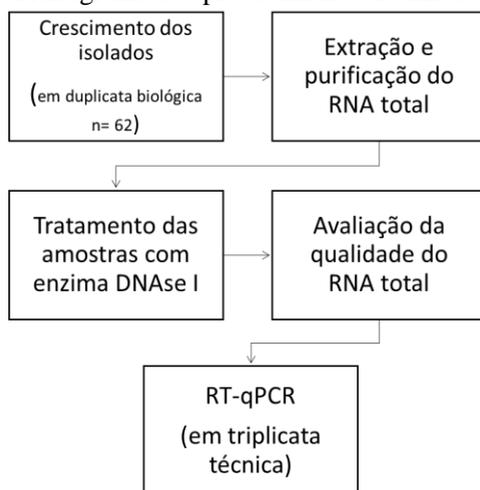


A) Análise comparativa entre os grupos realizada a partir dos valores de $2^{-\Delta Cq}$; B) Análise de cada isolado em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv a partir dos valores de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e análise entre os grupos a partir dos valores de $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Fonte: a autora

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS), localizado no Hospital Universitário (HU/UFSC) e integrante ao Departamento de Análises Clínicas (ACL), Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), situada na cidade de Florianópolis, Santa Catarina. Foram parceiros da pesquisa o Setor de Tuberculose do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina (LACEN) e o Laboratório Municipal de Florianópolis - LAMUF.

Os processos envolvidos na análise da expressão dos genes alvo *jeftA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* e *drrA* se deu conforme descrito na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma dos procedimentos realizados.



Legenda: RT-qPCR: Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real. Fonte: a autora.

4.4 CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE *M. tuberculosis*

Os isolados de *M. tuberculosis* obtidos a partir do banco de bactérias do LBMMS foram descongelados e semeados em meio sólido Ogawa-Kudoh (Laborclin/Brasil). As culturas foram incubadas a 37°C durante 28 dias (BRASIL, 2008). O meio Ogawa-Kudoh é um meio à base de ovos, solução aquosa de verde malaquita (inibe microbiota contaminante), Glicerol, Glutamato de Sódio, Citrato de Magnésio, água destilada e Fosfato Monopotássico Anidro (ANVISA, 2012). As

culturas foram preparadas em Cabine de Segurança Biológica de Classe II Tipo B2, respeitando as boas práticas microbiológicas (BRASIL, 2008).

Após crescimento em meio sólido, as colônias foram transferidas a um tubo de vidro contendo pérolas de vidro com tamanho entre 1 e 2 mm (Sigma-Aldrich, EUA); em seguida o tubo foi homogeneizado em agitador tipo *vortex* por 30 segundos e mantido em repouso por 15 minutos para prevenir o escape de aerossóis formados durante a agitação (NOGUEIRA et al., 2012). Cerca de 4 mL de meio líquido Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, EUA) (suplementado com Ácido Oleico, Albumina, Dextrose, Catalase e Polissorbato 80, preparado *in house*) foram adicionados às colônias e o tubo foi novamente homogeneizado em agitador tipo *vortex* e mantido em repouso por mais 15 minutos.

Dois mL da suspensão bacteriana foram inoculados em tubo de fundo cônico contendo 18 mL de meio Middlebrook 7H9, a mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C durante 7 dias. Após este período, a cultura foi homogeneizada e 2 mL foram transferidos para um novo tubo de fundo cônico contendo 18 mL de meio Middlebrook 7H9. As culturas foram novamente incubadas a 37°C durante sete dias, período este em que atingiram a fase exponencial de crescimento; ao fim deste período iniciou-se o processo de extração do RNA total (WILDNER, 2016). As amostras foram inoculadas em culturas independentes com um intervalo de 48 horas entre elas (duplicata biológica). Durante a realização do estudo, os isolados não foram desafiados frente a antibióticos, pois, uma vez que foram coletados no momento do diagnóstico, não ocorreu contato destes com a terapia prescrita posteriormente, sendo assim, o estudo procurou mimetizar as condições presentes *in vivo*, no que diz respeito a exposição a fármacos.

4.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

Para o sucesso da extração do RNA total quatro etapas são essenciais: a lise efetiva da célula, a inativação das ribonucleases endógenas e exógenas (RNases), a desnaturação de complexos nucleoproteicos, e a remoção de DNA e proteínas. Além da degradação enzimática, o RNA liberado do bacilo pode sofrer degradação termal, desta forma o tempo de extração deve ser o mais curto possível (MAHENTHIRALINGAM, 1998; SAMBROOK; RUSSELL, 2001; WALKER, 2008).

O espesso revestimento de lipídeos da parede celular de *M. tuberculosis* torna o bacilo resistente à lise, dificultando o processo de extração do RNA, o qual passa a exigir o emprego de equipamentos específicos que rompam a parede celular rapidamente (BRENNAN; NIKAIDO, 1995; ABDALLAH et al., 2007; AKHTAR et al., 2011). Grande parte dos trabalhos analisados neste estudo utilizaram equipamentos de ruptura celular conhecidos como *bead beaters* (MAHENTHIRALINGAM, 1998; DIETRICH et al., 2000; MCILROY et al., 2008; WALKER, 2008; KÄSER et al., 2010; AKHTAR et al., 2011; VENKATARAMAN; GUPTA; GUPTA, 2013). Tendo em vista que o LBMMS não possui equipamentos do tipo *bead beaters*, foram testadas metodologias que dispensam o uso do equipamento, como lise enzimática a partir de lisozima associada à lise mecânica em banho ultrassônico e lise mecânica em banho ultrassônico com e sem adição de pérolas (sílica/zircônia) associada ao Trizol e solução de guanidina, porém, não foi possível isolar RNA total em concentração e pureza requeridos a partir destas metodologias. A descrição das metodologias mencionadas, bem como os resultados obtidos encontram-se descritos no Apêndice A. Por fim, foi feita parceria com o Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias (CCA), UFSC, o qual emprestou o equipamento *bead beater* Precellys 24® (Bertin Instruments, França) para que as extrações pudessem ser realizadas.

O RNA total foi extraído a partir de culturas de *Mycobacterium tuberculosis* em meio líquido Middlebrook 7H9 com base no método Guanidina/Tri Reagent®/RNeasy Mini Kit (BUG@SBASE, 2016; LIFE TECHNOLOGIES, 2012; SAMBROOK; RUSSELL, 2001; WALKER et al., 2008). Imediatamente após remoção das culturas da estufa foram adicionados ao tubo de cultura quatro volumes da solução desnaturante de Tiocianato de Guanidina a 5M (Tiocianato de Guanidina, N-lauroyl-sarcosina, 1M Citrato de Sódio, Tween 80, β-mercaptoetanol). Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 1057 x g por 30 minutos. Parte do sobrenadante foi removido e o sedimento bacteriano ressuspenso em 10 mL do sobrenadante restante. A suspensão bacteriana foi novamente centrifugada a 1057 x g por 20 minutos e todo o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado ao sedimento 1,2 mL de Tri Reagent® (Sigma-Aldrich, EUA) e a suspensão foi congelada a -80°C até que todas as amostras estivessem prontas para a etapa de lise.

A suspensão bacteriana foi descongelada e transferida para tubos de lise [criotubos de 2 mL com tampa de rosca (Sarstedt, Alemanha) contendo 500 µL de pérolas de sílica/zircônio de 0,1 mm (BioSpec Products Inc., EUA) lavadas previamente com Ácido Clorídrico⁴], os quais foram submetidos a agitação no equipamento Precellys 24[®] (Bertin Instruments, França) a 6800 rpm por 3 ciclos de 30 segundos cada (KÄSER et al., 2010). Após agitação, os tubos foram incubados em temperatura ambiente⁵ por 5 minutos para que ocorresse a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. As culturas foram manipuladas em Cabine de Segurança Biológica de Classe II Tipo B2, até que a lise fosse concluída.

Foram adicionados ao lisado 240 µL de Clorofórmio P. A.⁶ (Merck, Alemanha) e em seguida as amostras foram homogeneizadas em agitador do tipo vórtex por 15 segundos e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, o que permitiu a visualização de 3 fases: uma fase orgânica inferior vermelha (contendo proteínas), uma interfase (contendo DNA) e uma fase aquosa superior incolor (contendo RNA). A fase aquosa foi transferida a um novo microtubo e foram adicionados 600 µL de 2-Propanol P. A. (Merck, Alemanha); as misturas foram agitadas e incubadas *overnight* a -20°C para que ocorresse a precipitação do RNA.

Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a 4°C, o que permitiu a visualização do sedimento de RNA. O sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com adição de 1,2 mL de Etanol 75% gelado. As amostras foram agitadas em *vortex* e centrifugadas a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e o sedimento de RNA foi seco em temperatura ambiente por 15 minutos. Por fim, foram adicionados ao sedimento 100 µL de Água RNase-DNase Free (Qiagen, Alemanha).

Para purificação do RNA total extraído foi utilizado o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. Adicionou-se à amostra 350 µL de *Buffer RLT* e 250 µL de Etanol

⁴ 5,8 M HCl: 1 volume de HCl concentrado para 1 volume de água ultrapura

⁵ Definiu-se como temperatura ambiente temperaturas entre 20°C e 25°C.

⁶ Todos os reagentes utilizados nos experimentos possuem grau de pureza recomendado para biologia molecular

100%. A mistura foi homogeneizada e transferida à coluna de purificação acoplada ao tubo coletor. Em seguida, centrifugou-se a 10000 x g por 15 segundos. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e foram adicionados à coluna 500 µL de *Buffer RPE*, a qual foi centrifugada a 10000 x g por 15 segundos. O conteúdo do tubo coletor foi novamente descartado e mais 500 µL de *Buffer RPE* foram adicionados à coluna, a qual foi centrifugada a 10000 x g por 2 minutos. A coluna foi transferida a um novo tubo coletor e centrifugada em velocidade máxima (13148 x g) por 1 minuto. Por fim, a coluna foi transferida a um microtubo e foram adicionados 30 µL de água RNase-DNase free (Qiagen, Alemanha), centrifugou-se a 10000 x g por 1 minuto e transferiu-se o volume eluído novamente à coluna; repetiu-se a centrifugação e coletou-se o RNA eluído, o qual foi imediatamente congelado a -80°C. Todas as centrifugações foram realizadas em temperatura ambiente.

4.6 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE RNA COM ENZIMA DNase I

Apesar de o processo de extração de RNA empregar reagentes e kit's que garantem a ausência de contaminação por DNA genômico, foi feito tratamento das amostras com a enzima DNase I (endonuclease) com o kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Aos 30 µL de RNA, foi adicionado 3,75 µL de RQ1 RNase-Free DNase 10X *Reaction Buffer* e 3,75 µL de RQ1 RNase-Free DNase. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e 3,75 µL de RQ1 DNase *Stop Solution* foi adicionado. Por fim ocorreu incubação a 65°C por 10 minutos (PROMEGA, 2009). O RNA total tratado foi alíquotado e armazenado a -80°C.

4.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA TOTAL

Para técnicas como RT-qPCR o RNA deve estar intacto para a correta quantificação da expressão gênica de RNA mensageiros (mRNA), conseqüentemente a checagem da qualidade e pureza do RNA são passos críticos na obtenção de dados confiáveis de expressão gênica (JAHN; CHARKOWSKI; WILLIS, 2008). As amostras foram avaliadas quanto à concentração e pureza no equipamento NanoVue™ Plus (General Electric, EUA) e integridade por eletroforese em gel de

agarose 1,2% com TAE 1x (20 mM Tris acetato, 0,5 mM EDTA, pH 8) a 80 V por 30 minutos com Brometo de etídio incorporado ao gel (Sigma-Aldrich, EUA). As bandas (23S/16S) foram visualizadas em transluminador de luz ultravioleta (LAS 500 – General Electric, EUA) (MANGANELLI et al., 1999; AKHTAR et al., 2011; VENKATARAMAN; GUPTA; GUPTA, 2013).

Sabe-se que os ácidos nucleicos possuem absorbância máxima no comprimento de onda 260 nm, as proteínas a 280 nm e contaminantes variados a 230 nm. A amostra foi considerada como “pura” para RNA quando os valores da razão $A_{260/280}$ foram $> 1,8$. Valores baixos da relação $A_{260/280}$ indicam contaminação com proteínas (GE, 2007).

A presença de contaminação por DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, de forma que a visualização de material genético nos poços de aplicação ou arraste imediatamente abaixo aos poços é indicativo de tal contaminação (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001).

4.8 SÍNTESE DE cDNA

O RNA total extraído foi convertido em DNA complementar (cDNA) a partir do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Life Technologies, EUA), seguindo orientações do fabricante. Todas as amostras foram diluídas de maneira a apresentarem concentração fixa de 30 ng/ μ L; esta concentração foi determinada com base no fato de que esta foi a menor concentração obtida no processo de extração. Para preparo do 2X RT *master mix*, foram adicionados, por amostra: 2 μ L de 10X RT *Buffer*, 0,8 μ L de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 μ L de 10X RT *Random Primers*, 1 μ L de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50U/ μ L), 1 μ L de RNase Out (Life Technologies/EUA) e 3,2 μ L de Água RNase-DNase *Free* (Qiagen, Alemanha). Foram distribuídos 10 μ L de *master mix* em microtubos, aos quais foram adicionados 10 μ L de RNA previamente diluído, totalizando 20 μ L de reação. As amostras foram posicionadas em termociclador (Applied Biosystems®, EUA) e as condições de transcrição foram as seguintes: 25°C/10 minutos, 37°C/120 minutos, 85°C/5 minutos e 4°C/até a retirada das amostras do termociclador. As amostras de cDNA foram diluídas (1:100), em água RNase-DNase *Free* (Qiagen, Alemanha), e armazenadas a -20°C até a realização da RT-qPCR.

Para verificação de possível contaminação do RNA total extraído por DNA genômico, foi feito um pool de RNA para cada 10 amostras; este pool foi submetido a reação de transcrição reversa, porém, substituiu-se a enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase por Água RNase-DNase free. Este cDNA foi denominado como controle de contaminação por DNA (CCD) e foi utilizado nas reações de qPCR.

4.9 ANÁLISE *IN SILICO* DA ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (*PRIMERS*) E FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS

Para análise da expressão dos genes *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* e *drrA* foi adotado um conjunto de 3 genes de referência, os genes *polA*, *sigA* e *rrs*⁷, escolhidos com base na literatura (MANGANELLI et al., 1999; JIANG et al., 2008; GUPTA et al., 2010b; RODRIGUES et al., 2012; GARIMA et al., 2015; LI et al., 2015).

As sequências dos iniciadores utilizados na avaliação dos transcritos dos genes *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA*, *drrA*, *polA*, *sigA* e *rrs* foram selecionadas a partir de dados publicados na literatura científica da área (Quadro 4), e foram avaliadas quanto à especificidade por meio da ferramenta *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), disponibilizada pela base de dados *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A especificidade foi também avaliada através da importação das sequências alvo da cepa de referência H37Rv, disponíveis na base de dados *Tuberculist* (<http://tuberculist.epfl.ch/>), e o alinhamento dos iniciadores frente a estas sequências.

As sequências foram também analisadas quanto à possibilidade de formação de *hairpin*, *self-dimers* e hetero-dímeros, através da ferramenta *OligoAnalyzer* 3.1, disponibilizada pela empresa IDT (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), a qual também fornece as temperaturas de dissociação e concentração de CG de cada iniciador.

⁷ O gene *rrs* codifica o RNA ribossomal 16S (rRNA 16S).

Quadro 4 – Iniciadores utilizados para análise da expressão basal de genes por RT-qPCR.

Gene	ID <i>GenBank</i>	Sequência dos iniciadores (5' - 3')	Produto (pb)	Referência
<i>jefA</i>	NC_0009 62.3	Senso – GCTCTATTGTCTGTGTGCTACC Antisenso - CGCCCGTGCTTTCATTCG	146	(KARDAN YAMCHI et al., 2015)
<i>efpA</i>	NC_0009 62.3	Senso – TAGGTTTCATCCC GTTCGTC Antisenso - TGACCAGGTTGGGGAAGTAG	177	(GUPTA et al., 2010a)
<i>mmr</i>	NC_0009 62.3	Senso – AACCAGCCTGCTCAAAAAG Antisenso - CAACCACCTTCATCACAGA	221	(RODRIGU ES et al., 2012)
<i>bacA</i>	NC_0009 62.3	Senso – GATCAGTGCCATCTGTGTGC Antisenso - TGTCGTTGCCTTGGTAGCTG	200	(GARIMA et al., 2015)
<i>draA</i>	NC_0009 62.3	Senso – TAGACATCGCGTGCGGATTGGT Antis. - GCGTGGTCAACAACGTGGCAAT	147	(LI et al., 2015)
<i>polA</i>	NC_0009 62.3	Senso – GAGTTAGCGCGTATCGACTC Antisenso - TACCGGCACCTTCCATCTTC	88	(WILDNER, 2016)
<i>sigA</i>	NC_0009 62.3	Senso – TCAAACAGATCGGCAAGGTAG Antisenso - CGCTAAGCTCGGTCATCAG	108	(WILDNER, 2016)
<i>rrs</i>	NC_0009 62.3	Senso – CAAGGCTAAAAC TCAAAGGA Antisenso - GGACTTAACCCAACATCTCA	197	(RODRIGU ES et al., 2012)

Legenda: (pb) – tamanho do produto em pares de base

Todos os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela empresa Sigma-Aldrich (São Paulo/SP, Brasil) e diluídos em água RNase-DNase *Free* (Qiagen, Alemanha) a uma concentração estoque de 100 µM. Para preparo da solução de trabalho, os iniciadores foram diluídos a uma concentração de 10 µM.

4.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

A quantificação dos transcritos dos genes *je fA*, *efpA*, *mmr*, *bacA*, *dr rA*, *polA*, *sigA* e *rrs* foi obtida com a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR), utilizando-se o cDNA, Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen®/Thermo Fisher Scientific, EUA) e o intercalante SYBR® Green I *Nucleic Acid Gel Stain* – 10.000X concentrado em DMSO (Applied Biosystems®/Thermo Fisher Scientific, EUA). As reações foram realizadas no equipamento *Mastercycler® ep Realplex 4* (Eppendorf®, Alemanha) em placas de 96 poços *Axygen® 96 Well Polypropylene PCR Microplate* (Axygen®/Corning Incorporated, EUA). Inicialmente, preparou-se a mistura da reação, contendo: 3 µL de 1X SYBR® Green I (diluído em água RNase-Free no momento do uso); 0,3 µL de cada iniciador a 10 µM (concentração final de 0,2 µM); 0,3 µL de 5 mM dNTPs (concentração final de 0,1 mM) (Qiagen®, Alemanha); 1,5 µL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 0,9 µL de 50 mM de MgCl₂ (concentração final de 3 mM) e 0,075 µL de 5 U/µL de Platinum Taq DNA Polymerase (concentração final de 0,375 U) (Invitrogen®/Thermo Fisher Scientific, EUA); e 1,125 µL de água livre de DNase/RNase (Promega Corporation, EUA), para cada poço de reação. Em seguida, distribuiu-se 7,5 µL do *mix* aos poços. Por fim, adicionou-se 7,5 µL de cDNA (1:100) de cada amostra em seus respectivos poços, totalizando 15 µL de reação. A placa foi selada com *MicroAmp® Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems®/Thermo Fisher Scientific, EUA) e centrifugada por 30 segundos a 300 x g. As condições de termociclagem foram as seguintes: ativação inicial da enzima Platinum Taq DNA Polymerase a 95°C por 15 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, hibridização a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; e curva de dissociação (ou curva de dissociação), com aquecimento gradual de 1°C a cada 15 segundos (de 65°C a 95°C) e monitoramento da fluorescência em cada grau centígrado. Com o objetivo de avaliar a existência de contaminação, para cada par de iniciadores foi inserida uma triplicada da reação substituindo-se o cDNA por água (controle sem amostra ou *no-template control*). Os controles CCD, descritos na seção 6.5.5 foram também avaliados para cada par de iniciadores. Os dados gerados foram visualizados e analisados com o software *Realplex* versão 2.2

(Eppendorf®, Alemanha). As amostras foram avaliadas em duplicata biológica e triplicata técnica, utilizando-se o RNA total obtido de duas culturas independentes.

4.11 ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES APÓS A RT-qPCR

Além das análises *in silico* descritas na seção 4.9, a especificidade de todos os iniciadores empregados foi também validada através de evidências experimentais diretas obtidas por meio da análise da curva de dissociação, disponibilizada pelo software *Realplex* versão 2.2 (Eppendorf®, Alemanha) e eletroforese em gel de agarose dos produtos gerados durante a qPCR.

A curva de dissociação (ou curva de *melting*) se molda em função da concentração de CG, comprimento e sequência do produto ou dímero de iniciadores. A temperatura em que produtos de interesse, produtos inespecíficos e dímeros de iniciadores se dissociam varia em grande escala, tornando possível a diferenciação. Produtos inespecíficos geralmente se dissociam em temperaturas inferiores às temperaturas de dissociação dos produtos de interesse (RIRIE; RASMUSSEN; WITWER, 1997). O software *Realplex* gera um gráfico de dissociação, pelo qual é possível identificar a presença de picos que indicam a temperatura de dissociação de cada produto formado ao fim dos 40 ciclos.

A eletroforese dos produtos formados foi feita em gel de agarose 2% com TBE 1X (89 mM Tris acetato; 20 mM EDTA, Ácido Bórico 89 mM, pH 8,0) e Brometo de Etídio (Sigma-Aldrich, EUA) incorporado ao gel. O fracionamento eletroforético ocorreu a 80V por 40 minutos. Os produtos foram visualizados sob luz ultravioleta de 320 nm em sistema de foto-documentação de géis ImageQuant LAS 500 (General Electric, EUA). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com marcadores de tamanho molecular (*ladder*) de 50 pb (Ludwig Biotec, Brasil).

Somente os iniciadores que mostraram um pico único na curva de dissociação e uma banda única de tamanho esperado no gel de agarose foram validados para a análise (LEKANNE DEPRez et al., 2002).

4.12 ANÁLISE DAS EFICIÊNCIAS DAS REAÇÕES DE RT-qPCR

A quantificação relativa da expressão de um determinado gene alvo em relação ao calibrador é determinada pelo método do *C_q* comparativo, o qual é validado apenas se as eficiências de amplificação do gene alvo e dos genes de referências forem aproximadamente iguais (entre 1,8 e 2,0) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Curvas padrão vêm sendo utilizadas para determinar a eficiência de amplificação da qPCR. Tais curvas podem ser geradas a partir do emprego de concentrações conhecidas de RNA total na reação de transcrição reversa ou através de diluição seriada de uma amostra de cDNA. A eficiência da amplificação é determinada pela inclinação (*slope*) da porção *log-linear* da curva e é calculada pela equação: Eficiência = $10^{(-1/slope)}$ (RAMAKERS et al., 2003). Por ser baseada em diluições seriadas de uma única amostra de cDNA, a curva padrão admite o viés de que contaminantes (sais, fenol, clorofórmio, etanol, etc) que reduzam a eficiência da reação sejam também diluídos, resultando em melhor eficiência a cada diluição (RAMAKERS et al., 2003).

Uma abordagem alternativa para a determinação da eficiência da reação de qPCR foi elaborada com base nos dados fluorométricos detectados ao final de cada ciclo da reação. Esta abordagem encontra-se disponível no programa LinRegPCR- *Analysis of quantitative qPCR Data*, versão 2016.2 (disponível para download em <http://linregpcr.hfrc.nl>) (RAMAKERS et al., 2003; RUIJTER et al., 2009) e foi o método escolhido para calcular a eficiência das reações de qPCR do presente estudo.

A análise executada pelo programa LinRegPCR é baseada na linearização da fórmula básica da amplificação exponencial da PCR⁸, de maneira a calcular o logaritmo de ambos os lados da equação, resultando na fórmula $\text{Log}(N_C) = \text{Log}(N_0) + \text{Log}(E) \times C$, onde N_C e C são os dados da fluorescência detectados e o número do ciclo, respectivamente. Os valores brutos de fluorescência obtidos ao final de

⁸ Equação básica da cinética da PCR: $N_C = N_0 \times E^C$, onde a quantidade de amplicon após C ciclos (N_C) é igual a concentração inicial do amplicon (N_0) multiplicado pela eficiência da PCR (E) na potência C .

cada ciclo da reação de qPCR foram importados pelo software, o qual, por poço de reação, executou a correção do baseline. A porção *log-linear* dos dados de fluorescência da qPCR foi determinada através da delimitação de uma janela de linearidade, dentro desta, o programa selecionou uma linha formada por 3 a 6 pontos com o maior valor de R^2 e a inclinação máxima. Uma análise por regressão linear da inclinação da curva de amplificação na fase exponencial foi então formulada e utilizada como base para calcular a concentração inicial de mRNA, por meio da equação $N_0 = 10^{\text{intercept}}$, e a eficiência individual da PCR, através da equação $E = 10^{\text{slope}}$. Por fim, o software calculou a média das eficiências obtidas para cada par de iniciadores bem como a média dos coeficientes de correlação (R^2). Eficiências de 1,8 e 2,0 indicam 90% e 100% de eficiência, respectivamente. Uma eficiência de 2,0 indica que a quantidade de produto duplica a cada ciclo. Iniciadores que obtiveram valores de eficiência entre 1,8 e 2,0 e R^2 entre 0,990 e 0,999 foram validados para utilização no presente estudo (RAMAKERS et al., 2003; RUIJTER et al., 2009).

4.13 DETERMINAÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA

Os genes de referência (ou normalizadores) inicialmente propostos, *polA*, *sigA* e *rrs*, foram avaliados em reações de RT-qPCR. Todas as amostras foram envolvidas nesta avaliação, em duplicata biológica e triplicata técnica. A média dos valores de C_q obtidos por amostra, para cada gene de referência avaliado, foi utilizada para calcular o valor $2^{-\Delta C_q}$, o qual foi analisado pela ferramenta *geNorm Visual Basic Application (VBA)* para *Microsoft Excel* (VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009). Tal ferramenta calcula o valor da estabilidade de expressão dos genes candidatos a genes de referência para o perfil de amostras a serem utilizadas. O software emprega um algoritmo que ranqueia os genes investigados de acordo com sua estabilidade de expressão e associa os genes, de maneira a definir o gene, ou a combinação de genes mais estável. A estabilidade é expressa como valor M (*M-value*), sendo que quanto menor o valor M , melhor será a estabilidade; além disso, o programa determina o número apropriado de genes de referência que devem ser utilizados no processo de normalização. Esta avaliação foi utilizada na determinação dos genes de referência do presente estudo. A média geométrica dos valores de C_q do gene, ou combinação de genes indicados pelo software como sendo a

mais estável foi empregada na normalização (VANDESOMPELE et al., 2002; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009). Durante a realização deste projeto, a ferramenta *RefFinder* (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference>), amplamente utilizada na avaliação de genes de referência, encontrou-se indisponível.

4.14 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* E *drrA*

A expressão dos genes alvo *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* e *drrA* foi determinada a partir dos dados gerados na reação de RT-qPCR, expressos em ciclo de quantificação (C_q), definido como o ciclo no qual a fluorescência proveniente do produto amplificado encontra o limiar de detecção. Os valores de C_q obtidos foram avaliados pelo método do C_q comparativo, descrito por Livak e Schmittgen (2001). A média geométrica dos valores médios de C_q dos genes de referência *rrs*, *polA* e *sigA* ($C_{q_{normalizador}}$) foi utilizada na normalização (VANDESOMPELE et al., 2002; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009).

Para avaliação da expressão basal do gene alvo em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv adotou-se o cálculo $2^{-\Delta\Delta C_q}$, (Figura 8, A) (a cepa de referência foi utilizada como calibrador) e para avaliação da expressão gênica basal entre os Grupos 1, 2 e 3 adotou-se o cálculo $2^{-\Delta C_q}$ (Figura 8, B). Inicialmente, foi calculada a média⁹ dos valores brutos de C_q , obtidos a partir da triplicata técnica para as amostras “teste” ($C_{q_{teste}}$) e cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv ($C_{q_{calibrador}}$). Tais médias foram então normalizadas com o $C_{q_{normalizador}}$, originando o valor ΔC_q . Por fim, os valores normalizados da amostra teste e calibrador foram subtraídos de forma a obter o valor $\Delta\Delta C_q$, o qual foi posteriormente linearizado ($2^{-\Delta\Delta C_q}$). Níveis de expressão relativa iguais a 1 indicaram que a expressão foi idêntica entre amostra e calibrador; níveis de expressão inferiores a 0,5 e superiores a 2 foram considerados subexpressão e superexpressão, respectivamente. Níveis de expressão relativa entre 0,5 e 1,8 foram considerados como expressão similar (marginalmente superior ou inferior) à cepa de referência. Para o método $2^{-\Delta C_q}$, os valores normalizados de cada amostra foram diretamente linearizados (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

⁹ Adotou-se no presente estudo desvio padrão $\leq 0,3$

Figura 8 – Representação dos cálculos envolvidos no método do C_q comparativo.

<p>A</p> $2^{-\Delta\Delta C_q}$ $\Delta C_{q_{\text{teste}}} = C_{q_{\text{teste}}} - C_{q_{\text{normalizador}}}$ $\Delta C_{q_{\text{calibrador}}} = C_{q_{\text{calibrador}}} - C_{q_{\text{normalizador}}}$ $\Delta\Delta C_q = \Delta C_{q_{\text{teste}}} - \Delta C_{q_{\text{calibrador}}}$	<p>B</p> $2^{-\Delta C_q}$ $\Delta C_{q_{\text{teste}}} = C_{q_{\text{teste}}} - C_{q_{\text{normalizador}}}$
--	---

Fonte: adaptado de Livak; Schmittgen (2001).

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software *Statistical Package for the Social Sciences* v. 22 (SPSS Statistics 22®). O programa *GraphPadPrism* v. 6 foi utilizado para a construção dos gráficos. Os resultados obtidos para cada replicata biológica de uma mesma amostra foram convertidos em média e desvio padrão. A partir destas médias realizou-se as análises estatísticas.

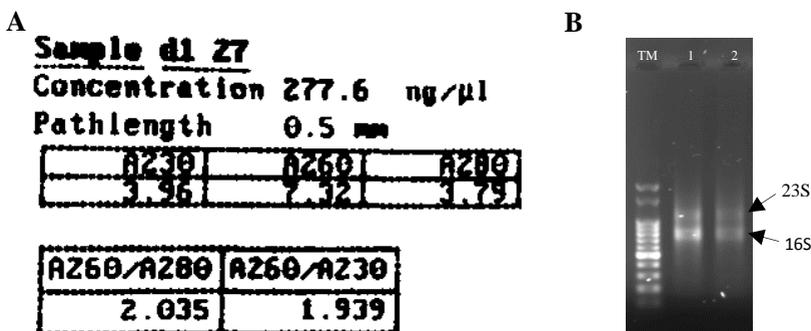
As amostras do presente estudo foram classificadas estatisticamente como amostras não pareadas. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para a verificação da distribuição (paramétrica ou não paramétrica). A comparação entre os grupos foi realizada pelos testes de análise de variância (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis. Foi adotado nível de significância $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES, EFICIÊNCIA DA REAÇÃO DE RT-QPCR E ESCOLHA DOS GENES DE REFERÊNCIA

Após extração, o RNA total foi avaliado quanto a concentração e pureza pelo equipamento NanoVue™ Plus (General Electric, EUA). Todas as amostras se enquadraram satisfatoriamente no parâmetro requerido, a saber, razão $A_{260/280} > 1,8$ (Figura 9, A). A partir desta análise, todas as amostras de RNA total foram diluídas à uma concentração de 30 ng/μL (menor concentração obtida pós extração). Para síntese de cDNA, foram utilizados 300 ng de RNA total. As amostras foram também avaliadas quanto à integridade por eletroforese em gel de agarose; com exceção das amostras com baixa concentração (35,4%), todas as demais demonstraram-se íntegras, exibindo duas bandas distintas no gel, as bandas 23S e 16S (Figura 9, B). A avaliação da ausência de contaminação por DNA genômico a partir dos controles não reversamente transcritos foi satisfatória, sendo que nenhum *pool* de RNA total demonstrou amplificação (dados não apresentados).

Figura 9 – Concentração, pureza e integridade das amostras de RNA do presente estudo.



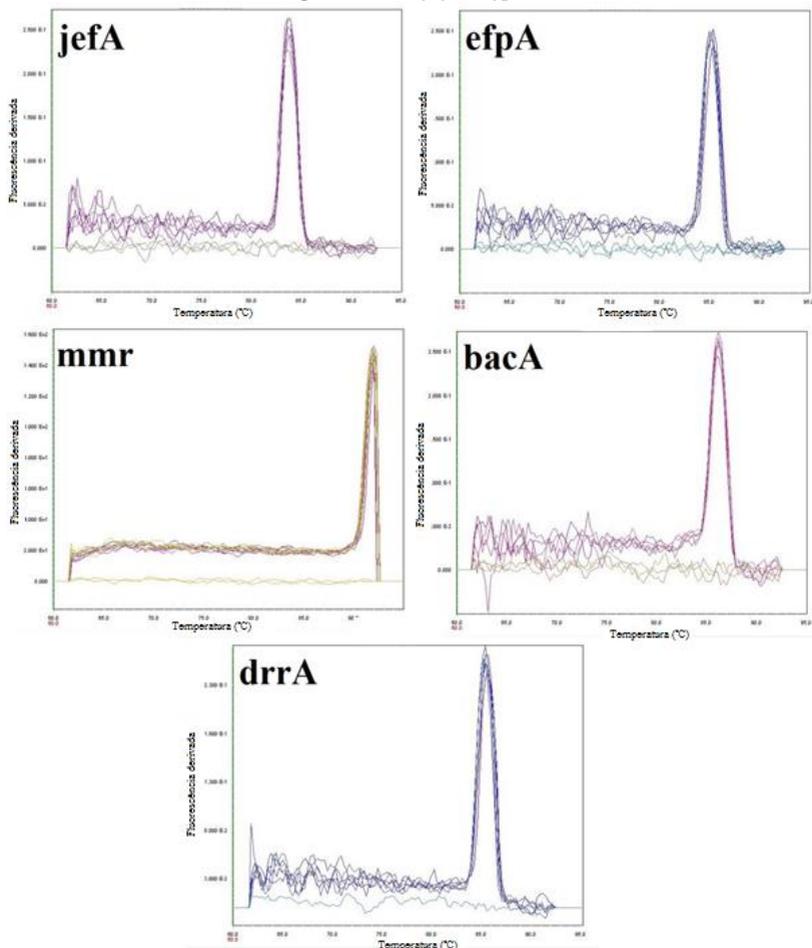
A) Concentração e pureza avaliados pelo equipamento NanoVue™ Plus

B) Eletroforese em gel de agarose 1,2% com TBE 1X (89 mM Tris acetato; 20 mM EDTA, Ácido bórico 89 mM, pH 8,0); 80V por 30 minutos com Brometo de etídio incorporado ao gel (Sigma-Aldrich, EUA). Aplicação de 5 uL de RNA em cada poço (cada amostra apresentou uma concentração distinta). Visualização realizada em transluminador de luz ultravioleta (LAS 500 – General Electric, EUA). TM: padrão de tamanho molecular 100 pb; 1 e 2 –

amostras de RNA demonstrando as bandas de RNA ribossomal 23S (superior, 3137 nucleotídeos) e 16S (inferior – 1537 nucleotídeos). Fonte: a autora

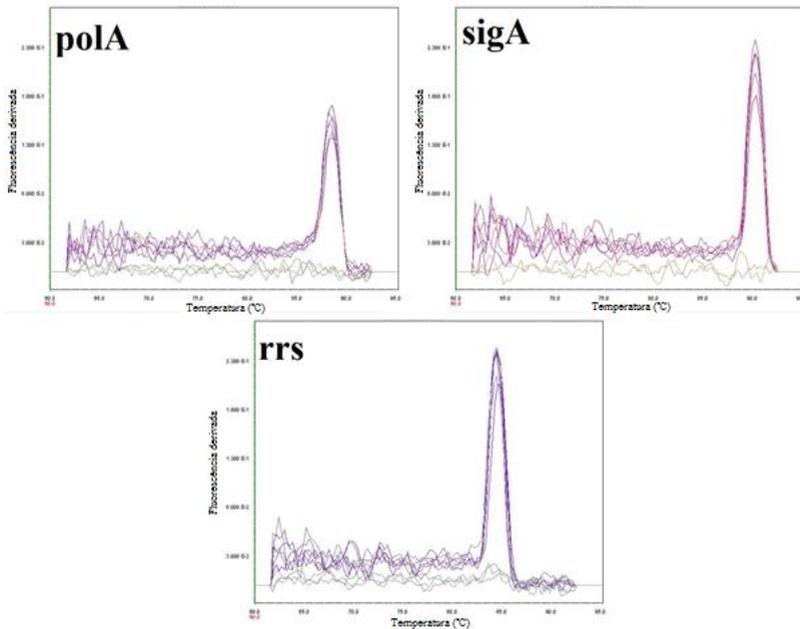
A especificidade dos iniciadores utilizados no estudo foi avaliada pela análise da curva de dissociação, gerada ao fim da reação de RT-qPCR. Pela curva de dissociação é possível identificar a presença de picos, que representam a temperatura de *melting* (T_m), definida como a temperatura na qual 50% dos produtos formados durante a reação encontram-se desnaturados. Esta avaliação é sensível a mínimas diferenças entre os produtos formados, possibilitando distingui-los. Todos os iniciadores empregados no presente estudo exibiram pico único no gráfico da curva de dissociação, demonstrando sua especificidade (formação de um único produto de interesse) bem como garantindo a ausência de dímeros de *primers* e produtos inespecíficos (Figura 10 e Figura 11). As temperaturas de dissociação averiguadas encontram-se descritas na Tabela 4.

Figura 10 – Curvas de dissociação dos produtos gerados pelos iniciadores referentes aos genes alvo *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* e *drrA*.



Fonte: a autora.

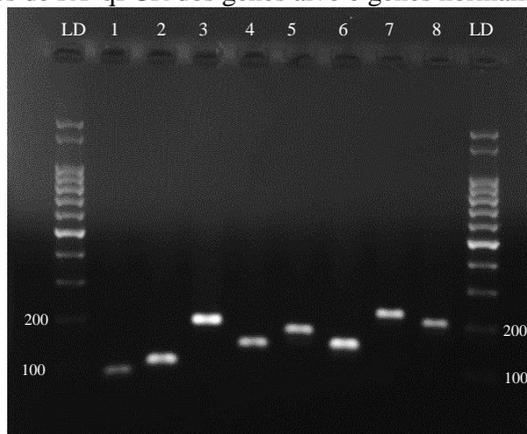
Figura 11 – Curvas de dissociação dos produtos gerados pelos iniciadores referentes aos genes de referência *polA*, *sigA* e *rrs*



Fonte: a autora.

De maneira complementar a análise da especificidade, os produtos gerados pela reação de RT-qPCR foram também avaliados por eletroforese em gel de agarose. Os produtos apresentaram banda única no gel, correspondente ao tamanho esperado (Figura 12). Tal achado reafirma a especificidade dos iniciadores escolhidos, validando a utilização desses nas reações de RT-qPCR.

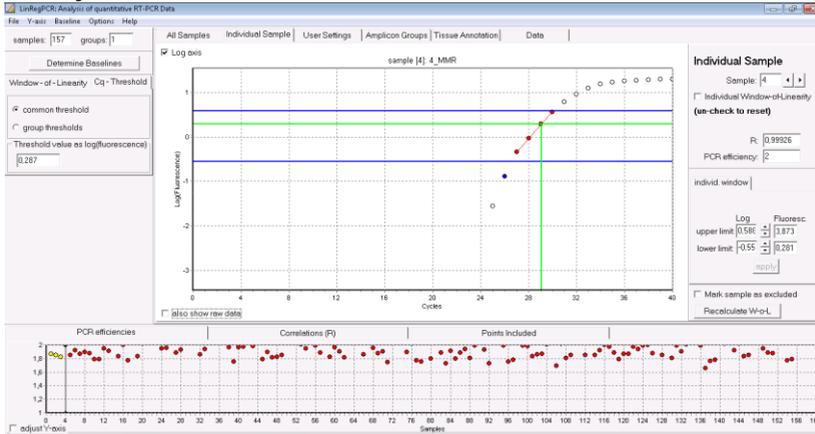
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos gerados nas reações de RT-qPCR dos genes alvo e genes normalizadores.



Eletroforese em gel de agarose 2% com TBE 1X (89 mM Tris acetato; 20 mM EDTA, Ácido bórico 89 mM, pH 8,0) a 80 V por 40 minutos com Brometo de etídio incorporado ao gel (Sigma-Aldrich, EUA). Visualização realizada em transluminador de luz ultravioleta (LAS 500 – General Electric, EUA). LD: padrão de tamanho molecular 100 pb; 1 – *polA* (produto 88 pb); 2 – *sigA* (produto 108 pb); 3 – *rrs* (produto 197 pb); 4 – *jefA* (produto 146 pb); 5 – *efpA* (produto 177 pb); 6 – *drmA* (produto 147 pb); 7 – *mmr* (produto 221 pb); 8 – *bacA* (produto 200 pb). Fonte: a autora.

As eficiências das reações de RT-qPCR tanto para os genes-alvo quanto para os genes de referência, determinadas pelo software LinRegPCR, demonstraram valores entre 90% e 100%, sendo então validados para análise por meio do método do *Cq* comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; RAMAKERS et al., 2003; RUIJTER et al., 2009). O coeficiente de correlação reportado para todos os pares de iniciadores foi superior a 0,990 (Figura 13; Tabela 1).

Figura 13 – Software LinRegPCR: determinação da eficiência por poço de reação.



Software LinRegPCR: cálculo da eficiência da reação por meio de regressão linear, a partir da inclinação da reta formada entre os pontos contidos na janela de linearidade (na fase exponencial da curva de amplificação). Na parte inferior da imagem observa-se pontos que correspondem as amostras. Por fim, foi feita a média dos valores de eficiência e R^2 . Fonte: a autora.

Tabela 1 – Valores de eficiência, coeficiente de correlação (R^2) e temperatura de dissociação.

	Eficiência	R^2	Temperatura de dissociação
Genes Alvo			
<i>jefA</i>	1,912	0,995	84,0 °C
<i>efpA</i>	1,950	0,994	85,0 °C
<i>Mmr</i>	1,878	0,997	91,0 °C
<i>bacA</i>	1,988	0,997	86,5 °C
<i>drrA</i>	1,908	0,998	85,5 °C
Genes normalizadores			
<i>polA</i>	1,893	0,998	89,0 °C
<i>sigA</i>	1,907	0,992	90,0 °C
<i>rrs</i>	1,913	0,998	85,0 °C

Como descrito na seção 4.13, os valores de *M-value* gerados a partir do software *geNorm* classificaram a combinação *polA*, *sigA* e *rrs* como a mais estável a ser adotada (Tabela 2). Sedo assim, para a etapa de normalização, foi utilizada a média geométrica dos valores de *Cq* dos genes *polA*, *sigA* e *rrs*.

Tabela 2 – Genes candidatos a normalizadores *rrs*, *polA* e *sigA*: valores *M-value* para os genes e suas combinações, gerados pelo programa *geNorm*.

Genes normalizadores	<i>M-value</i>
<i>rrs</i>	0,484
<i>polA</i>	0,550
<i>sigA</i>	0,594
<i>rrs+polA</i> *	0,438
<i>rrs+sigA</i> *	0,403
<i>polA+sigA</i> *	0,517
<i>rrs+polA+sigA</i>*	0,374

*combinação de genes. O menor *M-value* corresponde ao gene ou a combinação de genes mais estável, e na tabela encontra-se em negrito. Fonte: a autora.

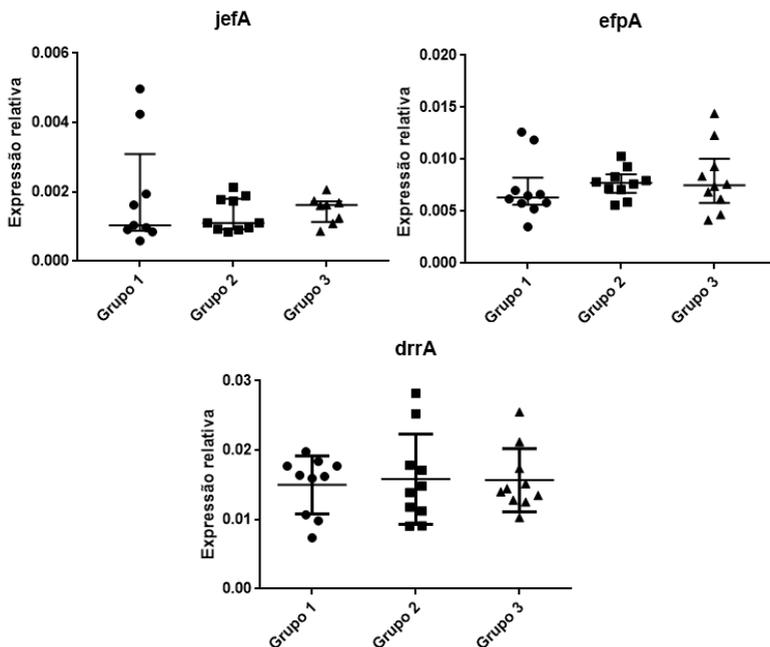
5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES ALVO *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* E *drpA*

A expressão dos genes *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* e *drpA* foi avaliada a partir dos dados gerados nas reações de RT-qPCR. Para cada amostra foi calculada a média dos valores de *Cq* obtidos da triplicata técnica, a qual foi normalizada pela média geométrica dos valores de *Cq* dos genes normalizadores *polA*, *sigA* e *rrs*. Por fim, os dados foram linearizados a $2^{-\Delta Cq}$ e as duplicatas biológicas foram convertidas em média e desvio padrão para realização das análises estatísticas entre os diferentes grupos do estudo (Apêndice B).

Não houve diferença nos níveis de expressão basal dos genes *jefA*, *efpA* e *drpA* entre os grupos 1 (isolados susceptíveis à isoniazida), 2 (isolados susceptíveis à isoniazida, porém provenientes de pacientes com baciloscopia positiva após o quarto mês de tratamento com o esquema básico) e 3 (isolados com monorresistência primária à isoniazida) ($p > 0,05$) (Figura 14). Em relação ao gene *jefA*, três isolados¹⁰ apresentaram desvio padrão entre as triplicatas técnicas superior a 0,3, sendo assim, estes isolados não foram incluídos nas análises estatísticas.

¹⁰ Isolado n° 2, pertencente ao grupo 1 e isolados n° 22 e 28, pertencentes ao grupo 3

Figura 14 – Níveis de expressão basal dos genes *jeftA*, *efpA* e *drrA* nos grupos 1, 2 e 3.

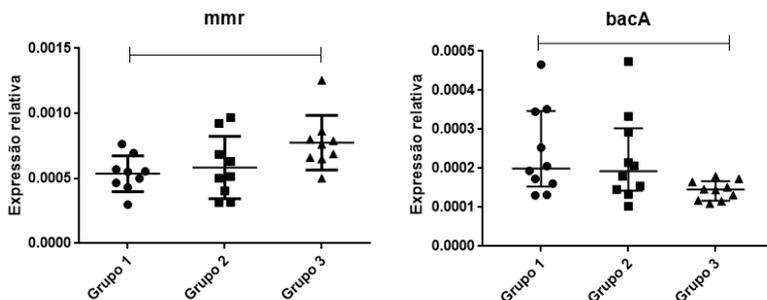


Para os genes *jeftA* e *efpA* os valores de expressão gênica foram expressos em mediana e interquartil. Para o gene *drrA*, o gráfico foi construído com base nas médias e desvio padrão. Fonte: a autora.

Em relação ao gene *mmr*, observou-se níveis de expressão basal maiores no grupo 3 ($2^{-\Delta Cq}$ média: $7,7 \times 10^{-4}$) quando comparados ao grupo 1 ($2^{-\Delta Cq}$ média: $5,4 \times 10^{-4}$) ($p = 0,024$); para este mesmo gene, foi excluída a amostra 4, por ser identificada estatisticamente como um *outlier* e não foram incluídas nas análises estatísticas as amostras 11 e 30, por apresentarem desvio padrão entre as triplicatas técnicas superior a 0,3 (Figura 15).

Os valores de expressão basal referentes ao gene *bacA* foram maiores no grupo 1 ($2^{-\Delta Cq}$ média dos ranques: 13,7) quando comparados ao grupo 3 ($2^{-\Delta Cq}$ média dos ranques: 7,3) ($p = 0,016$). Não foi observada diferença significativa nos níveis dos transcritos dos genes *mmr* e *bacA* entre os isolados do grupo 2 para com os demais grupos (Figura 15).

Figura 15 – Níveis de expressão basal dos genes *mmr* e *bacA* nos grupos 1, 2 e 3.

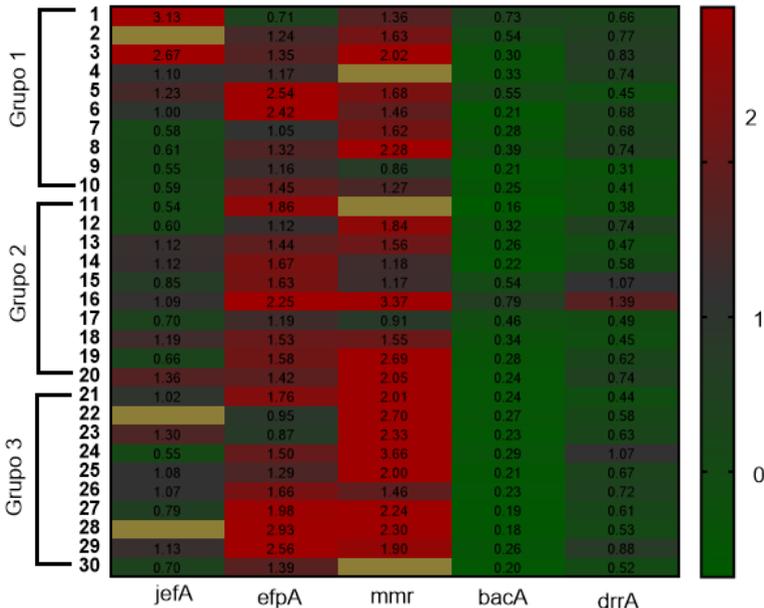


Valores de expressão gênica significativamente diferentes entre os grupos 1 e 3 ($p < 0,05$). Dados expressos em média e desvio padrão para o gene *mmr* e mediana e interquartil para o gene *bacA*. Fonte: a autora.

As amostras foram também avaliadas quanto a sua expressão em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv; para tal análise, os valores de ΔCq das amostras foram subtraídos pelo valor de ΔCq da cepa de referência, resultando no valor $\Delta\Delta Cq$, o qual foi também linearizado a $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Apêndice C). De maneira adicional, a partir deste resultado, foram feitas análises estatísticas dos valores encontrados entre os grupos.

Do total de 30 amostras avaliadas no estudo, 16 (56,3%) apresentaram superexpressão em relação à cepa de referência para um ou dois genes; os valores de superexpressão encontrados (expressos em *n-fold*) variaram entre 1,98 e 3,7 vezes em relação à cepa de referência. O gene mais frequentemente superexpresso foi o gene *mmr* (em 12 amostras), seguido do gene *efpA* (em 6 amostras) e *jefA* (em 2 amostras). O menor nível de expressão relativa encontrado foi de 0,16 vezes, referente ao gene *bacA* (amostra 11), e o maior nível de expressão foi referente ao gene *mmr* (3,66 vezes). Quatro isolados apresentaram superexpressão para mais de um gene: a amostra 3, sensível à isoniazida, superexpressou os genes *jefA* e *mmr*; e as amostras 16 (grupo 2), 27 e 28 (grupo 3) superexpressaram os genes *efpA* e *mmr* (Figuras 16).

Figura 16 – Níveis de expressão relativa dos genes *je fA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* e *drrA* em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv, distribuídos em relação ao gene (colunas) e aos grupos (linhas).

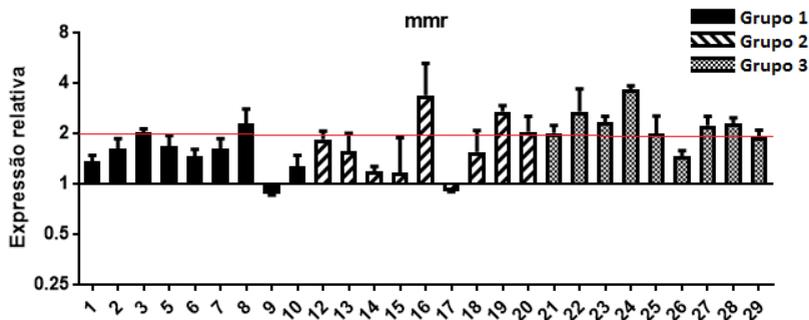


Expressão relativa dos genes *je fA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* e *drrA* em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv; normalizados pela média geométrica dos genes de referência *polA*, *sigA* e *rrs*. Valores expressos em $2^{-\Delta\Delta Cq}$. O ensaio ocorreu em duplicata biológica e triplicata técnica. Níveis de expressão iguais a 1 indicam que a expressão foi similar entre alvo e a cepa de referência, níveis abaixo de 0,5 indicam subexpressão e níveis acima de 2 indicam superexpressão. Na análise do gene *mmr*, a amostra 4 foi classificada como *outlier* e foi excluída do estudo. Por apresentarem desvio padrão entre as triplicatas técnicas superior a 0,3, foram excluídos das análises estatísticas as amostras de nº 2, 22 e 28, referentes ao gene *je fA* e as amostras de nº 11 e 30, referentes ao gene *mmr*.

Em relação ao gene *mmr*, não foi possível observar diferença entre os grupos, quando analisados quanto aos níveis de expressão basal relativos à cepa de referência ($p > 0,05$). Dos 27 isolados analisados no presente estudo para o gene *mmr*, cerca de 44,4% (12) apresentaram aumento superior a duas vezes na expressão em relação à cepa de referência, com valores variando entre 2,00 e 3,66 vezes; e 55,5% (15) apresentaram níveis de expressão similares (marginalmente superiores

ou inferiores) à cepa de referência, com valores variando entre 0,86 e 1,90 vezes. A maioria das amostras (7) que superexpressaram o gene *mmr* eram monorresistentes (monorresistência primária) à isoniazida (grupo 3), sendo que duas também superexpressaram transcritos do gene *efpA*; com relação as demais amostras superexpressas, três são do grupo 2, sendo que uma delas também superexpressou o gene *efpA*; e duas são do grupo 1, sendo uma delas também superexpressa para o gene *jefA* (Figuras 16 e 17).

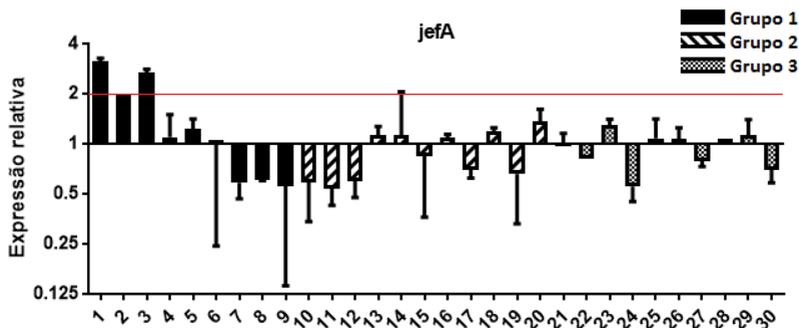
Figura 17 – Perfil de expressão relativa do gene *mmr* em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv.



Valores de expressão relativa ≥ 2 foram considerados superexpressos em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv e estão transpassados no gráfico pelo traço de cor vermelha.

Não foi possível observar diferença nos valores de expressão basal do gene *jefA* em relação à cepa de referência entre os grupos ($p > 0,05$). Dos 27 isolados analisados no presente estudo para o gene *jefA*, foi observado que 92,5% (25) destes apresentaram níveis de expressão similares à cepa de referência, com valores variando entre 0,54 e 1,36 vezes; e 7,5% (2) superexpressaram este gene, sendo que esta superexpressão foi observada nos isolados susceptíveis à isoniazida (Figuras 16 e 18).

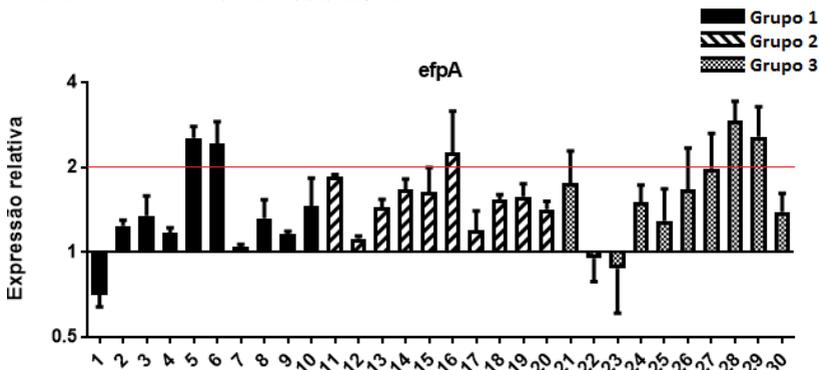
Figura 18 – Perfil de expressão relativa do gene *jefA* em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv.



Valores de expressão relativa ≥ 2 foram considerados superexpressos em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv e estão transpassados no gráfico pelo traço de cor vermelha.

A análise dos transcritos do gene *efpA* não demonstrou diferença na expressão deste (em relação à cepa de referência) entre os grupos analisados no presente estudo ($p > 0,05$). Dos 30 isolados analisados para o gene *efpA*, 80% (24) destes apresentaram níveis de expressão relativa similares à cepa de referência, com valores variando entre 0,71 vezes e 1,86 vezes. Seis isolados (20%) superexpressaram o gene *efpA*, com níveis de expressão relativa à cepa de referência variando entre 1,98 e 2,93 vezes; destes, 3 apresentavam monorresistência primária à isoniazida, um pertencente ao grupo 2, e dois isolados eram sensíveis à isoniazida (Figuras 16 e 19).

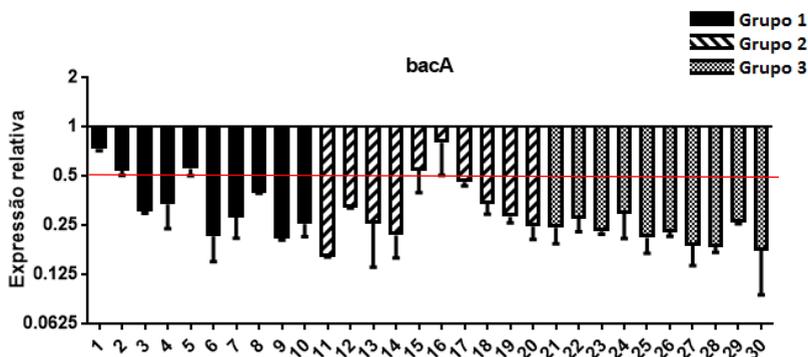
Figura 19 – Perfil de expressão relativa do gene *efpA* em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv.



Valores de expressão relativa ≥ 2 foram considerados superexpressos em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv e estão transpassados no gráfico pelo traço de cor vermelha.

Para o gene *bacA* se observou que os níveis de expressão basal relativa à cepa de referência encontrados no grupo 1 e 2 foram maiores do que os observados no grupo 3. No entanto, 83,3% (25) das amostras subexpressaram este gene em relação à cepa de referência, com valores variando entre 0,16 vezes e 0,46 vezes. Cinco isolados (16,6%) apresentaram níveis de expressão relativa similares à cepa de referência (Figuras 16 e 20).

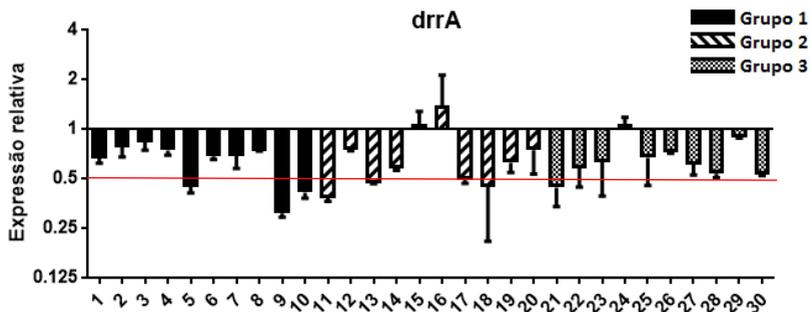
Figura 20 – Perfil de expressão relativa do gene *bacA* em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv.



Valores de expressão relativa $< 0,5$ foram considerados subexpressos em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv e estão transpassados no gráfico pelo traço de cor vermelha.

Não foi possível observar diferença significativa nos níveis de expressão relativa do gene *drrA* entre os grupos ($p > 0,05$), em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv. Aproximadamente 26% (8) dos isolados subexpressaram *drrA* em relação à cepa de referência, com valores variando entre 0,31 e 0,49 vezes; 22 (73,3%) dos isolados tiveram níveis de expressão relativa similares à cepa de referência, com valores entre 0,52 e 1,39 vezes (Figuras 16 e 21).

Figura 21 – Perfil de expressão relativa do gene *drrA* em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv.



Valores de expressão relativa < 0,5 foram considerados subexpressos em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv e estão transpassados no gráfico pelo traço de cor vermelha.

6 DISCUSSÃO

Compreender os mecanismos atuantes nos processos que favorecem a seleção de mutantes e desenvolver estratégias de enfrentamento a estes mecanismos é de suma importância ao combate do surgimento de casos de TB resistente. Diversos estudos apontam para o papel das bombas de efluxo como agentes favorecedores da seleção de mutantes, uma vez que estas acarretam na diminuição da concentração intracelular de fármacos. Em consequência, subpopulações bacterianas sob constante estresse das baixas concentrações de antibióticos, podem vir a ser selecionadas, criando oportunidade para o surgimento/seleção de outros mecanismos de resistência. (LOUW et al., 2009; GUPTA et al., 2010a; SRIVASTAVA et al., 2010; MACHADO et al., 2012). Estudo desenvolvido por Machado e colaboradores (2012), demonstrou que isolados clínicos de *M. tuberculosis*, quando expostos sucessivamente a concentrações subinibitórias de isoniazida, responderam prontamente via efluxo frente a agentes tóxicos como o Brometo de Etídio ou isoniazida. No entanto, a medida que o processo de exposição prosseguiu, os isolados clínicos demonstraram redução na atividade de efluxo, sugerindo que o sistema de efluxo está envolvido como primeira resposta da bactéria ao estresse à isoniazida.

Com base nessas informações, o presente estudo objetivou avaliar o papel das bombas de efluxo na falência terapêutica ao esquema básico de tratamento, com enfoque na resistência à isoniazida. Para tanto, foram selecionados isolados clínicos com perfis de sensibilidade conhecidos, a saber, isolados susceptíveis à isoniazida (grupo 1), isolados susceptíveis à isoniazida, porém provenientes de pacientes com baciloscopia positiva ao quarto mês de tratamento (grupo 2) e isolados com monorresistência primária à isoniazida (grupo 3). Tendo em vista que a presença de baciloscopia positiva ao quarto mês de tratamento é sugestiva de falência terapêutica, e que é possível que bactérias respondam prontamente via efluxo à exposição aos agentes tóxicos, como a isoniazida, realizou-se a análise dos níveis dos transcritos de genes codificadores para bombas de efluxo, a fim de se investigar o seu papel na persistência da positividade da baciloscopia.

Grande parte dos estudos relacionados às bombas de efluxo em *M. tuberculosis* são projetados com base na indução da expressão destes genes frente aos fármacos antimicobacterianos (GUPTA et al., 2010; COELHO et al., 2015). Outros estudos se basearam na quantificação dos

níveis de expressão basal desses genes em isolados clínicos (CALGIN et al., 2013; KARDAN YAMCHI et al., 2015; LI et al., 2015).

Em relação ao gene *mmr*, os achados do presente estudo corroboram os dados encontrados em estudos anteriores, os quais relacionam a resistência aos fármacos à níveis aumentados de expressão do gene *mmr* (GUPTA et al., 2010a; RODRIGUES et al., 2013; COELHO et al., 2015; LI et al., 2015).

Inicialmente foram comparados os níveis de expressão gênica basal do gene *mmr* (Rv3065) entre os diferentes grupos abordados no estudo. Os níveis de expressão basal do gene *mmr* estiveram significativamente maiores nos isolados com monorresistência primária à isoniazida do que nos isolados susceptíveis (Figura 15). Não foi encontrada diferença significativa entre o grupo 2 com os demais grupos. Poucos estudos realizaram abordagem semelhante; em um deles, idealizado por Li e colaboradores (2015), foi demonstrado que os níveis basais dos transcritos de certos genes de bombas de efluxo estavam significativamente maiores nos isolados TB-MDR quando comparados aos isolados susceptíveis, porém, não foi observada esta relação para o gene *mmr*, mas sim para os genes *efpA*, *jefA*, *drxA*, *Rv0849*, *Rv1250*, *p55*, *Rv1634*, *Rv2994*, *stp*, *pstB* e *drxB*. Os isolados analisados no presente estudo (isolados susceptíveis à isoniazida e isolados com monorresistência primária à isoniazida) e no estudo de Li e colaboradores (isolados susceptíveis à isoniazida e isolados TB-MDR) diferem quanto ao perfil de sensibilidade, sendo assim, sugere-se que a divergência encontrada nos resultados esteja em parte relacionada a variabilidade no perfil de susceptibilidade dos isolados analisados.

Apesar das divergências entre os genes que apresentaram expressão elevada nos isolados carreadores de resistência, os resultados do presente estudo e também de Li e colaboradores (2015) apresentaram relação significativa entre nível de expressão basal e o fenótipo resistente. A partir das diferenças encontradas entre isolados TB-MDR e susceptíveis, Li e colaboradores sugeriram que a quantificação dos níveis de expressão de genes de bombas de efluxo pode se tornar um novo método para diagnosticar TB resistente; os dados gerados a partir da quantificação poderiam ser úteis na avaliação da efetividade da associação entre medicamentos antimicobacterianos e inibidores de bombas de efluxo.

Com relação a comparação da expressão basal do gene *mmr* em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv, não foi possível

observar diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Observou-se que 55,5% dos isolados apresentaram níveis de expressão basal similares (marginalmente superiores ou inferiores) à cepa de referência. Doze isolados (44,4%) apresentaram superexpressão para este gene em relação à cepa de referência. Dos isolados que apresentaram superexpressão, a maior parte (7) pertencem ao grupo 3. Em relação ao grupo 2, três isolados superexpressaram o gene *mmr*. Dois isolados do grupo 1 superexpressaram o gene *mmr* sendo um deles também superexpresso para o gene *jefA* (Figuras 16 e 17).

Resultados semelhantes aos do presente estudo foram encontrados em estudo realizado por Coelho e colaboradores (2015), os quais avaliaram cinco isolados TB-MDR quanto à expressão gênica basal em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv; dos isolados avaliados pelos autores, um apresentou superexpressão¹¹, que foi observada para todos os genes analisados (*mmr*, *jefA*, *efpA*, *p55* e *Rv1258c*); para as demais amostras, não foi observado aumento na expressão dos genes. Quando exposto à concentração subinibitória de isoniazida, um isolado do estudo de Coelho e colaboradores (2015) elevou seus níveis de expressão para todos os genes analisados, sendo que os níveis de *mmr* foram elevados em 137,21 vezes, em relação ao controle não exposto; este achado sugere que os isolados clínicos são induzidos a expelir compostos tóxicos possivelmente em decorrência da constante pressão de antibióticos no cenário clínico (COELHO et al., 2015).

Em trabalho realizado por Rodrigues e colaboradores (2013), foram criados mutantes da cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv, os quais perderam o gene *mmr* (*mmrKO*) ou superexpressaram este gene. Os resultados mostraram que não houve diferenças no perfil de sensibilidade¹² das cepas *mmrKO* em relação à cepa selvagem. A partir deste e outros achados, os autores concluíram que a proteína de membrana *mmr* não transporta diretamente a isoniazida, porém, ela poderia transportar outros metabólitos, quer sejam derivados da isoniazida ou gerados em resposta ao dano induzido por ela. Por fim, os autores sugerem que a superexpressão observada para o gene *mmr* em

¹¹ Valores acima de 1,15 vezes foram considerados como superexpressão

¹² O perfil de sensibilidade foi averiguado a partir da análise dos resultados da MIC, tempo de crescimento em meio sólido, taxa de morte e ensaio de competição em crescimento

estudos em que os isolados foram expostos à isoniazida é decorrente de uma resposta generalizada ao estresse causado pela exposição prolongada a este fármaco e não pelo fato da isoniazida ser substrato de *mmr*. Também é sugerido que esta proteína esteja envolvida no transporte de componentes da parede celular e sua superexpressão ocorra de maneira a compensar o dano causado pela ação da isoniazida, a qual afeta a produção de ácidos micólicos da parede celular micobacteriana. De maneira semelhante, Li e colaboradores (2015) sugerem que, em resposta ao dano causado pela ação de doses subletais de isoniazida à parede celular, *M. tuberculosis* reage de forma a elevar o número de bombas de efluxo (ou combinações destas), no intuito de que o fármaco seja expelido e diminua sua efetividade.

Gupta e colaboradores (2010a), avaliaram por *microarray* cinco isolados clínicos TB-MDR quanto a expressão de genes de bombas de efluxo durante estresse induzido pelos fármacos antimicobacterianos mais comuns; o estresse causado pela isoniazida levou a superexpressão¹³ de cinco genes de bombas de efluxo, *mmr*, *efpA*, *jefA*, *bacA* e *Rv3728*, em relação ao calibrador não exposto. Com foco em *mmr*, estes mesmos autores observaram que a superexpressão deste gene esteve primariamente associada a isoniazida e etambutol, e apenas marginalmente aos demais fármacos estudados.

Com algumas exceções relacionadas a casos de retratamento (3 casos, Quadro 2), os isolados do presente estudo não foram expostos à isoniazida, o que nos leva a pensar em quais fatores favoreceriam um aumento dos níveis de expressão basal do gene *mmr* nos isolados com monorresistência primária à isoniazida quando comparados aos isolados susceptíveis. Sugere-se que os níveis aumentados de expressão basal de *mmr* associada à monorresistência primária à isoniazida observada no presente estudo possa estar relacionada à resposta bacteriana frente ao estresse causado pela exposição a fármacos, apresentada no cenário clínico anterior a infecção¹⁴, a qual, por meio da herança epigenética, torna-se evidente nos isolados obtidos dos pacientes com resistência primária à isoniazida. A regulação epigenética se define como o padrão

¹³ Valores acima de 2 vezes foram considerados como superexpressão.

¹⁴ Os isolados deste estudo foram coletados de indivíduos no momento do diagnóstico, anterior ao tratamento, porém, os indivíduos transmissores desta infecção poderiam estar em contato com os fármacos

de expressão gênica herdado, na ausência de mutação ou estímulo que justifique esta expressão (WATSON et al., 2008)

Sete dos nove isolados com monorresistência primária à isoniazida do presente estudo superexpressaram *mmr* quando comparados à cepa de referência, sugerindo que este gene possa estar envolvido com a resistência à isoniazida. Sugere-se também que, mutações no gene *Rv3066*, regulador transcricional do gene *mmr*, possam ser responsáveis pela superexpressão encontrada no presente estudo. A proteína *Rv3066*, codificada pelo gene *Rv3066*, liga-se à região promotora do gene *mmr*, reprimindo sua transcrição. É possível que mutações no gene *Rv3066*, associadas à resistência, reduzam a atividade repressora deste regulador (BOLLA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013).

Quando comparados os níveis de expressão basal do gene *jefA* (*Rv2459*) entre os grupos analisados no presente estudo, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). Desta forma, não foi possível estabelecer uma relação entre a expressão deste gene e o fenótipo de resistência apresentado pelos isolados (Figura 14). Estudo semelhante avaliou a expressão basal de *jefA* em isolados TB-MDR e susceptíveis; os resultados demonstraram que *jefA* foi significativamente mais expresso nos isolados TB-MDR (LI et al., 2015), resultado este discordante dos achados do presente estudo.

Os níveis de expressão basal de *jefA* foram também comparados à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv; não foi possível observar diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Observou-se que 92,5% dos isolados clínicos apresentaram níveis de expressão similares à cepa de referência. Dois isolados susceptíveis (7,4%) superexpressaram o gene *jefA* com relação à cepa de referência (Figuras 16 e 18). Resultados divergentes foram encontrados por Kardan Yamchi e colaboradores (2015), os quais avaliaram os níveis de expressão basal de cinco genes preditos como codificadores de bombas de efluxo, em isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes (20 isolados TB-MDR e 1 isolado TB-XDR) e susceptíveis (10 isolados); dentre eles, foi avaliada a expressão do gene *jefA*. Os níveis de expressão observados em todos isolados clínicos, tanto resistentes quanto susceptíveis foram significativamente maiores do que os níveis observados na cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv (KARDAN YAMCHI et al., 2015).

Dos cinco isolados TB-MDR analisados por Coelho e colaboradores (2015), foi observada superexpressão de *jefA* em relação

à cepa de referência em apenas um deles (5 vezes). Quando estes mesmos isolados foram expostos a concentrações subinibitórias dos fármacos mais comumente utilizados no tratamento da TB, foi observada superexpressão de *jefA* em relação ao controle não exposto, em dois isolados, para os fármacos rifampicina (16,59 vezes) e ofloxacina (2,96), porém não foi observada superexpressão quanto ao fármaco isoniazida (COELHO et al., 2015).

Em estudo descrito anteriormente, Gupta e colaboradores (2010a) observaram por *microarray*, que a expressão de *jefA* foi induzida, em todos os isolados TB-MDR, apenas quando expostos à isoniazida (7,4 vezes), no entanto, os dados expressos na validação por qPCR foram divergentes, mostrando indução pelos fármacos isoniazida (5,1 vezes), etambutol (10,3 vezes) e estreptomicina (2,3 vezes). Estes autores sugerem que a proteína *jefA* atua com mecanismos semelhantes no efluxo dos fármacos isoniazida e etambutol, tendo em vista que ambos os fármacos interferem na parede celular de *M. tuberculosis*; em relação à estreptomicina, este gene parece estar pouco envolvido na sua resistência, uma vez que os níveis de expressão relativa foram similares ao controle não exposto (1,93 vezes) (GUPTA et al., 2010a). Em outro estudo, Gupta e colaboradores (2010b) investigaram especificamente o papel da proteína *jefA* como bomba de efluxo, por meio da clonagem de vetor superexpresso para o gene *jefA* em *M. tuberculosis* H37Rv; os resultados demonstraram que a MIC dos fármacos isoniazida e etambutol foram elevadas nos isolados clonais e em presença de inibidores de efluxo observaram valores diminuídos da MIC. Por fim, os autores indicam que *jefA* atua de forma alternativa/adicional na resistência à isoniazida e etambutol, sugerindo que seu mecanismo seja por extrusão dos fármacos (bomba de efluxo), e que por ser pouco semelhante às proteínas humanas, esta pode se tornar um alvo terapêutico potencial (GUPTA et al., 2010b).

Nos estudos descritos anteriormente, não há indicações de que os isolados TB-MDR sob investigação eram provenientes de pacientes com resistência primária, desta forma, pode-se inferir que os padrões de expressão observados podem ser decorrentes da exposição à fármacos durante o tratamento. Os isolados monorresistentes à isoniazida analisados no presente estudo provêm de pacientes em resistência primária, o que nos permite sugerir que os níveis reduzidos de expressão de *jefA* com relação aos demais estudos possam ser justificados pela

ausência de exposição à isoniazida e etambutol, os quais estão relacionados à superexpressão de *jefA*.

A análise dos transcritos do gene *efpA* (Rv2846) não demonstrou diferença significativa na expressão basal deste entre os grupos analisados no presente estudo ($p > 0,05$) (Figura 14). Resultados divergentes foram encontrados por Li e colaboradores (2015), os quais observaram níveis de expressão basal para *efpA* significativamente maiores no grupo dos isolados TB-MDR em relação ao grupo susceptível¹⁵.

Quando analisados em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv, não foi possível observar diferença significativa nos níveis de expressão relativa do gene *efpA* entre os grupos ($p > 0,05$). Um percentual de 80% dos isolados apresentaram níveis de expressão relativa similares à cepa de referência. Seis isolados superexpressaram o gene *efpA*; destes, 3 eram monorresistentes à isoniazida, um pertencente ao grupo 2, e dois isolados eram sensíveis à isoniazida (Figuras 16 e 19). Observou-se que a superexpressão foi heterogênea em relação ao perfil de resistência.

Dos cinco isolados TB-MDR analisados por Coelho e colaboradores (2015) em relação à cepa de referência, um demonstrou superexpressão para todos os genes analisados, no entanto, os níveis de expressão relativa encontrados para o gene *efpA* foram os menores (2 vezes). É interessante observar, que quando exposto a concentrações subinibitórias de fármacos, o mesmo isolado citado anteriormente não apresentou superexpressão para este gene, estando subexpresso¹⁶; neste mesmo estudo, outro isolado apresentou elevação nos níveis de expressão de *efpA* quando exposto a fármacos (56,8 vezes para rifampicina e 10,41 vezes para isoniazida).

Todos os cinco isolados TB-MDR avaliados por Gupta e colaboradores (2010a) apresentaram níveis de expressão elevados para o gene *efpA* quando expostos à isoniazida, em relação ao calibrador não tratado (superexpressão de 4,2 vezes); por fim, os autores concluem que a proteína *efpA* atua de forma alternativa/aditiva nos mecanismos de resistência à isoniazida.

Viveiros e colaboradores (2002) induziram isolados clínicos susceptíveis provenientes de paciente ainda não tratados e a cepa de

¹⁵ Mediana dos valores $2^{-\Delta CT}$ – Grupo TB-MDR: 6,49; Grupo susceptível: 1,39

¹⁶ Subexpressão de 0,07 vezes para isoniazida e 0,01 vezes para Rifampicina

referência *M. tuberculosis* H37Rv a se tornarem resistentes à isoniazida por meio da exposição gradual a concentrações crescentes deste fármaco. Subsequentemente, Rodrigues e colaboradores (2012) avaliaram os níveis de expressão de genes¹⁷ codificadores de bombas de efluxo nesses isolados. A exposição à isoniazida levou a superexpressão de todos os genes avaliados na cepa de referência e em um dos isolados clínicos induzidos, com valores de 6,8 e 4,7 vezes para o gene *efpA* e 37,9 e 31,1 vezes para o gene *mmr*. Contudo, não foi observada superexpressão para os genes *efpA* e *mmr* no segundo isolado clínico induzido. Os autores sugerem que as diferenças encontradas nos perfis de expressão são fruto das diferentes pressões ambientais às quais os isolados foram expostos, nos cenários clínico e laboratorial, e que a superexpressão de bombas de efluxo frente a antibióticos parece estar mais relacionada a uma resposta generalizada ao estresse do que uma resposta específica de uma bomba em particular. Com base nisto, os autores sugerem que o perfil de expressão observado sob exposição à isoniazida depende do genótipo de cada isolado e não da exposição a este fármaco em específico.

Os níveis de expressão encontrados para o gene *efpA* no presente estudo foram majoritariamente similares aos da cepa de referência. Com exceção de um isolado de Coelho e colaboradores (2015) com superexpressão de 10,41 vezes, foi observada superexpressão máxima para o gene *efpA* de 6,8 vezes nos estudos mencionados anteriormente; observa-se então que os níveis de elevação da expressão do gene *efpA* foram inferiores aos apresentados por *mmr*. Apesar dos achados de Li e colaboradores (2015) indicarem relação significativa entre a expressão de *efpA* e resistência, e Gupta e colaboradores (2010a) encontrarem superexpressão de *efpA* em todos os isolados analisados, observa-se também, com base nos resultados demonstrados por Coelho e colaboradores (2015) e Rodrigues e colaboradores (2002), que ocorreu grande variabilidade no perfis de expressão entre os isolados analisados, o que demonstra que fatores intrínsecos (genótipo) e pressões ambientais anteriores à análise podem ter interferido na resposta de cada isolado frente ao estresse causado pelo fármaco. Por fim, sugere-se que

¹⁷ *efpA*, *mmr*, *p55*, *Rv1258c* e *mmpL7*. Normalizador: *16S rRNA*. Superexpressão: níveis > 4

o perfil de expressão encontrado no presente estudo para o gene *efpA* está ligado às características genóticas e epigenéticas de cada isolado analisado, adicionado às condições às quais estes isolados foram expostos clinicamente e laboratorialmente (no que diz respeito a não exposição à isoniazida), o que não propiciou a superexpressão deste gene neste cenário. A literatura analisada sugere fortemente a relação deste gene como mecanismo adicional/alternativo à resistência à isoniazida (DORAN et al., 1997; WILSON et al., 1999; GUPTA et al., 2010a; RODRIGUES et al., 2012; COELHO et al., 2015; LI et al., 2015; MACHADO et al., 2016).

Os níveis basais dos transcritos do gene *bacA* (Rv1819c) estiveram significativamente menores nos isolados com monorresistência primária à isoniazida quando comparados aos isolados susceptíveis ($p < 0,05$) (Figura 15). Jiang e colaboradores (2008) analisaram os níveis de expressão basal do isolado clínico *M. tuberculosis* 1499 (TB-MDR) e da cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv, e observaram que os níveis de expressão¹⁸ do isolado TB-MDR estiveram significativamente inferiores aos níveis da cepa de referência. Os resultados do presente estudo são semelhantes aos resultados encontrados por Jiang e colaboradores (2008), uma vez que, ainda que o perfil dos isolados seja diferente, os níveis de expressão do gene *bacA* nos isolados susceptíveis foram superiores aos isolados resistentes, quer sejam eles monorresistentes ou TB-MDR.

Tendo em vista a expressão basal do gene *bacA* em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv, observou-se que os níveis de expressão relativa encontrados no grupo 1 e 2 foram significativamente maiores do que os observados no grupo 3. Vinte e cinco amostras (83,3%) subexpressaram o gene *bacA* em relação à cepa de referência (Figuras 16 e 20). Jiang e colaboradores (2008) observaram que quando exposto a fármacos, o isolado clínico TB-MDR 1499 apresentou aumento nos níveis de expressão do gene *bacA* em presença da isoniazida, porém não respondeu à rifampicina, indicando que este gene possa estar envolvido no efluxo da isoniazida. Em estudo realizado por Gupta e colaboradores (2010a), num total de cinco isolados TB-MDR expostos a fármacos, foi observada indução do gene *bacA* em quatro

¹⁸ Os dados quantitativos são a razão do número de cópias do gene alvo/número de cópias do gene 16S rRNA

isolados em relação à isoniazida e em dois isolados em relação à rifampicina; os autores concluíram que não houve um padrão consistente e fixo de indução do gene *bacA* nos isolados expostos à estes dois fármacos.

Garima e colaboradores (2015) expuseram a cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv a diferentes concentrações subinibitórias de isoniazida, estreptomicina, rifampicina e etambutol. O gene *bacA* foi superexpresso frente à isoniazida, sendo que os níveis de expressão apresentados foram proporcionais ao aumento da concentração do fármaco. *bacA* foi também superexpresso quando exposto à rifampicina, porém a superexpressão observada foi inversamente proporcional ao aumento da concentração do fármaco; para este achado, os autores justificam que as crescentes concentrações de rifampicina levam a crescente inibição da transcrição, em consequência, a transcrição de genes de bombas de efluxo é também reduzida.

Gopinath e colaboradores (2013), ocasionaram mutações randômicas no genoma de *M. tuberculosis* visando identificar quais genes estariam relacionados à deficiência na captação de vitamina B12 exógena, *in vitro*. Os resultados revelaram que inserções no gene *Rv1819c* eram responsáveis por esta deficiência. Subsequentemente, os autores promoveram a deleção do gene *Rv1819c*, eliminando a habilidade de *M. tuberculosis* transportar vitamina B12 e outros corrinóides *in vitro*. Este achado estabeleceu o papel essencial do gene *Rv1819c* na captação da vitamina B12 (GOPINATH et al., 2013). Por ser um transportador da família ABC, *bacA* está envolvida na captura de nutrientes e secreção de peptídeos, lipídeos, íons e agente tóxicos. (JIANG et al., 2008).

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que níveis reduzidos de expressão do gene *bacA* estão relacionados com a resistência primária à isoniazida. Sugere-se também que *bacA* possa sofrer supressão de sua expressão em isolados com monorresistência primária à isoniazida.

Os níveis de expressão basal observados em 83,3% dos isolados clínicos, tanto monorresistentes quanto susceptíveis foram menores do que os níveis observados na cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv.

Com base nos resultados do presente estudo e dos estudos mencionados anteriormente levanta-se a questão de quais mecanismos associados à resistência estariam reduzindo a expressão do gene *bacA* nos isolados resistentes não expostos à fármacos em relação aos isolados

susceptíveis, porém, aumentado sua expressão frente a exposição à fármacos. Sugere-se que: (I) a redução nos níveis de expressão de *bacA* nos isolados resistentes decorre dos custos gerados por possíveis mutações, as quais conferem resistência, porém, acarretam prejuízos ao *fitness* bacteriano; (II) isolados susceptíveis direcionam seu perfil transcricional majoritariamente às funções vitais/basais da célula, enquanto que isolados resistentes moldam seu perfil transcricional de maneira a superexpressar alguns genes associados à resistência em detrimento de certos genes (subexpressar genes que não são vitais), entretanto, frente a exposição ao fármaco, o perfil é redirecionado para combater a atuação deste. Como *bacA* está envolvido em funções nutricionais e atua como bomba de efluxo, ele é subexpresso em isolados resistentes, mas, em presença do fármaco, ele passa a ser superexpresso; (III) os isolados monorresistentes do presente estudo subexpressaram *bacA* em decorrência de mecanismos associados à sua resistência, e por serem provenientes de pacientes em resistência primária, não foram expostos a fármacos, sendo assim, não superexpressaram *bacA*; (IV) a diminuição da expressão de *bacA* ocorreu de forma a compensar o gasto energético envolvido na superexpressão de outras bombas de efluxo, como por exemplo, *mmr*.

Quando comparados os níveis de expressão basal do gene *drrA* (Rv2936) entre os grupos analisados no presente estudo, não foi observada diferença significativa entre estes ($p > 0,05$), desta forma, não foi possível estabelecer uma relação entre a expressão deste gene e o fenótipo de resistência apresentado pelos isolados (Figura 14). Resultados semelhantes foram encontrados por Calgin e colaboradores (2013), os quais investigaram os níveis de expressão basal de 15 genes preditos como codificadores de bombas de efluxo, em isolados clínicos susceptíveis e resistentes (TB-MDR) de *M. tuberculosis*. Entre estes genes foi investigado em comum ao presente estudo o gene *drrA*. Os autores não observaram diferença significativa entre os níveis de expressão do gene *drrA* entre os isolados susceptíveis e resistentes. Resultados distintos foram encontrados por Li e colaboradores (2015), os quais observaram níveis de expressão basal do gene *drrA* significativamente maiores nos isolados TB-MDR quando comparados aos isolados susceptíveis.

Quando analisados em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv, não foi possível observar diferença significativa nos níveis de expressão relativa do gene *drrA* entre os grupos ($p > 0,05$).

Oito (26,6%) isolados subexpressaram *drmA* em relação à cepa de referência e 73,3% (22) tiveram níveis de expressão relativa similares à esta (Figuras 16 e 21). Resultados divergentes foram encontrados por Calgin e colaboradores (2013) em estudo descrito anteriormente, os quais observaram que os níveis transcricionais basais do gene *drmA*, em todos os isolados clínicos, foram superiores aos níveis observados nas cepas de referência *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618, ATCC 25177, e *M. tuberculosis* H37Rv Pasteur Institute RSKK 598) (CALGIN et al., 2013).

O gene *drmA*, compõe o *operon* de resistência doxorrubicina, *drr*, o qual codifica as proteínas *drrABC*. O *operon drr* se encontra localizado no *cluster* dos 13 genes envolvidos na biossíntese e transporte dos lipídios ptiocerosato (PDIMs) do citoplasma para a parede celular. Os PDIMs atuam na permeabilidade da parede celular de *M. tuberculosis* e são um fator de virulência bacteriano, sobretudo durante os primeiros estágios da infecção quando os bacilos se deparam com a resposta imune via macrófagos (CAMACHO et al., 2001; SILVA et al., 2016). Choudhuri e colaboradores (2002) demonstraram que o complexo proteico *drrAB*, em *M. smegmatis*, conferiu resistência a diversos fármacos de importância clínica, incluindo estreptomicina, etambutol e tetraciclina e este fenótipo resistente foi revertido pelo tratamento com reserpina ou verapamil, ambos inibidores de bombas de efluxo (CHOUDHURI et al., 2002; SILVA et al., 2016)(ROSSI; AÍNSA; RICCARDI, 2006).

Em busca de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), Kanji e colaboradores (2016a) sequenciaram o genoma completo de 32 isolados TB-XDR. Os dados obtidos foram utilizados para investigar a presença de SNPs em genes codificadores de bombas de efluxo, em comparação ao genoma da cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv. Os autores observaram que oito isolados apresentaram SNPs não sinônimos (NS) (substituição de ácido aspártico por histidina) no gene *drmA*, na posição 3273138. Por fim, os autores concluíram que este polimorfismo pode resultar na superexpressão de bombas de efluxo em isolados de *M. tuberculosis*. Em estudo subsequente, Kanji e colaboradores (2016b) avaliaram os níveis de expressão relativa de cinco genes preditos como codificadores de bombas de efluxo, dentre eles, foi avaliada a expressão do gene *drmA*, em isolados TB-XDR (n=10). Os resultados obtidos foram comparados à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv e a isolados de *M. tuberculosis* susceptíveis (n=9). Os autores observaram

superexpressão significativa do gene *drrA* nos isolados TB-XDR quando comparados às cepas susceptíveis e sugeriram que os valores aumentados nos níveis de expressão de genes de bombas de efluxo podem contribuir para a resistência em isolados TB-XDR (KANJI et al., 2016a, 2016b).

A análise dos dados do presente estudo, com relação ao gene *drrA*, foi dificultada pela diversidade de resultados apresentados nos estudos descritos anteriormente, além disso, o perfil de resistência dos isolados analisados em todos os estudos é bem divergente. Apesar de dificultar a análise comparativa, sugere-se que possa haver uma relação entre o perfil de resistência dos isolados e a superexpressão de *drrA*, uma vez que, em isolados TB-XDR, foi observada superexpressão em relação a isolados susceptíveis; em isolados TB-MDR, os resultados foram controversos, e em isolados monorresistentes à isoniazida não foi observada elevação nos níveis de *drrA*. Estudos futuros são necessários no intuito de se esclarecer o papel do gene *drrA* nos diferentes tipos de resistência apresentados em *M. tuberculosis*.

O perfil de expressão relativa dos genes avaliados no presente estudo foi diversificado. Para certos genes foi estabelecida relação significativa entre os níveis de expressão e o fenótipo de resistência apresentado. As variações encontradas podem ser resultantes das características do ambiente ao qual os isolados foram expostos clinicamente, as quais, ainda que não presentes no momento da análise, influenciam o perfil transcricional por meio da regulação epigenética. As implicações genéticas relacionadas ao perfil transcricional encontrado devem ser investigadas em estudos futuros, a fim de se esclarecer a relação entre a presença ou não de mutações e o perfil observado. A variabilidade nos perfis de expressão entre isolados com o mesmo fenótipo de resistência nos levam a crer que a resposta de cada isolado em um mesmo cenário infeccioso (um mesmo indivíduo alberga populações bacterianas distintas) pode variar, de maneira que populações bacterianas se sobressaiam frente a fármacos e tenham maiores chances de se estabelecerem como população resistente.

Em estudo realizado por Machado e colaboradores (2016) foi observado que a superexpressão de genes de bombas de efluxo foi mais evidente em isolados TB-MDR quando comparados a isolados monorresistentes à isoniazida. Os autores concluíram que há associação entre resistência, perfil genético, perfil transcricional de genes de bombas de efluxo e habilidade de efluxo. Grande parte dos estudos

relacionados à análise dos níveis de expressão de genes de bombas de efluxo em *M. tuberculosis* adotaram como objeto de estudo isolados clínicos TB-MDR, o que diverge o perfil definido no presente estudo. Esta divergência dificulta a análise, uma vez que não há dados suficientes que suportem a relação entre certos perfis de expressão com os diferentes perfis de resistência encontrados.

7 CONCLUSÕES

O mecanismo de efluxo está presente em todas as células, protegendo-as contra a ação de agentes tóxicos (PAULSEN; BROWN; SKURRAY, 1996). Este mecanismo se torna evidente em isolados de *M. tuberculosis*, quando expostos a agentes tóxicos, como a isoniazida, os quais passam a superexpressar certos genes preditos como codificadores de bombas de efluxo (DORAN et al., 1997; VIVEIROS et al., 2002; GUPTA et al., 2010a; HAO et al., 2011; SILVA et al., 2011; MACHADO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012; BLACK et al., 2014; GARIMA et al., 2015; CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2016). A identificação dos perfis de transcrição de certos genes em isolados clínicos com diferentes perfis de sensibilidade pode ser útil no esclarecimento dos mecanismos implicados no surgimento da resistência.

No presente estudo, foi encontrada relação significativa entre os níveis basais de expressão dos genes *mmr* e *bacA* e o fenótipo de monorresistência primária à isoniazida. O gene *mmr* apresentou valores de expressão basal aumentados nos isolados com monorresistência primária à isoniazida quando comparados aos isolados susceptíveis, sugerindo que este gene possa estar relacionado com a resistência à isoniazida. Os níveis de expressão basal do gene *bacA* nos isolados susceptíveis foram superiores aos níveis encontrados nos isolados com monorresistência primária à isoniazida, sugerindo que níveis reduzidos de expressão do gene *bacA* possam estar relacionados com a resistência à isoniazida. Os níveis de expressão basal observados em 83,3% dos isolados clínicos, tanto monorresistentes quanto susceptíveis foram menores do que os níveis observados na cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv. Para os genes *jeftA*, *efpA* e *drxA* não foi observada diferença significativa nos níveis de expressão entre os grupos analisados no presente estudo.

8 LIMITAÇÕES

A escassez de dados na literatura que correlacionam os níveis de expressão gênica em isolados monorresistentes à isoniazida a isolados susceptíveis foi desafiador para a análise dos dados do presente estudo.

Este estudo foi pioneiro no que diz respeito ao emprego de RNA para avaliação de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia – LBMMS, da Universidade Federal de Santa Catarina. Em decorrência, as técnicas utilizadas foram padronizadas e implantadas na rotina laboratorial, o que demandou grande parte do tempo disponível para o desenvolvimento do presente estudo. O processo de extração de RNA total em *Mycobacterium tuberculosis* é desafiador pelas características intrínsecas deste microrganismo. Aliado a isso, a falta do equipamento *bead bater* (equipamento de lise mecânica), fez com que diversos protocolos fossem testados na tentativa de se extrair RNA com concentração e pureza requeridos. Infelizmente, os resultados obtidos a partir do emprego destes protocolos não foram satisfatórios. Somente em agosto de 2016 se tomou conhecimento da existência do equipamento *bead beater* Precellys 24® (Bertin Instruments, França) no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias (CCA), UFSC, o qual emprestou o equipamento para que as extrações pudessem ser realizadas. Dentro das limitações encontradas, o projeto foi iniciado, porém não se encontra encerrado, uma vez que a investigação do papel das bombas de efluxo em *M. tuberculosis* requer avaliações complementares.

9 EXPECTATIVAS

Futuros estudos voltados à identificação do genótipo dos isolados do presente estudo se fazem necessários, a fim de se esclarecer a relação entre possíveis mutações e o perfil transcricional de genes de bombas de efluxo. Objetiva-se então, investigar a presença de mutações nos genes envolvidos com a resistência à isoniazida nos isolados do presente estudo bem como correlacionar os resultados da MIC (em andamento) aos resultados do perfil de expressão dos isolados do presente estudo.

Objetiva-se também avaliar a associação entre inibidores de bomba de efluxo (verapamil) e isoniazida na redução da Concentração Inibitória Mínima (MIC) em isolados de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, A. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; CHAMPION, P. a D.; COX, J.; LUIRINK, J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; APPELMELK, B. J.; BITTER, W. Type VII secretion-mycobacteria show the way. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 883–891, 2007.

AKHTAR, S.; SARKAR, S.; MISHRA, A.; SARKAR, D. A method to extract intact and pure RNA from mycobacteria. **Analytical Biochemistry**, v. 417, n. 2, p. 286–288, 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**. BRATS: Brasília. n.16, 2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE ASSISTÊNCIA À SAÚDE Módulo 7: Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica**. ANVISA: Brasília, 2012.

APPLIED BIOSYSTEMS. **User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System: Relative Quantitation of Gene Expression** Applied Biosystems, 2001.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; UM, K. S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; DE LISLE, G.; JACOBS, W. R.; URN, K. S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; LISLE, G. De; JR, W. R. J. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 263, n. 01, p. 227–230, 1994.

BARRY, C. E.; BOSHOFF, H. I.; DARTOIS, V.; DICK, T.; EHRT, S.; FLYNN, J.; SCHNAPPINGER, D.; WILKINSON, R. J.; YOUNG, D. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845–55, 2009.

BLACK, Philippa A. et al. Energy Metabolism and Drug Efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58, n. 5, p. 2491–2503, 2014.

BODDINGHAUS, B.; ROGALL, T.; FLOHR, T.; BLOCKER, H.; BOTTGER, E. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1751–1759, 1990.

BOLLA, J. R.; DO, S. V.; LONG, F.; DAI, L.; SU, C. C.; LEI, H. T.; CHEN,

X.; GERKEY, J. E.; MURPHY, D. C.; RAJASHANKAR, K. R.; ZHANG, Q.; YU, E. W. Structural and functional analysis of the transcriptional regulator Rv3066 of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 18, p. 9340–9355, 2012.

BOTTAI, D.; STINEAR, T. P.; SUPPLY, P.; BROSCHE, R. Mycobacterial Pathogenomics and Evolution. **Microbiology Spectrum**, n. May 2016, p. 1–19, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Tuberculose na Atenção Primária à Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde, 2011b.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico: perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública**. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 47, n. 13, 2016.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 83, n. 1-3, p. 91–97, 2003.

BRENNAN, P. J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 64, p. 29–63, 1995.

BROSCHE, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684–3689, 2002.

BUG@S, **BμG@S group**. Department of Cellular and Molecular Medicine, St George's, University of London, 2016. Disponível em:

http://bugs.sgul.ac.uk/bugsbases/tabs/protocol.php?protocol_id=33&action=view

BUSTIN, S. a.; BENES, V.; GARSON, J. a.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEW, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–22, abr. 2009.

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; AMARAL, R. C. R.; DEMITTO, F. O.; MALTEMPE, F. G.; CANEZIN, P. H.; SCODRO, R. B. L.; NAKAMURA, C. V.; LEITE, C. Q. F.; SIQUEIRA, V. L. D.; CARDOSO, R. F. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. **Tuberculosis**, v. 97, 2016.

CALGIN, M. K.; SAHIN, F.; TUREGUN, B.; GERCEKER, D.; ATASEVER, M.; KOKSAL, D.; KARASARTOVA, D.; KIYAN, M. Expression analysis of efflux pump genes among drug-susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates and reference strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 3, p. 291–297, 2013.

CAMACHO, L. R.; CONSTANT, P.; RAYNAUD, C.; LANÉELLE, M. A.; TRICCAS, J. A.; GICQUEL, B.; DAFFÉ, M.; GUILHOT, C. Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19845–19854, 2001.

CAMPBELL, E. a. E. A.; KORZHEVA, N.; MUSTAEV, A.; MURAKAMI, K.; NAIR, S.; GOLDFARB, A.; DARST, S. A. S. a. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. **Cell**, v. 104, n. 6, p. 901–12, 2001.

CAMUS, J.-C.; PRYOR, M. J.; MÉDIGUE, C.; COLE, S. T. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. Pt 10, p. 2967–73, 2002.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Core curriculum on tuberculosis, chapter 2: transmission and pathogenesis of tuberculosis**. 6 ed. Atlanta: CDC, 2013.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **TB Elimination: Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TB)**. New letter. p. 1–3, Jan 2013.

CHO, S. Y.; NAM, Y. S.; YANG, H.; SOH, Y. S.; KIM, M. J.; LEE, H. J. A Study of Efflux Pump Genes in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 17, n. 2, p. 65–68, Junho 2014.

CHOUDHURI, B. S.; BHAKTA, S.; BARIK, R.; BASU, J.; KUNDU, M.; CHAKRABARTI, P. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Biochemical journal**, v. 367, n. Pt 1, p. 279–285, 2002.

COELHO, T.; MACHADO, D.; COUTO, I.; MASCHMANN, R.; RAMOS, D.; VON GROLL, A.; ROSSETTI, M. L.; SILVA, P. a.; VIVEIROS, M. Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. April, p. 1–12, 2015.

COHEN, K. A.; BISHAI, W. R.; PYM, A. S. Molecular basis of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology Spectrum**, p. 16, 2014.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 396, n. NOVEMBER, p. 190–198, 1998.

DALCOLMO, M. P.; ANDRADE, M. K. de; PICON, P. D. Multiresistant tuberculosis in Brazil: History and control. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. SUPPL. 1, p. 1–8, 2007.

DE ROSSI, E.; ARRIGO, P.; BELLINZONI, M.; SILVA, P. a E.; MARTÍN, C.; AÍNSA, J. a; GUGLIERAME, P.; RICCARDI, G. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 8, n. 11, p. 714–724, 2002.

DE ROSSI, E.; BRANZONI, M.; CANTONI, R.; RICCARDI, G.; CIFERRI, O. *mmr*, a *Mycobacterium tuberculosis* gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. Nov. 1998, p. 6068–6071, 1998.

DIETRICH, G.; SCHAIBLE, U. E.; DIEHL, K. D.; MOLLENKOPF, H.; WIEK, S.; HESS, J.; HAGENS, K.; KAUFMANN, S. H.; KNAPP, B. Isolation of RNA from mycobacteria grown under in vitro and in vivo conditions. **FEMS microbiology letters**, v. 186, n. 2, p. 177–80, 2000.

DIVE, Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Barriga Verde: Informativo Epidemiológico: controle da tuberculose em Santa Catarina, avanços e desafios**. Florianópolis: Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Ano XIV, Março, 2016.

DOMENECH, P.; KOBAYASHI, H.; LEVIER, K.; WALKER, G. C.; BARRY, C. E. BacA, an ABC transporter involved in maintenance of chronic murine infections with *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 2, p. 477–485, 2009.

DORAN, J. L.; PANG, Y.; MDLULI, K. E.; MORAN, a J.; VICTOR, T. C.; STOKES, R. W.; MAHENTHIRALINGAM, E.; KREISWIRTH, B. N.; BUTT, J. L.; BARON, G. S.; TREIT, J. D.; KERR, V. J.; VAN HELDEN, P. D.; ROBERTS, M. C.; NANO, F. E. *Mycobacterium tuberculosis* *efpA* encodes an efflux protein of the QacA transporter family. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 4, n. 1, p. 23–32, 1997.

EDWARDS, D.; KIRKPATRICK, C. H. The immunology of Mycobacterial Diseases. **American Review of Respiratory Disease**, v. 134, p. 1062–1071, 1986.

FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Educação a Distância. Rio de Janeiro, 348 p., 2008

GARIMA, K.; PATHAK, R.; TANDON, R.; RATHOR, N.; SINHA, R.; BOSE, M.; VARMA-BASIL, M. Differential expression of efflux pump genes of *Mycobacterium tuberculosis* in response to varied subinhibitory concentrations of antituberculosis agents. **Tuberculosis**, v. 95, n. January, p. 1–7, 2015.

GE, General Electric Company. **NanoVue™: user manual**. General Electric Company. Piscataway: General Eletric, 2007.

GEMAL, A.; DALCOLMO, M. P. **Considerações sobre a situação atual da produção de medicamentos para o tratamento da tuberculose no Brasil**. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle da Tuberculose, PNCT, 2011.

GOPINATH, K.; VENCLOVAS, C.; IOERGER, T. R.; SACCHETTINI, J. C.; MCKINNEY, J. D.; MIZRAHI, V.; WARNER, D. F. A vitamin B12 transporter in *Mycobacterium tuberculosis*. **Open biology**, v. 3, n. 2, p. 120175, 2013.

GUO, H.; SEET, Q.; DENKIN, S.; PARSONS, L.; ZHANG, Y. Molecular

characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. **Journal of medical microbiology**, v. 55, p. 1527–31, nov. 2006.

GUPTA, A. K.; KATOCH, V. M.; CHAUHAN, D. S.; SHARMA, R.; SINGH, M.; VENKATESAN, K.; SHARMA, V. D. Microarray Analysis of Efflux Pump Genes in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* During Stress Induced by Common Anti-Tuberculous Drugs. **Microbial drug resistance**, v. 16, n. 1, 2010a.

GUPTA, A. K.; REDDY, V. P.; LAVANIA, M.; CHAUHAN, D. S.; VENKATESAN, K.; SHARMA, V. D.; TYAGI, A. K.; KATOCH, V. M. *jefA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol. **Indian Journal of Medical Research**, v. 132, n. 8, p. 176–188, 2010b.

GUPTA A.; KAUL, A.; TSOLAKI, A. G.; KISHORE, U.; BHAKTA, S. *Mycobacterium tuberculosis*: Immune evasion, latency and reactivation. **Immunobiology**, v. 217, p. 363-374, 2012.

GUPTA, S.; TYAGI, S.; ALMEIDA, D. V; MAIGA, M. C.; AMMERMAN, N. C.; BISHAI, W. R. Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with verapamil as an efflux inhibitor. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 188, n. 5, p. 600–7, 1 set. 2013.

HAO, P.; SHI-LIANG, Z.; JU, L.; YA-XIN, D.; BIAO, H.; XU, W.; MIN-TAO, H.; SHOU-GANG, K.; KE, W. The role of ABC efflux pump, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 6, p. 549–553, 2011.

HARTMANN, G.; HONIKEL, K. O.; KNUSEL, F.; NUESCH, J. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 145, p. 843–844, 1967.

HERRERA, V.; PERRY, S.; PARSONNET, J.; BANAEI, N. Clinical application and limitations of interferon- γ release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 8, p. 1031–1037, 2011.

HORSBURGH, C. R.; RUBIN, E. Latent tuberculosis infection in the United States. **New England Journal of Medicine**, p. 1441–1448, 2011.

JAHN, C. E.; CHARKOWSKI, A. O.; WILLIS, D. K. Evaluation of isolation

methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 2, p. 318–324, 2008.

JIANG, X.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; GAO, F.; LU, C.; ZHANG, X.; WANG, H. Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 14, n. 1, p. 7–11, 2008.

JOHNSSON, K.; SCHULTZ, P. G. Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid by the Catalase Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 16, p. 7425–7426, 1994.

KANJI, A.; HASAN, R.; ZAVER, A.; ALI, A.; IMTIAZ, K.; ASHRAF, M.; CLARK, T. G.; MCNERNEY, R.; SHAFIQ, S.; HASAN, Z. Alternate efflux pump mechanism may contribute to drug resistance in extensively drug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, p. S97–S98, 2016a.

KANJI, A.; HASAN, R.; ZHANG, Y.; SHI, W.; IMTIAZ, K.; IQBAL, K.; SHAFIQ, S.; HASAN, Z. Increased expression of efflux pump genes in extensively drug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, p. S150, 2016b.

KARDAN YAMCHI, J.; HAEILI, M.; GIZAW FEYISA, S.; KAZEMIAN, H.; HASHEMI SHAHRAKI, A.; ZAHEDNAMAZI, F.; IMANI FOOLADI, A. A.; FEIZABADI, M. M. Evaluation of efflux pump gene expression among drug susceptible and drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Iran. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 36, p. 23–26, 2015.

KÄSER, M.; RUF, M. T.; HAUSER, J.; PLUSCHKE, G. Optimized DNA preparation from mycobacteria. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 5, n. 4, 2010.

KAUR, D.; GUERIN, M. E.; ŠKOVIEROVÁ, H.; BRENNAN, P. J.; JACKSON, M. Chapter 2: Biogenesis of the Cell Wall and Other Glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 69, n. 09, p. 23–78, 2009.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN, W.C. **Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology**. Washington: 5 ed. Lippincott, 2001.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 57–

72, 2011.

LEKANNÉ DEPRez, R. H.; FIJNVANDRAAT, A. C.; RUIJTER, J. M.; MOORMAN, A. F. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v. 307, n. 1, p. 63–69, 2002.

LEW, J.M.; KAPOPOULOU A.; JONES L.M.; COLE S.T. TubercuList-10 years after. **Tuberculosis (Edinb)**. N. 91. 2011. Disponível em: <http://tuberculist.epfl.ch/>

LI, G.; ZHANG, J.; GUO, Q.; JIANG, Y.; WEI, J.; ZHAO, L.; ZHAO, X.; LU, J.; WAN, K. Efflux Pump Gene Expression in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0119013, 2015.

LIFE TECHNOLOGIES. **TRIzol® Reagent**, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. São Diego, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOPES, A. C. **Tratado de clínica médica**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2006.

LOUW, G. E.; WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; MCEVOY, C. R. E.; VAN HELDEN, P. D.; VICTOR, T. C. A balancing act: Efflux/influx in mycobacterial drug resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3181–3189, 2009.

MACHADO, D.; COUTO, I.; PERDIGÃO, J.; RODRIGUES, L.; PORTUGAL, I.; BAPTISTA, P.; VEIGAS, B.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS one**, v. 7, n. 4, jan. 2012.

MACHADO, D.; PIRES, D.; PERDIGÃO, J.; COUTO, I.; PORTUGAL, I.; MARTINS, M.; AMARAL, L.; ANES, E.; VIVEIROS, M. Ion Channel Blockers as Antimicrobial Agents, Efflux Inhibitors, and Enhancers of Macrophage Killing Activity against Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Plos One**, v. 11, n. 2, p. e0149326, 2016.

MAHENTHIRALINGAM, E. Extraction of RNA from mycobacteria. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 101, p. 65–75, 1998.

MANGANELLI, R.; DUBNAU, E.; TYAGI, S.; KRAMER, F. R.; SMITH, I. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular microbiology**, v. 31, n. 2, p. 715–724, 1999.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**, v. 87, n. 12, p. 1137–1147, 2005.

MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1771–1777, 2000.

MCILROY, S.; PORTER, K.; SEVIOUR, R. J.; TILLET, D. Simple and safe method for simultaneous isolation of microbial RNA and DNA from problematic populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6806–6807, 2008.

MENZIES, D. Interpretation of repeated tuberculin tests: Boosting, conversion, and reversion. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, n. 1, p. 15–21, 1999.

MITCHISON, D. A. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 2, n. 1, p. 10-15, 1998.

NIEDERWEIS, M. Mycobacterial porins - new channel proteins in unique outer membranes. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1167–1177, 2003.

NIKAIDO, H. Multiple antibiotic resistance and efflux. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 516–523, 1998.

NIKAIDO, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 12, n. 3, p. 215–223, 2001.

NOGUEIRA, C. L.; WILDNER, L. M.; SENNA, S. G.; ROVARIS, D.; GRUNER, M. F.; JAKIMIU, A. R.; DA SILVA, R. M.; BAZZO, M. L. Alternative sputum preparation to improve polymerase chain reaction assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 16, n. 6, p. 783–787, 2012.

NTCA, N. T. C. A.; APHL, A. of P. H. L. **Consensus statement on the use of Cepheid Xpert MTB/RIF® assay in making decisions to discontinue airborne infection isolation in healthcare settings**. p. 16, 2016.

NUNES-ALVES, C.; BOOTY, M. G.; CARPENTER, S. M.; JAYARAMAN, P.; ROTHCHILD, A. C.; BEHAR, S. M. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289–99, 2014.

PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: from basic science to patient care**. 1. ed. Bélgica, Brasil, Argentina: Bourcillier Kamps, 2007.

PANDOLFI, J. R.; MALASPINA, A. C.; SANTOS, A. C. B.; SUFFYS, P. N.; OELLEMANN, M. A. C.; VALENTINI, S. R.; LEITE, C. Q. F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 251–257, 2007.

PAULSEN, I. T.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Proton-dependent multidrug efflux systems. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 4, p. 575–608, 1996.

PREFEITURA MUNICIPAL DE FLORIANÓPOLIS. **Boletim Epidemiológico**, n2, agosto 2015. Disponível em http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/10_09_2015_14.12.59.8b25de9b1fe7279ef9cc7a19e062bfcd.pdf

PRIM, R. I. **Caracterização molecular de estirpes de mycobacterium tuberculosis resistentes à isoniazida e/ou rifampicina isoladas de amostras clínicas do estado de santa catarina**. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

PRIM, R. I.; SCHÖRNER, M. A.; SENNA, S. G.; NOGUEIRA, C. L.; FIGUEIREDO, A. C. C.; OLIVEIRA, J. G. De; ROVARIS, D. B.; BAZZO, M. L. Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in the state of Santa Catarina, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2015.

PROMEGA. **Sv total rna isolation system: technical manual**. 2013.

PROMEGA CORPORATION. **RQ1 RNase-Free DNasePromega Corporation**, 2009.

PUTMAN, M.; VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 4, p. 672–93, 2000.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; LEKANNE DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 154–160, 1997.

RODRIGUES, L.; MACHADO, D.; COUTO, I.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Infection, genetics and evolution. **Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 12, n. 4, p. 695–700, jun. 2012.

RODRIGUES, L.; VILLELLAS, C.; BAILO, R.; VIVEIROS, M.; AÍNSA, J. a. Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 751–7, fev. 2013.

ROSSI, E. D.; AÍNSA, J. A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: An unresolved question. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 36–52, 2006.

ROZWARSKI, D. A.; GRANT, G. A.; BARTON, D. H. R.; JR, W. R. J.; SACCHETTINI, J. C. Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 279, n. 2, January, p. 98–102, 1998.

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. F. M. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, 2009.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 39–47, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. v. 1, 3 ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SILVA, P. E. A. da; MACHADO, D.; RAMOS, D.; COUTO, I.; GROLL, A. Von; VIVEIROS, M. Efflux Pumps in Mycobacteria: Antimicrobial Resistance, Physiological Functions, and Role in Pathogenicity. In: LI, X.-Z.; ELKINS, C. A.; ZGURSKAYA, H. I. (Ed.). **Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications**. Vancouver: Adis, p. 527–559, 2016.

SILVA, P. E. A. da; PALOMINO, J. C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Classical and new drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1417–1430, 2011.

SILVA, P. E. A.; VON GROLL, A.; MARTIN, A.; PALOMINO, J. C. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–9, 2011.

SILVA, S. N.; SENNA, S. G.; RIBEIRO, M. O.; VALIM, R. M.; TELLES, M. A.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. R. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* Genes of Brazilian Isoniazid-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4471–4474, 2003.

SOMOSKOVI, A.; PARSONS, L. M.; SALFINGER, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Respiratory Research**, v. 2, n. 3, p. 164–8, 2001.

SRIVASTAVA, S.; MUSUKA, S.; SHERMAN, C.; MEEK, C.; LEFF, R.; GUMBO, T. Efflux-pump-derived multiple drug resistance to ethambutol monotherapy in *Mycobacterium tuberculosis* and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of ethambutol. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 8, p. 1225–31, 15 abr. 2010.

TB CARE I. **International standards for tuberculosis care: diagnosis, treatment, public health. TB CARE I.** The Hague.3 ed. São Francisco, 2014.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; LOWRIE, D.; COLE, S.; COLSTON, M. J.; MATTER, L.; SCHOPFER, K.; BODMER, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet**, v. 341, p. 647–650, 1993.

TIEMERSMA, E. W.; WERF, M. J. van der; BORGDORFF, M. W.; WILLIAMS, B. G.; NAGELKERKE, N. J. D. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. **PloS one**, v. 6, n. 4, 2011.

TORTOLI, E.; CICHERO, P.; PIERSIMONI, C.; SIMONETTI, M. T.; GESU, G.; NISTA, D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: Multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3578–3582, 1999.

UNITED NATIONS. **The Millennium Development Goals Report 2015**. Nova Iorque: Nações Unidas, 2015.

VAN INGEN, J.; RAHIM, Z.; MULDER, A.; BOEREE, M. J.; SIMEONE, R.; BROSCHE, R.; VAN SOOLINGEN, D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 653–655, 2012.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 18 jun. 2002.

VANDESOMPELE, J.; KUBISTA, M.; PFAFFL, M. M. W. Reference Gene Validation Software for Improved Normalization. **Real-time PCR: Current Technology and Applications**, v. 4, n. JANUARY, p. 47–64, 2009.

VENKATARAMAN, B.; GUPTA, N.; GUPTA, A. A robust and efficient method for the isolation of DNA-free, pure and intact RNA from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, n. 3, p. 198–202, 2013.

VILCHÈZE, C.; JACOBS, W. R. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. **Annual review of microbiology**, v. 61, p. 35–50, 2007.

VIVEIROS, M.; LEANDRO, C.; AMARAL, L. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 274–278, 2003.

VIVEIROS, M.; PORTUGAL, I.; BETTENCOURT, R.; VICTOR, T. C.; JORDAAN, A. M.; LEANDRO, C.; ORDWAY, D.; AMARAL, L. Isoniazid-Induced Transient High-Level Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 2804–2810, 2002.

VIVEIROS, M.; RODRIGUES, L.; MARTINS, M.; COUTO, I.; SPENGLER, G.; MARTINS, A.; AMARAL, L. Evaluation of Efflux Activity of Bacteria by a Semi-automated Fluorometric System. In: MCHUGH, S. H. G. AND T. D. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. 2. ed. Springer Science+Business Media, 642p. 159–172, 2010.

WALKER, John M. **Mycobacteria Protocols**. 2. ed. Nova Iorque: Humana Press, 456 p., 2008.

WATSON, James D. **Molecular Biology of the gene**. 6. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2008.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9–11, 2003.

WILDNER, L. M. **Atividade antimicobacteriana in vitro de lactonas sesquiterpênicas e investigação do seu mecanismo de ação**. 2016. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

WILSON, M.; DERISI, J.; KRISTESEN, H.-H.; IMBODEN, P.; RANE, S.; BROWN, P. O.; SCHOOLNIK, G. K. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12833–12838, 1999.

WHO, World Health Organization. **Toman's tuberculosis: case detection, treatment, and monitoring: questions and answers**. 2. ed. Geneva: WHO, 2004.

WHO, World Health Organization. **Tratamento da tuberculose: linhas orientadoras para programas nacionais** 3. ed. Lisboa: WHO, 2006.

WHO, World Health Organization. **Global tuberculosis control: WHO report 2011**. Geneva: WHO, 2011.

WHO, World Health Organization. **Global Tuberculosis Report 2014**. Geneva: WHO, 2014a.

WHO, World Health Organization. **Xpert MTB/RIF implementation manual: technical and operational “how-to”: practical considerations**. Geneva: WHO, 2014b.

WHO, World Health Organization. **Global Tuberculosis Report 2015**. Geneva: WHO, 2015.

WHO, World Health Organization. **Global tuberculosis report 2016**. Geneva: WHO, 2016.

ZAINUDDIN, Z. F.; DALE, J. W. Does *Mycobacterium tuberculosis* have plasmids? **Tubercle**, v. 71, n. 1, p. 43–49, 1990.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YOUNG, D.; COLE, S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of **Mycobacterium tuberculosis**. **Nature**, v. 358, n. 6387, p. 591–593, 1992.

APÊNDICE A – METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE RNA DE *M. tuberculosis* EMPREGADAS NO PRESENTE ESTUDO QUE DISPENSAM O USO DE EQUIPAMENTO *BEAD BEATER*

Inicialmente, tentou-se extrair o RNA total de *M. tuberculosis* a partir da lise enzimática promovida pela Lisozima (Life Technologies, EUA) associada à lise mecânica em banho ultrassônico de frequência 42kHz (Cristófoli, Brasil). A cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv e um isolado clínico (MM1) foram utilizadas nesta testagem, cada isolado em duplicata. As bactérias foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9 por 15 dias e uma alíquota de 1 mL do meio na turbidez 0,5 da escala de Mc Farland ($10^6 - 10^8$ células/mL) foi transferida para um tubo de 2 mL contendo 1 mL de *RNAprotet Bacteria Reagent*¹⁹(Qiagen, Alemanha). As amostras foram centrifugadas a 7969 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 100 µL de tampão TE²⁰ com subsequente incubação por 10 min a 95°C. O resfriamento ocorreu a 24°C. Foi adicionado 50 µL de Lisozima (3 mg/mL) e incubado por 30 min a 24°C. Foram adicionados 75 µL do Tampão *RNA Lysis Buffer*²¹ (Promega/EUA) e a mistura foi colocada em banho ultrassônico por 15 min. Foram adicionados 350 µL do Tampão *RNA Dilution Buffer* e homogeneizado por inversão. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e 200 µL de etanol 95% foram adicionados e a mistura homogeneizada. As amostras foram aplicadas na coluna do Kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega/EUA), e o RNA foi obtido de acordo com as instruções do fabricante. A etapa de digestão do DNA ocorreu diretamente na coluna de purificação, como parte integrante dos procedimentos do kit. Para cada amostra, foi preparado o DNase mix, contendo 40 µL de *Yellow Core Buffer*, 5 µL 0.09M MnCl₂ e 5 µL da enzima DNase I, nesta ordem. A mistura foi cuidadosamente homogeneizada e 50 µL foram pipetados diretamente sobre a membrana no interior da coluna. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 20–25°C.

¹⁹ Tecnologia patenteada que promove imediata estabilização do perfil da expressão genica in vivo. Previne a degradação dos transcritos e indução de genes (Qiagen, 2012).

²⁰ 10 mM Tris-HCl (Life Technologies/EUA), 1 mM EDTA (Life Technologies/EUA), pH 8.0

²¹ O RNA Lysis Buffer deve conter 2% de β-mercaptoetanol

Em seguida, foram adicionados 200 μL de *DNase Stop Solution* à coluna que foi centrifugada a 12000-14000 $\times g$ por um minuto. A partir de então foram realizados os procedimentos de lavagem e eluição em água DEPC (MACHADO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012; PROMEGA, 2013). As amostras foram em seguida avaliadas quanto a concentração e pureza no equipamento NanoVue™ Plus (General Electric, EUA) e integridade por eletroforese em gel de agarose 1,2% com TAE 1x (20 mM Tris acetato, 0,5 mM EDTA, pH 8) a 80 V por 30 minutos com Brometo de Etídio incorporado ao gel (Sigma-Aldrich, EUA), com subsequente visualização em transluminador de luz ultravioleta (LAS 500 – General Electric, EUA). Os resultados obtidos das avaliações de concentração e pureza encontram-se descritos na Tabela 1. Não foi possível visualizar nenhuma banda no gel de agarose.

Tabela 1 - Resultados obtidos das amostras extraídas com base em protocolo incluindo Lisozima e banho ultrassônico.

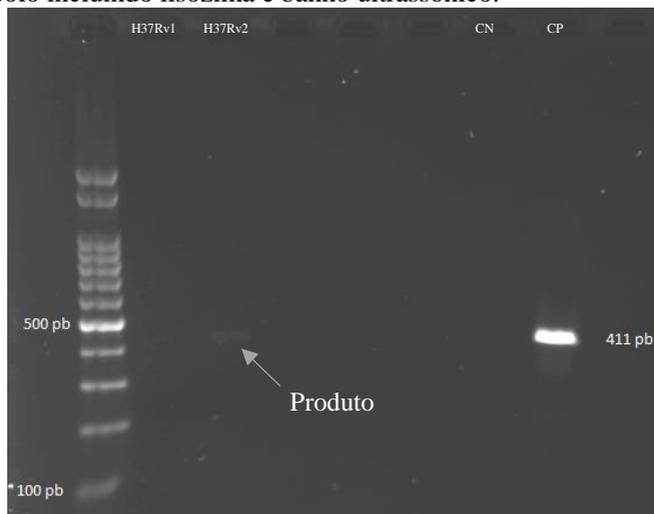
Isolado	Concentração	A _{260/280} *
H37R _{v1}	12 ng/ μL	1.97
H37R _{v2}	9,3 ng/ μL	1.74
MM1 ₁	8 ng/ μL	1.85
MM1 ₂	6,8 ng/ μL	1.79

*Valores desejáveis: A_{260/280} – acima de 2.0;

Em seguida, os produtos de extração foram submetidos a Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase – RT-PCR por meio do kit *SuperScript III One-Step System with Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Para 25 μL de reação foram adicionados 12,5 μL de 2X *Reaction Mix*, 0,25 μL (25pmol/ μL) dos iniciadores rpoB senso 5'-AGTTCTTCGGCACCAGC-3 e rpoB antisense 5'-CGCTCACGTGACAGACC-3 (PRIM et al., 2015), 1 μL da enzima *SuperScript III RT/ Platinum Taq* e 11 μL de RNA total. As condições de termociclagem foram: 56,5°C/30 minutos e 94°C/2 minutos, seguidos por 40 ciclos de 94°C/15 segundos, 55°C/30 segundos, 68°C/1 minuto e 20 segundos, e extensão final a 68°C/5 minutos. Os produtos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1.5% (120 V/40 minutos) e corados com Brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em seguida, foram visualizados sob luz ultravioleta de 320 nm em sistema de foto-documentação de géis ImageQuant LAS 500 (GE - EUA). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com marcadores de tamanho molecular (*ladder*) de 100 pb. Foi possível observar que houve amplificação do gene *rpoB* em uma das amostras,

porém não foi possível descartar a possibilidade de que esta amplificação seja fruto de contaminação por DNA genômico (Figura 1).

Figura 1 - *One-Step* RT-PCR das amostras extraídas com base em protocolo incluindo lisozima e banho ultrassônico.

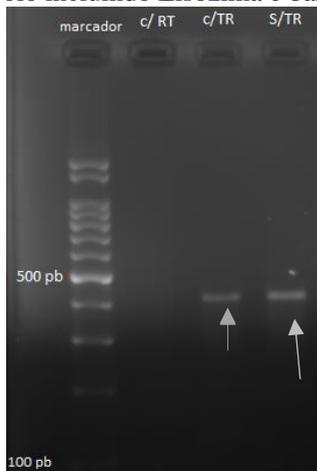


Legenda: pb – pares de base; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; marcador: marcador de tamanho molecular 100 pb (Life Technologies, EUA); H37Rv1 e H37Rv2: amostras obtidas a partir do protocolo de extração com base em lisozima e banho ultrassônico. Produto da amplificação do fragmento de 411 pb do gene *rpoB*. Fonte: a autora.

Em seguida foi investigado se o produto da reação anterior seria originário de RNA, como esperado, ou poderia ser proveniente de DNA. Assim, uma nova reação foi realizada, com as etapas de Transcrição Reversa e PCR executadas em separado. O RNA total foi convertido à cDNA e após isso este cDNA foi amplificado utilizando-se os mesmos iniciadores da reação anterior. Amostras de RNA total não convertidas a cDNA (mix de transcrição sem adição da enzima transcriptase reversa) foram inseridas na reação de PCR, afim de identificar uma possível contaminação por DNA genômico. Os produtos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1.5% (120 V/30 minutos) e corados com Brometo de etídio (1µg/mL). Em seguida, foram visualizados sob luz ultravioleta de 320 nm em sistema de fotodocumentação de géis ImageQuant LAS 500 (GE - EUA). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com marcadores de tamanho molecular (ladder) de 100 pb. Foi observada amplificação

proveniente da amostra que não sofreu transcrição reversa (s/TR), o que indica contaminação por DNA genômico (Figura 2).

Figura 2 - Resultados obtidos das amostras extraídas com base em protocolo incluindo Lisozima e banho ultrassônico.



Legenda: pb: pares de base; marcador: marcador de tamanho molecular 100 pb (Life Technologies, EUA); c/RT: Transcrição Reversa com adição da enzima Transcriptase Reversa, s/RT: Transcrição Reversa sem adição da enzima Transcriptase Reversa. Fonte: a autora.

Com base nos resultados obtidos a partir do protocolo descrito anteriormente, optou-se por inserir sílica/zircônio ao processo. No entanto, os resultados não foram satisfatórios, não ocorrendo amplificação nem mesmo na avaliação por *one-step* RT-PCR.

Posteriormente, testou-se protocolo de extração baseado nas propriedades do reagente Trizol® (Life Technologies, EUA) associado à Solução de Tiocianato de Guanidina 5M – GTC (Sigma-Aldrich/EUA), com posterior lise mecânica por pérolas de zircônia ou sílica, em banho ultrassônico. A cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv foi testada em duplicata e em diferentes condições de lise: com pérolas de zircônia (H37Rv_{zir}) e com pérolas de sílica (H37Rv_{sil}). Quatro volumes da solução GTC foram adicionados à cultura. A suspensão foi centrifugada a 1057 x g por 30 min. O sobrenadante foi removido e os sedimentos dos múltiplos tubos - referentes a uma mesma amostra - combinados em um só tubo com posterior adição de mais 10 mL de GTC. A suspensão foi centrifugada a 1057 x g por 30 min. O sobrenadante de GTC foi removido e 1,2 mL de Trizol foram adicionados. A mistura foi

transferida para tubos de lise contendo o equivalente a 0,5 mL de pérolas de Zircônio (0,1 mm) ou Sílica. Os tubos foram levados ao banho ultrassônico a 45kHz por 3 ciclos de 5 minutos cada, com um minuto de resfriamento em gelo entre os ciclos. Os tubos repousaram a temperatura ambiente²² por 10 min. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, EUA) e o tubo foi agitado em *vortex* por 30 segundos com posterior incubação em temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 18516 x g por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e foi adicionado igual volume de clorofórmio. Após homogeneização a mistura foi centrifugada a 18516 x g por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi novamente transferida para um novo microtubo e 0,8 volumes de Isopropanol foram adicionados. Ocorreu homogeneização por inversão e incubação *overnight* a -20°C. No dia seguinte as amostras foram centrifugadas 18516 x g por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado. O sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 70% (Sigma-Aldrich/EUA) gelado e a mistura foi centrifugada a 18516 x g por 15 min a 4°C. O Etanol foi removido por pipetagem e o sedimento foi seco em temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. O sedimento foi ressuspensão em 50 µL água DEPC. Com a finalidade de testar diferentes condições, a amostra H37Rvzir foi incubada por 5 a 10 minutos a 24°C e a amostra H37Rvsil foi incubada a 57°C por 10 minutos. Por fim ambas foram armazenadas em gelo. Em seguida foi realizada a digestão do DNA por meio do kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, EUA). A digestão foi realizada em alíquotas. Para cada alíquota de 12 µL de RNA, foi adicionado 1,5 µL de 10X *Reaction Buffer* e 1,5 µL de *RNase-Free DNase*. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e 1 µL de *DNase Stop Solution* foi adicionado. Por fim ocorreu incubação a 65°C por 10 minutos (PROMEGA CORPORATION, 2009). O RNA total extraído foi armazenado a -20°C. As amostras foram avaliadas quanto a concentração, pureza e integridade como descrito anteriormente (Tabela 2). Não foi possível visualizar as bandas 23S e 16S em gel de agarose. Na reação *One-Step RT-PCR*, não ocorreu amplificação para nenhuma das amostras avaliadas; isto pode ter ocorrido devido ao excesso de contaminantes na amostra, os quais foram capazes de inibir a reação.

²² Temperatura ambiente: entre 23°C e 25°C.

Tabela 2 - Avaliação da concentração e pureza das amostras extraídas a partir da utilização de Trizol, banho ultrassônico e pérolas de Sílica ou Zircônio.

Isolado	Concentração	A _{260/280} *
H37Rv _{zir1}	51,2 ng/μL	1.45
H37Rv _{zir2}	55,6 ng/μL	1.43
H37Rv _{sil1}	44 ng/μL	1.23
H37Rv _{sil2}	43.6 ng/μL	1.22

*Valores desejáveis: A_{260/280} > 1,8. H37Rvzir- Pérolas de zircônia; H37Rvsil- Pérolas de sílica

Em busca de resultados satisfatórios, foram feitas alterações nos protocolos descritos anteriormente: uma etapa adicional de lavagem com etanol foi adicionada a ambos os protocolos. Com relação ao rendimento, a turbidez da cultura utilizada foi duplicada (de McFarland 0,5 para McFarland 1,0). Ao primeiro protocolo, alterações no tempo e temperatura de incubação da enzima Lisozima foram feitas a fim de melhorar a sua atividade. As condições de incubação passaram de 30 minutos a 24°C para *overnight* a 37°C. Adicionalmente, pérolas de Zircônia foram acrescentadas ao protocolo buscando aprimorar a lise. Como indica a Tabela 3, as concentrações obtidas das amostras que não sofreram incubação *overnight* a 37°C foram levemente maiores do que as concentrações obtidas das amostras que sofreram tal incubação, o que indica que um maior tempo e temperatura de incubação não aprimora a atividade da enzima Lisozima. As concentrações de RNA foram próximas entre as amostras testadas com e sem pérolas de Zircônio, indicando que a presença das pérolas não altera o rendimento.

Tabela 3 - Resultados das alterações feitas nos protocolos de extração baseados em lisozima, banho ultrassônico e pérolas de zircônio ou sílica.

Isolado	Condições	Concentração	A _{260/280} *
H37Rv	Lisozima <i>overnight</i> c/ zir	11,7 ng/μL	1.8
H37Rv	Lisozima <i>overnight</i> s/ zir	9,2 ng/μL	1.8
H37Rv	Lisozima 30 min c/ zir	11,1 ng/μL	1.7
H37Rv	Lisozima 30 min s/ zir	13,6 ng/μL	1.8

*Valores desejáveis: A_{260/280} > 1,8 zir: pérolas de zircônia

No decorrer do emprego dos protocolos de extração citados anteriormente se tomou conhecimento da existência de um equipamento do tipo *bead beater* em dos laboratórios da UFSC. Por fim, foi feita parceria com este laboratório, como descrito no ítem 4.5.

APÊNDICE B – Níveis de expressão dos genes *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* e *drmA* nos isolados do presente estudo, expressos em $2^{-\Delta Cq} (x10^{-4}) \pm D$

	<i>jefA</i> $2^{-\Delta Cq} (x10^{-4}) \pm D$		<i>efpA</i> $2^{-\Delta Cq} (x10^{-4}) \pm D$		<i>mmr</i> $2^{-\Delta Cq} (x10^{-4}) \pm D$		<i>bacA</i> $2^{-\Delta Cq} (x10^{-4}) \pm D$		<i>drmA</i> $2^{-\Delta Cq} (x10^{-4}) \pm D$	
1	49.7	0.1	35.2	0.1	4.7	0.1	4.7	0.0	159.3	0.1
2	----		61.9	0.1	5.5	0.2	3.5	0.1	183.8	0.2
3	42.4	0.1	66.4	0.3	7.0	0.1	1.9	0.0	197.8	0.1
4	16.2	0.6	58.3	0.1	----		2.1	0.4	177.2	0.1
5	19.4	0.2	126.2	0.1	5.7	0.2	3.5	0.1	106.9	0.1
6	10.4	1.4	118.7	0.3	5.0	0.1	1.3	0.4	163.8	0.1
7	9.1	0.3	52.2	0.0	5.5	0.2	1.7	0.4	162.2	0.2
8	9.7	0.0	65.1	0.2	7.6	0.3	2.5	0.0	177.1	0.0
9	5.9	1.4	57.8	0.0	3.0	0.0	1.3	0.0	73.7	0.1
10	8.5	0.6	70.1	0.4	4.3	0.2	1.6	0.2	98.1	0.1
11	8.4	0.3	92.9	0.0	----		1.0	0.0	91.0	0.1
12	9.3	0.3	55.9	0.0	6.3	0.2	2.1	0.0	178.5	0.0
13	17.8	0.2	71.8	0.1	5.1	0.4	1.5	0.7	112.3	0.0
14	9.7	1.8	83.2	0.1	4.1	0.1	1.3	0.4	139.0	0.0
15	11.0	0.9	79.6	0.3	3.2	1.0	3.3	0.4	252.6	0.3
16	17.3	0.1	102.9	0.6	9.7	0.9	4.7	0.6	282.0	0.9
17	11.1	0.2	58.7	0.3	3.1	0.0	2.9	0.1	117.8	0.1
18	18.9	0.1	76.3	0.1	5.0	0.5	2.1	0.2	90.5	0.9
19	9.1	0.8	78.3	0.2	9.2	0.1	1.8	0.1	148.2	0.2
20	21.3	0.3	70.8	0.1	6.8	0.3	1.5	0.2	171.2	0.4
21	16.1	0.2	83.8	0.4	6.9	0.2	1.5	0.3	102.8	0.3
22	----		46.8	0.3	8.6	0.6	1.7	0.2	134.8	0.3
23	20.6	0.1	41.6	0.5	8.0	0.1	1.5	0.1	140.1	0.6
24	8.6	0.3	74.1	0.2	12.6	0.1	1.8	0.4	255.2	0.1
25	16.3	0.5	61.8	0.4	6.6	0.4	1.3	0.3	151.6	0.5
26	16.9	0.2	76.1	0.6	5.0	0.1	1.4	0.1	173.6	0.0
27	12.5	0.1	93.1	0.5	7.6	0.2	1.2	0.4	144.6	0.2
28	----		144.0	0.2	7.9	0.1	1.2	0.1	128.0	0.1
29	17.4	0.4	123.1	0.4	6.5	0.1	1.7	0.0	212.0	0.0
30	10.9	0.2	68.7	0.2	----		1.1	0.9	125.5	0.0

Níveis de expressão dos genes *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* e *drrA*; normalizados pela média geométrica dos genes *polA*, *sigA* e *rrs*. Valores expressos em $2^{-\Delta Cq}$ ($\times 10^4$). D: desvio padrão entre os valores de ΔCq das duplicatas biológicas. O ensaio ocorreu em duplicata biológica e triplicata técnica. Na análise do gene *mmr*, a amostra 4 foi classificada como *outlier* e foi excluída do estudo. Amostras com a identificação (----) não apresentaram desvio padrão aceitável entre as triplicatas técnicas, e foram excluídas da análise.

APÊNDICE C – NÍVEIS DE EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* E *drrA* NOS ISOLADOS DO PRESENTE ESTUDO, EM RELAÇÃO À CEPA DE REFERÊNCIA *M. tuberculosis H37Rv*

	<i>jefA</i>	<i>efpA</i>	<i>mmr</i>	<i>bacA</i>	<i>drrA</i>
1	3.13	0.71	1.36	0.73	0.66
2	-----	1.24	1.63	0.54	0.77
3	2.67	1.35	2.02	0.30	0.83
4	1.10	1.17	-----	0.33	0.74
5	1.23	2.54	1.68	0.55	0.45
6	1.00	2.42	1.46	0.21	0.68
7	0.58	1.05	1.62	0.28	0.68
8	0.61	1.32	2.28	0.39	0.74
9	0.55	1.16	0.86	0.21	0.31
10	0.59	1.45	1.27	0.25	0.41
11	0.54	1.86	-----	0.16	0.38
12	0.60	1.12	1.84	0.32	0.74
13	1.12	1.44	1.56	0.26	0.47
14	1.12	1.67	1.18	0.22	0.58
15	0.85	1.63	1.17	0.54	1.07
16	1.09	2.25	3.37	0.79	1.39
17	0.70	1.19	0.91	0.46	0.49
18	1.19	1.53	1.55	0.34	0.45
19	0.66	1.58	2.69	0.28	0.62
20	1.36	1.42	2.05	0.24	0.74
21	1.02	1.76	2.01	0.24	0.44
22	-----	0.95	2.70	0.27	0.58
23	1.30	0.87	2.33	0.23	0.63
24	0.55	1.50	3.66	0.29	1.07
25	1.08	1.29	2.00	0.21	0.67
26	1.07	1.66	1.46	0.23	0.72
27	0.79	1.98	2.24	0.19	0.61
28	-----	2.93	2.30	0.18	0.53
29	1.13	2.56	1.90	0.26	0.88
30	0.70	1.39	-----	0.20	0.52

Expressão relativa dos genes *jefA*, *efpA*, *mmr*, *bacA* e *drrA* em relação à cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv; normalizados pela média geométrica dos genes *polA*, *sigA* e *rrs*. Valores expressos em $2^{-\Delta\Delta Cq}$. O ensaio ocorreu em duplicata biológica e triplicata técnica. Níveis de expressão iguais a 1 indicam que a expressão foi igual entre o isolado clínico e a cepa de referência, níveis abaixo de 0,5 indicam subexpressão e níveis acima de 2 indicam superexpressão (em negrito na tabela). Na análise do gene *mmr*, a amostra 4 foi classificada como *outlier* e foi excluída do estudo. Amostras com a identificação (-----) não apresentaram desvio padrão aceitável entre as triplicatas técnicas, e foram excluídas da análise.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO PELO COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA COM SERES HUMANOS/UFSC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da influência da depleção RDRio e da Concentração Inibitória Mínima na falência da resposta ao tratamento de primeira linha de tuberculose pulmonar: uma coorte prospectiva de 2 anos na grande Florianópolis/SC

Pesquisador: Maria Luiza Bazzo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 25716113.7.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA E INOVAÇÃO DO ESTADO DE SANTA CATARINA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 550.598

Data da Relatoria: 10/03/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da influência da depleção RDRio e da Concentração Inibitória Mínima na falência da resposta ao tratamento de primeira linha de tuberculose pulmonar: uma coorte prospectiva de 2 anos na grande Florianópolis/SC" orientado pela Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo, visa a obtenção do título de doutor. O projeto é patrocinado pela Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar da influência da depleção RDRio e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os fármacos de primeira linha no desfecho do tratamento convencional em pacientes com tuberculose pulmonar na grande Florianópolis/SC.

Objetivo Secundário:

- Determinar a CIM a Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida dos isolados de M. tuberculosis de pacientes virgens de tratamento;
- Caracterizar e mapear as famílias de M. tuberculosis circulantes na grande Florianópolis por método molecular Spoligotyping;

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 550.598

- Avaliar a presença da deleção RDRio nos isolados de M. tuberculosis;
- Analisar a influência da variação genotípica caracterizada pela presença da deleção RDRio no fenótipo da doença clínica;
- Avaliar a relação entre os valores de CIM apresentados pelo microrganismo no início do tratamento e o desfecho clínico;
- Correlacionar as famílias circulantes com a presença da deleção RDRio, a CIM inicial e o desfecho do tratamento;
- Relacionar os valores das CIM na cultura inicial com os valores de CIM obtidos nas culturas que se mantiverem positivas após dois meses de tratamento;
- Analisar os fatores de risco para falência terapêutica nos pacientes virgens de tratamento;
- Correlacionar os valores de CIM com as principais mutações para Isoniazida e Rifampicina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Embora conste no Relatório de Pesquisa que não há riscos oriundos dessa pesquisa já que não haverá qualquer intervenção nas pessoas que doarão as amostras e responderão ao questionário, é necessário considerar que de acordo com a Res. CNS 466/12 sempre há riscos nas pesquisas que envolvem seres humanos. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade. Quanto aos benefícios, tal como consta no Relatório de Pesquisa, os dados obtidos poderão contribuir para o estabelecimento, através do estudo clínico, de critérios para interpretação dos valores de concentração inibitória mínima para os fármacos de primeira linha. Os critérios de interpretação e a determinação da concentração inibitória mínima, permitirão a otimização do uso destes fármacos e consequentemente diminuição da utilização de fármacos de segunda linha que são substancialmente mais onerosos ao sistema de saúde, desacelerando o aumento da resistência; Os resultados das análises filogenéticas dos isolados de M. tuberculosis circulantes na grande Florianópolis, podem contribuir para o entendimento do curso local da tuberculose e consequentemente

auxiliar na idealização de programas de controle da doença, visto que atualmente o monitoramento genético é considerado um dos pilares dos programas de controle da tuberculose. A determinação de fatores de risco para falência terapêutica nos pacientes virgens de tratamento, poderá contribuir para a implementação de medidas preventivas para evitar falhas no tratamento dos pacientes futuros

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 550.598

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa aborda um tema relevante e contribuirá para o conhecimento das práticas associadas à saúde da população. Coorte prospectiva para avaliação da influência da deleção RDRio e da Concentração Inibitória Mínima inicial na falência da resposta ao tratamento convencional da tuberculose pulmonar na grande Florianópolis em um período de 2 anos. Os defechos cura, falência ao tratamento ou morte relacionada à tuberculose, serão avaliados até a conclusão do tratamento, excluindo-se os casos de abandono de

tratamento. Serão incluídos no estudo pacientes com tuberculose pulmonar ativa, virgens de tratamento (novos casos), com cultura positiva, diagnosticados na grande Florianópolis, no período entre janeiro de 2014 a janeiro de 2015 ou até atingir o número da amostra necessária calculada para o estudo. O LAMUF informará a ocorrência de baciloscopia positiva, os pesquisadores entrarão em contato com a unidade de saúde que informará a data e horário da consulta do paciente. No momento da consulta os pesquisadores explicarão o estudo para o paciente e se este concordar em participar, assinará o TCLE. A partir de então será aplicado o questionário (anexoII) e fotografada a radiografia de torax do paciente. O acesso a cultura do paciente no LAMUF será dado com a apresentação do TCLE devidamente assinado. Na pesquisa os pacientes serão identificados através de um número sequencial. As variáveis a serem estudadas são: idade, sexo, endereço residencial (para mapeamento das famílias circulantes de M. tuberculosis); dados clínicos (tosse, produção de escarro, hemoptise, febre, perda de peso (kg), status HIV, resultado do teste tuberculínico); tabagismo (número de cigarros por dia, menos de 10, de 11 a 20, de 21 a 30 ou mais de 31); ingestão alcoólica nos últimos dois anos classificada como: moderada - aquele que bebe antes das refeições, ou ao fim do dia, ou no dia do pagamento, não se embriaga (a não ser muito raramente) e não apresenta dependência psíquica ou física pelo álcool; excessiva - aquele que a distribuição de ingestão é igual ao grupo anterior, porém, em maior quantidade, chega até à embriaguez; procura momento de euforia artificialmente através do álcool, para mudar um estado de ânimo depressivo, apresenta dependência psíquica pelo álcool; ou adicta - aquele que apresenta dependência psíquica, cultural e física, a distribuição da ingestão é maior do que nos grupos anteriores e apresentam manifestações de abstinência ou síndrome de privação (cefaléia, tremores)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação completa

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 550.598

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que a proposta apresentada se encontra adequadamente fundamentada, contendo documentação e demais informações pertinentes à questão ética em conformidade com os termos da legislação que trata da participação de seres humanos em pesquisa, encaminho voto favorável à Aprovação do Projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 10 de Março de 2014

Assinador por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-900

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-9206

Fax: (48)3721-9696

E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

ANEXO B – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS REFERENTES AO BRASIL PUBLICADOS PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, *GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2016*.

Brazil

Population 2015 208 million

Estimates of TB burden*, 2015	Number (thousands)	Rate (per 100 000 population)
Mortality (excludes HIV+TB)	5.5 (5.2–5.9)	2.7 (2.5–2.8)
Mortality (HIV+TB only)	2.2 (1.2–3.6)	1.1 (0.56–1.7)
Incidence (includes HIV+TB)	84 (72–97)	41 (35–47)
Incidence (HIV+TB only)	13 (11–15)	6.3 (5.3–7.3)
Incidence (MDR/RR-TB)**	2.3 (1.9–2.8)	1.1 (0.91–1.3)

Estimated TB incidence by age and sex (thousands)*, 2015	0–14 years		> 14 years	Total
	Females	3.8 (2.2–5.4)	24 (14–33)	28 (17–38)
Males	4.3 (3–5.6)	52 (41–64)	57 (44–69)	
Total	8.1 (6.2–10)	76 (69–83)	84 (72–97)	

TB case notifications, 2015	
Total cases notified	81 137
Total new and relapse	73 221
- % tested with rapid diagnostics at time of diagnosis	23%
- % with known HIV status	82%
- % pulmonary	87%
- % bacteriologically confirmed among pulmonary	73%

Universal health coverage and social protection

TB treatment coverage (notified/estimated incidence), 2015 87% (75–100)

TB patients facing catastrophic total costs

TB case fatality ratio (estimated mortality/estimated incidence), 2015 0.09 (0.07–0.11)

TB/HIV care in new and relapse TB patients, 2015		Number	(%)
Patients with known HIV-status who are HIV-positive		9 069	15%
- on antiretroviral therapy		2 852	31%

Drug-resistant TB care, 2015		New cases	Previously treated cases	Total number***
Estimated MDR/RR-TB cases among notified pulmonary TB cases				1 900 (1 600–2 300)
Estimated % of TB cases with MDR/RR-TB		1.5% (1.1–1.9)	8% (5.9–10)	
% notified tested for rifampicin resistance		26%	35%	22 608
MDR/RR-TB cases tested for resistance to second-line drugs				237
Laboratory-confirmed cases			MDR/RR-TB: 1 197, XDR-TB: 14	
Patients started on treatment****			MDR/RR-TB: 619, XDR-TB: 29	

Treatment success rate and cohort size		Success	Cohort
New and relapse cases registered in 2014		71%	74 117
Previously treated cases, excluding relapse, registered in 2014		39%	7 532
HIV-positive TB cases, all types, registered in 2014		49%	6 891
MDR/RR-TB cases started on second-line treatment in 2013		52%	759
XDR-TB cases started on second-line treatment in 2013		12%	17

TB preventive treatment, 2015	
% of HIV-positive people (newly enrolled in care) on preventive treatment	
% of children (aged < 5) household contacts of bacteriologically-confirmed TB cases on preventive treatment	

TB financing, 2016	
National TB budget (US\$ millions)	
60	
Funding source: 77% domestic, <1% international, 22% unfunded	

* Ranges represent uncertainty intervals

** MDR is TB resistant to rifampicin and isoniazid; RR is TB resistant to rifampicin

*** Includes cases with unknown previous TB treatment history

**** Includes patients diagnosed before 2015 and patients who were not laboratory-confirmed

Tuberculosis profile

