

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PEDRO HENRIQUE CANEZIN

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE BOMBAS DE EFLUXO EM
Mycobacterium tuberculosis APÓS EXPOSIÇÃO À RIFAMPICINA E
VERAPAMIL EM AMBIENTE INTRAMACROFÁGICO

Maringá

2017

PEDRO HENRIQUE CANEZIN

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE BOMBAS DE EFLUXO EM
Mycobacterium tuberculosis APÓS EXPOSIÇÃO À RIFAMPICINA E
VERAPAMIL EM AMBIENTE INTRAMACROFÁGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosilene Fressatti Cardoso.

Maringá

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO*

PEDRO HENRIQUE CANEZIN

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE BOMBAS DE EFLUXO EM *Mycobacterium tuberculosis* APÓS EXPOSIÇÃO À RIFAMPICINA E VERAPAMIL EM AMBIENTE INTRAMACROFÁGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Rosilene Fressatti Cardoso
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP

Prof^ª. Dr^ª. Regiane Bertin de Lima Scodro
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 29/03/2017

Local de defesa: Anfiteatro – Bloco T20 - UEM

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por me dar força e motivação para finalizar essa pós-graduação, o que sem dúvida é um mérito muito honroso.

Não há também como deixar de agradecer a minha família, em especial a minha mãe Marinelda Becker, que não pôde estar presente neste dia, meu pai José Carlos Canezin, que me deu suporte para estar aqui hoje, minha avó Carmem Freitas Becker, que tem sido meu grande tesouro, e meu irmão Júlio Cezar Canezin.

Gostaria também de agradecer especialmente a minha orientadora Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, que me proporcionou entendimento e se tornou uma grande amiga desde à graduação, e também à minha orientadora, Rosilene Fressatti Cardoso, pela paciência e compreensão ao longo desses dois anos.

Ainda gostaria de agradecer ao laboratório de Bacteriologia Médica e a todos que colaboraram de forma direta ou indireta com o meu trabalho, servidores e professores, e em especial à Isabella Letícia Esteves Barros, que me ajudou nas atividades laborais e também na minha vida pessoal.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE BOMBAS DE EFLUXO EM *Mycobacterium tuberculosis* APÓS EXPOSIÇÃO À RIFAMPICINA E VERAPAMIL EM AMBIENTE INTRAMACROFÁGICO

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). A resistência do bacilo aos medicamentos comumente utilizados no tratamento da TB vem crescendo e recebem a denominação de TB multidroga-resistente (MDR), que é causada por *Mycobacterium tuberculosis* resistente à rifampicina e à isoniazida e TB extensivamente resistente (XDR), quando o bacilo apresenta resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos três medicamentos injetáveis de segunda linha. O crescente reconhecimento de TB-MDR/XDR provocou o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas utilizando novos e antigos fármacos. Além da resistência intrínseca devido a constituição da parede celular e mutações em genes, o sequenciamento do genoma de *Mtb* mostrou que o bacilo apresenta constitutivamente várias bombas de efluxo (BEs) responsáveis pelo bombeamento de íons, moléculas e fármacos para fora do ambiente bacilar. Existem substâncias capazes de inibir esse sistema de efluxo, fazendo com que o fármaco permaneça dentro do bacilo causando a morte do mesmo, tais como Verapamil (VP). Alguns autores relataram uma relação entre BEs e a capacidade de *Mtb* superar o estresse oxidativo no interior dos macrófagos. Por isso, o modelo de infecção de células THP-1 por *Mtb* vem sendo utilizado para avaliação da resistência bacilar após sua exposição ao ambiente macrofágico. Desta forma, esse estudo visou avaliar a expressão gênica de BEs em ambiente macrofágico na exposição a RIF e VP sozinhos e combinados, em 24 h e 72 h. As células THP-1 foram infectadas com *Mtb* H₃₇Rv e expostas a RIF, VP e RIF+VP em 24 h e 72 h. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi realizado utilizando o master mix PCR SYBR green no equipamento StepOne™. Em 24 h de exposição aos fármacos, observou-se uma superexpressão da maioria das BEs na exposição ao RIF, VP e RIF+VP. No entanto, às 72 h foi observada ausência de expressão da maioria das BEs, inclusive na combinação RIF+VP. Nesse sentido, estudos adicionais in vivo poderiam trazer novas informações sobre a ação de RIF+VP no bacilo. Logo, essa combinação poderia indubitavelmente auxiliar na terapia contra MTB-MDR.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, THP-1, verapamil, rifampicina, bombas de efluxo, expressão gênica.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Multidrug-resistant TB (MDR) is caused by rifampicin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis*, while in the extensively resistant TB (XDR), the bacillus presents additional resistance to any fluoroquinolone and to at least one of the three second-line injectables (amikacin, Kanamycin or capreomycin). The growing recognition of MDR / XDR-TB has led to the development of new therapeutic strategies using new and old tuberculostatic drugs. In cases of MDR-TB, as well as for XDR-TB, specialized and individualized treatment is advocated. *Mtb* presents intrinsic resistance to some drugs by the constitution of membrane rich in fatty acids. Thus, the main mechanism of resistance involves mutations in genes involved in the metabolism of anti-TB drugs. Recently, the sequencing of the *Mtb* genome showed that the bacillus constitutively presents several efflux pumps (EPs) responsible for pumping ions, molecules and drugs out of the bacillary environment. There are substances capable of inhibiting this efflux system, causing the drug to remain within the bacillus and its death, such as Verapamil (VP). Some authors have reported a relationship between EPs and the ability of *Mtb* to overcome oxidative stress within macrophages. Therefore, the model of infection of THP-1 cells by *Mtb* has been used to evaluate the bacillary resistance after its exposure to the macrophagic environment. Thus, this study aimed to evaluate the gene expression of EPs in macrophagic environment at exposure to RIF, VP and RIF+VP in 24 h and 72 h. THP-1 cells were infected with *Mtb* H₃₇Rv and exposed to RIF, VP and RIF+VP in 24 h and 72 h. The qPCR was performed using the master SYBR green PCR mix in the StepOne™ Real Time PCR System. At 24 h of drug exposure, an overexpression of the majority of BEs was observed in exposure to RIF, VP and RIF+VP. However, at 72 h there was an absence of expression of most BEs, including the RIF+VP combination. In this sense, additional *in vivo* studies could bring new information about the action of RIF+VP in the bacillus. Therefore, this combination could undoubtedly aid *mtb*-MDR therapy.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, THP-1, verapamil, rifampicin, efflux pumps, gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Lista dos 30 países com alta prevalência de tuberculose e a correlação com a coinfeção com HIV e tuberculose multidroga resistente (TB-MDR).....	11
Figura 2 - Esquemática da parede celular de micobactérias	13
Figura 3 - Fluxograma de exposição ao <i>Micobacterium tuberculosis</i> a partir de gotículas suspensas no ar, com desenvolvimento ou não da Tuberculose.....	14
Figura 4 - Esquema das principais famílias de bombas de efluxo encontradas hoje em procariotos e eucariotos	19
Figura 5 - Estrutura básica de um granuloma	21

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
BEs	Bombas de efluxo
CCCP	<i>m</i> -clorofenil-hidrazona
EMB	Etambutol
IFN- γ	Intérferon gama
INH	Isoniazida
LAM	Lipoarabinomananas
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MDR	Multidroga-resistente
MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
MNT	Micobactérias não tuberculosas
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NO	Nitric oxide (Óxido Nítrico)
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
PGL	Phenolic glycolipid (Glicolípido fenólico)
PZA	Pirazinamida
RIF	Rifampicina
RIF+VP	Rifampicina e verapamil em combinação
RND	<i>resistance nodulation division</i>
RNS	Reactive nitrogen species (espécies reativas de nitrogênio)
ROS	Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)
SMR	<i>small drug multiresistance</i>
TB	Tuberculose
TLR	<i>TollLike</i> Receptor
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral-beta
VP	Verapamil
WHO	World Health Organization
XDR	Extensivamente resistente
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida humana

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I e III) e das publicações científicas (Capítulo II): *Tuberculosis*, disponível em: <<http://www.tuberculosisjournal.com/>>

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	11
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	11
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
1.3 DOENÇA E RESPOSTA IMUNE	13
1.4 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA	15
1.5 TRATAMENTO.....	16
1.6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	17
1.7 CULTURA DE CÉLULAS	20
1.8 JUSTIFICATIVA	23
1.9 OBJETIVOS.....	24
REFERÊNCIAS	25
2. CAPÍTULO II	30
2.1 MANUSCRITO - Avaliação da expressão gênica de bombas de efluxo em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> após exposição ao ambiente macrofágico.....	32
3. CAPÍTULO III	47
3.1 CONCLUSÃO.....	47
3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS	48

CAPÍTULO I

1.1 EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). A infecção, desenvolvimento e evolução da TB são dependentes de fatores como aglomerados humanos, desnutrição e a baixa resistência imunológica, sendo este último fator intimamente relacionado com casos de infecção provocada pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) (WHO, 2016).

Mundialmente, 10,4 milhões de pessoas foram acometidas por essa doença em 2015. No mesmo ano, a TB levou à óbito 1,4 milhões de pessoas, sendo 1 milhão HIV negativas e 0,4 milhões HIV positivas. Neste cenário, o Brasil se encontra no grupo entre os 20 países que concentram 84 % dos casos estimados de TB no mundo, e também convive com HIV (figura 1), representando 0,9 % dos casos estimados no mundo e 33 % dos estimados para as Américas (WHO, 2016).

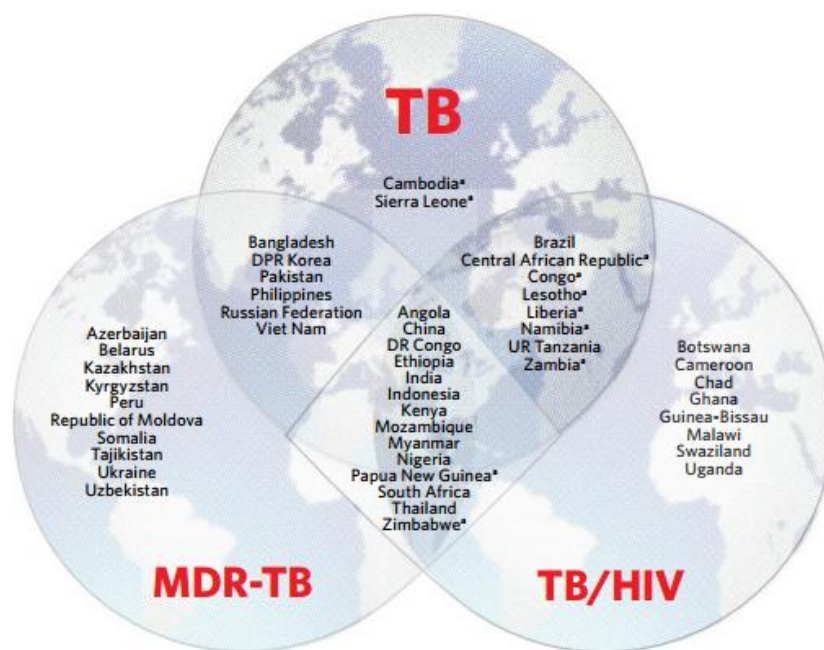


Figura 1 - Lista dos 30 países com alta prevalência de tuberculose e a correlação com a coinfeção com HIV e tuberculose multidroga-resistente (TB-MDR). Fonte: WHO, 2016. * Indica países que estão incluídos na lista dos 30 países com altas taxas de tuberculose.

No panorama global de 2015, uma estimativa de 3,9 % de novos casos e 21 % de casos com tratamento prévio foram caracterizados como multidroga-resistente (MDR –

resistência a isoniazida e a rifampicina, os dois fármacos mais eficazes na terapia anti-TB). No mesmo ano, houve cerca de 250.000 mortes provenientes de infecções por *Mtb* MDR. Já no caso de TB extensivamente resistente (XDR – apresenta resistência à rifampicina e à isoniazida, associada a pelo menos uma fluoroquinolona e um fármaco injetável de segunda linha - amicacina, kanamicina ou capreomicina), 9,5% dos casos MDR foram determinados como XDR, fato similar às estimativas de anos anteriores. O Brasil se enquadra no grupo dos países com baixas taxas de TB-MDR. Em 2015, foram descritas entre 0 a 2,9 % de novos casos de TB-MDR, e 0 a 5,9 % de novos casos MDR previamente tratados (WHO 2016).

1. 2 *Mycobacterium tuberculosis*

Atualmente o gênero *Mycobacterium* comporta mais de 150 espécies, sendo a maioria não patogênica, encontradas no ambiente. De forma geral, as micobactérias podem ser divididas em 2 grandes grupos: membros do complexo *Mtb* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. orygis*, *M. mungi*, *M. suricatta*, *M. canetti*, *M. pinnipedii*) e micobactérias não tuberculosas (MNT) (PARSONS et al., 2013). As bactérias do complexo *Mtb* compartilham 99 % de similaridade do genoma, mas diferem significativamente na sua morfologia, bioquímica e padrão de doença em humanos e animais. Além destas características, uma peculiaridade importante é o agrupamento dos bacilos em forma de ramos alongados e tortuosos, conhecidos como fator corda. É importante ressaltar que não apenas *Mtb* causa a TB em humanos, mas também outras espécies de micobactérias, como é o caso de *M. bovis* (PFYFFER et al., 2015).

Mtb é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não esporulado, não encapsulado, que mede aproximadamente de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura, sendo a propriedade morfotintorial da álcool-ácido resistência uma importante característica do bacilo. O método de coloração a quente com fucsina fenicada de Ziehl, ou a frio com auramina, retém os corantes após a descoloração com solução de álcool-ácido (VELAYATI & FARNIA, 2012). A parede celular (Figura 2) é caracterizada por uma estrutura única cuja composição a diferencia das outras bactérias. Essa parede é rica em ácidos graxos, ácidos micólicos e glicolipídios. O tempo de replicação celular de *Mtb* é de 18-24 horas, sendo necessário cerca de 15 a 20 dias para crescimento visível em meio de cultura sólido (BARRY et al., 2007; JACKSON et al., 2013).

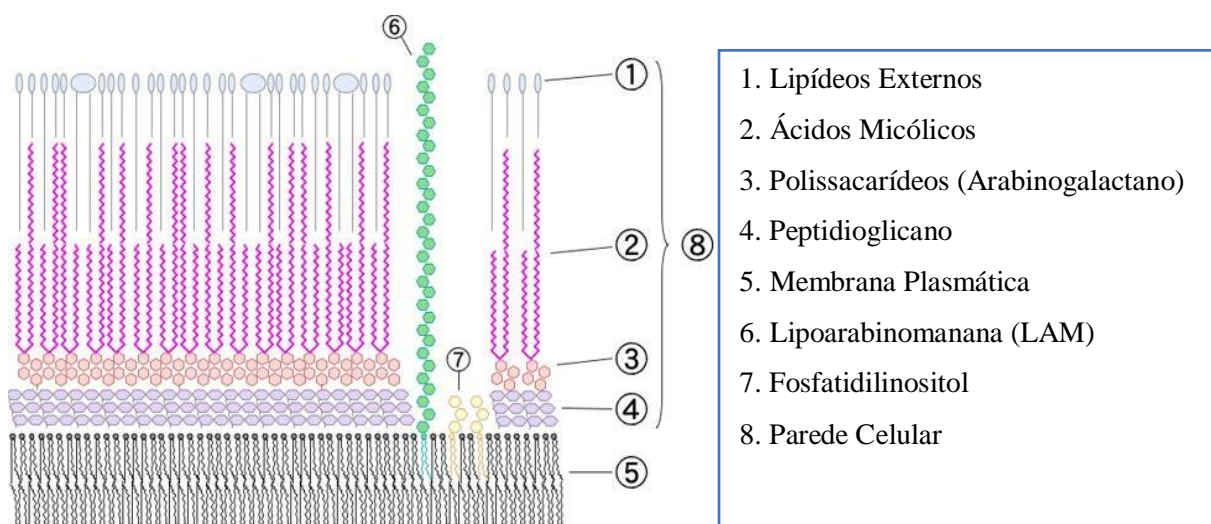


Figura 2 - Esquemática da parede celular de micobactérias

(Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a2/Mycobacterial_cell_wall_diagram.png)

1.3 DOENÇA E RESPOSTA IMUNE

A principal via de disseminação e contágio pelo bacilo, também chamado de “bacilo de Koch”, é a via aerógena. Aerossóis contendo o bacilo são liberados ao tossir ou falar, pelo indivíduo acometido pela doença. Rapidamente, gotículas entre 1 e 5 µm são dispersadas, as quais, ao conter apenas três bacilos já se tornam infectantes (GROSSET, 2003).

Ao adentrar a orofaringe de um indivíduo, existe uma série de obstáculos a serem vencidos, entre eles, a presença da defesa mucociliar, as ramificações dos brônquios e bronquíolos, até alcançar a cavidade dos alvéolos (NARDELL, 1993; WHO, 2016). Macrófagos localizados nessa região fagocitam os bacilos, os quais podem ser eliminados por uma defesa inespecífica, rápida e efetiva por intermediários de oxigênio produzidos pelo hospedeiro. Neste momento, pode ser ativada no *Mtb* uma série de vias que permitem a sua sobrevivência no interior do macrófago, dentre elas a inibição da fusão do lisossomo com o fagossomo contendo o bacilo, inibição da acidificação do fagolisossomo, proteção contra espécies reativas de oxigênio, entre outros mecanismos (ZHANG & YEW, 2009; MEENA & RAJNI, 2010).

Após duas a três semanas de infecção, os bacilos se multiplicam no hospedeiro e se disseminam para várias regiões do corpo, produzindo um exsudato que contém agentes quimiotáticos, fazendo com que macrófagos, linfócitos, neutrófilos e outras células de defesa do hospedeiro migrem para a região acometida. A partir desse momento, é formado um foco infeccioso chamado granuloma ou complexo de Ghon. É comum que a própria defesa do hospedeiro elimine os bacilos, na maioria dos casos, mas existe a possibilidade de adaptação e

sobrevivência de *Mtb*, tornando-se um processo crônico e migrando para um estágio de latência (Figura 3). Todo este processo é a chamado infecção primária da TB (FENTON & VERMEULEN, 1996; HEENSKERK et al., 2015).

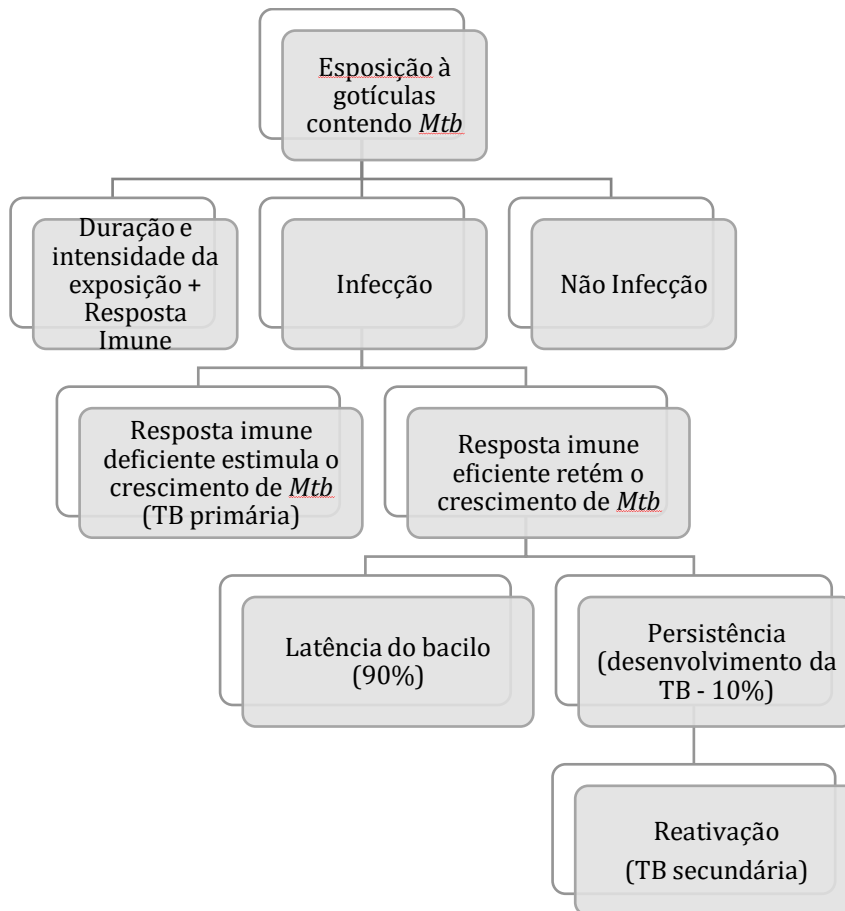


Figura 3 - Fluxograma de exposição a *Mycobacterium tuberculosis* a partir de gotículas suspensas no ar, com desenvolvimento ou não da tuberculose.

A resposta imune mediada por macrófagos é fundamental para que o indivíduo não adoça, sendo importante a atuação de vários tipos de receptores celulares. Os receptores de complemento são os principais responsáveis por fagocitar *Mtb* opsonizados por componentes do sistema complemento. Receptores de manose e receptores *scavenger* são receptores que se ligam aos bacilos não opsonizados. Os receptores *TollLike*, (principalmente TLR 2 e 4, os quais estão envolvidos com a ligação com peptidoglicano e lipopolissacarídeos bacteriano, respectivamente), desempenham um papel central na ativação do macrófago pelo bacilo, no sentido de estimular a produção de citocinas via fatores de transcrição e também de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (QUALLS & MURRAY, 2015; SHAH et al., 2013).

Existem muitos mecanismos envolvidos no processo de eliminação de *Mtb* em macrófagos infectados, dentre eles: geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e mecanismos mediados por citocinas. A produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos ativados é um dos mais importantes mecanismos antimicrobianos. Alguns componentes micobacterianos, como por exemplo, lipoarabinomananas (LAM) e glicolípido fenólico (PGL), são potentes eliminadores de ROS, além de outros que podem interferir no mecanismo antimicrobiano dependente de radicais de oxigênio. Além disso, estudos constataram um sinergismo entre Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interferon gama (IFN- γ) na indução de efeitos antimicobacterianos pelos macrófagos (FLYNN & CHAN, 2001; KORB et al., 2016).

1.4 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA

A baciloscopia, para a detecção direta do bacilo na amostra clínica, é o método mais utilizado hoje na prática clínica sendo de fundamental importância para o diagnóstico rápido da TB, principalmente em adultos. Se realizada de forma correta, é possível detectar de 60 a 80 % dos casos de TB pulmonar. Recomenda-se a realização do exame em pelo menos duas amostras clínicas, uma na consulta e outra ao despertar do dia seguinte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Além do exame direto, existe também a cultura das amostras clínicas, que é considerada padrão-ouro, com alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de TB pulmonar e extrapulmonar. Os meios de cultura mais comumente utilizados para a realização de cultura são os meios Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh, que têm a vantagem de serem os de menor custo (comparado com outros meios de cultura) e de apresentarem um índice de contaminação menor com a microbiota humana e com bactéria do meio ambiente. No entanto, a desvantagem do meio sólido é o tempo de detecção do crescimento bacteriano, que varia de 14 a 30 dias, podendo se estender por até oito semanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Também é possível o cultivo de *Mtb* em meios líquidos ou sólidos sintéticos, como é o caso do Middlebrook 7H9 broth e Middlebrook 7H10 e 7H11 a base de ágar, respectivamente, enriquecidos com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) e glicerol (FLOURNOY & TWILLEY, 2001).

Tendo em vista o tempo elevado para obtenção do crescimento micobacteriano, foram desenvolvidos métodos automatizados de detecção de *Mtb*. Um dos mais utilizados hoje é o BACTEC® MGIT (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems). Trata-se de um

sistema comercial semi-automatizado de cultivo em meio Middlebrook broth usado para o isolamento de micobactérias. Fundamenta-se na detecção de rutênio marcado com fluorocromos, que emitem luz em baixas concentrações de oxigênio. A realização de cultura automatizada pode ser realizada em diversos tipos de materiais biológicos, incluindo escarro, urina, lavado bronco-alveolar, líquido de serosas, tecidos, entre outros. O tempo de liberação do exame reduz-se, na maioria dos casos, ao prazo de 7 a 12 dias. O sistema BACTEC 9000TB® e o BACTEC-MGIT 960® são os atualmente recomendados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Os testes moleculares também são atualmente aplicados para o diagnóstico laboratorial da TB no Brasil e no mundo. O único teste molecular rápido para o diagnóstico da TB atualmente recomendado pela Organização Mundial da Saúde é o XpertMTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale EUA) (WHO, 2016). O teste tem mais sensibilidade do que a microscopia e se baseia na purificação, concentração e amplificação de ácidos nucleicos por PCR em tempo real, com o benefício de integrar e automatizar esses três processos que seriam realizados separadamente na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional. O método detecta, por meio de fluorescência, o DNA de *Mtb* e a resistência à rifampicina com a utilização de cinco sondas complementares a regiões específicas do gene *rpoβ* (FERRI, 2014).

Além do geneXpert, é comum hoje a implantação de testes moleculares *in house*, que nada mais são do que análises que cada laboratório padroniza a partir de estudos prévios. Esse método utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) e tem geralmente como alvo de amplificação regiões específicas de *Mtb* sendo as mais usadas IS6110, MTP40, IS986, e *hsp65* (VITTOR et al., 2015).

Ainda assim, métodos de detecção de resistência fenotípica, baseados na realização de cultura e teste de susceptibilidade, atualmente permanecem como padrão de referência para detecção de resistência em *Mtb* (WHO, 2016).

1.5 TRATAMENTO

O tratamento recomendado para casos novos de TB consiste no uso, por dois meses, de isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), seguido de quatro meses com INH e RIF. Se devidamente tratada, a TB é uma doença curável. No entanto, como o tratamento é longo, e os fármacos utilizados possuem importantes efeitos colaterais, com frequência o tratamento é interrompido pelo próprio paciente ou em algumas

situações por indicação médica. Em casos especiais, o tratamento pode ser prolongado, podendo ultrapassar os seis meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Os pacientes portadores de bacilos resistentes a INH e RIF constituem um grupo de doentes classificados como portadores de TB multidroga resistente (TB-MDR). Para esses casos, foi proposto um esquema constituído por estreptomicina (SM), EMB, terizidona, PZA e uma quinolona (levofloxacina ou ofloxacina). Na impossibilidade de se utilizar SM, esta deve ser substituída por amicacina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Pacientes portadores de TB extensivamente resistente (TB-XDR), ou seja, causada por bacilos resistentes também a uma fluoroquinolona e fármacos injetáveis de segunda linha, devem ser encaminhados para centros de referência terciários. Para estes pacientes, é indicado utilizar esquemas de tratamento individualizados com fármacos de reserva, que incluem capreomicina, canamicina, amicacina ou quinolonas de última geração, entre outros. Neste contexto, as emergências de TB-MDR e TB-XDR são uma grande preocupação no controle da epidemia e exigem um tratamento específico e individualizado (ARBEX, 2015; DELA CRUZ, 2016).

1.6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Mtb apresenta intrinsecamente resistência a vários fármacos, como β -lactâmicos, pela baixa permeabilidade em decorrência da constituição da parede celular ou até mesmo pela constituição gênica, na qual genes produtores de proteínas são deletados, como é o caso da transcrição de porinas pelo gene *mshA* (NGUYEN, 2016; DANILCHANKA et al., 2008). No entanto, é bastante comum a ocorrência de mutações espontâneas em diversos genes conferindo resistência aos principais fármacos (UNISSA et al., 2016).

A INH é um pró-fármaco que atravessa a parede celular micobacteriana por difusão passiva, e no citoplasma é modificado pela enzima catalase-peroxidase (codificada pelo gene *katG*). Essa enzima transforma INH em compostos ativos (tais como radicais livres e ácidos nicotínicos), afetando a síntese de ácidos micólicos pela ligação às proteínas ACP (proteína carreadora de enoilacil), codificada pelo gene *inhA*, e betacetoacil ACP sintase, codificada pelo operon *kas*. Desta forma, mutações nos genes *inhA*, *kasA* e *katG*, além de outros genes envolvidos com a oxidação de radicais livres produzidos pela INH (como *ahpC* e *ndh*), podem gerar resistência em *Mtb* à INH (UNISSA et al., 2016; NGUYEN, 2016).

Em relação a RIF, sua ação envolve ligação à subunidade β da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpo β* , o que acarreta inibição da síntese de proteínas e consequente morte

bacilar. Mutações em uma sequência de aproximadamente 80 pares de base neste gene podem levar a resistência à RIF pelo bacilo (NGUYEN, 2016; BORITSCH & BROSCHE, 2016).

Além da INH e RIF, a PZA (um pró-fármaco), depois de ativada, tem uma ação tuberculostática importante atuando nos bacilos intramacrofágicos. Mutações no gene *pncA*, que codifica a enzima pirazinamidase, leva à codificação de uma enzima ineficaz para a ativação de PZA em metabólitos ativos que inibem a síntese de ATP e a produção de ácidos graxos de membrana, levando o bacilo a apresentar resistência à PZA (NGUYEN, 2016; BORITSCH & BROSCHE, 2016).

O EMB é um fármaco que age inibindo a arabinosiltransferase, codificada pelos genes no operon *embCAB*, enzima esta necessária para a síntese de arabinogalactanos, um componente da parede celular das micobactérias. Mutações neste operon podem levar à resistência ao EMB (NGUYEN, 2016; BORITSCH & BROSCHE, 2016).

Outra forma de aquisição de resistência por *Mtb* é a resistência mediada por bombas de efluxo (BEs), as quais podem conferir resistência natural a um ou vários fármacos. A análise sequencial do genoma mostra que *Mtb* possui múltiplas BEs e diversas delas já foram identificadas em várias espécies de micobactérias (SCHMALSTIEG et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012; YADAV et al., 2016).

O aumento da atividade dos sistemas de efluxo resulta na redução da concentração intracelular de determinado fármaco, que pode contribuir para a seleção de bactérias resistentes (MACHADO et al., 2012; NGUYEN, 2016). Neste sentido, a inibição, inativação, ou mesmo alterações nas BEs são promissores para controlar o mecanismo de resistência bacteriana a determinados fármacos.

Dentre as principais famílias de BEs citadas na literatura, cinco são as mais estudadas: família RND (*resistance nodulation division*), SMR (*small drug multiresistance*), MFS (*major facilitator superfamily*), MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) e família ABC (*ATP binding cassette*) (PIDDOCK et al., 2006).

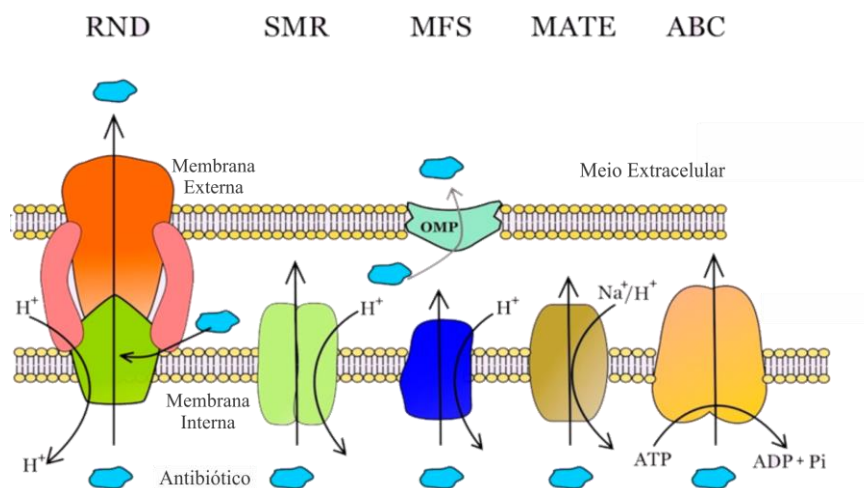


Figura 4 - Esquema das principais famílias de bombas de efluxo encontradas hoje em procariotos e eucariotos (PIDDOCK et al., 2006).

A família RND é conhecida por se manifestar em bactérias Gram-negativas. Essa BE usa o gradiente de prótons para forçar o efluxo e transportar moléculas lipofílicas e anfifílicas para fora do ambiente celular. A família SMR é o menor sistema de efluxo, transporta fármacos catiônicos (como macrolídeos e tetraciclina) e o efluxo é realizado pela entrada ativa de próton na célula (PIDDOCK et al., 2006). A família MFS está presente largamente em bactérias Gram-negativas e gram-positivas e tem como substrato diversos metabólitos, tais como açúcares, ésteres de fosfato, intermediários do ciclo do ácido cítrico e xenobióticos. Utiliza também o transporte ativo de prótons para gerar o potencial de efluxo (DANG et al., 2010). A família MATE foi a última família de BEs descoberta e é caracterizada como geradora de resistência a múltiplos fármacos. Em bactérias, esta família transporta cátions, xenobióticos e antibióticos (aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tigeciclina) em troca do influxo de prótons (Na^+ e H^+) (BECKER et al., 2009).

Os transportadores ABC fazem parte da maior família de transportadores de membrana e estão presentes em todos os organismos vivos, desde bactérias até seres humanos. Os membros desta família são proteínas transmembrana capazes de transportar diversos substratos através da membrana celular, com gasto de ATP. Nas células saudáveis, os transportadores ABC têm diferentes funções, como transporte de sais biliares, colesterol, diferentes íons e ânions, porém, também estão relacionados com a resistência de células cancerígenas aos tratamentos quimioterápicos. Em micobactérias, esta BE está relacionada com a extrusão de fármacos anti-TB do ambiente intrabacilar (GLAVINAS et al., 2004; DEAN et al., 2005).

Tem sido demonstrada a existência de substâncias capazes de inibir as BEs *in vitro* em *Mtb*, fazendo com que as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de alguns

antimicobacterianos diminuem consideravelmente quando em combinação com esses inibidores (RODRIGUES et al., 2012; KUMAR et al., 2016). Algumas substâncias, já em uso na prática clínica para outros fins, tais como o verapamil (VP), reserpina, clorpromazina, tioridazina, carbonilcianeto *m*-clorofenil-hidrazona (CCCP) e omeprazol, são capazes de inibir mecanismos de efluxo em várias células eucarióticas e procarióticas. No entanto, na maioria das vezes, têm se mostrado ativos em concentrações mais elevadas do que as utilizadas clinicamente, com exceção do verapamil, o qual se destacou por atingir grandes concentrações nos pulmões em concentrações sistêmicas relativamente baixas, não acometendo significativamente outros alvos (ALMEIDA DA SILVA & PALOMINO, 2011; ADAMS et al., 2014).

Recentemente tem sido demonstrada a relação entre BEs e a capacidade de *Mtb* superar o estresse oxidativo no interior dos macrófagos. Adams e colaboradores (2011) demonstraram que genes que codificam para BEs (como Rv1258c), quando ativos, promovem a sobrevivência intramacrofágica de *Mtb*. Ao utilizar o VP, a tolerância aos principais fármacos anti-TB (INH e RIF) e o crescimento de *Mtb* e *Mycobacterium marinum* em macrófagos são reduzidos, promovendo a morte de ambos no ambiente macrofágico (SCHMALSTIEG et al., 2012; GUPTA et al., 2013; ADAMS et al., 2014).

1.7 CULTURA DE CÉLULAS

Uma das características do bacilo, na infecção por *Mtb*, é a sua multiplicação no interior de macrófagos. O microambiente interno de macrófagos representa um ambiente complexo e dinâmico que não pode ser facilmente simulado em estudos *in vitro* utilizando *Mtb*. Por conseguinte, vários modelos *ex-vivo* de infecção de macrófagos foram estabelecidos. Macrófagos murinos derivados de medula (BMDMs) provaram ser um sistema modelo de grande utilidade. Estes podem ser facilmente cultivados e multiplicam-se até atingir um grande número de células. Alternativamente, linhagens de células imortalizadas podem ser utilizadas para estudar interações de *Mtb*, incluindo macrófagos J774 e THP-1. Sendo assim, a infecção de células monocíticas THP-1, de linhagem leucêmica de humanos, tem sido amplamente utilizada como modelo de interação entre macrófago e *Mtb* (LUO et al., 2013; JORDAO et al., 2008; ADAMS et al., 2014).

Uma característica típica da TB, ao infectar macrófagos, é a formação de granulomas. Estudos prévios determinaram que a micobactéria multiplica-se livremente no ambiente macrofágico após fagocitose e ainda atrai macrófagos não infectados via ESX-1 (um sistema

complexo de secreção de proteínas) e locus RD1 (*region of difference 1* – responsável pela produção das citocinas dependente de caspase-1, IL-18 e IL-1 β) (VOLKMAN et al., 2010; WEISS & SCHAIBLE, 2015). O glicolípido de membrana micobacteriana TDM (Trealose-6,6-dimicolato) é o principal ativador da formação do granuloma no sentido de estimular a síntese de TNF- α , IL6 e C5 (NDLOVU & MARAKALALA, 2016).

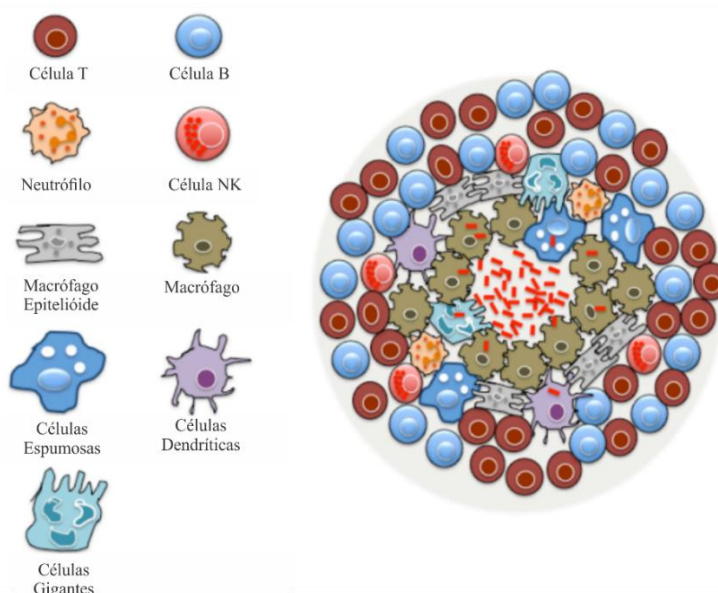


Figura 5: Estrutura básica de um granuloma
(Fonte: adaptado de NDLOVU & MARAKALALA, 2016)

No macrófago, *Mtb* é reconhecido por receptores presentes na membrana plasmática do macrófago, dentre eles o TLR2. Em seguida, é internalizado pela invaginação da membrana plasmática em um fagossomo, o que segue fundindo-se com lisossomo. No ambiente do fagolisossomo, ocorrem vários fenômenos, que vão desde a inibição de vias de expressão gênica do macrófago, pela secreção de intermediários por *Mtb*, até a ativação de vias de peroxidases e hidrolases, com produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (NDLOVU & MARAKALALA, 2016; ADAMS et al., 2014).

Neste sentido, para que haja completa eficácia e morte do bacilo internalizado, é preciso o bombeamento de prótons por enzimas localizadas na membrana do fagolisossomo para a ativação das hidrolases e formação de espécies reativas de oxigênio. Como o bacilo tem capacidade de sobreviver em ambientes com pH 5,0 e até mesmo secretar proteínas de virulência, as bombas de potássio ativadas por cálcio e as próprias bombas de cálcio presente na membrana precisam trabalhar de forma mais eficaz. É neste ponto que a utilização de VP auxilia na terapia. Na presença deste inibidor, as bombas de potássio e de cálcio são bloqueadas e a concentração de potássio é aumentada dentro do fagolisossomo (por difusão),

o que faz com que a ATPase de próton (um cotransportador antiporte de K^+ e H^+) seja ativada, aumentando a concentração de H^+ dentro do fagolisossomo e conseqüentemente melhorando a resposta contra a micobactéria (VIVEIROS et al., 2012; FORRELAD et al., 2013).

Atualmente, um dos modelos mais utilizados é a infecção de células THP-1 por *Mtb* para avaliação da resistência bacilar após sua exposição ao ambiente macrofágico. Este tipo de estudo também visa a análise de expressão gênica de BEs entre outros mecanismos que possam induzir resistência bacilar e auxiliar a compreender a resposta imune desencadeada durante os processos de infecção e doença causadas por *Mtb* (ZHANG & YEW, 2009; ADAMS et al., 2014).

1.8 JUSTIFICATIVA

A investigação de novos mecanismos alternativos de resistência em isolados de *Mtb* e a busca por terapias mais seguras e eficazes, principalmente nos casos de TB-MDR e TB-XDR, estão se tornando cada vez mais necessárias.

Quando há falha no tratamento da TB com os fármacos de primeira linha, os de segunda linha (amicacina, capreomicina, fluoroquinolonas, etionamida, kanamicina entre outros) se tornam a única opção para realizar o tratamento do paciente. Porém, estes fármacos apresentam baixa eficácia, requerem um período maior de administração (18-24 meses), apresentam maior custo e vários efeitos adversos com baixa taxa de cura. Por isso, o estudo de inibidores de BEs como o VP, associado à fármacos pode auxiliar na terapia anti-TB de forma que a terapia se torne mais eficaz e menos agressiva.

O sequenciamento do genoma de *Mtb* proporcionou uma riqueza de informações, que podem ser usadas no desenvolvimento de estratégias moleculares para compreender melhor a fisiopatologia do bacilo. Entre estas, faz-se necessário conhecer o papel que as BEs desempenham nos mecanismos de resistência do bacilo. Hoje é reconhecido que as BEs influenciam diretamente na concentração de fármacos, como a rifampicina, no interior do bacilo, o que resulta na diminuição da eficácia do fármaco.

Com base nesses conhecimentos, poderão ser desenvolvidos novos esquemas terapêuticos com atividade direcionada para burlar os mecanismos de resistência desenvolvido pelo bacilo. Adicionalmente, estes conhecimentos poderão direcionar as pesquisas para novos fármacos com menor toxicidade para o paciente, possíveis sinergismos com os já existentes ou mesmo diminuir o tempo de tratamento da TB. Estes fatores associados podem ser vantajosos por levar a uma melhor adesão do paciente ao tratamento e conseqüentemente à cura.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo geral:

Avaliar a ação isolada e combinada do inibidor de bombas de efluxo verapamil com rifampicina após a exposição de *M. tuberculosis*, em macrófagos THP-1.

1.9.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a expressão gênica das principais bombas de efluxo por Real time-PCR (qPCR), após exposição de *Mtb* à rifampicina e verapamil, isolada e em combinação, em ambiente intramacrofágico.

- Comparar a expressão gênica de bombas de efluxo após exposição de *Mtb* ao ambiente intramacrofágico e à RIF e VP, de forma isolada e combinada;

- Comparar a expressão gênica de bombas de efluxo após exposição ao ambiente *in vitro* intramacrofágico e *in vitro* na ausência do macrófago.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA DA SILVA, P. E. & PALOMINO, J. C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 66, n. 7, p. 1417-30, 2011.
- ADAMS, K.N. et al. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. **Cell**, v. 145, p. 39–53, 2011.
- ADAMS, K.N.; SZUMOWSKI, J.D.; RAMAKRISHNAN, L. Verapamil, and Its Metabolite Norverapamil, Inhibit Macrophage-induced, Bacterial Efflux Pump-mediated Tolerance to Multiple Anti-tubercular Drugs. **J. Infect. Dis.**,v. 210, n. 3, p.456-66, 2014.
- ARBEX, M.A.; SIQUEIRA, H.R.; D'AMBROSIO, L.; MIGLIORI, G.B. O desafio do tratamento da tuberculose extensivamente resistente em um hospital de referência no estado de São Paulo: um relato de três casos. **J. Bras. Pneumol.**, v.41, n.6, p. 554-559, 2015.
- BARRY, C. E.; CRICK, D. C. MCNEIL, M. R. Targeting the formation of the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Disord. Drug Targets**,v.7, p.182-202, 2007.
- BECKER, M.I. et al. Genetic variation in the multidrug ant toxin extrusion 1 transporter protein influences the glucose-lowering effect of metformin in patients with diabetes: a preliminary study. **Diabetes**, v.58, p.1718-1722, 2009.
- BORITSCH, E.C. & BROSCH, R. Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: New insights into Pathogenicity and Drug Resistance. **Microbiol. Spectr**, v. 4, n. 5, 2016.
- CALEFFI-FERRACIOLI, K.R. et al. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. **Tuberculosis**, v. 97, p.65-72, 2016.
- DANG, S. et al. Structure of a fucose transporter in an out-ward open conformation. **Nature**, v.467. p.734-738, 2010.

DANILCHANKA, O.; PAVLENOK, M.; NIEDERWEIS, M. Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.52, n. 9, p.3127–3134, 2008.

DEAN, M. The genetics of ATP-binding Cassette Transporter. **Methods Enzymol.**, v.400, p.409-429, 2005.

DELA CRUZ, C.S. et al. Treatment of Drug Susceptible Tuberculosis. **Ann. Am. Thorac. Soc.**, v.13, n.11, p. 2060-2063, 2016.

FENTON, M.J. & VERMEULEN, M.W. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. **Infection and immunity**, v.64, n.3, p. 683–690, 1996.

FERRI, A.O. et al. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. **Liberato**, v. 15, n. 24, p. 105-212, 2014.

FLOURNOY, D. & TWILLEY, J. Modified Middlebrook 7H9 broth for the rapid detection of mycobacteria. **Clin. Lab. Sci.**, v.14, n.2, p.85-88, 2001.

FLYNN J.L.; CHAN J. Immunology of Tuberculosis. **Annual Review Immunology**, v.9, p.93-129, 2001.

FORRELAD, M.A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p.3-66, 2013.

GLAVINAS, H. et al. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. **Curr. Drug Deliv.**, v. 1, n. 1, p.27-42, 2004.

GREEN, A.M.; DIFAZIO, R.; FLYNN, J.L. IFN- γ from CD4 T-cells is essential for host survival and enhances CD8 T-cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Immunol.** v. 190, p.270-277, 2013.

GROSSET, J. *Mycobacterium tuberculosis* in the Extracellular Compartment: an Underestimated Adversary. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.47, n.3, p. 833–836, 2003.

GUPTA, S. et al. Acceleration of Tuberculosis Treatment by Adjunctive Therapy with Verapamil as a Efflux Pump Inhibitor. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 188, n. 5, p.600–607, 2013.

HEENSKERK, D.; CAWS, M.; MARAIS, B.; FARRAR, J. Tuberculosis in adults and children. **London: Springer**, Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK344402> (acessado em 08/03/2017).

JACKSON, M.; MCNEIL, M. R.; AND BRENNAN, P. J. Progress in targeting cell envelope biogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Future Microbiol.**, v.8, p.855-875, 2013.

JORDAO, L.; BLECK, C.K.; MAYORGA, L.; GRIFFITHS, G.; ANES, E. On the killing of mycobacteria by macrophages. **Cell Microbiol.**, v.10, n.2, p. 529–548, 2008.

KORB, V.C.; CHUTURGOON, A.A.; MOODLEY, D. *Mycobacterium tuberculosis*: Manipulator of Protective Immunity. **Int. J. Mol. Sci.**, v.17, n.3, p.131, 2016.

LUO, X. et al. *Zanthoxylum capense* constituents with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro* and *ex vivo* within human macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.146, p.417-422, 2013.

MEENA, L.S.& RAJNI. Survival Mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. **FEBS J.**, v.277, n. 11, p.2416-27, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil, 2011. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/30/MANUAL-DE-RECOMENDACOES-PARA-O-CONTROLE-DA-TUBERCULOSE-NO-BRASIL.pdf> (Acessado em 04/07/2016).

NARDELL, E. Pathogenesis of tuberculosis. In L. B. Reichman and E. Hirschfield (ed.), **Lung biology in health and disease**. Marcel Dekker, Inc., New York p. 103–123, 1993.

NDLOVU, H. & MARAKALALA, M.J. Granulomas and Inflammation: Host-Directed Therapies for Tuberculosis. **Front Immunol.**, v.7, p.434, 2016.

NGUYEN, L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. **Arch. Toxicol.** v. 90, n. 7, p. 1585-604, 2016.

PANDEY, A.K. & SASSETTI, C.M. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.105, p.4376-4380, 2008.

PARSONS, S.D. et al. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. **Emerg. Infect. Dis.**, v.19, n.12, p.2004-7, 2013.

PIDDOK, L.J. Multidrug-resistance efflux pumps – nor just for resistance. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.4, p. 629-636, 2006.

PFYFFER, G. et al. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. **Manual of Clinical Microbiology**, 11^a ed., ASM Press, Washington, DC, p.536-569, 2015.

RODRIGUES, L. et al. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Infect. Genet. Evol.**, v.12, p.695-700, 2012.

SCHMALSTIEG, A.M. et al. The antibiotic resistance arrow of time: efflux pump induction is a general first step in the evolution of mycobacterial drug resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 56, p.4806–4815, 2012.

UNISSA, A.N.; SUBBIAN, S.; HANNA, L.E.; SELVAKUMAR, N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Genet. Evol.**, v. 45, p.474-492, 2016.

VELAYATI, A.A. & FARNIA, P. Morphological characterization of *Mycobacterium tuberculosis*. INTECH Open access Publisher, 2012. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/28419.pdf> (acessado em 29/08/2016).

VITTOR, A.Y.; GARLAND, J.M.; GILMAN, R.H. Molecular Diagnosis of TB in the HIV Positive Population. **Annals of Global Health**, v.80, n.6, p.476-485, 2015.

VIVEIROS, M. et al. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, v. 10, n. 9, p. 983–998, 2012.

VOLKMAN, H.E. et al., Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. **Science**, v.327, p.466–9, 2010.

WEISS, E. & SCHAIBLE, U.E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunol. Rev.**, v. 264, n.1, p.182-203, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1> (acessado em 08/11/2016).

YADAV, R. et al. Reduction of minimum inhibitory concentrations in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the presence of efflux pump inhibitors. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, v. 5, p.88-89, 2016.

YOUNG, D. B., PERKINS, M. D., DUNCAN, K. & BARRY, C. E. 3rd Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 1255–1265, 2008.

ZHANG, Y.;YEW, W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v. 13, n. 11, p.1320–1330, 2009.

CAPÍTULO II

Manuscript: Gene Expression evaluation of efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* after exposure to Rifampicin and Verapamil in the intramacrophagic environment

Gene Expression evaluation of efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* after exposure to Rifampicin and Verapamil in intramacrophagic environment

Pedro Henrique Canezin^a, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli^b, Regiane Bertin de Lima Scodro^b, Vera Lúcia Dias Siqueira^b, Fernando Rogério Pavan^c, Isabella Letícia Esteves Barros^a, Rosilene Fressatti Cardoso^b

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; ^b Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; ^c Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo.

Corresponding author. Laboratório de Bacteriologia Médica, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil.

Tel.: +55 44 3011 5375; fax: +55 44 3011 4797.

E-mail address: rfressatticardoso@gmail.com (CARDOSO, R.F.).

SUMMARY

The aim of this work was evaluate the expression of EPs in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) after exposure to macrophage environment in the presence of rifampicin (RIF) and verapamil (VP) alone and in combination. The THP-1 cells were infected with *Mtb* H₃₇Rv and exposed to RIF and VP alone and RIF+VP at 24 h and 72 h. After de RNA extraction, the qPCR was performed using SYBR green PCR master mix in StepOne™ Real-Time PCR System. At 24 h of exposition to the drugs, was observed an overexpression of the majory EPs in the exposition to RIF and VP alone and at RIF+VP combination. However, at 72 h was observed a downexpression of the majory EPs, including of the RIF+VP combination. An comparative analysis between RIF alone and RIF+VP at 72 h showed that EPs expression was downexpressed, indicating a possible inhibition of EP expression. This study showed that RIF+VP decrease the expression of the most EPs in *Mtb* inside the macrophage environment. Therefore, this combination would indoubtely aid in therapy against MDR-TB.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, THP-1, Verapamil, Rifampicin, Efflux pumps, Gene expression.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) complex, being responsible for 1.4 million deaths in the world population in 2015, with an estimative 10.4 million new cases according to the World Health Organization (WHO). In 2015, there were an estimated 480.000 new cases of multidrug-resistant TB (MDR-TB) and an additional 100.000 people with rifampicin-resistant TB (RR-TB) who were also newly eligible for MDR-TB treatment [1].

The currently treatment of TB consists of two months by an initial intensive phase of INH, RIF, ethambutol (EMB) and pyrazinamide (PZA) followed by four months with INH and RIF. For MDR-TB cases, it was proposed a treatment consisting of other drugs as streptomycin, terizidone and a quinolone (levofloxacin or ofloxacin) [2]. Patients with extensively drug-resistant TB (XDR-TB), which is those also resistant to any fluoroquinolone and an injectable second-line drug, should be conducted to a referral center and using individualized regimens with reserved drugs, which include capreomycin, moxifloxacin, para-aminosalicylic acid and ethionamide. Indeed, few drugs are available to treat drug-resistant TB, especially XDR-TB [3,4].

The MDR and XDR *Mtb* phenotype is caused by sequential mutations in specific chromosomal genes, which are related to the mechanism of RIF and INH actions and other drugs. However, the genetic basis of these two and other anti-TB drugs resistance are not fully known. In some resistant bacilli, the classical mutations related to resistance to specific drugs are not present, suggesting other resistance mechanisms are responsible for the phenotype [5].

Sequence analysis of the *Mtb* genome showed multiple Efflux Pumps (EPs) [6,7], which encode for membrane proteins that are capable of actively transporting a broad range of compounds, including drugs. The actions of these EPs have been linked with efflux of anti-TB drugs such as INH, RIF and EMB [8,9]. Among the leading families of EPs, five are the most often cited in mycobacteria: RND family (resistance nodulation division), SMR (small drug multiresistance), MFS (major facilitator superfamily), MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) and ABC family (ATP binding cassette) [10].

Efflux Pump Inhibitors (EPIs) have been tested in combinations with anti-TB drugs to increase the effectiveness of anti-TB drugs by the inhibition of their efflux from intracellular environment. In this sense, antagonists of transmembrane electrochemical potential and calcium channel as verapamil (VP) has been tested *in vitro* and showed to be a good synergistic therapy candidates to treat TB [9, 11].

A relationship between EPs and the ability of *Mtb* to overcome oxidative stress within macrophages has been reported [12] and VP, as a EPI, can reduce the tolerance to anti-TB drugs (INH and RIF) and then promote the death of mycobacteria in the macrophagic environment, because it allows the retention of the drug for longer in the bacillus [6, 11, 12]. Macrophage model attempts to mimic the conditions observed in humans at a cellular level and has been demonstrated to be useful for studying the effect of drug combinations against *Mtb*. This model provides more information than *in vitro* models based on cultures, such as drug penetration and the interaction between drugs inside macrophages [13]. In this sense, this study demonstrate an idea of how the gene expression of EPs in *Mtb* occurs when exposed to the macrophagic environment in different times, in such a way that few works report this condition. Finally, *ex-vivo* studies can help and better understand mechanisms of resistance and immune response in infections caused by *Mtb*.

2. Material and Methods

2.1 Mycobacterium tuberculosis

Mtb H₃₇Rv (ATCC 27294) was grown at 35-37 °C for 15 days in Middlebrook 7H9 medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 10% (v/v) oleic acid, bovine serum albumin, dextrose and catalase enrichment (OADC, BBL/Becton e Dickinson, Sparks, MD, USA), added of 0.2 % glycerol (v/v) and 0.025 % Tween 80 (v/v).

2.2 Minimum inhibitory concentration (MIC)

The MICs for RIF and VP alone were determined by the Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) and the interactions between RIF+VP were evaluated using the Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay (REDCA), in previous studies by Caleffi-Ferracioli et al. [11].

2.3 THP-1 Cell Culture

Human acute monocytic leukaemia cell line THP-1 (ATCC TIB-202) was maintained in DMEM-6429 medium (Sigma, St Louis, MO, USA) containing 10 % (v/v) fetal bovine

serum (FBS) and 100 U/ml penicillin/streptomycin mixture (Sigma, St Louis, MO, USA). The cells were incubated at 37 °C in 5 % CO₂. The number of THP-1 cells was calculated by trypan blue (Sigma, St Louis, MO, USA) exclusion. When exponential cell growth was achieved, a concentration of 5x10⁵ cells/mL was seeded in 24-well plates and incubated until reaching macrophage differentiation by adding 100 nM of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Sigma, St Louis, MO, USA) for 12 h at 37 °C in 5 % CO₂. After, the supernatant was discarded and PMA was added again and the culture was incubated for an additional 4 day in the same temperature and atmosphere conditions. After the 4-day growth and differentiation, changes in morphology were checked through microscopy. Afterwards, macrophages were washed once with supplemented DMEM, adding then 1 mL of supplemented DMEM with 10% heat-inactivated FBS without the penicillin/streptomycin mixture.

2.4 Infection of THP-1 cells by *Mycobacterium tuberculosis*

The *Mtb* H₃₇Rv growth was centrifuged at 2880 g for 10 min and the bacterial pellet was resuspended in DMEM without antibiotics. For avoiding bacterial clumps, the suspension was shaken for 45 s with beads. Single cell suspension was checked by Ziehl-Neelsen staining.

The bacterial concentration was adjusted by optical density (OD) = 0.8-1.0 in spectrophotometer Hitachi model U-1100 (Hitachi, Tokyo), which corresponds to the concentration of 10⁷ CFU/ml. The sample was diluted until obtain the concentration of 5 x 10⁵ CFU/mL.

The THP-1 macrophages were infected with *Mtb* by a multiplicity of infection (MOI) 1:1 and incubated for 3 h at 37 °C in 5 % CO₂. After, macrophages were washed three times with PBS to withdraw the excess of bacteria. Two wells containing the infected THP-1 macrophages were lysed using Triton 0,1 % (Sigma, St Louis, MO, USA) and seeded on OADC-supplemented Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for CFU/mL determination. The 24-well plate was incubated with DMEM medium containing 10% (v/v) FBS without antibiotics at 37 °C in 5 % CO₂ for 72 h to allow *Mtb* to grow inside the macrophages.

2.5 Exposition to drugs

After this previous incubation, for *Mtb* to grow inside the macrophages (corresponding to Day 0), the wells were washed with PBS and macrophages lyses were performed by adding

0.1 % Tryton (Sigma, St Louis, MO, USA) with posterior seed on Middlebrook 7H11. In parallel, the isolated and in combination drugs were added at ¼ MIC for VP (31,25 µg/mL) and ½ MIC for RIF (0,0015 µg/mL) [11, 14], in a 24-well plate and incubated at 24 and 72 h. After, the wells were washed three times with PBS (pH 7.4) and two of them were lysed with 0.1 % Triton for seed on 7H11. All experiments were carried out three times in different days. The lysed from the other wells were used at gene expression analysis.

2.6 Gene Expression Study

Total RNA was extracted in two time-independent experiments and purified using RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen Biotechnology, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Quantification assessment was performed with a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The synthesis of the first cDNA tape was carried out by random primers total RNA using the Pharmacia cDNA synthesis TimerSaver Kit (Qiagen) according to changes made by Bowler et al. [15].

qPCR was performed using SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in StepOne™ Real-Time PCR System. The EPs specific primers (Promega, Madison, WI, USA) are listed in Table 1.

Table 1

Primers used in qPCR for gene expression of efflux pumps determination in *Mycobacterium tuberculosis*.

Efflux Pump Gene	Transporter family	Sequences (5' - 3')	Amplicon size (bp)	Reference
Rv2942	RND	Fw - TACCCAAGCTGGAAACAA Rv - CCGTCAGAATAGAGGAACAG	214	[6]
Rv3065	SMR	Fw - AACCAGCCTGCTCAAAAG Rv - CAACCACCTTCATCACAGA	221	[6]
Rv2846	MFS	Fw - ATGGTAATGCCTGACATCC Rv - CTACGGGAAACCAACAAAG	131	[6]
Rv1410c	MFS	Fw - AGTGGGAAATAAGCCAGTAA Rv - TGGTTGATGTCGAGCTGT	198	[6]
Rv1258c	MFS	Fw - AGTTATAGATCGGCTGGATG Rv - GTGCTGTTCCCGAAATAC	268	[6]

Rv2459	MFS	Fw - CATCTTCATGGTGTGTT CGT G Rv - CGGTAGCACACAGACAATAG	232	[16]
Rv1456c	ABC	Fw- GAGTCGCACCAGAATCGC Rv- TCGCTGTTGGTTGCCTAC	90	[7]
Rv1457c	ABC	Fw- GTAGCACCGAGTCGTTTG Rv- ATCTCCACCGCATTACCC	80	[7]
Rv1458c	ABC	Fw- CAGTCCAAGTACCTCAATG Rv- GCGATACGGGTCAATAAC	163	[7]
Rv1218c	ABC	Fw- CCGCAAGGCGTCTAGTGAA Rv- TGGACCCGTTGATGGAAAA	173	[17]
Rv1217c	ABC	Fw- CGGTGAGGTTGGCGTAG Rv- CGGTCCGAATCTGGAAA	150	[17]
Rv1819c	ABC	Fw- CGGTGATTTCTTTCACAGC Rv- CCGACAGATTCCATCCATT	351	[17]
16s RNA		Fw- CAAGGCTAAAACCTCAAAGGA Rv- GGACTTAACCCAACATCTCA	197	[6]

Fw, Forward. Rv, Reverse. RND (*resistence nodulation division*). SMR (*small drug multirresistence*). MFS (*major facilitator supefamily*). ABC (*ATP binding cassete*).

Melting curves were assessed, and samples were run in triplicate. The 16S RNA (*rrs*) gene was used to normalize all reactions. Negative control was performed in all experiments. A reference assay was conducted in the absence of drugs. The relative quantification of target gene expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [18]. The data analysis was performed using a oneway test with BIOESTAT 5.0 software [19], followed by the Tukey *post hoc* test ($p < 0.05$ were considered significant). All the experiment was designed in the figure 1.

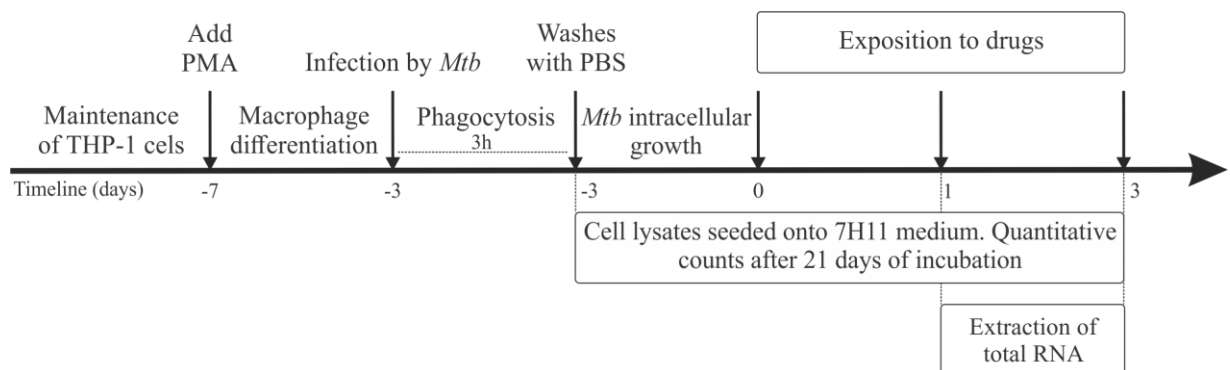


Figure 1. Experiment design of antimicrobial drug activity in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophage model. Each drug (RIF, VP and combination of both drugs) condition was tested in triplicate. Drug-free infected

macrophages were added as a control of bacterial growth per triplicate for each time point. PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate. PBS, Phosphate buffered saline powder, pH 7.4.

3. Results

To determine the *Mtb* survival, in the infected macrophages at different times, the MOI 1:1 was performed for the two drugs alone and the combination studied. In the Figure 2 we can observe that at the infection time, the *Mtb* cell counting in Middlebrook 7H11 was approximately 6.0×10^5 of alive bacilli. The control of the number of bacteria that effectively infected the macrophages was carried out, in order to assure the MOI for gene expression assays (MOI 1:1) [20].

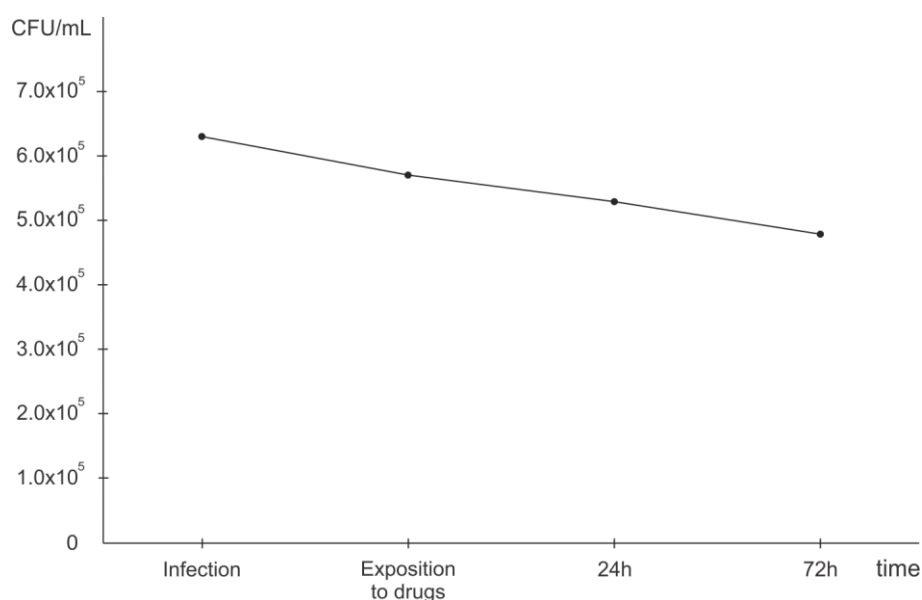


Figure 2. Unit colony forming (UFC) of *Mycobacterium tuberculosis* after infection of THP-1 cells and after 24 h and 72 h of exposition to drugs.

After 24 h of drug exposition (figure 3A), an increase in the expression of 11 EPs after exposure to RIF alone was observed, except for Rv1258c (MFS family) and Rv2942 (RND family), but without statistically significant results when compared to the control. For VP alone, an increase in the gene expression of the genes tested was also observed, except for Rv1258c, Rv2459 and Rv1217c (MFS, MFS and ABC family, respectively). For the combination of RIF and VP, the majority (6/11 - 54.5%) of the genes showed a drop in gene expression compared to control. However, in genes Rv1456c, Rv3065, Rv1217c and Rv2459 (ABC, SMR, ABC and MFS family, respectively) a significant increase in gene expression ($p < 0.01$ for Rv1456c and $p < 0.05$ for Rv3065, Rv1217c and Rv2459) was detected. The

RIF+VP combination presented lower gene expression when compared to RIF alone in all evaluated genes.

In the 72 h time (Figure 3B), all genes related to the RIF isolated exposure showed an overexpression, except Rv1457c (ABC family). For the isolated VP, a downexpression was observed compared to the control in most of the genes (except Rv1456c, Rv2459 and Rv1217c). Finally, in the combination of RIF+VP, a statistically significant overexpression ($p < 0.01$) of the Rv1218c, Rv1457c and Rv1819c genes (ABC family) was observed in relation to the control. In the other genes, the reduction of the gene expression was observed compared to RIF alone.

When we compare the 24 h and 72 h times, it was analyzed that, in general, there was overexpression of most EPs when exposed to RIF alone. Exposure to VP alone, in general, inhibited gene expression over time. When the combination of RIF and VP was verified, a reduction of the gene expression was observed with respect to the RIF alone (except in genes Rv1218c, Rv1457c and Rv1819c at 72 h). Finally, no gene expression of the Rv2942 gene (RND family) was detected at the times studied.

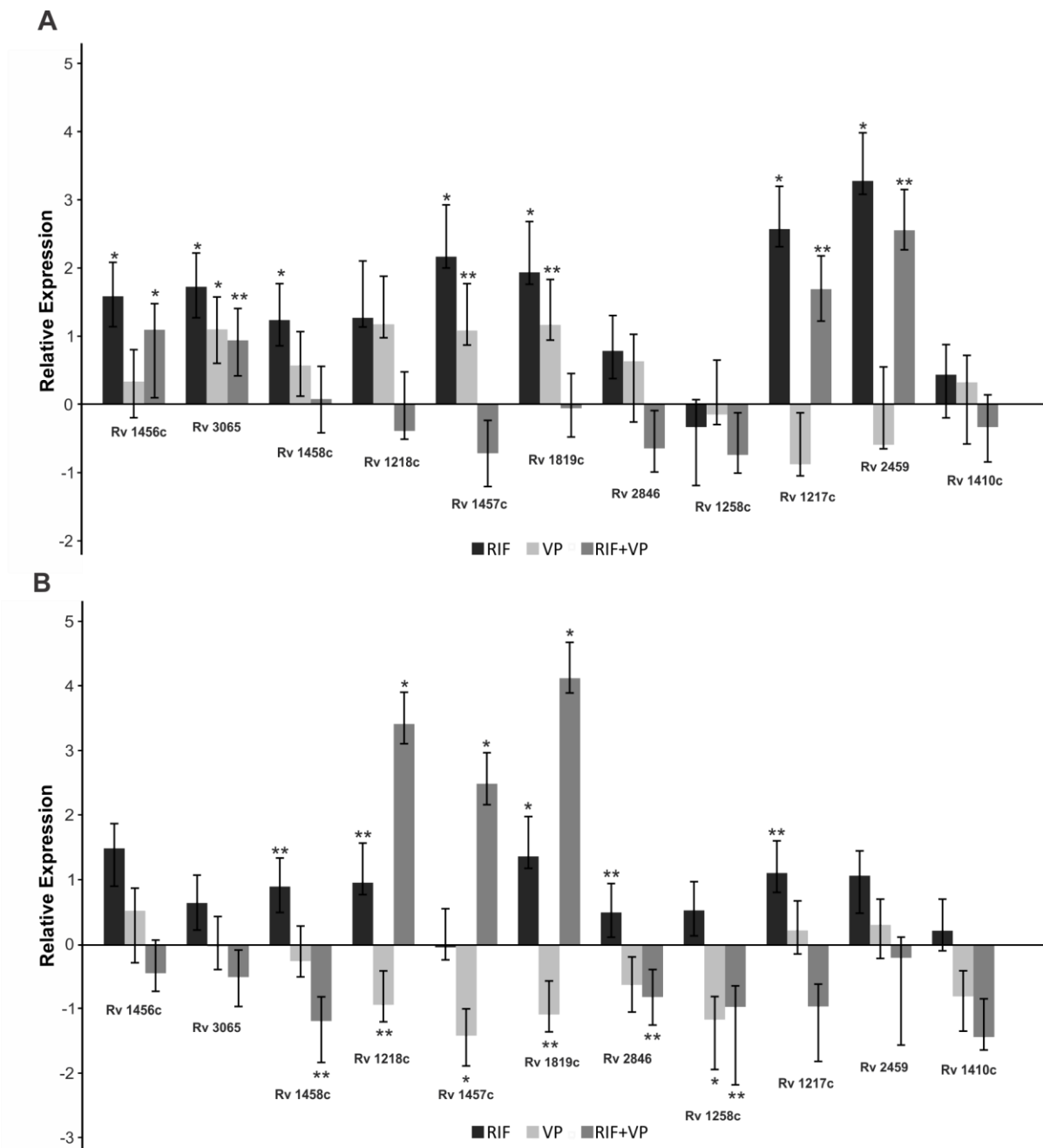


Figure 3. Relative differential expression of 11 efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* assessed by qPCR after 24 h (A) and 72 h (B) of exposure to ½ MIC rifampicin (0,0015 µg/mL), ¼ MIC verapamil (31,25 µg/mL), and RIF+VP combination in logarithmic scale. The error bars indicate SD. The results were normalized to 16s RNA and the relative expression calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *p < 0.01, **p < 0.05 compared with *Mtb* control growth in the absence of the drugs.

4. Discussion

Research into alternative mechanisms of drug resistance in *Mtb*, as well as the search for drugs that overcome these mechanisms is extremely necessary to find safer and effective

therapies against TB. Studies to determine the action and synergism of EPIs with INH, RIF and others drugs have already been performed in *Mtb* [11, 16, 17].

Recently we reported the *in vitro* study of differentially expressed EPs genes in *Mtb* exposed to RIF+VP combination, and it was observed downexpression of EPs, suggesting an inhibitory activity [11, 21]. This work motivated us to conduct further investigations on the macrophage environment.

It is clear some pathways follow by *Mtb* throughout the process from infection to the disease. Once inside the cell host, the bacillus faces the most varied adversities, such as nutritional deficiency, acidity, hypoxia, environments with oxidative stress among others that will certainly influence the result to develop TB. In the same way, different alterations undergone by the bacillus, after a stress, can bring different consequences to it, mainly with respect to its susceptibility for anti-TB drugs. In this sense, our study has the differential by the experimental procedure in EPs expression, was carried out in *Mtb* exposed to the RIF, VP and the RIF+VP combination into the macrophagic environment and compared with previous *in vitro* study using the same EPs.

The number of CFU/mL verified in 7H11 culture (figure 2) was consistent with the MOI used for gene expression studies [20]. We analysed if there would be multiplication or death of the phagocized bacillus, but our study showed that at the drugs exposition times, the number of viable bacilli had a non-significant decrease (24 h and 72 h of drugs exposure).

The 12 EPs genes from the ABC, MFS, RND, and SMR families, which have been associated with resistance to RIF and other drugs, were chosen to compare de EPs expression *in vitro* in *Mtb*, previously studied by Caleffi-Ferracioli et al. [11], and compared with the present intramacrophagic study. At 24 h of RIF exposure, most of the *Mtb* EPs were overexpressed, except the Rv1258c (MFS superfamily), which was downexpressed at intramacrophagic *in vitro* study. The *in vitro* study shows a very different EPs expression pattern by the bacillus exposed to RIF alone. In the study performed by Caleffi-Ferracioli et al. [11], seven EPs (Rv1456c, Rv3065, Rv1458c, Rv1457c, Rv2846, Rv1258c and Rv1410c) were downexpressed at 16 h of RIF alone exposure. There was only the Rv1258c that was downexpressed in the two different conditions, *in vitro* and intramacrophagic studies. Jiang et al. [17] reported an overexpression of Rv1258c when *Mtb* H₃₇Rv was exposed to RIF alone. One possible explanation for the difference may be related to the exposure time, which were not specified by the author.

The VP exposure undergone to overexpression of eight EPs and downexpression of three, Rv1258c, Rv1217c and Rv2459, which were from the MFS, ABC and MFS families,

respectively. Different from our *in vitro* intramacrophagic study, the *in vitro* assay [11], which the *Mtb* was exposed to another environment, showed downexpression of all EPs evaluated.

The RIF+VP combination had variable EPs pattern expression between the two conditions of *Mtb* growth (*in vitro* and intramacrophagic *in vitro*). The only similarity in the EPs expression was observed with three EPs, Rv1217c, Rv2459 and Rv1410c. The Rv1217c (ABC family) and Rv2459 (MFS superfamily) were statistically overexpressed and the Rv1410c downexpressed in both studies.

The study carried out at 72 h of RIF exposure showed that the bacillus in the macrophage environment had upexpression of ten EPs (Figure 3B). However, five EPs (four of them are ABC family) showed to have a statistically significant increase in their expression (Rv1458c, Rv1218c, Rv1819c, Rv2846 and Rv1217c). In previous studies, carried out *in vitro*, overexpressions of the EPs Rv1258c [11, 17], Rv1457c [7], Rv1819c [22,11], Rv 2846 [11], Rv1258c [17,11], Rv1456c [11], Rv3065 [11], Rv1458c [7, 11], Rv2459 [11], Rv1410c [23,11] and Rv1217c [24,11] were also observed in the bacillus exposed to RIF alone.

RIF goes into *Mtb* and macrophages cells freely [25] including into the phagolysosome binding to the bacterial DNA-dependent RNA polymerase, then blocking the protein synthesis and leading the death of the bacillus. We could expect a low bacillus EPs expression in the macrophage environment, compared to the *in vitro* studies, once the bacillus is under varied adversities imposed by the macrophages such as exposition to reactive oxidative species, acidity, protective cytokines and others [26]. This is clear comparing the EPs expression at 24 h and 72 h, which shows a decrease of the expression levels with the time of RIF exposure. The same understanding may be realized with the low *Mtb* EPs expression inside of macrophage compared to *in vitro* study performed by Caleffi-Ferracioli et al., [11] and others [27, 28]. The VP alone exposure induced the bacillus to a down EPs expression at 72 h compared to 24 h.

At 72 h, the gene expression evaluation of RIF+VP combination showed downexpression of the most EPs, with the exception of Rv1218c, Rv1457c and Rv1819c. Notably, this result was different from that found by Caleffi-Ferracioli et al. [11], which showed an overexpression for almost all EPs, except for Rv1819c.

It is noteworthy that in the 72 h there was downexpression of majority of the EPs when compared RIF+VP with RIF alone, including statistically significant results for Rv2846, Rv1258c and Rv1458c. However, the EPs Rv1218c, Rv1457c and Rv1819c (all of ABC family) were overexpressed with statistically significant results. *In vitro* study [11] showed

the same pattern of gene expression for the majority, except for Rv1218c, Rv1457c, Rv1819c and Rv2846.

When we compare the EPs expression at 24 h and 72 h relative to the RIF+VP combination of drugs exposure, it was observed that most EPs were downexpressed at 72 h when compared to 24 h. However, the EPs Rv1218c, Rv1457c and Rv1819c were overexpressed. The *in vitro* study showed that six EPs were overexpressed over the time (Rv3065, Rv1458c, Rv 2846, Rv1258c, Rv2942 and Rv1410), none of them related with the overexpressed genes of this study, what indicate a difference between *in vitro* and intramacrophagic studies.

As previously described, VP is a pump inhibitor capable of blocking EPs in *Mtb* through passive transport across the macrophage membrane [29]. The VP acts by two pathways that directly affect the survival of *Mtb* within the macrophage. The first one involves the inhibition of Ca²⁺ pumps present in the phagolysosome membrane, which has the consequence of increasing the acidity and the better activity of the hydrolases located inside the phagolysosome, which results in the mycobacteria death [27]. The second pathway is related to the inhibition of EPs in the bacillus membrane, which increases the concentration of RIF inside the bacillus and improves the efficacy of the drug [28].

It is expected that in the RIF+VP combination, the bacillus is at death risk, which would result in an increase of EPs gene expression that was observed with the Rv1218c, Rv1457c and Rv1819c at 72 h of exposure. However, it appears that RIF+VP combination was effective to a point of causing downexpression of most the studied EPs compared with RIF alone, which was also observed *in vitro* by Caleffi-Ferracioli et al. [11]. Finally, Ramon-Garcia et al. [23], which studied the effect of other EPs in *Mycobacterium fortuitum*, shares the idea that this kind of study would clarify the possibility of reducing the resistance mediated by EPs in resistant *Mtb*.

5. Conclusion

This study showed that the RIF+VP combination decrease the expression of most EPs in *Mtb* inside the macrophagic environment. Therefore, these combination would undoubtedly aid in therapy against *Mtb* MDR. In this sense, additional studies as *in vivo* assay could highlight the observed action of the RIF+VP combination against the bacillus in TB therapy.

Acknowledgements

We would like to thank Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial assistance.

Funding

This work was supported by Fundação Araucária.

Competing interests

None declared.

Ethical approval

Not required.

References

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2016. Geneva: World Heal. Organ. 2016. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

- [2] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil, 2011. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/30/MANUAL-DE-RECOMENDACOES-PARA-O-CONTROLE-DA-TUBERCULOSE-NO-BRASIL.pdf>.

- [3] Arbex MA, Siqueira HR, D’ambrosio L, Migliori GB. O desafio do tratamento da tuberculose extensivamente resistente em um hospital de referência no estado de São Paulo: um relato de três casos. *J Bras Pneumol* 2015; **41**: 554-559.

- [4] Dela Cruz CS et al. Treatment of Drug Susceptible Tuberculosis. *Ann A Thorac Soc* 2016; **13**: 2060-2063.

- [5] da Silva PE, Von Groll A, Martin A, Palomino JC. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; **63**: 1-9.
- [6] Rodrigues L, Machado D, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol* 2012; **12**: 695-700.
- [7] 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 Microbiol (Praha)* 2011; **56**: 549-53.
- [8] Yadav R, Dhatwalia SK, Mewara A, Behera D, Sethi S. Reduction of minimum inhibitory concentrations in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the presence of efflux pump inhibitors. *J Glob Antimicrob Resist* 2016; **5**: 88-89.
- [9] Adams KN, Szumowski JD, Ramakrishnan L. Verapamil, and its metabolite norverapamil, inhibit macrophage-induced, bacterial efflux pump-mediated tolerance to multiple anti-tubercular drugs. *J Infect Dis* 2014; **3**: 456-66.
- [10] PIDDOK LJ. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 2016; **4**: 629-636.
- [11] Caleffi-Ferracioli K.R et al. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. *Tuberculosis* 2016; **97**: 65-72.
- [12] ADAMS KN et al. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell* 2011; **145**: 39–53.
- [14] Li G. et al. Antimycobacterial activity of five efflux pump inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *The J of Antibiotics* 2016; **69**: 173-175.

- [15] Bowler, LD, Hubank, M, Spratt, BG. Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 1999; **145**: 3529-37.
- [16] Machado D, Couto I, Perdigao 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* 2012; **7**: e34538.
- [17] 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 realtime reverse transcription PCR. *Microb Drug Resist* 2008; **14**: 7-11.
- [18] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method. *Methods* 2001; **25**: 402-8.
- [19] Ayres M, Ayres-Jr M, Ayres DL, Santos AAS. Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas Versão 5.0. *Sociedade Civil Mamirauá/MCT/CNPq* 2007; e324.
- [20] Rivero-Lezcano OM. *In vitro* infection of human cells with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2013; **93**: 123-9.
- [21] Demitto FdO, do Amaral RCR, Maltempe FG, Siqueira VLD, Scodro R, Lopes MA, et al. In Vitro Activity of Rifampicin and Verapamil Combination in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 2015; **10**: e0116545.
- [22] Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS, Sharma R, Singh M, Venkatesan K, Sharma VD. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common antituberculous drugs. *Microb Drug Resist* 2010; **16**: 21e8.
- [23] Ramon-Garcia S, Martin C, Thompson CJ, Ainsa JA. Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3675-82.

- [24] Wang K, Pei H, Huang B, Zhu X, Zhang J, Zhou B, Zhu L, Zhang Y, Zhou FF. The expression of ABC efflux pump, Rv1217c-Rv1218c, and its association with multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in China. *Curr Microbiol* 2013; **66**: 222-6.
- [25] Piddock LJ, Williams KJ, Ricci V. Accumulation of rifampicin by *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2000; **45**: 159–165.
- [26] Guirado E, Schlesinger LS, Kaplan G. Macrophages in Tuberculosis: Friend or Foe. *Semin Immunopathol* 2013; **35**: 563–583.
- [27] Viveiros M, Martins M, Rodrigues L, Machado D, Couto I, Ainsa J, Amaral L. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for antitubercular drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; **10**: 983-98.
- [28] Machado D et al. Ion Channel Blockers as Antimicrobial Agents, Efflux Inhibitors, and Enhancers of Macrophage Killing Activity against Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 2016; **11**: e0149326.
- [29] Rybalchenko V, Prevarskaya N, Coppenolle FV, Legrand G, Lemonnier L, Bourhis XL, Skryma R. Verapamil Inhibits Proliferation of LNCaP Human Prostate Cancer Cells Influencing K1 Channel Gating. *Mol Pharmacol* 2001; **59**: 1376–87.

CAPÍTULO III

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a combinação RIF+VP diminuiu a expressão gênica da maioria das BEs em *Mtb* dentro do ambiente macrofágico em ambos os tempos testados. Além disso, foi observado que há diferença da expressão gênica de BEs quando se compara os ensaios *in vitro* e *in vitro* intramacrofágico. Por conseguinte, essa combinação poderá ser útil na terapia contra a *Mtb* MDR. Neste sentido, estudos adicionais como ensaios *in vivo* podem ajudar a elucidar a ação observada na combinação RIF+VP contra o bacilo na terapia da TB.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo envolvendo a combinação entre inibidores de BEs e fármacos anti-TB vêm crescendo a cada dia, apresentando resultados promissores para o tratamento anti-TB. A partir disso, é preciso compreender melhor como o VP age internamente ao macrófago a nível de expressão gênica, e como isso influencia o metabolismo de *Mtb*. Assim, estudos *in vivo* envolvendo a resposta macrofágica na presença da combinação entre VP e RIF esclareceria como se dá a resposta imune dentro do ambiente do macrófago. Além disso, compreender melhor a ação do VP sobre o fagolisossomo e sobre a expressão gênica de outras BEs em *Mtb* ajudará o desenvolvimento de terapias que permitirão a melhora no tratamento.