

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AMANDA MENDES RÊGO

**USO DA METABOLÔMICA NA PREDIÇÃO DE PERFIS DE
SUSCEPTIBILIDADE DE *Mycobacterium tuberculosis* A DROGAS DE
PRIMEIRA E SEGUNDA LINHA**

Rio de Janeiro - RJ
2018

Rêgo, Amanda Mendes .

Uso da metabolômica na predição de perfis de susceptibilidade de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas de primeira e segunda linha / Amanda Mendes Rêgo. - Rio de Janeiro, 2018.

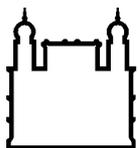
113 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Luis Caetano Martha Antunes.

Bibliografia: f. 104-109

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. perfil metabólico. 3. resistência à fármacos. 4. espectrometria de massas. 5. metabolômica. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Amanda Mendes Rêgo

Uso da metabolômica na predição de perfis de susceptibilidade de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas de primeira e segunda linha

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador:

Dr. Luis Caetano Martha Antunes

RIO DE JANEIRO

2018

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me ajudado a conquistar essa vitória.

Aos meus pais **Solange e Gentil**, por toda a dedicação, por sempre me apoiarem, pela educação e pelo amor incondicional que me deram desde sempre.

Às minhas **irmãs Gabriela e Juliana**, por toda força e incentivo que sempre me deram.

À minha querida sobrinha **Lara**, por encher meu coração de amor e alegria.

À minha tia **Mercês**, por sempre me aconselhar e incentivar da melhor forma.

Ao restante da minha **família**, por todos os momentos vividos.

Ao meu companheiro e melhor amigo, **Marcelo**, por toda a paciência, por ser meu ouvido nos momentos de desespero, por sempre me ajudar e por se orgulhar tanto de mim.

Às minhas amigas de infância, **Nathalia, Danielle, Tainá, Larissa, Kessy e Lyanna**, por existirem na minha vida, por tanto tempo de amizade e por alegrarem minha vida desde sempre.

Aos meus queridos amigos, **Patricia e Raphael**, pela amizade, pelo amor, pelo companheirismo e principalmente pelo presentinho que está a caminho.

Às minhas amigas desde a faculdade, **Eliane, Camila, e Carol**, por todos os momentos que tive o prazer de compartilhar com vocês.

Às minhas amigas do sapateado, **Camilla, Amanda, Pillar e Juanna** por alegrarem minhas noites de segundas e quartas e também pelos momentos de extrema alegria que compartilhamos.

Aos meu orientador **Dr. Caetano**, por estar comigo desde a iniciação científica e ter me ensinado tanto nesse tempo, por confiar em mim e por sempre acreditar que eu seria capaz de chegar até aqui.

Aos meus irmãos da ciência **Nicole, Duanne e Lucindo**, pela ajuda nos experimentos, pelo companheirismo e por todo apoio que me deram em todas as etapas desse projeto.

À **todos do Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF)**, por terem me ensinado tanto nesse tempo em que estive lá.

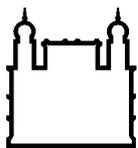
Ao **Dr. Júlio Jablonski e à Dra. Soraya de Mendonça** do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO pela colaboração.

Ao **Dr. Fábio Nogueira** do Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC-UFRJ) não só pela colaboração, mas também por me receber de forma tão acolhedora em seu laboratório.

Ao **Dr. Joseph Evaristo e a Dra. Geisa Caprini**, por tudo que me ensinaram, pela paciência e preocupação que tiveram comigo e por terem sido incansáveis ao me ajudar com o último experimento.

Aos membros da **banca examinadora**, por terem aceitado o convite e estarem aqui contribuindo na avaliação deste trabalho.

E por fim, ao **Instituto Oswaldo Cruz** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro e pela oportunidade de realizar esse trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Amanda Mendes Rêgo

Uso da metabolômica na predição de perfis de susceptibilidade de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas de primeira e segunda linha

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Caetano Martha Antunes

Aprovada em: 11/ 10 / 2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani – IOC/FIOCRUZ (Presidente)
Prof. Dr. Leila de Mendonça Lima - IOC/FIOCRUZ (Membro)
Prof. Dr. Márcia de Berrêdo Pinho Moreira - IOC/FIOCRUZ (Membro)
Prof. Dr. Rosana Barreto Rocha Ferreira – IMPG/UFRJ (Suplente)
Prof. Dr. Tatiana de Castro Abreu Pinto - IMPG/UFRJ (Suplente)

Rio de Janeiro, 11 de Outubro de 2018

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa de extrema importância, sendo uma das principais causas de morte provocadas por um único agente infeccioso em todo o mundo. Apesar disso, a tuberculose pode ser facilmente tratada através da terapia com drogas antimicobacterianas. Entretanto, cepas resistentes a antibióticos são cada vez mais comuns, gerando falhas no tratamento e dificultando o controle da doença. Dessa forma, a determinação de perfis de susceptibilidade a drogas é rotineiramente realizada em laboratórios de diagnóstico. Isso permite a escolha de drogas ideais para o tratamento, tendo em vista a susceptibilidade da cepa que infectou um dado paciente. Porém, a determinação de perfis de susceptibilidade leva tempo, e muitas vezes o tratamento precisa ser iniciado antes que o resultado dos testes seja obtido. Isso faz com que indivíduos infectados acabem sendo tratados com antibióticos inapropriados, resultando em falhas no tratamento e propiciando o desenvolvimento de resistência. Por isso, o desenvolvimento de novas técnicas que permitam a determinação rápida de perfis de susceptibilidade é imperativo. Este estudo teve como objetivo caracterizar os perfis metabólicos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis a drogas, resistente a múltiplas drogas (MDR) e extensivamente resistente a drogas (XDR) através de metabolômica por espectrometria de massas de alta vazão. O objetivo deste estudo foi determinar se a avaliação destes perfis metabólicos poderia ser utilizada como uma alternativa aos métodos tradicionais de determinação de perfis de susceptibilidade. Tal proposta partiu do princípio de que cepas com diferentes níveis de resistência são metabolicamente distintas, permitindo assim que biomarcadores associados a padrões de resistência a drogas sejam identificados e utilizados como ferramentas diagnósticas. Nossos resultados demonstraram que perfis de susceptibilidade a drogas de *M. tuberculosis* podem ser preditos através das análises metabólicas aqui descritas, sobretudo quando amostras com perfis de susceptibilidade conhecidos são utilizadas como controles em paralelo. Além disso, foi possível observar que cepas sensíveis apresentaram em seus perfis metabólicos níveis mais elevados de ácido pantotênico e biotina do que cepas resistentes; estas moléculas estão diretamente relacionadas com a síntese de ácidos graxos. Além destas, outras moléculas, como os aminoácidos prolina e isoleucina, também foram encontradas em níveis diferenciados entre cepas sensíveis e resistentes. Tais metabólitos, por serem estáveis e de identificação relativamente simples, são importantes candidatos a biomarcadores. Assim, nosso estudo representa um avanço significativo no atual entendimento do efeito da resistência a drogas no metabolismo bacteriano, além de apresentar possíveis trajetos a serem seguidos para a confirmação de marcadores específicos de resistência a drogas e o desenvolvimento de métodos diagnósticos baseados nestas informações. Os achados deste estudo destacam também a importância do metabolismo dos ácidos graxos e ácidos micólicos, ambos componentes estruturais da parede celular e envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. Além disso, ressaltamos estes metabólitos como possíveis marcadores de resistência de *M. tuberculosis*. Portanto, estes resultados e abrem um leque de possíveis empregos de técnicas de metabolômica como ferramentas para a detecção de resistência a drogas através destas moléculas. Futuramente, os resultados aqui obtidos poderão subsidiar o desenvolvimento de métodos para a detecção rápida da resistência a drogas, contribuindo para a escolha do tratamento adequado para cada paciente e para o aumento do sucesso no controle da tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis is a high medical relevance infectious disease and is one of the leading causes of death provoked by a single infectious agent worldwide. Despite this, tuberculosis can be easily treated through antimycobacterial drug therapy. However, resistance to antibiotics is becoming increasingly common, leading to treatment failures and making the control of this disease challenging. Therefore, the determination of drug susceptibility profiles is routinely performed in diagnostic laboratories. This allows clinicians to make informed decisions when choosing a course of treatment, taking into account the drug susceptibility profile of the strain causing infection in a particular patient. However, the determination of susceptibility profiles takes time, and treatment often needs to be initiated before test results are available. This may result in patients being treated with inappropriate antibiotics, leading to treatment failures and the development of drug resistance. For that reason, the development of new techniques that can quickly determine drug susceptibility profiles of *Mycobacterium tuberculosis* is imperative. This study aimed to characterize the metabolic alterations of drug-susceptible, multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *M. tuberculosis* strains by metabolomics using high-throughput mass spectrometry, in order to determine if the analysis of metabolic profiles can be used as an alternative to traditional methods of drug susceptibility testing. This proposal is based on the principle that strains with different levels of resistance are metabolically distinct, thus allowing metabolic biomarkers to be associated with patterns of resistance and used as diagnostic tools. Our findings have demonstrated that resistance profiles of *M. tuberculosis* can be predicted through the metabolic analyses described herein, provided that samples with known susceptibility profiles are used as control. In addition, it was observed that susceptible strains showed higher levels of pantothenic acid and biotin in their metabolic profiles when compared to resistant strains. It is important to note that both these molecules are directly involved in fatty acid synthesis, an important facet of *M. tuberculosis* metabolism. In addition to the molecules described above, two amino acids, proline and isoleucine, were also found in different levels when comparing susceptible and resistant strains. Due to their stability and the relative simplicity of their identification, these molecules are important biomarker candidates. Thus, our study represents a significant advance in the current understanding of the effect of antibiotic resistance on bacterial metabolism and opens new avenues for the detection and confirmation of drug resistance-specific biomarkers. These results are likely to be used in the future for the development of diagnostic tools for the detection of drug resistance in *M. tuberculosis*. In addition, our findings highlight the importance of the metabolism of fatty acids and mycolic acids, critical for cell wall structure and response to oxidative stress, as potential markers of *M. tuberculosis* drug resistance. Also, these studies provide a proof of concept that metabolomics techniques can be employed as useful tools for the detection of drug resistance through biomarkers. In the future, the results presented herein may support the development of tools for the rapid detection of resistance, contributing to better informed decisions by health care providers, and the choice of appropriate treatments for each patient, aiding in the success of tuberculosis control measures.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIATURA/SIGLA	SIGNIFICADO
ABF	Azul de Bromofenol
AMK	Amicacina
BCG	Bacilo Calmette Guérin
BK	Bacilo de Koch
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAP	Capreomicina
CE	Eletroforese Capilar
CRPHF	Centro de Referência Professor Hélio Fraga
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GC	Cromatografia gasosa
GU	Unidade de crescimento
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICL	Isocitrato Liase
INH	Isoniazida
KAN	Canamicina
KV	Quilovolt
LC	Cromatografia líquida
LJ	Löwenstein-Jensen
LTBI	Tuberculose infecção latente
MAS-PCR	Reação em cadeia da polimerase multiplex alelo específico

MDR	Multidroga resistente
MGIT	Tudo indicador de crescimento
MNT	Micobactéria não causadora de tuberculose
MS	Espectrometria de massas
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NMR	Ressonância magnética nuclear
O ₂	Gás Oxigênio
OFLO	Ofloxacina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Análise de componente principal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDIM	Fitiocerol dimicocerosato
RIF	Rifampicina
RJ	Rio de Janeiro
S	Sensível
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TBE	Tampão Borato EDTA
TCA	Ácido tricarboxílico
TOF	Tempo de voo
V	Volt
WT	Tipo selvagem
XDR	Extensivamente resistente

LISTA DE SÍMBOLOS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
°C	Graus centígrados
>	Maior que
<	Menor que
nm	Nanômetros
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
%	Por cento
®	Marca registrada
™	<i>Trademark</i>

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	CONTEÚDO	PÁGINA
Figura 1.1	Incidência de tuberculose no mundo em 2016.	3
Figura 1.2	Lâmina de <i>M. tuberculosis</i> corada através da coloração de Ziehl-Neelsen e observada no microscópio ótico com objetiva de 100X.	5
Figura 1.3	Aspecto das colônias de <i>M. tuberculosis</i> em meio de cultura LJ.	6
Figura 4.1	Fluxograma do estudo.	29
Figura 4.2	Representação dos possíveis resultados do teste SD Bioline TB Ag MPT64 RAPID®.	31
Figura 4.3	Desenho dos <i>primers</i> utilizados nesse estudo.	39
Figura 5.1	Análises de componentes principais (PCA) do primeiro experimento.	50-51
Figura 5.2	Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo do primeiro experimento.	53
Figura 5.3	Análise de agrupamento hierárquico em modo negativo do primeiro experimento.	54
Figura 5.4	Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst em modo positivo no primeiro experimento.	55
Figura 5.5	Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst em modo negativo no primeiro experimento.	56
Figura 5.6	Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do primeiro experimento na comparação S vs MDR.	57
Figura 5.7	Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do primeiro experimento na comparação S vs XDR.	57
Figura 5.8	Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do primeiro experimento na comparação MDR vs XDR.	58
Figura 5.9	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação S vs MDR no primeiro experimento.	59
Figura 5.10	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior	60

	poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação S vs XDR no primeiro experimento.	
Figura 5.11	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação MDR vs XDR no primeiro experimento.	61
Figura 5.12	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do primeiro experimento na comparação S vs MDR.	63
Figura 5.13	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do primeiro experimento na comparação S vs XDR.	64
Figura 5.14	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do primeiro experimento na comparação MDR vs XDR.	65
Figura 5.15	Análises de componentes principais (PCA) do segundo experimento.	67-68
Figura 5.16	Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo do segundo experimento.	70
Figura 5.17	Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst em modo positivo no segundo experimento.	71
Figura 5.18	Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do segundo experimento na comparação S vs MDR.	72
Figura 5.19	Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do segundo experimento na comparação S vs XDR.	73
Figura 5.20	Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do segundo experimento na comparação MDR vs XDR.	73
Figura 5.21	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação S vs MDR no segundo experimento.	75
Figura 5.22	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação S vs XDR no segundo experimento.	76

Figura 5.23	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação MDR <i>vs</i> XDR no segundo experimento.	77
Figura 5.24	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do segundo experimento na comparação S <i>vs</i> MDR.	79
Figura 5.25	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do segundo experimento na comparação S <i>vs</i> XDR.	80
Figura 5.26	Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do segundo experimento na comparação MDR <i>vs</i> XDR.	81
Figura 5.27	Análise de componentes principais (PCA) do terceiro experimento.	86
Figura 5.28	Análise de agrupamento hierárquico do terceiro experimento.	87
Figura 5.29	Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst no terceiro experimento.	88
Figura 5.30	Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do terceiro experimento na comparação S <i>vs</i> MDR.	89
Figura 5.31	Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do terceiro experimento na comparação S <i>vs</i> XDR.	89
Figura 5.32	Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do segundo experimento na comparação MDR <i>vs</i> XDR.	90
Figura 5.33	Análise de agrupamento hierárquico do terceiro experimento na comparação S <i>vs</i> MDR baseando-se nos compostos com identificações putativas escolhidas.	91
Figura 5.34	Análise de agrupamento hierárquico do terceiro experimento na comparação S <i>vs</i> XDR baseando-se nos compostos com identificações putativas escolhidas.	91
Figura 5.35	Análise de agrupamento hierárquico do terceiro experimento na comparação MDR <i>vs</i> XDR baseando-se nos compostos com identificações putativas escolhidas.	92

Figura 5.36 Gráficos representativos dos níveis relativos dos compostos com alto poder discriminatório e boa identificação putativa no terceiro experimento.

93

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA	CONTEÚDO	PÁGINA
Quadro 1.1	Genes envolvidos na resistência a fármacos antituberculose.	19
Quadro 4.1	Etapas de reação de amplificação para amplificação parcial dos genes <i>rpob</i> , <i>inhA</i> , <i>katG</i> , <i>gyrA</i> e <i>rrs</i> .	39
Tabela 5.1	Cepas selecionadas para o primeiro experimento e seus resultados de detecção do antígeno MPT64 e testes de susceptibilidade.	46
Tabela 5.2	Cepas selecionadas para o segundo experimento e seus resultados de detecção do antígeno MPT64 e testes de susceptibilidade.	48
Tabela 5.3	Resumo dos resultados de metabolômica do primeiro experimento.	62
Tabela 5.4	Resumo dos resultados de metabolômica do segundo experimento.	78
Tabela 5.5	Resumo dos resultados de sequenciamento de determinantes genéticos de resistência a drogas nas cepas utilizadas neste estudo.	82-83
Tabela 5.6	Cepas selecionadas para o terceiro experimento e seus resultados de detecção do antígeno MPT64 e testes de susceptibilidade.	85

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epidemiologia da Tuberculose	1
1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
1.3. Prevenção	6
1.4. Transmissão	7
1.5. Diagnóstico	7
1.6. Tratamento.....	9
1.7. Resistência aos Fármacos.....	12
1.8. Mecanismos de Resistência	14
1.9. Detecção de Resistência.....	16
1.10. Metabolômica.....	20
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	28
Objetivo Geral.....	28
Objetivos Específicos	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. Fluxograma	29
4.2. Cepas Utilizadas.....	30
4.3. Confirmação da Identidade das Cepas Utilizadas.....	30

4.4.	Teste de Sensibilidade pelo Sistema <i>BACTECTM MGIT960TM MYCOBACTERIAL DETECTION</i>	32
4.5.	Extração de Metabólitos	34
4.6.	Espectrometria de Massas – Quadrupolo (Synapt G1).....	35
4.7.	Espectrometria de Massas – Quadrupolo – Orbitrap (Q Exactive TM Plus)	36
4.8.	Análise de Dados	38
4.9.	Extração de DNA	39
4.10.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Amplificação Parcial dos Genes <i>rpoB</i> , <i>inhA</i> , <i>katG</i> , <i>gyrA</i> e <i>rrs</i>	39
4.11.	Eletroforese	41
4.12.	Purificação dos Produtos da PCR.....	41
4.13.	Reação de Sequenciamento.....	42
4.14.	Precipitação da Reação de Sequenciamento	42
4.15.	Desnaturação.....	43
4.16.	Sequenciamento	43
4.17.	Análise das Sequências	43
5.	RESULTADOS	45
6.	DISCUSSÃO	95
7.	CONCLUSÃO.....	102
8.	PERSPECTIVAS.....	103
	BIBLIOGRAFIA	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que normalmente afeta os pulmões, casos em que é denominada TB pulmonar, mas que pode também afetar outros órgãos, sendo nesses casos denominada de TB extrapulmonar (1). A TB tem como agente etiológico a espécie *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), bactéria descrita em 1882 por Robert Koch e por isso também conhecida como bacilo de Koch (2).

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a TB como uma emergência de saúde pública mundial, em um momento em que surgiram entre 7 a 8 milhões de novos casos resultando em 1,3 a 1,6 milhão de mortes a cada ano (3). Ainda que nos dias de hoje exista um tratamento altamente eficaz contra a TB, a doença permanece como uma emergência global, afetando em grande parte populações pobres, vulneráveis e marginalizadas, que vivem principalmente em países de baixa e média renda (4).

No ano 2000, foi criada a parceria *Stop TB* que é composta por cerca de 1500 participantes, incluindo organizações técnicas, programas governamentais, agências de pesquisa e fomento, organizações não-governamentais, entre outros. Presentes em mais de 100 países, a *Stop TB* tem como principal objetivo eliminar a TB como um problema de saúde pública. A *Stop TB* tinha como metas principais a serem alcançadas até 2015 a detecção de pelo menos 70% dos novos casos através de exame de escarro e a cura de até 85% deles. Além disso, o objetivo deste programa era de reduzir em 50% o número de mortes por TB e reduzir a sua prevalência a até 1 caso de TB por milhão de habitantes/ano (5). Dentre os mais de 100 países participantes, apenas nove conseguiram alcançar as metas propostas pela *Stop TB*. De acordo com a OMS, em 2015 foram notificados, somente no Brasil, 81.137 novos casos da doença. Ainda assim, o Brasil se encontra entre os nove países que conseguiram alcançar todas as metas

de diminuição da incidência, prevalência e mortalidade da TB estipuladas pelo *Stop TB* (6). Ainda em 2015, uma nova estratégia foi iniciada e novas metas foram estabelecidas até o ano de 2030. Entre os anos de 2016 a 2020, pelo menos 90% das pessoas diagnosticadas com a doença devem obter sucesso no tratamento. Como meta principal do *Stop TB*, espera-se acabar com a epidemia de TB até o ano de 2030 (6).

De acordo com a OMS, em 2016 dos 10,4 milhões de novos casos de TB estimados no mundo, foram reportados 6,3 milhões, o que representa 61% do número estimado. Destes, 46% correspondem a pacientes HIV positivos. Além disso, nesse mesmo ano a TB teve 1,3 milhão de mortes estimadas em indivíduos HIV-negativos e 374 mil óbitos estimados em indivíduos com a coinfeção TB-HIV (7). No mundo, a TB é a nona principal causa de morte, representando a principal causa de morte por um único agente infeccioso nos anos de 2012 a 2016, ficando acima do HIV. Alguns dados de incidência global da TB podem ser vistos na Figura 1.1, como pode-se observar, a Índia e países do continente africano concentram o maior número de casos. Já no Brasil, em 2016 foram diagnosticados e registrados 66.796 casos novos e 12.809 casos de retratamento com aproximadamente mil casos de cepas resistentes, com cerca de 4,5 mil mortes, sendo a TB neste ano a 4º causa de morte por doenças infecciosas e a 1º causa de morte dentre as doenças infecciosas definidas dos pacientes com HIV (7). É importante notar que a maioria dessas mortes poderia ser evitada com um diagnóstico precoce e tratamento adequado.

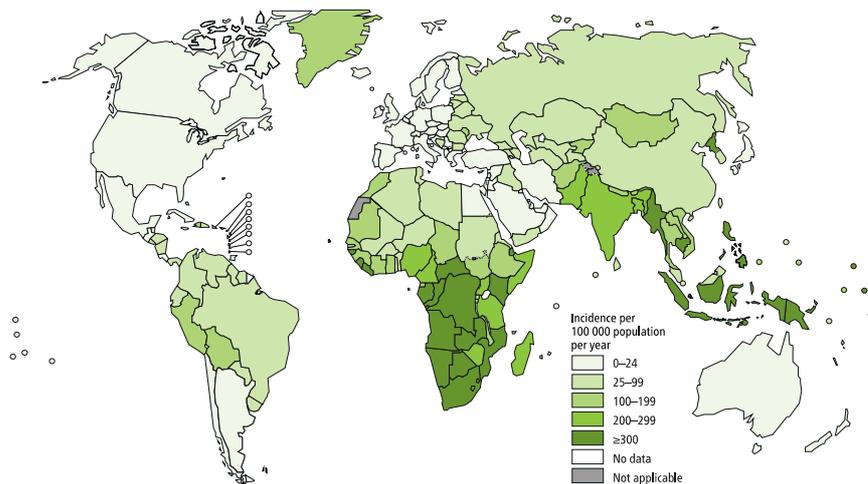


Figura 1.1 – Incidência de tuberculose no mundo em 2016. Mapa demonstrando o número anual de casos de TB em relação ao tamanho da população (taxa de incidência) **Fonte:** WHO, 2017.

No plano internacional, de acordo com a nova classificação da OMS (2016-2020), o Brasil ocupa a 20^a posição na lista dos 30 países que concentram 87% dos casos de tuberculose. Além disso, o país ocupa a 19^a posição na lista dos 30 países que concentram a maior porcentagem dos casos de TB-HIV (7).

1.2. *Mycobacterium tuberculosis*

O *M. tuberculosis* foi descoberto em 1882 pelo bacteriologista alemão Robert Koch e em sua homenagem também é conhecido como bacilo de Koch. O *M. tuberculosis* foi assim denominado em 1896 por Lehman & Neumann, devido à presença de película formada pela micobactéria na superfície de meios líquidos, película a qual era considerada característica de alguns fungos (8).

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, subordem Corynebacterineae, ordem Actinomycetales. É possível afirmar que as micobactérias estão entre as bactérias mais estudadas, por serem os agentes etiológicos da TB, causada por micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, e da hanseníase, causada pelo *M. leprae* (9).

O *M. tuberculosis*, junto com o *M. africanum*, *M. orygis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi*, *M. suricattae* e *M. mungi* formam o complexo *M. tuberculosis*, um grupo de micobactérias que apresenta grande similaridade genética e causam o mesmo espectro de doença (10). As demais micobactérias não incluídas no complexo *M. tuberculosis* são chamadas de micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT), como proposto pela *American Thoracic Society* (10, 11).

O *M. tuberculosis* apresenta-se em forma de bacilo reto ou levemente curvado, com 1 a 10 µm de comprimento e 0,2 a 0,6 µm de largura. São bactérias imóveis, não esporuladas e não encapsuladas, sendo a propriedade mais importante a sua característica morfotintorial de álcool-ácido resistência. Esta propriedade se refere à capacidade dos componentes da parede celular desse gênero em resistir ao descoloramento com solução de álcool etílico a 95% e de ácido clorídrico a 3% (solução álcool-ácida) durante o processo de coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (12-14) (Figura 1.2). Bactérias do gênero *Mycobacterium* dificilmente podem ser coradas pelo método de Gram, mas são consideradas como Gram positivas pelas características de sua parede celular. Além dessas características, uma propriedade importante é o agrupamento dos bacilos formando ramos alongados e sinuosos, conhecidos como cordas (15).

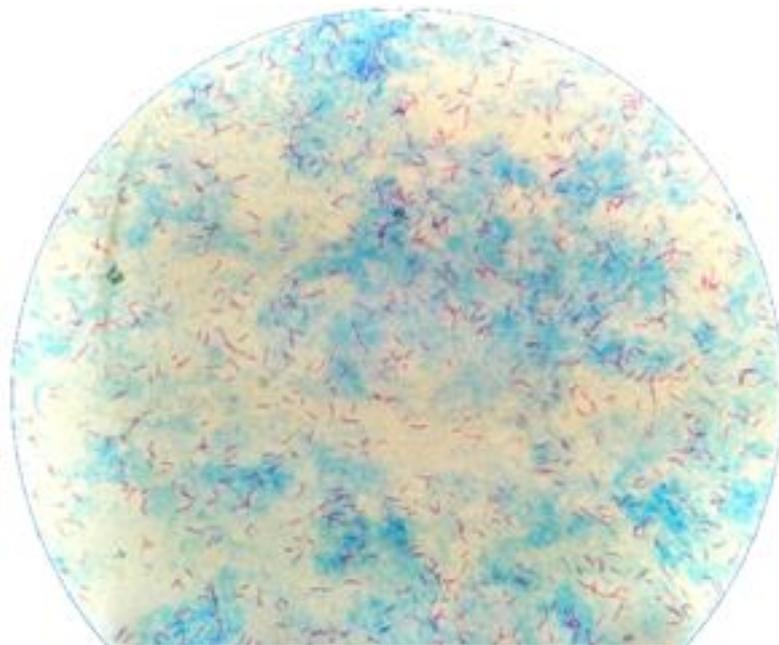


Figura 1.2 – Lâmina de *M. tuberculosis* corada através da coloração de Ziehl-Neelsen e observada no microscópio óptico com objetiva de 100X. Na imagem observa-se em vermelho, bacilos retos ou levemente curvados corados por fucsina. **Fonte:** Ferreira N.V., 2015.

A parede celular das espécies do gênero *Mycobacterium* é constituída principalmente por ácidos micólicos, formando uma barreira hidrofóbica que confere características peculiares ao gênero, como resistência à dessecação e tempo de geração de aproximadamente 20 horas, além de maior virulência e resistência aos antimicrobianos (16).

O bacilo da tuberculose é um patógeno aeróbio estrito, ou seja, necessita de oxigênio para crescer e se multiplicar. É considerado um parasito intracelular facultativo, que se prolifera inicialmente nos pulmões (células macrofágicas dos alvéolos pulmonares) e a partir destes pode se difundir para diversas partes do organismo humano, podendo causar tuberculose extrapulmonar, atingindo ossos, cérebro, nódulos linfáticos e outros tecidos (14). As micobactérias do complexo *M. tuberculosis* são classificadas como micobactérias não pigmentadas de crescimento lento, por apresentarem um tempo de geração médio entre 18 e 24 horas e por necessitarem de mais de uma semana para formar uma colônia, enquanto micobactérias de crescimento rápido apresentam um tempo de geração de 2 a 5 horas e formam colônias visíveis em meio sólido em aproximadamente 7 dias (14). Suas colônias têm aspecto seco, rugoso, acamurçado e sem produção de pigmento, apresentando-se com coloração creme

no crescimento em meio Löwenstein-Jensen (LJ) (15) (Figura 1.3). O *M. tuberculosis* tem como temperatura ótima de crescimento 35 a 37 °C e são sensíveis à ação de agentes físicos, como o calor e a radiação ultravioleta, e relativamente resistentes à desinfecção por agentes químicos (14).



Figura 1.3 - Aspecto das colônias de *M. tuberculosis* em meio de cultura LJ. Cultura de *Mycobacterium tuberculosis* em meio LJ, onde pode-se observar a morfologia característica das colônias, seu aspecto rugoso e sem pigmentação. **Fonte:** Ferreira N.V., 2015.

1.3. Prevenção

Embora a OMS e os membros da parceria *Stop TB* estejam trabalhando no desenvolvimento de novas vacinas com maior eficácia, a vacina com o Bacilo Calmette-Guérin (BCG) ainda é a única forma de se prevenir as formas mais graves de TB em crianças, como por exemplo a TB meníngea, a forma pulmonar progressiva e a doença miliar que é um tipo de tuberculose em que as bactérias estão disseminadas na corrente sanguínea, provocando lesões em vários tecidos e órgãos do corpo. Admite-se que a vacina BCG possa ter o mesmo efeito na prevenção de outras formas graves de TB em crianças, mas é menos eficaz na prevenção da TB pulmonar nos adultos, que é a forma de TB mais frequente (5).

1.4. Transmissão

A transmissibilidade está presente desde os primeiros sintomas respiratórios, caindo rapidamente após o início de tratamento efetivo. A infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre a partir de uma transmissão direta, quando um paciente acometido por tuberculose pulmonar ativa, elimina o bacilo através de aerossóis produzidos pela tosse, fala ou espirro. Esse aerossol, por sua vez, é inalado por outros indivíduos, podendo ou não desencadear um quadro de evolução favorável da doença. A evolução da doença depende de vários fatores, como por exemplo, a imunidade, nutrição, infecção por HIV e acometimento por doenças imunológicas em geral. Algumas características cepa-específicas como níveis mais altos de expressão de fatores de virulência ou a carga infectante também podem interferir nesse processo (17). Embora o risco de adoecimento seja maior nos primeiros dois anos pós-infecção, uma vez infectada, a pessoa pode adoecer em qualquer momento de sua vida. Isso ocorre porque o bacilo pode permanecer latente no organismo humano por longos períodos de tempo, manifestando-se quando as condições lhe forem propícias (18). A transmissão chega a níveis insignificantes após 15 dias do início do esquema terapêutico adequado (18). No entanto, com base em evidências de transmissão da TB resistente à drogas, recomenda-se que seja também considerada a negatificação da baciloscopia (19, 20).

1.5. Diagnóstico

De acordo com critérios clínicos e de saúde pública, indivíduos com tuberculose podem ser classificados em três grupos. O primeiro grupo é representado por indivíduos com infecção latente (LTBI, *latent TB infection*); estes indivíduos são assintomáticos, e incapazes de transmitir a doença (21). O segundo grupo é composto por indivíduos com TB ativa, que é a forma transmissível da doença; tais indivíduos apresentam sintomas específicos, como

febre, fadiga, tosse persistente, falta de apetite e perda de peso. No entanto, alguns pacientes com tuberculose ativa diagnosticados com cultura positiva podem ser assintomáticos, sendo separados em um terceiro grupo como casos de TB subclínica (17).

A TB ativa pode ser detectada clinicamente e confirmada através de exames laboratoriais, geralmente baseados em cultura bacteriana e métodos moleculares (4, 22). Os métodos diagnósticos indicados pela OMS são exames de imagem, bacteriológicos e moleculares. A partir dos primeiros sintomas, exames de imagem devem ser realizados para auxiliar no diagnóstico; entre eles podemos citar a radiografia torácica, ultrassonografia do pulmão, ressonância magnética e tomografia computadorizada, que podem evidenciar cavidades nos pulmões causadas pela TB (7). O diagnóstico bacteriológico, por sua vez, ocorre através da identificação de bacilos em amostras biológicas. Amostras provenientes do trato respiratório superior, tais como escarro e lavado bronco alveolar, são analisadas por microscopia direta através da utilização da coloração de Ziehl-Neelsen a fim de identificar bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), como pode ser observado na Figura 1.2 (16, 23). A baciloscopia é uma metodologia rápida e barata; porém, não é capaz de identificar bacilos durante a infecção em pacientes paucibacilares, termo utilizado para descrever indivíduos que apresentam menos de 5000 bacilos/mL na amostra proveniente do trato respiratório, mas apresentam quadro clínico e radiografia compatíveis com a doença (24). Simultaneamente à baciloscopia, pode ser realizada cultura em meio sólido, LJ ou Ogawa-Kudoh, que aumentam em 30% a detecção do bacilo quando a amostra é proveniente de uma baciloscopia negativa, pois são necessários apenas cerca de 10 bacilos/mL de amostra para se obter crescimento bacteriano. Entretanto, o resultado é extremamente demorado, podendo levar de 14 dias à 8 semanas (25).

Atualmente, OMS recomenda a realização do teste molecular Xpert® MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA), que é um teste de amplificação de ácido nucléico totalmente automatizado, capaz de identificar em até duas horas o bacilo *M. tuberculosis* em amostras

de escarro previamente tratadas com tampão contendo NaOH (hidróxido de sódio) e álcool isopropílico. Além de ser capaz de detectar material genético específico de membros do complexo *M. tuberculosis*, o Xpert® MTB/RIF também avalia a possível presença de mutações no gene *rpoB* (codificador da subunidade β da RNA polimerase) capazes de produzir resistência à rifampicina (Rif). Todo este processo é realizado utilizando sondas fluorescentes específicas, em um ensaio de PCR em tempo real (6, 23, 26, 27).

1.6. Tratamento

A TB é uma doença completamente curável com o uso de antibióticos apropriados, e a eficiência do tratamento está diretamente relacionada à rapidez do diagnóstico. Vários desafios se apresentam para que o tratamento da TB alcance a cura da doença e previna sua recidiva. Logo, o tratamento precisa ter atividade bactericida precoce (capacidade de matar o maior número de bacilos, o mais rapidamente possível, diminuindo a infectividade), prevenir o surgimento de bacilos resistentes ao antibiótico utilizado (utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos simultaneamente) e ter atividade esterilizante (capaz de eliminar virtualmente todos os bacilos do organismo) (20, 28).

Para o tratamento da tuberculose susceptível aos medicamentos, a OMS recomenda um regime de 2 meses de tratamento com os quatro antibióticos ditos de primeira linha (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol), que associados possuem as propriedades relacionadas as questões anteriormente citadas, seguidos por 4 meses de tratamento com apenas rifampicina (Rif) e Isoniazida (Inh) (6, 28). Esses medicamentos possuem propriedades químicas distintas, que lhes conferem uma ação combinatória importante. A Inh e Rif são os medicamentos que juntos apresentam maior poder bactericida, sendo ativos em todas as subpopulações de *M. tuberculosis* sensíveis (intracavitária, em granulomas ou intracelulares). A Rif é o medicamento com maior poder esterilizante. A pirazinamida (Pza) é

ativa apenas em meio ácido, como por exemplo, o meio encontrado no ambiente intracelular ou no interior dos granulomas. O etambutol (Emb), por sua vez, é bacteriostático e utilizado em associação com medicamentos mais potentes para prevenir o surgimento de cepas resistentes (20). Além de suas atividades complementares, como cada subpopulação micobacteriana tem diferentes proporções de bacilos com resistência natural aos diferentes antimicrobianos, a forma principal de evitar a seleção de bacilos resistentes é a utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos anti-TB simultaneamente, uma vez que bacilos naturalmente resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro (20, 29).

Um dos grandes problemas referentes ao tratamento da TB é que, com exceção dos fármacos quinolônicos que não são específicos para tratar a doença, há mais de 30 anos não surge um novo fármaco potente para combatê-la, enquanto a resistência a múltiplos fármacos avança no mundo. O tratamento para tuberculose utiliza combinações de fármacos que foram desenvolvidas entre os anos de 1940 e 1950 e podem reduzir drasticamente as taxas de mortalidade. No Brasil, o II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos anti-TB, realizado no período 2007-2008, mostrou em relação ao primeiro Inquérito (1997), um aumento da taxa de resistência primária à Inh, de 3,5% para 6%, e à Rif, de 0,2% para 1,5%. Estes fatos levaram o Programa Nacional de Controle da Tuberculose a acrescentar o Emb ao esquema inicial (RIF, INH e PZA), com o objetivo de eliminar o risco de falência e de recidiva nos pacientes com resistência primária isolada à INH ou à RIF. O esquema RIPE (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol) já é usado praticamente em todos os países há vários anos, com a mesma finalidade (30, 31).

As recomendações e apresentações farmacológicas descritas acima são as preconizadas pela OMS, e são utilizadas na maioria dos países, tanto para adultos quanto para adolescentes. Em todos os esquemas a medicação é de uso diário e deve ser administrada em dose única (20, 30, 31).

Outro grave problema enfrentado com relação ao tratamento da TB é o chamado abandono do tratamento. Este termo é usado para definir o desfecho em que o paciente opta por não continuar o seu tratamento como prescrito. Apesar do termo ter sido recentemente questionado quanto à sua unilateralidade e imputação de responsabilidade do cuidado estritamente sobre o paciente (32), ele vem sendo usado ao longo dos anos como um indicador de falhas do sistema de saúde e de medidas de controle da TB. Uma ampla gama de fatores pode levar ao abandono; entretanto, há duas peculiaridades do tratamento da TB que indiscutivelmente contribuem para a interrupção precoce do tratamento. A primeira delas é a longa duração do tratamento, que pode se estender por até dois anos, em caso de cepas multirresistentes. A segunda é que a utilização destas drogas por longos períodos comumente está associada ao aparecimento de efeitos colaterais, causados pelo alto índice de toxicidade de alguns desses medicamentos. Além destas peculiaridades, a melhora rápida dos sintomas, cerca de 2 a 3 semanas depois do início do tratamento, também favorece a interrupção do mesmo (6). Seja qual for o motivo, acredita-se que a interrupção abrupta do tratamento, assim como falhas na tomada da medicação ao longo do mesmo, sejam fatores importantes para o aparecimento de cepas resistentes. Em tese, o tratamento inadequado gera uma pressão seletiva que pode selecionar bacilos naturalmente resistentes, que se proliferam com relativa facilidade em doses subinibitórias de antibióticos. Estas doses subinibitórias são possivelmente encontradas em tecidos de indivíduos que tenham ingerido as drogas em quantidade ou periodicidade inferiores às prescritas. Estas variantes resistentes podem então se espalhar para novos indivíduos, causando infecções em que o esquema básico de tratamento não será mais eficaz, gerando prejuízo tanto para o indivíduo quanto para a comunidade, ao tornar necessários esquemas terapêuticos mais longos, mais tóxicos e mais caros (6). Assim, mais estudos que abordem detalhadamente a relação entre falhas na administração do tratamento e o surgimento de variantes bacterianas resistentes.

1.7. Resistência aos Fármacos

Atualmente, um dos principais desafios para o tratamento da TB é o aumento da incidência de cepas resistentes às drogas antibacterianas disponíveis. A resistência aos antibióticos em *M. tuberculosis* acontece naturalmente devido a alguns fatores; por exemplo, sua parede celular rica em lipídeos como ácidos micólicos, e portanto altamente impermeável à entrada dos antibióticos com atividade citoplasmática, bombas de efluxo que podem excretar os antibióticos do interior do bacilo, impedindo sua ação, além da produção de enzimas hidrolíticas ou fármaco-modificadoras como β -lactamases e aminoglicosídeo acetil transferases. Tais mecanismos de resistência podem ocorrer em populações bacterianas que não tenham entrado em contato com medicamentos anti-TB (33). Em cada grupo de 10^7 a 10^9 bacilos, existe um que apresenta resistência natural à Inh, outro à Rif, outros ainda ao Emb. Esta é a razão porque não se pode tratar a TB com um só medicamento, porque o mesmo destrói uma grande quantidade de bacilos sensíveis, e os naturalmente resistentes ao fármaco passam a proliferar, surgindo uma nova cepa resistente ao mesmo. Este fato ocorreu com o uso inicial da estreptomicina (Sm), no início da década de 1940; inicialmente, a medicação foi eficaz, mas a seguir a TB ressurgiu resistente à Sm em vários pacientes (20).

O tipo de resistência apresentado por uma dada cepa de *M. tuberculosis*, pode ser classificado em dois grupos: a) resistência primária, quando o indivíduo nunca tratado para TB se contamina por bacilos já resistentes; b) resistência secundária ou adquirida, que surge em pacientes com bacilos inicialmente sensíveis a um medicamento, mas que se tornam resistentes por exposição ao fármaco de forma incorreta (20).

De acordo com a OMS, a resistência a drogas por *M. tuberculosis* pode ser dividida em várias classes: (i) monorresistência, quando a cepa de *M. tuberculosis* é resistente a apenas um fármaco de primeira linha; (ii) polirresistência, quando a cepa é resistente a mais de um fármaco de primeira linha, com exceção da rifampicina e isoniazida; (iii) resistência à Rif

(RR), quando a cepa é resistente somente à Rif; iv) resistência a múltiplas drogas (MDR), quando a cepa apresenta resistência simultânea à Inh e Rif, podendo ou não apresentar resistência a outras drogas de primeira linha; e (v) resistência extensiva a drogas (TB-XDR – do inglês, *extensively drug resistant TB*), quando a cepa é resistente à Inh e Rif, com ou sem resistência a outras drogas de primeira linha, e é resistente a qualquer fluoroquinolona e pelo menos um dos três medicamentos injetáveis de segunda linha (capreomicina (Cap), Canamicina (Kan) e Amicacina (Amk)) (6). Os casos de cepas MDR e XDR representam um grande obstáculo para o controle da TB, uma vez que as cepas são resistentes a alguns dos antibióticos mais importantes usados durante o tratamento. Uma vez que a resistência se desenvolve, o tratamento é completamente comprometido, já que o número de células resistentes aumenta e os organismos resistentes podem ser transmitidos para outros indivíduos, levando à resistência primária aos medicamentos, o que resultará na ausência de resposta clínica do paciente à terapia padrão (6, 28, 34).

O advento da resistência de *M. tuberculosis* às principais drogas utilizadas no esquema terapêutico anti-TB resulta na utilização de drogas de alto custo (fluoroquinolonas e drogas injetáveis), menor eficácia e que geram mais efeitos colaterais. No Brasil, a OMS recomenda o tratamento da infecção por cepas MDR em duas fases: intensiva e de manutenção. A fase intensiva compreende o uso de no mínimo 4 drogas potencialmente efetivas, sendo uma fluoroquinolona (grupo 3 -moxifloxacina, gatifloxacina ou levofloxacina), uma das drogas injetáveis (grupo 2 - Kan, Amk ou Cap), uma droga oral (grupo 4 - cicloserina, ácido p-aminossalicílico (PAS), teriziclona, protionamida ou etionamida) e uma droga de reforço (grupo 5 – linezolida, ertapenem, imipenem/cilastatina, meropenem, claritromicina, tioacetazona, amoxicilina/clavulanato, clofazimina, isoniazida em altas doses, bedaquilina ou delamanid). Na fase de manutenção, a droga injetável deve ser retirada, e as outras drogas devem ser mantidas por 12 meses após a negatificação dos exames bacteriológicos. Já quando se trata de TB-XDR, o tratamento deve ser individualizado de acordo com o histórico de

tratamento do paciente e dos padrões de resistência às drogas de primeira e segunda linha. A OMS propõe a utilização de pirazinamida e/ou algum outro fármaco de primeira linha, a utilização de fluoroquinolonas de última geração (moxifloxacina ou gatifloxacina), ainda que o teste de susceptibilidade demonstre resistência à levofloxacina e/ou Ofloxacina (Oflo), o uso de uma droga injetável para a qual a amostra bacteriológica demonstrou sensibilidade, sempre que possível, a utilização de dois ou mais agentes do grupo 5 e a utilização de todos os agentes do grupo 4 que não foram prescritos anteriormente. O tratamento em casos de infecção por cepas resistentes é longo, podendo chegar a 24 meses (6, 35, 36).

1.8. Mecanismos de Resistência

Como mencionado acima, alguns mecanismos de resistência a drogas são utilizados por *M. tuberculosis*, e são também amplamente utilizados por outros microrganismos. Entre os mecanismos comumente presentes em *M. tuberculosis*, podemos citar mecanismos de modificação do alvo do fármaco, modificação da via de ativação da droga, inativação enzimática da droga, assim como a utilização de bombas de efluxo, como descrito abaixo (33).

Modificação do alvo do fármaco

O principal mecanismo envolvido em resistência a antibióticos em *M. tuberculosis* é a modificação do alvo do fármaco, que decorre de mutações no DNA bacteriano e consiguiente modificação molecular dos alvos terapêuticos. Este é o mecanismo mais comum em *M. tuberculosis*, visto que são mutações genéticas que podem acontecer naturalmente, e os mutantes naturalmente resistentes podem ser selecionados quando há exposição a droga (37). Por exemplo, *M. tuberculosis* pode apresentar mutações no gene *gyrA*, que levam à produção de uma proteína GyrA modificada. GyrA é uma subunidade proteica da enzima DNA girase,

fundamental para replicação e reparo de DNA e conseqüentemente para a divisão celular ginsburg (37). A DNA girase é inibida por fluoroquinolonas; porém, algumas mutações fazem com que essa inibição não aconteça ou seja minimizada, o que resulta na resistência da bactéria a esta classe de antibióticos. Além da presença de mutações gênicas, outro mecanismo que pode levar à modificação do alvo são alterações enzimáticas pós-traducionais ou pós-transcricionais (37).

Modificação da via de ativação do fármaco

Este mecanismo é especialmente importante para as drogas antimicobacterianas que se apresentam como pró-fármacos, e que dependem de enzimas de *M. tuberculosis* para sua conversão para droga ativa, que após modificadas se ligarão a seu alvo e apresentarão atividade antibacteriana. São exemplos de drogas que utilizam este mecanismo a Inh e a Pza, que são pró-fármacos que dependem das enzimas catalase-peroxidase (KatG) e pirazinamidase (PncA), respectivamente para serem convertidas para sua forma ativa. Logo, mutações nos genes que codificam estas proteínas levam à resistência ao pró-fármaco em questão (38-40).

Inativação enzimática da droga

A resistência aos β -lactâmicos, está diretamente relacionada à inativação enzimática da droga. Esta classe de antimicrobianos por muito tempo não foi empregada no tratamento da TB, pois *M. tuberculosis* produz naturalmente enzimas β -lactamases que inativam tais antibióticos. Com o avanço das cepas resistentes, o uso destas drogas passou a ser necessário em alguns casos, associando-se o uso dos β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases como o clavulanato. Atualmente, esta combinação pode ser empregada para o tratamento de casos de TB causados por cepas MDR e XDR (41).

Aumento do efluxo dos antibióticos

Bombas de efluxo são proteínas cuja função é o transporte de moléculas pequenas através da membrana bacteriana, principalmente com o intuito de eliminar do citoplasma compostos possivelmente tóxicos (42). Na presença de antibióticos, essas proteínas podem atuar expulsando-os do interior da bactéria. Dessa forma, a capacidade de ação dos antibióticos torna-se reduzida favorecendo a sobrevivência das bactérias, mesmo na presença de drogas às quais elas seriam naturalmente sensíveis na ausência do mecanismo de efluxo (43). O aumento do efluxo dos antibióticos faz com que este não consiga atingir concentrações citoplasmáticas necessárias para que possa interagir com seu alvo de maneira suficiente para causar morte celular. Este mecanismo pode explicar casos em a resistência fenotípica a um dado antibiótico pode ser detectada, mas não são encontradas mutações genéticas que justifiquem esta resistência (42).

1.9. Detecção de Resistência

A detecção rápida e precisa de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos é fundamental para a escolha do regime de tratamento correto e consequente redução da propagação da doença. Para isso, são realizados em laboratório testes de sensibilidade de *M. tuberculosis* a variados fármacos, através de métodos fenotípicos e moleculares.

Métodos fenotípicos de detecção de resistência a drogas em M. tuberculosis

Método das proporções

O primeiro método fenotípico de detecção da resistência é chamado de método das proporções, que foi descrito por Canetti, Rist e Grosset em 1963 (teste padrão) e em 1969 (teste

simplificado). Esse método envolve o cultivo de *M. tuberculosis* em meio de cultura LJ, onde as drogas são incorporadas antes da coagulação do meio. A versão simplificada do teste, com apenas uma concentração da droga, é a mais utilizada. Esta consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes contidos em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente a uma concentração da droga que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis, mas não o das células resistentes “concentração crítica” (44). Brevemente, a cepa a ser testada é semeada em meio com e sem droga e incubada a 37°C. Então, é realizada a contagem do número de colônias que crescem nos meios sendo utilizadas para determinar se uma amostra é ou não resistente ao antibiótico. A proporção de colônias que devem crescer na presença da droga para que a amostra seja considerada resistente varia de acordo com a droga testada. A primeira leitura é feita com 28 dias de incubação para determinar se houve crescimento de colônias em número suficiente para interpretar os resultados. Em casos de resistência com contagem de colônias suficiente para interpretar o resultado, o diagnóstico de resistência pode ser obtido nesse período. Se não houver resistência, deve-se aguardar a segunda leitura ao final de 42 dias. Essa precaução é para assegurar que não seja emitido um resultado de falsa susceptibilidade devido ao aparecimento tardio de colônias mutantes resistentes (14).

BACTEC MGIT 960 Mycobacterial Detection System

O outro método fenotípico utilizado é o método automatizado *BACTEC MGIT 960 Mycobacterial Detection System* (Becton, Dickson & Company, New Jersey, USA), que se baseia na detecção do consumo de O₂ durante o cultivo de *M. tuberculosis* na presença da droga a ser testada. Como esse método não requer o crescimento completo da cepa, baseando-se apenas no monitoramento de concentrações de O₂ para detectar crescimento, ele é mais sensível, gerando resultados em um período de 6 a 13 dias. Para realização deste teste, o *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT), tubo contendo meio de cultura para o cultivo bacteriano, é utilizado. Além de meio de cultura o tubo possui um anel de silicone contendo um

composto fluorescente cuja emissão é inibida na presença de oxigênio. Ao adicionar micobactérias ao tubo, o crescimento bacteriano acarretará no consumo de oxigênio, o que resultará na emissão proporcional de fluorescência, que é medida pelo aparelho detector a cada 60 minutos (45). O equipamento interpreta o resultado do teste de sensibilidade quando a unidade de crescimento (GU; *Growth Unit*) no tubo controle atinge o valor de 400 (geralmente entre 4 e 13 dias). O aparelho então interpreta os resultados dos tubos com antibióticos em sensíveis, quando o valor da GU do tubo for inferior a 100 e resistentes, quando o valor da GU do tubo for igual ou superior a 100. Os preços do aparelho e dos reagentes são excessivamente altos para a maioria dos estabelecimentos públicos, o que impede seu uso de forma sistemática (45).

Métodos moleculares de detecção de resistência a drogas em M. tuberculosis

Atualmente, métodos moleculares de diagnóstico da tuberculose e de resistência a drogas têm sido amplamente utilizados na clínica, por serem mais rápidos, eficientes e apresentarem maior especificidade e sensibilidade. Os mecanismos genéticos associados à multirresistência de *M. tuberculosis* geralmente envolvem mutações nos genes que codificam as proteínas alvo dos fármacos. As mutações podem produzir trocas de aminoácidos, que geram uma proteína com menos atividade ou menor afinidade pelo fármaco (46). Mutações que modificam a ação dos promotores dos genes, e até mesmo seus reguladores, alterando a sua expressão gênica, também são conhecidas (46). Alguns dos genes envolvidos na resistência a fármacos no tratamento anti-TB podem ser observados no quadro 1.1 (47).

Antibióticos	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>embB</i>	<i>pncA</i>	<i>rrs</i>	<i>eis</i>	<i>tylA</i>	<i>gyrA</i>	<i>rpsL</i>
Rifampicina	X									
Isoniazida		X	X							
Etambutol				X						
Pirazinamida					X					
Amicacina						X	X			
Canamicina						X	X			
Capreomicina							X	X		
Estreptomicina						X	X			X
Ciprofloxacina									X	
Ofloxacina									X	

Quadro 1.1 - Genes envolvidos na resistência a fármacos antituberculose. O quadro relaciona os principais genes envolvidos na resistência aos antibióticos em *M. tuberculosis*.

Sequenciamento

Um dos métodos moleculares de detecção de resistência considerado como padrão ouro é o sequenciamento dos genes mutados responsáveis pelo fenótipo de resistência. Inicialmente, realiza-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para a delimitação e amplificação da região a ser analisada. A região delimitada é então sequenciada, e a sequência de nucleotídeos obtida é alinhada com a sequência de referência para *M. tuberculosis*, para a determinação de possíveis mutações e, conseqüentemente, do diagnóstico de resistência específica a um determinado fármaco (48).

Multiplex allele-specific PCR

Outro método comumente utilizado é o *Multiplex allele-specific PCR* (MAS-PCR), é rápido e simples para o diagnóstico de resistência. Inicialmente esse método foi desenvolvido a fim de identificar mutações no genoma humano relacionadas à fibrose cística, mas logo foi adaptado para o diagnóstico de resistência a drogas em *M. tuberculosis*. A técnica consiste na realização de várias reações de PCR em um só tubo, usando um oligonucleotídeo reverso longo e diversos oligonucleotídeos diretos pequenos e específicos para o diagnóstico de mutações nos códons de interesse (49).

1.10. Metabolômica

A metabolômica é um conjunto de ferramentas de análise molecular integrado nas chamadas metodologias “ômicas”, e que se referem a análises em grande escala da composição química de amostras biológicas complexas. Como o nome indica, a metabolômica envolve a caracterização do metaboloma de sistemas biológicos, avaliando a presença e níveis relativos de pequenas moléculas, comumente conhecidas como metabólitos, nas amostras estudadas (50-53). Metabólitos são compostos de baixo peso molecular (até cerca de 1500 Da, apesar de diferentes autores considerarem valores diferentes), que são uma representação do estado metabólico das amostras estudadas, e que também podem ser utilizados como impressões químicas únicas do metabolismo da amostra biológica em questão (52, 54-57).

Existem duas abordagens distintas nas quais estratégias metabolômicas foram divididas, metabolômica *untargeted* e *targeted*, sendo em geral utilizadas para investigar metabólitos endógenos de forma qualitativa ou quantitativa, respectivamente (55, 58). A metabolômica *untargeted* é baseada na análise qualitativa de vários metabólitos desconhecidos, fornecendo uma visão abrangente sobre o estado metabólico do sistema biológico em estudo sem conhecimento particular de cada metabólito. Já a metabolômica *targeted* é baseada em metabólitos conhecidos que são de interesse do investigador e podem ser usados para a descoberta ou validação de biomarcadores, em que estudos de quantificação relativa podem ser realizados utilizando moléculas de referência para comparação (52, 55, 59).

A metabolômica, é uma das mais novas tecnologias ômicas, e que vem sendo utilizada no campo de estudos de resistência a drogas (60). Esta é uma ferramenta poderosa e com grande potencial, que é considerada por muitos como complementar às outras ciências “ômicas”, como proteômica, genômica e transcriptômica, acrescentando uma peça final para a pesquisa sobre ação de drogas, fisiopatologia de doenças, variação individual de resposta a drogas e no conhecimento dos mecanismos responsáveis pela resistência aos medicamentos (55, 61-64).

Duas técnicas analíticas sofisticadas que geralmente são utilizadas para estudos metabolômicos são a ressonância magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance* - NMR) e a espectrometria de massa (*mass spectrometry* - MS). A ressonância magnética nuclear é a técnica mais simples das duas, uma vez que o fluido biológico não requer qualquer tratamento físico ou químico antes da análise, sendo capaz de analisar amostras biológicas intactas. A NMR é geralmente usada para detectar átomos de hidrogênio em metabólitos. Este método detecta os perfis específicos de absorção de ressonância de metabólitos em um campo magnético. A maior vantagem da técnica da NMR é que após análise por essa ferramenta as amostras ainda podem ser analisadas por outras técnicas. Por outro lado, a principal desvantagem é sua baixa sensibilidade (52, 55, 65).

A espectrometria de massas baseia-se na conversão de moléculas individuais em íons para que possam ser movidos e manipulados por campos elétricos e magnéticos externos, usando a diferença na razão de massa por carga (m/z) de átomos ou moléculas ionizadas para separá-los. A MS é a técnica analítica mais utilizada na metabolômica, pois fornece análises rápidas com alta sensibilidade e seletividade, alta produtividade e alta precisão (52, 55, 65).

A GC-MS, que combina cromatografia gasosa (*gas chromatography*, GC) e espectrometria de massa é a mais utilizada no campo da metabolômica. Este método apresenta alta sensibilidade, mas requer um preparo da amostra demorado, principalmente quando se analisam compostos não voláteis que necessitam de derivatização, ou seja, modificação dos grupos funcionais do composto, a fim de aumentar sua volatilidade, diminuir a polaridade e melhorar sua estabilidade (52, 55, 65, 66).

Atualmente, a LC-MS tem sido cada vez mais aplicada na pesquisa metabolômica. Ela utiliza a cromatografia líquida (*liquid chromatography*, LC) acoplada à MS. Esta técnica analítica apresenta alta sensibilidade e seletividade, além de ser de fácil operação. A LC-MS pode analisar muitas classes de compostos devido à grande variedade de fases estacionárias disponíveis, bem como diferentes modos de separação, como a eluição de fase reversa, com ou

sem emparelhamento iônico, interação hidrofílica e troca iônica. No entanto, tem uma resolução cromatográfica comparativamente mais baixa e uma relação sinal/ruído mais elevada quando comparada com a da GC-MS (52, 65, 66).

Na técnica de espectrometria de massas por infusão direta (DI-MS), a amostra é diretamente introduzida na fonte ESI sem separação cromatográfica utilizando uma seringa. A técnica DI-MS é considerado um método de alto rendimento devido ao seu curto tempo de análise. No entanto, sua seletividade é inferior a LC-MS por não ser possível avaliar o tempo de retenção dos metabólitos (52, 66).

A última técnica, CE-MS, que envolve o emprego de eletroforese capilar (*capillary electrophoreses*, CE), promove a separação de compostos iônicos polares, e tem sido usada como uma técnica complementar à LC-MS e GC-MS. Esta técnica apresenta alta eficiência na análise de compostos polares e iônicos em pouco tempo. No entanto, apresenta baixa reprodutibilidade e sensibilidade quando comparada com as demais técnicas descritas (52, 55, 66). Todos esses métodos carregam suas próprias vantagens, desvantagens e poder preditivo.

Utilizando a abordagem metabolômica, centenas de diferentes compostos podem ser analisados e identificados simultaneamente, permitindo a descoberta de novas atividades enzimáticas e vias metabólicas (67). Até o momento vários grupos de pesquisa utilizaram essa abordagem com o intuito de compreender melhor desde a ação de drogas de primeira e segunda linha no metabolismo de *M. tuberculosis*, bem como para investigar as características metabólicas de cepas de *M. tuberculosis* com mutações pontuais que conferem resistência à uma determinada droga. Alguns destes estudos têm como principal objetivo desenvolver regimes de tratamento mais curtos e mais eficazes (68-70).

Em 2012, Du Preez e colaboradores, caracterizaram a resistência à rifampicina através de GC-MS, comparando o metabolismo de ácidos graxos de duas cepas de *M. tuberculosis* contendo mutações em *rpoB* (S522L e S531L) com uma cepa *wild type* totalmente suscetível à Rif. Os resultados deste estudo demonstraram uma clara diferenciação entre os três grupos de

cepas analisados. Os autores identificaram metabólitos alterados nas cepas mutantes, indicando uma diminuição na síntese de ácidos graxos de cadeia ramificada e um aumento na utilização de ácidos graxos de cadeia curta como fonte de energia. Além disso, a cepa contendo a mutação S531L, que ocorre em mais de 70% das cepas de *M. tuberculosis* resistentes à Rif, demonstrou uma maior capacidade para usar essa fonte de energia alternativa quando comparada à cepa contendo a mutação S522L, menos comum em cepas clínicas. Este foi o primeiro estudo que associou a resistência à Rif e mutações em *rpoB* em *M. tuberculosis* com o metabolismo de ácidos graxos alterado, demonstrando assim o papel que a metabolômica pode desempenhar na identificação de novos marcadores associados a resistência à drogas (68).

Considerando que a forma mais comum de resistência a drogas encontrada em amostras de *M. tuberculosis* é a monorresistência à Inh, vários estudos genômicos e proteômicos já investigaram este fenômeno (69); no entanto, os mecanismos exatos relativos a como isso ocorre, bem como as implicações disso na função e estrutura dos organismos causadores de TB, são apenas parcialmente compreendidos. Assim, Loots em 2014 utilizou a abordagem metabolômica para identificar novas vias metabólicas e biomarcadores que pudessem explicar as características fenotípicas associadas à mutação no gene *katG* e conseqüentemente à resistência à isoniazida em *M. tuberculosis*. A fim de alcançar estes objetivos, os perfis de metabólitos de duas cepas resistentes à Inh e uma cepa *wild type* foram gerados e comparados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (GCxGC-TOF-MS). Através desta análise foi demonstrada uma clara diferença da composição metabólica das diferentes cepas, e os metabólitos que melhor separaram as mesmas foram identificados. Os dados indicam que cepas resistentes à Inh, devido a uma mutação no gene *katG*, que codifica a enzima catalase peroxidase, apresentam maior susceptibilidade ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, adaptaram-se a isso aumentando a síntese de vários compostos envolvidos no aumento da absorção e uso de alcanos e ácidos graxos como fonte de carbono e

energia e síntese de vários compostos diretamente envolvidos na redução do estresse oxidativo (69).

Em 2014, Nandakumar e colaboradores utilizaram cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (LC-TOF-MS) para identificar alterações metabólicas em cepas de *M. tuberculosis* induzidas por doses subletais de Inh, Rif e Sm, respectivamente. Foi identificado um conjunto de alterações no metaboloma nestas condições de cultivo; em uma análise de agrupamento hierárquico, foi identificado um grupo de alterações induzidas comuns aos três antibióticos. Apesar de ter como alvo diversos processos celulares, foi demonstrado nesse estudo que todas as três drogas desencadeiam a ativação das isocitrato liases (ICLs) de *M. tuberculosis*, enzimas metabólicas comumente envolvidas no abastecimento do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Foi demonstrado ainda que cepas de *M. tuberculosis* deficientes em ICL são significativamente mais suscetíveis aos três antibióticos do que a cepa *wild type*, e que esta susceptibilidade pode ser resgatada quimicamente quando o *M. tuberculosis* é incubado na presença de um antioxidante. Estes resultados identificam um papel anteriormente não descrito para as ICLs de *M. tuberculosis* na defesa antioxidante como um mecanismo de tolerância a antibióticos (70).

Considerando toda a importância e poder analítico, a metabolômica pode ser considerada uma ferramenta poderosa para identificar variações metabólicas anteriormente desconhecidas. Estudos como os relacionados anteriormente tem demonstrado que utilizando uma abordagem metabolômica é possível avaliar desde os impactos das drogas no patógeno, até os efeitos da resistência às drogas no metabolismo do patógeno. Assim, o presente estudo visa sobretudo um entendimento mais amplo das diferenças entre os perfis metabólicos de cepas de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de susceptibilidade a drogas de primeira e segunda linha (S, MDR e XDR). Este entendimento é necessário para que possamos identificar marcadores moleculares que determinem os perfis de susceptibilidade com rapidez, tendo em vista que o diagnóstico de resistência é parte importantíssima da clínica e os métodos atuais são

demorados, como é o caso do método fenotípico *BACTEC™ MGIT960™ Mycobacterial Detection System*, ou geram dados limitados, como é o caso do Xpert® MTB/RIF que só detecta resistência à rifampicina.

2. JUSTIFICATIVA

A resistência a antimicrobianos representa um grande e constante desafio da saúde pública. Cepas resistentes a drogas dificultam o tratamento, diminuem as chances de cura e favorecem o espalhamento de doenças infecciosas. Para que este problema seja contornado, faz-se absolutamente necessária a detecção e monitoramento da resistência, de maneira rápida e precisa. Casos de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos utilizados no tratamento são crescentes, e a OMS declarou a TB resistente a drogas uma urgência mundial. Assim, um dos aspectos cruciais para o monitoramento e controle dessas cepas é a rapidez com que a detecção de resistência é alcançada. Atualmente, dois principais métodos de determinação da resistência a antimicrobianos por *M. tuberculosis* são utilizados rotineiramente. O primeiro e mais antigo é o método das proporções, que envolve o cultivo da cepa a ser testada em meio com ou sem a droga e, através da comparação do número de colônias capazes de se desenvolver nestas condições, determina-se susceptibilidade ou resistência da cepa, o que leva pelo menos 21 dias. O segundo é o método automatizado *BACTECTM MGIT960TM Mycobacterial Detection System*, que se baseia na quantificação relativa de crescimento bacteriano através de medições do consumo de O₂; neste teste, o resultado é liberado em média, de 6 a 13 dias após o início do mesmo.

Apesar de amplamente utilizados, ambos os métodos de detecção da resistência descritos acima possuem a desvantagem de necessitarem de dois ciclos de crescimento do microrganismo, um para o isolamento do bacilo do espécimen clínico e outro para a realização do teste de susceptibilidade. Em função do cenário atual da tuberculose no mundo, e do crescente número de cepas resistentes, o desenvolvimento de uma técnica que possa ser realizada diretamente em uma cultura de *M. tuberculosis*, sem a necessidade de um ciclo adicional de cultivo seria extremamente vantajosa, e aceleraria o tempo de detecção da resistência de 4-21 dias para um máximo de 2 dias. Isso permitiria o início do tratamento

adequado com maior antecedência, resultando em um maior sucesso do tratamento e menor desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar o uso da metabolômica como uma ferramenta que pudesse auxiliar na detecção de resistência com mais rapidez quando comparado aos métodos fenotípicos atuais.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar o perfil metabólico de cepas de *M. tuberculosis* sensíveis (S), multirresistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR) a drogas, objetivando identificar marcadores moleculares que identifiquem perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos com rapidez.

Objetivos Específicos

- Selecionar um grupo representativo de cepas do complexo *M. tuberculosis* da coleção de culturas do Laboratório de Referência Nacional.

- Confirmar que as cepas selecionadas fazem parte do complexo *M. tuberculosis* através do teste rápido de detecção de antígeno MPT64.

- Determinar o perfil de susceptibilidade às drogas de primeira e segunda linha de cepas de *M. tuberculosis* selecionadas através de métodos fenotípicos.

- Determinar a presença de marcadores genotípicos de resistência a drogas em cepas de *M. tuberculosis* selecionadas.

- Determinar o perfil metabólico de cepas de *M. tuberculosis* que apresentem sensibilidade (S), multirresistência (MDR) ou extensiva resistência às drogas (XDR).

- Utilizar técnicas de estatística, análise de dados multivariados e análise classificatória para detectar padrões nos perfis metabólicos que permitam a identificação do perfil de susceptibilidade de cada cepa.

4. METODOLOGIA

4.1. Fluxograma

A primeira etapa do presente estudo consistiu na seleção de cepas de *M. tuberculosis* de diversas origens. Assim, foram selecionadas cepas de *M. tuberculosis* previamente isoladas de amostras clínicas, e que fazem parte da coleção de cepas do Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose e Micobacterioses Ângela Maria Werneck, do Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF). Em seguida, a identidade das cepas como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* foi confirmada através do uso do teste imunocromatográfico de detecção de antígeno MPT64 (SD, Yongin, Coréia). Em seguida, as cepas foram submetidas ao teste de sensibilidade pelo método fenotípico *BACTEC™ MGIT960™ MYCOBACTERIAL DETECTION* para fármacos de 1ª e 2ª linha. Após a realização dos testes de sensibilidade, foram extraídos metabólitos e DNA das cepas para posterior análise por espectrometria de massas e sequenciamento dos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *rrs* e *gyrA* (Figura 4.1).

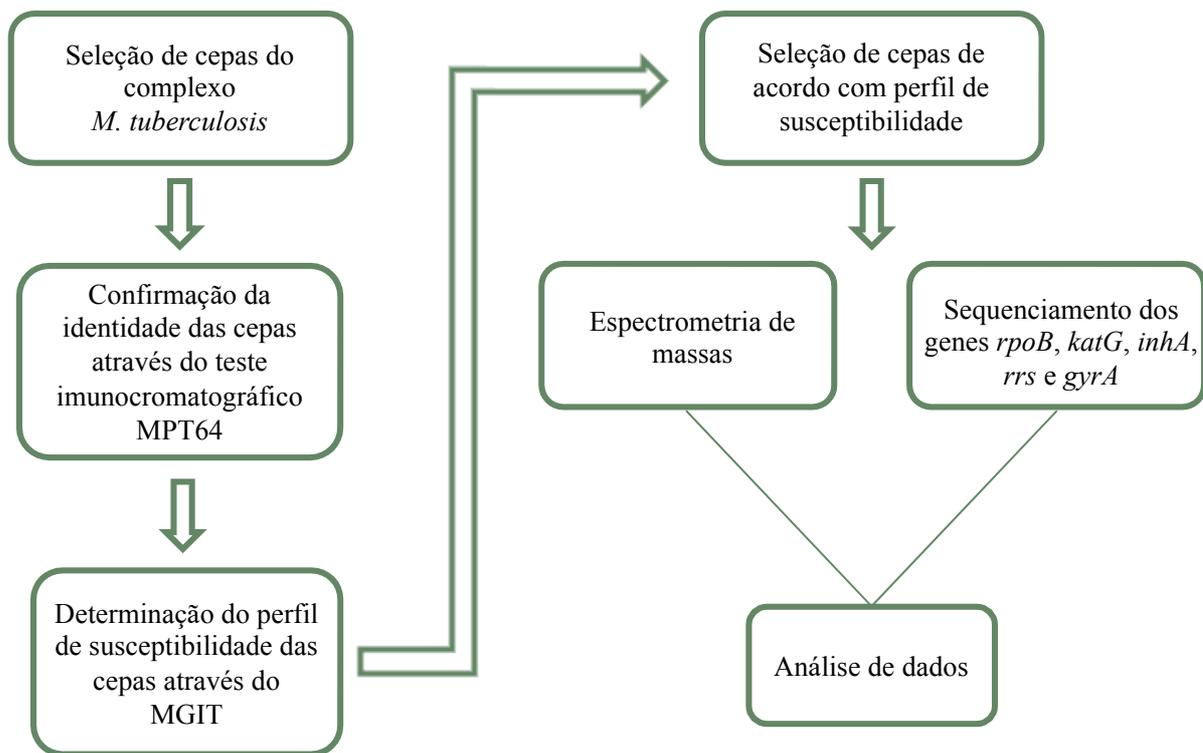


Figura 4.1: Fluxograma do estudo. Fluxograma utilizado para realização do trabalho.

4.2. Cepas Utilizadas

Ao todo, 53 cepas identificadas como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose e Micobacterioses Ângela Maria Werneck (CRPHF/ENSP/FIOCRUZ), armazenadas a -70°C , foram utilizadas.

4.3. Confirmação da Identidade das Cepas Utilizadas

As cepas foram submetidas ao teste rápido imunocromatográfico SD Bioline TB Ag MPT64 RAPID[®], elaborado pela *Standard Diagnostics, Inc.* (SD, Yongin, Coréia), que utiliza anticorpos monoclonais para detectar a proteína MPT64 (24 kDa), um antígeno específico de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* codificado na região de diferenciação RD2. Embora esta região esteja presente na cepa de *Mycobacterium bovis* – BCG Moreau, que é

utilizada para vacinação no Brasil que pode desencadear BCGite, esse teste é recomendado pela OMS para diferenciar Complexo *M. tuberculosis* das micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT).

Para a realização do teste, uma alça bacteriológica descartável estéril foi utilizada para remover o crescimento bacteriano do meio sólido LJ e produzir uma suspensão de bactérias em um tubo com pérolas de vidro e 200 µL de água estéril. O teste é realizado com o auxílio de um cassete, onde 100 µL da suspensão de células são adicionados ao poço de amostra, e o cassete é então incubado à temperatura ambiente por 15-30 min. O cassete possui duas marcações (Figura 4.2). A primeira delas é a marcação “C”, que representa o controle do teste. Após o início do teste uma faixa rosa deve ser claramente identificada nesta marcação; caso contrário, o teste é considerado inválido. A segunda marcação é a “T”, que representa o teste propriamente dito; a amostra flui através da membrana e o anticorpo conjugado com ouro coloidal liga-se ao antígeno MPT64 presente na amostra, formando um complexo antígeno-anticorpo conjugado, produzindo as linhas coloridas. Na ausência do MPT64 na amostra testada, não ocorrerá formação da linha teste “T”. Caso haja a identificação de uma banda rosa na posição “T” a amostra é considerada como positiva para MPT64, caracterizando-a como membro do complexo *M. tuberculosis*. A ausência da faixa rosa na posição "T" indica que a amostra é negativa para o antígeno MPT64, e, portanto, caracteriza uma micobactéria não causadora de tuberculose (Figura 4.2).

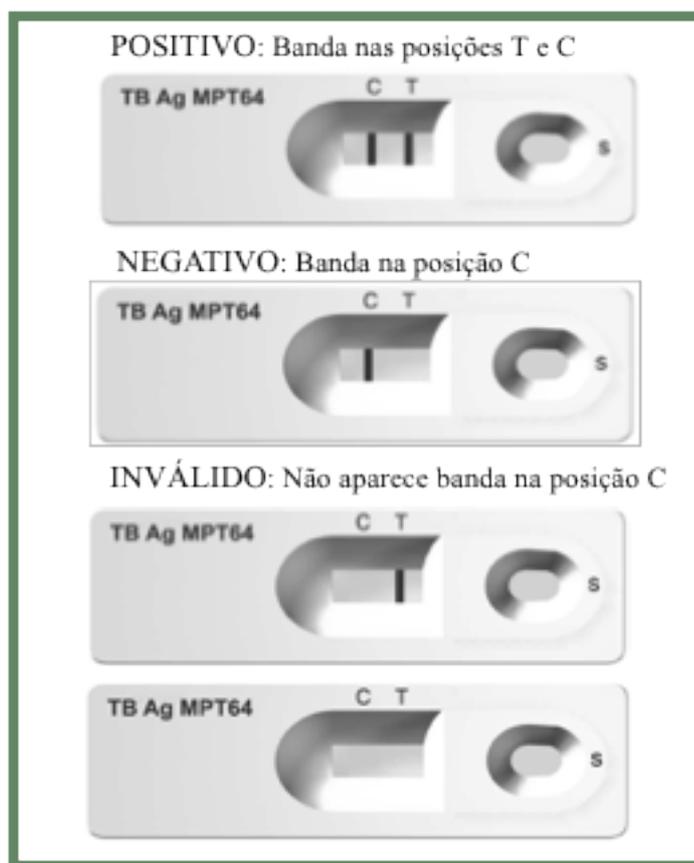


Figura 4.2 - Representação dos possíveis resultados do teste SD Bioline TB Ag MPT64 RAPID®. O painel superior representa um resultado positivo para MPT64, quando a faixa rosa é identificada nos marcadores “T” e “C”, caracterizando a amostra como pertencente ao complexo *M. tuberculosis*. O segundo painel representa um resultado negativo, quando a banda rosa só aparece na posição “C”, mas não na posição “T”. Já os dois painéis inferiores representam resultados inválidos. Em ambos os casos, a falta de coloração rosa na posição “C” indica que a amostra não se espalhou por toda a superfície do teste, ou que a qualidade da amostra estava comprometida, invalidando o resultado obtido. S: amostra; T: teste; C: controle.

4.4. Teste de Sensibilidade pelo Sistema *BACTEC™ MGIT960™ MYCOBACTERIAL DETECTION*

Para realização do teste de sensibilidade, as cepas foram semeadas em meio sólido LJ e incubadas a 37°C por aproximadamente 20 dias para obtenção do crescimento bacteriano necessário e posterior realização dos testes de sensibilidade. Foram testados os fármacos de primeira linha Rif, Iso, Sm e Emb (Becton, Dickson & Company, New Jersey, USA) e também os fármacos de segunda linha Oflo, Amk, Cap e Kan (Sigma-Aldrich). Para tal, foi utilizado o sistema automatizado *BACTEC™ MGIT960™ MYCOBACTERIAL DETECTION* (Becton, Dickson & Company, New Jersey, USA).

O sistema BACTEC MGIT 960 baseia-se na quantificação relativa de crescimento bacteriano através de medições do consumo de O₂. O tubo de MGIT contém 8 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9, enriquecido com uma solução de ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC), e um anel fluorescente de rutênio, cuja fluorescência é inibida por O₂. Periodicamente, o aparelho mede a fluorescência deste anel. Dessa forma, à medida que a micobactéria cresce no meio de cultura e consome o O₂ a fluorescência medida aumenta, indicando crescimento bacteriano.

Para realização do teste de susceptibilidade a drogas, uma alça bacteriológica descartável estéril foi utilizada para remover o crescimento bacteriano do meio sólido LJ e produzir uma suspensão de bactérias em um tubo com pérolas de vidro de 5 mm de diâmetro e 200 µL de água destilada estéril. Em seguida, a suspensão foi deixada em repouso por 15 minutos para decantar as partículas maiores e para evitar dispersão de aerossóis. Foi retirado cerca de 1 mL do sobrenadante e gotejado em um tubo contendo 4 mL de água destilada estéril, ajustando a turvação da suspensão até que ela correspondesse ao tubo número 1 ($\approx 3 \times 10^8$ células) da escala nefelométrica de McFarland (padrão de turvação mais frequentemente utilizado para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos) (McFarland, 1907). Então 1 mL da suspensão acima foi diluída em 4 mL de água destilada estéril (suspensão 1:5) e 0,1 mL da suspensão em 10 mL de água destilada estéril (suspensão 1:100). Feito isso, foi inoculado no tubo MGIT o controle de crescimento, representado por 0,5 mL da suspensão 1:100. Nos tubos contendo os fármacos, foi adicionado 0,5 mL da suspensão 1:5 em cada um dos tubos contendo Rif (1,0 µg/mL), Iso (0,1 µg/mL), Sm (1,0 µg/mL), Emb (5,0 µg/mL), Amk (1,0 µg/mL), Oflo (2,0 µg/mL), Kan (5,0 µg/mL) ou Cap (2,5 µg/mL). Ao final, todos os tubos foram incubados no sistema BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickson & Company). Como descrito acima, após a adição da suspensão bacteriana e posterior consumo de O₂ pelas bactérias, o anel de rutênio passa a emitir fluorescência de maneira proporcional ao crescimento bacteriano, detectado pelo aparelho a cada 60 minutos. O resultado é liberado, em

média, de 4 a 13 dias após o início do teste, quando o tubo controle atinge o valor de 400 unidades de crescimento (GU, *Growth Units*). O aparelho considera uma cepa sensível quando o crescimento do tubo com droga for menor que 100 GUs, e resistente quando este valor for igual ou maior que 100 GUs.

4.5. Extração de Metabólitos

A partir dos resultados do teste de sensibilidade, foram selecionadas cepas para análise metabolômica. Três grupos de amostras foram utilizados neste estudo. Foram selecionadas 10 cepas sensíveis às drogas, 8 cepas que apresentaram MDR, caracterizada pela resistência concomitante à Inh e Rif e o terceiro grupo de amostras foi composto por 10 cepas apresentando XDR às drogas para o primeiro experimento e 8 cepas sensíveis às drogas, 9 cepas que apresentaram MDR e 8 cepas apresentando XDR às drogas para o segundo experimento. A XDR se caracteriza pela MDR adicionada à resistência à ofloxacina e uma de três drogas injetáveis (amicacina, canamicina ou capreomicina).

Para realizar a extração de metabólitos, uma alça bacteriológica descartável estéril foi utilizada para remover todo o crescimento bacteriano do meio sólido LJ e produzir uma suspensão de bactérias em um tubo com pérolas de vidro de 5 mm de diâmetro e 2 mL de meio líquido Middlebrook 7H9 contendo tween 80 e suplementado com OADC. Esta suspensão bacteriana foi diluída 1:200 em meio líquido Middlebrook 7H9 e a densidade ótica (600 nm) da suspensão foi medida usando um espectrofotômetro. A suspensão foi então diluída a fim de se obter uma densidade ótica de 5 para todas as amostras; o volume exato da suspensão bacteriana usado na diluição foi determinado de acordo com a densidade celular da suspensão, para que todas as extrações tivessem a mesma concentração de células por volume de meio. Em seguida, volumes idênticos de cada amostra foram centrifugados por 4 minutos a 4.058 g, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 500 µL de acetonitrila 100% de alta

pureza (Sigma-Aldrich). O pellet ressuspendido foi homogeneizado intensamente com auxílio de um vórtex para que desmanchasse, submetido a banho ultrassônico por 3 minutos e centrifugado novamente por 4 minutos a 4.058 g. O sobrenadante foi coletado, filtrado, utilizando filtros de seringa com poros de 0,22 μm , e estocado a -20°C .

4.6. Espectrometria de Massas – Quadrupolo (Synapt G1)

As análises foram realizadas no Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) em colaboração com o Dr. Julio Jablonski Amaral e a Dra. Soraya de Mendonça. As análises foram realizadas através de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) em um sistema de espectrometria de massas de alta resolução (HDMS) Synapt G1 (Waters, Brasil). O solvente no qual os extratos foram preparados foi evaporado em uma centrífuga equipada com uma bomba de vácuo e as amostras secas foram ressuspendidas em 1 mL de solução de acetonitrila 60% (em água), mantidas em banho ultrassônico por 5 minutos, e centrifugadas a 14.000 g a 6°C durante 30 minutos. Cada amostra foi dividida em duas partes, para as condições de análise nos modos positivo e negativo. Para as análises em modo positivo foi adicionado ácido fórmico a 0,1%; já para o modo negativo foi adicionado hidróxido de amônio a 0,5%. O controle de qualidade das análises foi realizado com uma mistura de todas as amostras, a qual foi injetada no início e no final das análises, assim como após cada grupo de 10 amostras. A calibração do espectrômetro de massas foi realizada com solução de ácido fosfórico na faixa de m/z 50 a 2.000. As amostras foram injetadas aleatoriamente na vazão de 10 μL por minuto, e os espectros foram adquiridos na faixa de m/z 100 a 1.000 por cinco minutos em modo dinâmico e tempo de varredura de 0,8 segundos. As análises em modo positivo foram realizadas com voltagem do capilar em 3,2 kV, voltagens no cone de amostragem e de extração respectivamente em 30 e 5 V. Os parâmetros da fonte para análise em modo negativo foram 3 kV no capilar, e cone de amostragem e extração

respectivamente em 50 e 6 V. Outros parâmetros experimentais incluem a temperatura da fonte a 80°C, temperatura de dessolvatação a 100°C, vazão do gás em 380 L por hora e voltagem da célula de colisão em 6 V.

Os dados de espectrometria de massas foram adquiridos usando o software MassLynx™ v.4.1 (Waters, Milford, MA, USA), sendo processados tanto por ferramentas deste mesmo programa quanto pelo aplicativo MarkerLynx™ XS, incluso no mesmo pacote. Primeiramente, os dados brutos foram transformados para modo centroide (valor da ponta de cada pico – linha reta), usando-se a ferramenta “Accurate Mass Measure” e, em seguida, os dados resultantes das massas foram processados usando-se o aplicativo MarkerLynx™, usando-se os seguintes parâmetros: “analysis type” = “combined scan range”, “peak separation” (Da) = 0,02 e “marker intensity threshold (counts)” = 3.000, 6.000 ou 12.000. Finalmente, foi gerada uma matriz de dados bidimensional (m/z versus intensidade do pico) para cada grupo de amostras, sendo exportada para um formato propício para posterior análise dos dados.

4.7. Espectrometria de Massas – Quadrupolo – Orbitrap (Q Exactive™ Plus)

As análises foram realizadas no Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) - Laboratório de Proteômica (LabProt), do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro em colaboração com o Dr. Fábio C. S. Nogueira, Dr. Joseph Evaristo e Dra. Geisa Caprini. As análises foram realizadas através de espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida com ionização por eletrospray (ESI-MS) em um sistema de espectrometria de massas de alta resolução (HDMS) Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ (Thermo Scientific).

Inicialmente, 100 µL das amostras em solução de 100% acetonitrila foram coletados e o solvente foi evaporado em uma centrifuga equipada com uma bomba de vácuo. Em seguida, as amostras secas foram reconstituídas em 200 µL de metanol 5% (em água). O controle de

qualidade das análises foi realizado com uma mistura de todas as amostras, contendo 10 μL de cada amostra em 200 μL de metanol 5%, a qual foi injetada no final das análises de cada grupo de 7 amostras. Além disso, uma amostra controle contendo apenas acetonitrila 100% evaporada e reconstituída com 200 μL metanol 5% foi injetada em triplicata técnica.

A calibração do espectrômetro de massas foi realizada antes das aquisições, utilizando solução de calibração comercial (Thermo Scientific, San Diego, USA) para o modo positivo na faixa de m/z de 195 a 1.522, e para o modo negativo na faixa de m/z de 265 a 1.680. A etapa de cromatografia líquida foi realizada utilizando uma coluna C_{18} Zorbax 2.1 x 50 mm, poro de 1,8 μm (Agilent) em um fluxo de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante uma corrida cromatográfica de 15 min utilizando como fase móvel metanol contendo 0,1% de ácido fórmico (fase B) em um gradiente de: 0-1 min - 5% fase B, 9 min - 60% fase B, 10 min - 100% fase B, 12 min - 100% fase B, 13 min - 5% fase B, 15 min - 5% fase B, faixa de m/z de 67 a 1.005, em modo *profile*, com resolução de 70.000 em *FullMS*. A tensão do cone de amostragem foi ajustada para +4,0 kV em modo positivo. A temperatura do capilar foi ajustada para 320°C, e o nível de rádio frequência aplicada à lente foi de 50 (unidade arbitrária). O gás de dessolvatação foi nitrogênio de alta pureza, a uma vazão de 5 L/h a 50°C. O AGC (controle de ganho automático) foi de 1×10^6 e o máximo de IT (*ion trap* - armadilha de íons) de 50 ms. Os perfis de MS^2 foram adquiridos como dependentes de dados (*DDA – data dependent acquisition*) dos 15 íons mais abundantes a cada 100 ms, com 17.500 de resolução, em modo centróide, AGC 1×10^5 e máximo IT de 100 ms. A janela de isolamento usada foi de 2,0 m/z e desvio de 0,5 m/z . A energia de colisão (*CE – collision energy*) foi alternada entre 15/20/30 eV.

Os dados de espectrometria de massas foram adquiridos utilizando o software Xcalibur™, sendo processados pelo software de identificação de pequenas moléculas *Compound Discoverer 2.1* (Thermo Fisher Scientific, USA) utilizando o fator de estudo *Categorical Factor* para identificar os diferentes grupos de amostras e realizar razões entre os mesmos. O fluxograma de trabalho escolhido para o software foi o *Untargeted Metabolomics*

with Statistics Detect Unknowns with ID using Online Databases. Os bancos de dados utilizados pelo software para realizar identificações putativas foram ChEMBL, *E. coli* Metabolome Database, Human Metabolome Database, KEEG, LipidMAPS, MassBank e Metabolights.

4.8. Análise de Dados

Para estimar as diferenças na composição metabólica entre cepas de *M. tuberculosis* pertencentes aos grupos com diferentes perfis de susceptibilidade a drogas, primeiramente utilizamos o software Microsoft Excel[®] para filtrar os dados para incluir apenas metabólitos que foram identificados em um número significativo de amostras (80%) de pelos menos um dos grupos de amostras testadas (S, sensíveis; MDR, *multidrug resistant*; XDR, *extensively drug resistant*). Após, foi realizada uma análise de componente principal (*Principal Component Analysis*, PCA) utilizando o software MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>), com o intuito de se identificar variações gerais na composição metabólica comparativa entre os grupos testados. Então, os níveis relativos dos metabólitos detectados foram comparados entre os grupos de amostras. Para isso, médias das intensidades foram calculadas para cada um dos três grupos de amostras. Razões entre estas médias foram então obtidas, e metabólitos com diferenças de 2 vezes ou mais em qualquer uma das comparações executadas (S versus MDR, S versus XDR e MDR versus XDR) foram selecionados como potencialmente interessantes. Posteriormente, testes *t* de Student foram realizados com estes metabólitos, e aqueles mostrando diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) foram então selecionados como potenciais marcadores dos diferentes grupos examinados. A partir destes dados, também com auxílio do software MetaboAnalyst, foram realizadas análises de agrupamentos hierárquicos com base no grau de similaridade dos perfis de abundância dos metabólitos com maior poder discriminatório entre os grupos, de modo a gerar dendrogramas. Além das análises utilizando o MetaboAnalyst,

foram realizadas análises manuais utilizando os softwares Microsoft Excel[®] e GraphPad Prism, a fim de gerar gráficos representativos da abundância relativa dos íons em um determinado grupo de cepas.

4.9. Extração de DNA

O protocolo de extração de DNA de cepas de *M. tuberculosis* utilizado divide-se em duas fases e foi desenvolvido no Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose do CRPHF. Na fase A, com auxílio de uma alça bacteriológica descartável estéril, parte da cultura bacteriana foi retirada do meio sólido LJ e transferida para um microtubo de 2 mL contendo pérolas de vidro e agitadas intensamente por 1 min com auxílio de um vórtex. Em seguida, 300 µL de TE (pH 8,0 - Tris 10 mM+ EDTA 1 mM) e Triton X100 1% (pH 8,0) foram adicionados, e novamente a solução foi agitada intensamente por 1 minuto. Após a agitação, os microtubos foram colocados em repouso à temperatura ambiente por 8 min. Na fase B, 100 µL do tampão de lise (partes iguais de TE-Triton a 1%, Chelex 100 a 15% e Tween 20 a 0,5%) foram adicionados em microtubo com capacidade de 0,5 mL e adicionados 50 µL da mistura obtida na Fase A de extração. Então, a solução foi agitada por 1 min e aquecida em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Quebec, Canadá) por 20 min a 100°C. Em seguida, a solução foi agitada novamente por 2 min e centrifugada a 4.058 g por 8 min para obter duas camadas distintas. O sobrenadante desta solução foi utilizado como molde na técnica de PCR.

4.10. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Amplificação Parcial dos Genes

rpoB, inhA, katG, gyrA e rrs

Para amplificação dos genes alvos foi feito um mix para a reação de PCR contendo água estéril *qsp* 50 µL, 5 µL de tampão de reação 10X, 3 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,4 µL do mix de

dNTPs (cada dNTP - 25 mM), 0,2 µL da enzima Taq Polimerase (5 U/µL – Invitrogen, Carlsbad, USA) e 1 µL de cada um dos *primers* (20 pmoles/µL). Os *primers* obtidos da Integrated DNA Technologies, o volume do DNA das amostras assim como as etapas de reação de amplificação para cada gene estão descritos abaixo no quadro 4.1. Todas as reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, USA). Para o gene *katG* foi utilizado 0,3 µL da enzima Taq Polimerase (5 U/µL – Invitrogen, Carlsbad, USA) e para os genes *gyrA* e *rrs* o volume de MgCl₂ (50 mM) foi 1,5 µL.

Gene	Primer - Forward	Primer - Reverse	Reação de amplificação
<i>rpoB</i>	5'TCGACGCTGACCGAAGA3	5'GACGTCCATGTAGTC3'	1. Desnaturação a 96°C por 5 min.; 2. Desnaturação 28 ciclos de 50 segundos a 95°C; 3. Anelamento 4 segundos a 54°C; 4. Extensão por 30 segundos a 72°C e 5. Extensão final de 3 min a 72°C
<i>inhA</i>	5'CAGCCACAGCGCTTTTGA3'	5'CCTCGACCGGACCCTGGT3'	1. Desnaturação a 95°C por 4 min. 2. Desnaturação 35 ciclos de 30 segundos a 95°C; 3. Anelamento 30 segundos a 60°C; 4. Extensão por 60 segundos a 72°C e 5. Extensão final de 4 min a 72°C
<i>katG</i>	5'CAAGGAAGCCACCTGGCTC3'	5'TCTCGGTGGATCAGCTTATA3'	1. Desnaturação a 96°C por 3 min. 2. Desnaturação 25 ciclos de 30 segundos a 96°C; 3. Anelamento 40 segundos a 54°C; 4. Extensão por 60 segundos a 72°C e 5. Extensão final de 7 min a 72°C
<i>gyrA</i>	5'CCGGATCGAACCGTTGAC3'	5'GTTAGGGATGAAATCGACTG3'	1. Desnaturação a 95°C por 2 min. 2. Desnaturação 20 ciclos de 60 segundos a 94°C; 3. Anelamento 60 segundos a 72°C 4. Extensão de 60 segundos a 72°C 5. Desnaturação 30 ciclos de 60 segundos a 94°C, 6. Anelamento 60 segundos a 60°C; 7. Extensão 60 segundos a 72°C e 8. Extensão final de 10 min. a 72°C.
<i>rrs</i>	5'GTGAGATGTTGGGTTAAGTCC3'	5'TGGTGCTCCTTAGAAAGGAG3'	1. Desnaturação a 94°C por 2 min. 2. Desnaturação 20 ciclos de 60 segundos a 94°C; 3. Anelamento 60 segundos a 72°C 4. Extensão de 60 segundos a 72°C 5. Desnaturação 30 ciclos de 60 segundos a 94°C, 6. Anelamento 60 segundos a 62°C; 7. Extensão 60 segundos a 72°C e 8. Extensão final de 10 min. a 72°C.

Quadro 4.1 - Etapas de reação de amplificação para amplificação parcial dos genes *rpoB*, *inhA*, *katG*, *gyrA* e *rrs*. O quadro relaciona a sequência dos *primers* utilizados assim como as etapas de reação de amplificação para cada gene.

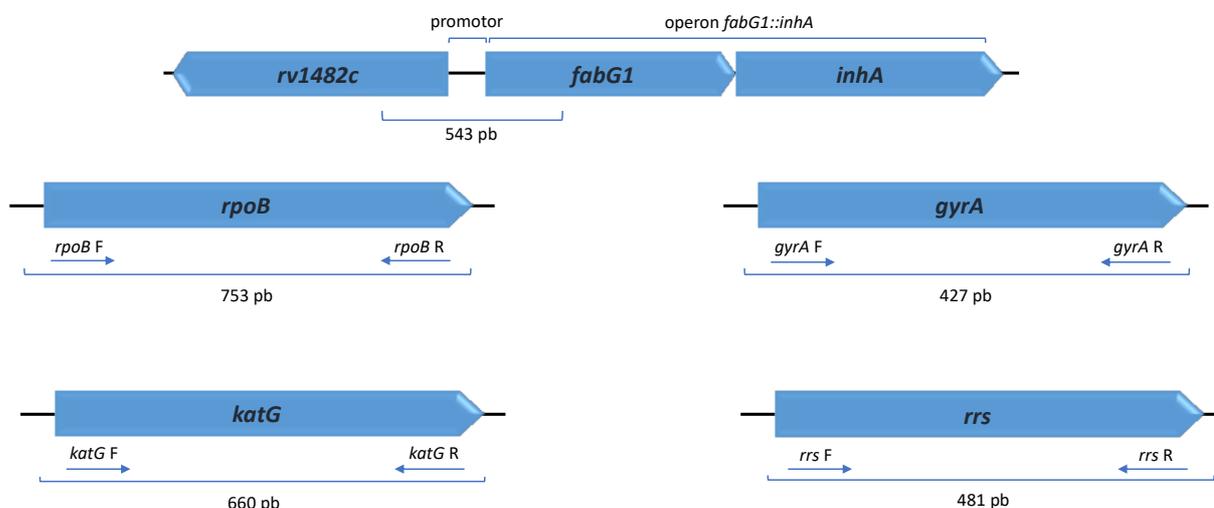


Figura 4.3 – Desenho dos primers utilizados nesse estudo. Desenho dos *primers* forward e reverse utilizados no PCR dos genes *inhA*, *rpoB*, *katG*, *gyrA* e *rrs*.

4.11. Eletroforese

Os produtos da PCR foram observados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 1X (pH 8,2) (TBE). O gel foi preparado em cuba com pentes que fazem a separação dos poços, onde foram aplicados os produtos de cada PCR. Cada gel foi colocado em uma cuba de eletroforese horizontal (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) contendo tampão TBE 1X. Em cada poço foi acrescentada uma solução contendo 2 µL de solução tampão da amostra (ABF), composta por sacarose, ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), azul de bromofenol e água destilada, 1 µL de GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) e 2 µL da amostra da PCR. Além disso, em um dos poços foi aplicado o marcador de peso molecular, 100 bp DNA Ladder (EasyPath, São Paulo, Brasil). Cada gel foi submetido a uma corrente elétrica de aproximadamente 100 V por cerca de 30 minutos. Após o término da corrida eletroforética, o gel foi observado em um transiluminador MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel), sob a incidência de luz UV no comprimento de onda de 310 nm. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados através da comparação com o marcador de peso molecular.

4.12. Purificação dos Produtos da PCR

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Illustra GFX PCR DNA and *Gel Band Purification Kit* (GE-Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Este kit contém tubos coletores e colunas para a purificação de DNA. Em cada tubo com DNA, foi adicionado 500 µL da solução “*Capture buffer type 3*” e os tubos foram centrifugados por 30 segundos a 16.089 g, descartando-se em seguida a solução que atravessou a coluna. Logo após, foi adicionado 500 µL da segunda solução “*Wash buffer type 1*”, e centrifugou-se os tubos por mais 30 segundos a 16.089 g. Depois de descartar a solução e o tubo coletor, a coluna foi colocada dentro de um

novo microtubo, onde foi adicionada a solução “*Elution buffer type 6*” em um volume que variou entre 35 a 50 μL dependendo da intensidade da banda visualizada no gel de eletroforese: quanto mais forte a banda mais solução tampão foi adicionada. Após 2 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se cada microtubo por 2 minutos a 16.089 g e o líquido contendo o produto da PCR purificado foi estocado a -20°C .

4.13. Reação de Sequenciamento

Para a realização da reação de sequenciamento, utilizou-se uma microplaca de 96 poços, que foi montada a fim de realizar o sequenciamento das duas fitas, *forward* e *reverse*. Em cada poço foi adicionada uma solução contendo os seguintes reagentes: 1 μL do tampão de diluição 5X, 1,5 μL de água Milli-Q estéril, 1,5 μL de *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1* (Applied Biosystems), 4 μL do *primer* (0,8 pmoles/ μL) e 2 μL do produto da PCR correspondente. A microplaca foi incubada em um termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), sendo utilizado o seguinte ciclo: 96°C por 1 minuto para desnaturação inicial e 25 ciclos de 95°C por 10 segundos para desnaturação, 50°C por 5 segundos para anelamento e 60°C por 4 minutos para extensão dos fragmentos.

4.14. Precipitação da Reação de Sequenciamento

Para precipitar o DNA amplificado na reação de sequenciamento foram adicionados 2,5 μL de EDTA 125 mM, pH 8, em cada poço e as soluções foram homogeneizadas com o auxílio de uma micropipeta. Em seguida, 30 μL de etanol 100% foram adicionados em cada poço. A placa foi então selada com uma tampa de silicone e brevemente agitada em vórtex para misturar o conteúdo. A placa foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo de luz, e, então centrifugada por 45 minutos a 1.650 g em centrífuga refrigerada a 4°C . Ao término da

centrifugação o sobrenadante foi descartado vertendo-se a placa suavemente sobre um papel absorvente, e foi realizada uma breve centrifugação com a placa invertida para remover o etanol adicionado. Após, 30 μ L de etanol 70% foram adicionados em cada poço e a placa foi centrifugada novamente em centrífuga refrigerada a 4°C por 15 minutos a 1.650 g. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi descartado suavemente e foi realizada uma breve centrifugação com a microplaca invertida. A placa foi então colocada para secar, não vedada, em um termociclador a 60°C por 10 minutos, com a tampa aberta e coberto com papel alumínio, para não haver exposição à luz.

4.15. Desnaturação

Foram adicionados 10 μ L de formamida HI-DI (Applied Biosystems) em cada poço. Para que ocorresse a desnaturação, as microplacas foram centrifugadas brevemente e colocadas em um termociclador *Peltier Thermal Cycler MJ96+/MJ96G* (Biocycler, Ramsey, USA) a 95°C por 3 minutos, e em seguida colocada em uma cuba com gelo por 10 minutos.

4.16. Sequenciamento

Logo após a desnaturação do DNA a microplaca foi levada para o sequenciador modelo *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) para eletroforese e detecção fluorimétrica automatizada.

4.17. Análise das Sequências

As sequências foram editadas utilizando o programa *ChromasPro v. 1.5*. Logo após, as sequências foram analisadas utilizando um programa de alinhamento, BLAST (*Basic Local*

Alignment Search Tool), disponível online (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que permite a comparação das sequências obtidas com as sequências de cepas tipo obtidas do *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Análises de mutações foram realizadas utilizando-se o programa *ApE A Plasmid Editor*, desenvolvido na *University of Utah* e disponível gratuitamente online (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

5. RESULTADOS

As 53 cepas de *M. tuberculosis* incluídas nesse estudo foram avaliadas quanto à sua sensibilidade aos fármacos de primeira (estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol) e segunda linha (amicacina, ofloxacina, kanamicina e capreomicina) através do sistema *BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System* (BD, New Jersey, USA). Como tais cepas fazem parte da coleção de culturas do laboratório, resultados de alguns testes de sensibilidade já estavam disponíveis. Tais resultados foram usados para guiar a escolha de cepas com diferentes perfis de susceptibilidade. Estas cepas foram então testadas novamente para todas as drogas citadas, independentemente de existência de resultados anteriores (Tabelas 5.1 e 5.2).

Após o resultado desta análise, visando avaliar potenciais diferenças metabólicas entre as amostras dos grupos com perfis de susceptibilidade distintos, foram selecionadas algumas amostras de cada um destes grupos para as etapas subsequentes. Assim, 10 cepas sensíveis às drogas de primeira linha (S1-S10), isto é, estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol foram selecionadas. Foram também selecionadas 8 cepas apresentando MDR, a qual é caracterizada pela resistência concomitante à Inh e Rif (M1-M8). O terceiro grupo de amostras foi composto por 10 cepas apresentando XDR, que se caracteriza pela resistência concomitante à Inh e Rif adicionada da resistência à Oflo e uma de três drogas injetáveis (Amk, Kan ou Cap) (X1-X10). Para evitar que múltiplos fatores fossem introduzidos nas nossas comparações, dificultando assim a análise dos resultados obtidos, foram selecionadas amostras com perfis de susceptibilidade o mais semelhante possível. Assim, as cepas MDR escolhidas apresentam resistência apenas a isoniazida e rifampicina, sendo sensíveis a todas as outras drogas, de primeira e segunda linha. Quanto às cepas XDR, em alguns casos os perfis de susceptibilidade às drogas injetáveis não foram idênticos; isto ocorreu porque não havia cepas suficientes em nossa coleção com os mesmos perfis de susceptibilidade a estas drogas. Assim, selecionamos

cepas com perfis de susceptibilidade os mais próximos possíveis, de modo a minimizar a variabilidade dos resultados (Tabela 5.1). As 28 amostras foram então estudadas quanto aos seus perfis metabólicos, como descrito em detalhes abaixo.

Tabela 5.1 – Cepas selecionadas para o primeiro experimento e seus resultados de detecção do antígeno MPT64 e testes de susceptibilidade.

Cepa	MPT64	Sm	Inh	Rif	Emb	Amk	Oflo	Kan	Cap
S1	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S2	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S3	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S4	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S5	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S6	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S7	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S8	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S9	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S10	+	S	S	S	S	S	S	S	S
MDR1	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR2	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR3	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR4	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR5	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR6	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR7	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR8	+	S	R	R	S	S	S	S	S
XDR1	+	R	R	R	S	R	R	R	R
XDR2	+	R	R	R	S	R	R	R	R
XDR3	+	S	R	R	S	R	R	R	R
XDR4	+	S	R	R	S	R	R	R	R
XDR5	+	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR6	+	R	R	R	S	R	R	R	R
XDR7	+	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR8	+	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR9	+	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR10	+	R	R	R	R	R	R	R	R

+: resultado positivo no ensaio de detecção do antígeno MPT64. Sm: estreptomina; Inh: isoniazida; Rif: rifampicina; Emb: etambutol; Amk: amicacina; Oflo: ofloxacina; Kan: canamicina; Cap: capreomicina. R: resistente; S: sensível.

Após obtenção dos resultados, um segundo grupo de amostras foi selecionado. Para simplificar o texto e facilitar sua compreensão, estas duas análises independentes são chamadas, ao longo desta dissertação, de primeiro e segundo experimentos. Assim, para o segundo

experimento foram selecionadas outras 8 cepas sensíveis às drogas de primeira linha (S11-S18), 9 cepas apresentando multirresistência (M9-M17) e 8 cepas apresentando extensiva resistência às drogas (X11-X18). Assim como no primeiro experimento, e pelo mesmo motivo, os perfis de susceptibilidade às drogas injetáveis das cepas utilizadas no segundo experimento não foram idênticos (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Cepas selecionadas para o segundo experimento e seus resultados de detecção do antígeno MPT64 e testes de susceptibilidade.

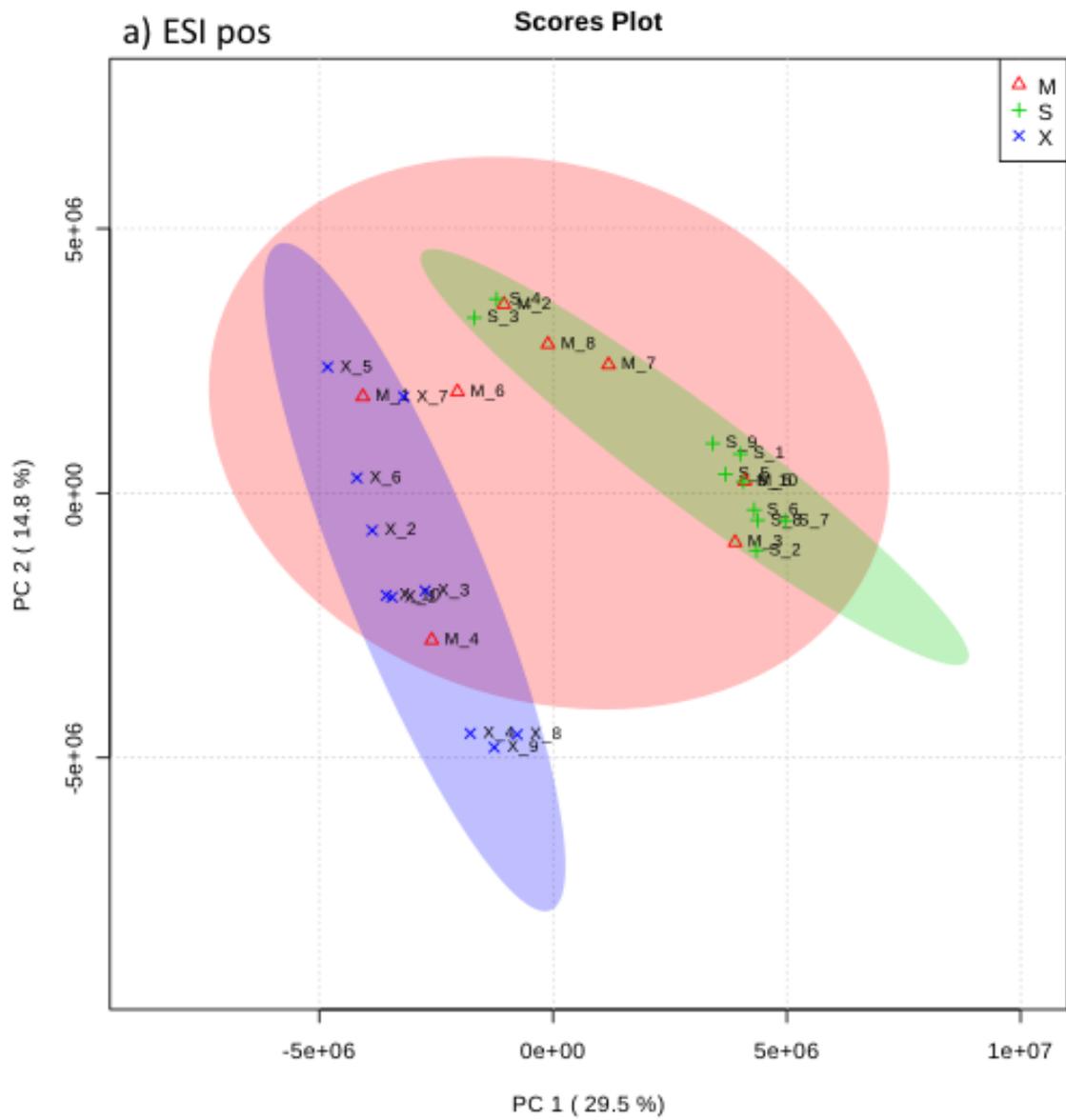
Cepa	MPT64	Sm	Inh	Rif	Emb	Amk	Oflo	Kan	Cap
S11	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S12	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S13	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S14	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S15	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S16	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S17	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S18	+	S	S	S	S	S	S	S	S
MDR9	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR10	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR11	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR12	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR13	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR14	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR15	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR16	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR17	+	S	R	R	S	S	S	S	S
XDR11	+	R	R	R	S	R	R	R	R
XDR12	+	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR13	+	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR14	+	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR15	+	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR16	+	S	R	R	S	R	R	R	R
XDR17	+	S	R	R	S	R	R	R	S
XDR18	+	S	R	R	S	R	R	R	R

+: resultado positivo no ensaio de detecção do antígeno MPT64. Sm: estreptomina; Inh: isoniazida; Rif: rifampicina; Emb: etambutol; Amk: amicacina; Oflo: ofloxacina; Kan: canamicina; Cap: capreomicina. R: resistente; S: sensível.

As cepas selecionadas foram então submetidas a análises por espectrometria de massas de alta vazão para determinação de seus perfis metabólicos. Para isso, crescimento bacteriano das diferentes cepas em meio sólido LJ foi coletado e utilizado para gerar uma suspensão bacteriana em meio líquido 7H9 a uma densidade ótica (600 nm) de 5. O meio líquido foi removido e células obtidas por centrifugação. Os metabólitos foram extraídos das células com acetonitrila para obtenção de seus metabólitos. Os extratos evaporados e resuspendidos em 1 mL de acetonitrila 60% (em água) foram divididos em duas partes, uma parte foi injetada com adição de ácido fórmico a 0,1% para análise em modo positivo e a outra com adição de

hidróxido de amônio a 0,5% para o modo negativo. Assim, as duas partes dos extratos das diferentes amostras foram injetados aleatoriamente a 10 µL por minuto, e os espectros foram adquiridos na faixa de m/z 100 a 1.000. Os dados brutos de espectrometria de massas adquiridos pelo software MassLynx™ e transformados para o modo centróide utilizando a ferramenta “*Accurate Mass Measure*”, foram processados através do aplicativo MarkerLynx™. Assim, foram detectados um total de 3.372 metabólitos no primeiro experimento. Destes, 1.958 metabólitos foram detectados em ionização negativa, enquanto 1.414 metabólitos foram detectados em ionização positiva (Tabela 5.3).

A primeira etapa de avaliação dos resultados brutos obtidos por espectrometria de massas envolveu a realização de análises de componentes principais, com o objetivo de identificar diferenças globais em padrões metabólicos de diferentes grupos de amostras. Gráficos de PCA foram gerados utilizando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) baseando-se nos dados brutos obtidos em ionização positiva ou negativa, separadamente. O gráfico de PCA dos dados de ionização negativa (ESI neg) não revelou uma separação significativa entre os diferentes grupos, e o perfil metabólico de todos os isolados mostrou-se semelhante. Já o gráfico de PCA dos dados de ionização positiva revelou uma separação mais proeminente entre os grupos de amostras, como pode ser observado na Figura 5.1. Os gráficos de PCA (ESI pos e neg) não foram capazes de discriminar com clareza amostras pertencentes aos diferentes grupos, apesar de sugerirem que há uma divergência metabólica entre os grupos de amostras estudados.



grupos foi virtualmente nulo. Já metabólitos que foram detectados na maioria das amostras de um dos grupos, mas ausentes dos outros, possuíram um potencial preditivo maior. Assim, os dados foram filtrados para incluir apenas metabólitos que foram detectados em pelo menos 80% das amostras de um ou mais dos grupos avaliados (S, MDR, XDR). Ao fazer essa filtragem, obteve-se ainda um total de 1.175 metabólitos, tendo sido 1.118 detectados em modo negativo e 57 detectados em modo positivo no primeiro experimento.

A partir destes dados foram realizadas análises de agrupamentos hierárquicos com base no grau de similaridade dos perfis de abundância dos 25 (Figura 5.2 e 5.3) e 5 (Figura 5.4 e 5.5) metabólitos com maior poder discriminatório entre os grupos de modo a gerar dendrogramas. Estas análises foram realizadas no software MetaboAnalyst. Como já havia sido observado na análise de componentes principais, pudemos notar pelos dendrogramas e nos *heat maps* gerados, que de fato há uma melhor separação dos grupos de amostras com diferentes perfis de susceptibilidade em modo positivo (Figuras 5.2 e 5.4). Com base nos dados do primeiro experimento, foi observado em modo positivo uma notável separação do grupo de cepas XDR com relação aos grupos de cepas sensíveis e MDR, com todas as cepas XDR agrupando separadamente do restante das cepas. Além disso, pode-se observar uma separação razoável entre amostras S e MDR, com 8 das 10 cepas sensíveis e 6 das 8 cepas MDR constituindo um grupo independente cada (Figura 5.2). Entretanto, o grupo de cepas XDR apresentou uma cepa não-XDR, assim como o grupo de cepas sensíveis apresentou uma cepa não-sensível e o grupo de cepas MDR apresentou duas cepas não-MDR. Já em modo negativo, foi observada uma boa separação do grupo de cepas S com relação aos grupos de cepas MDR e XDR, com 8 das 10 cepas sensíveis se agrupando. Entretanto, houve também neste grupo a inclusão de uma cepa não-sensível. Já com relação às cepas MDR e XDR, a análise em modo negativo não permitiu a separação entre esses dois grupos (Figura 5.3).

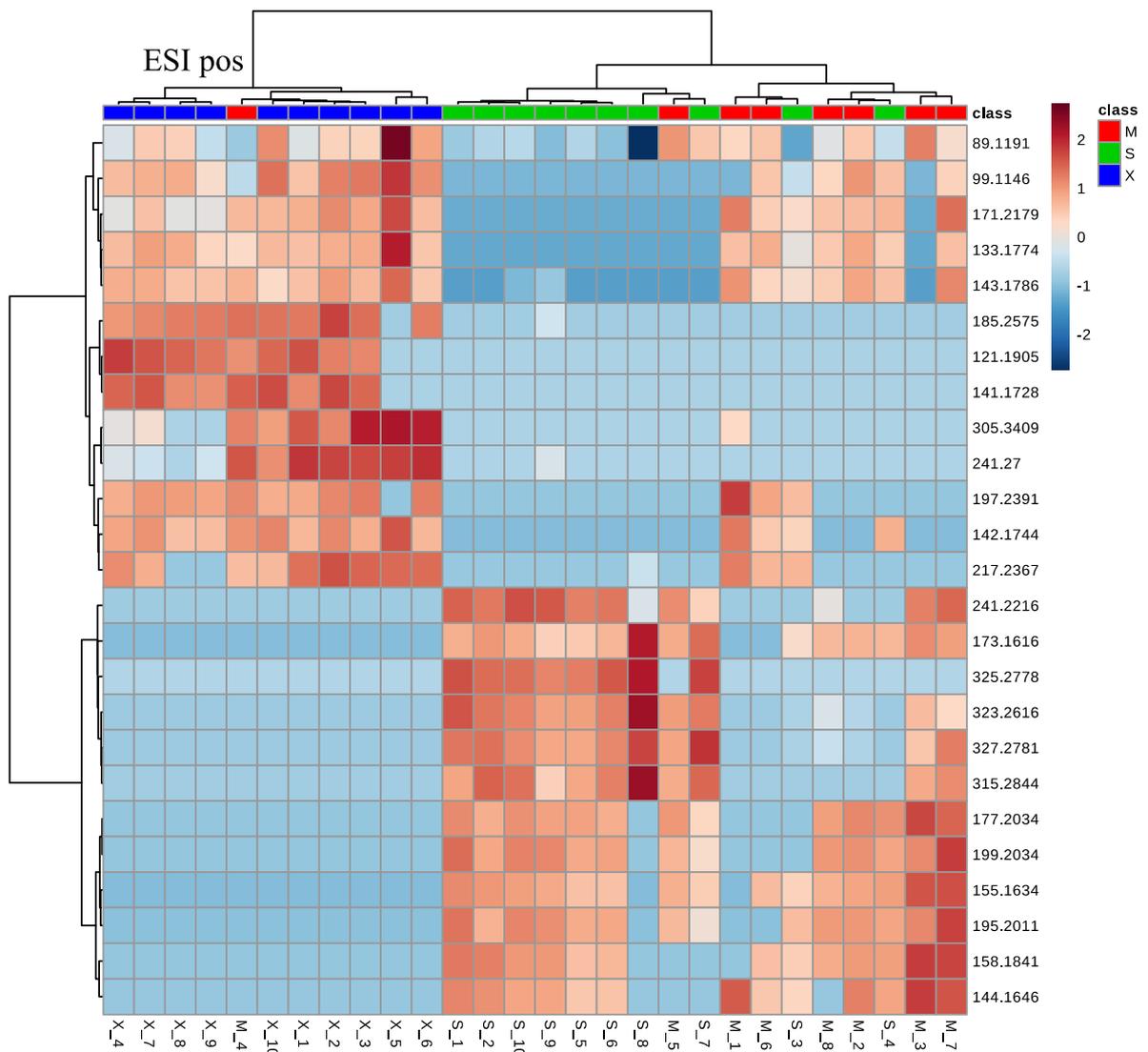


Figura 5.2 – Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo do primeiro experimento. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo positivo, com base nos 25 íons com maior poder discriminatório. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de m/z detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

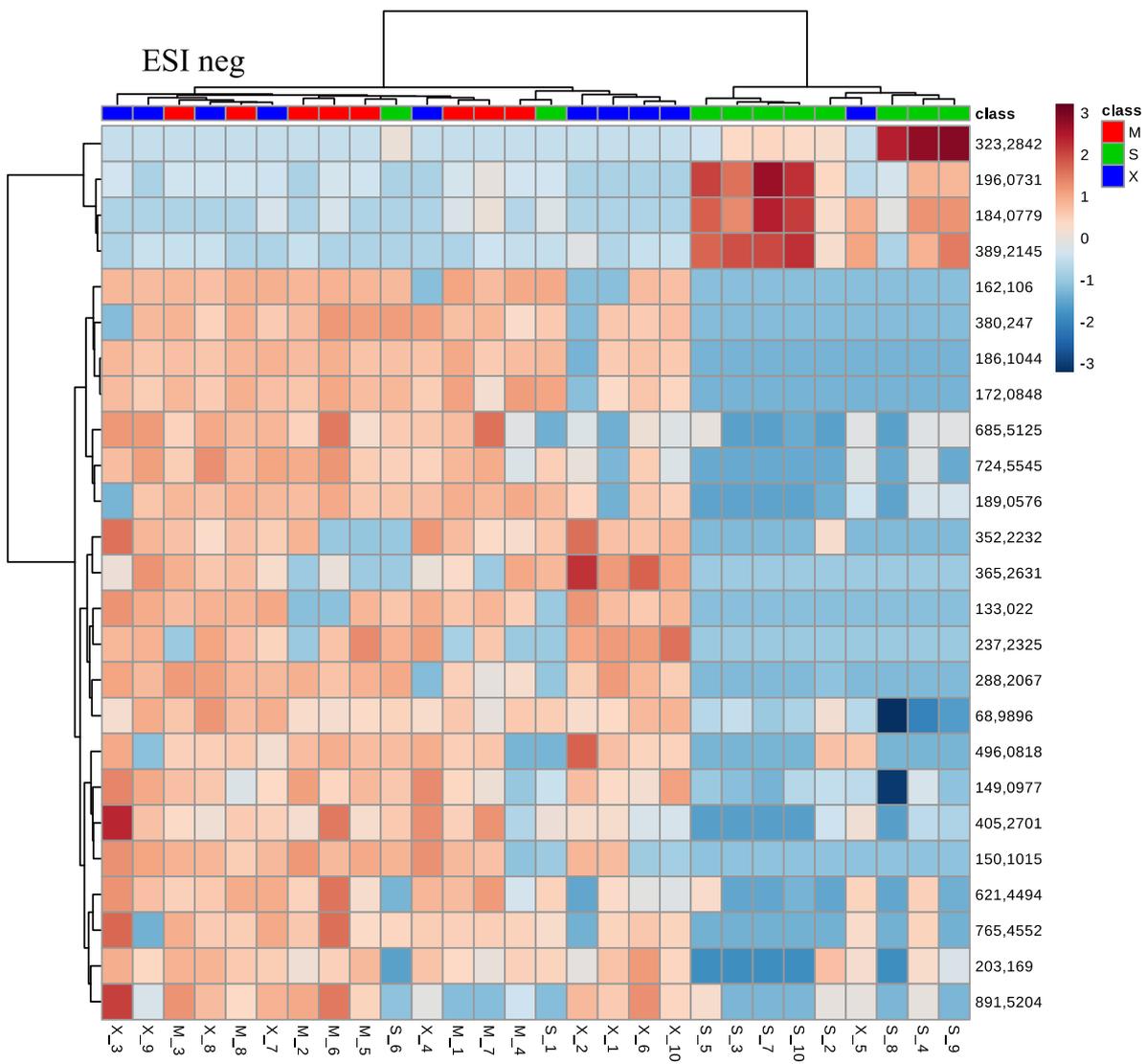


Figura 5.3 – Análise de agrupamento hierárquico em modo negativo do primeiro experimento. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo negativo, com base nos 25 íons com maior poder discriminatório. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de m/z detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Quando consideramos apenas os 5 íons com maior poder discriminatório detectados, foi observado no primeiro experimento através da análise de agrupamento hierárquico, que há uma excelente separação de amostras sensíveis dos demais grupos, e uma boa separação de amostras XDR com relação às amostras MDR em modo positivo. Com relação às cepas sensíveis, 8 das 10 amostras analisadas formaram um grupo do qual nenhuma amostra resistente fez parte. Quanto às cepas XDR, a separação também foi satisfatória, com 8 das 10 cepas fazendo parte de um único grupo. Entretanto, este grupo também conteve uma cepa não-XDR. Já quanto às

cepas MDR os resultados não foram tão satisfatórios, e um grupo distinto contendo amostras MDR não pôde ser formado. Apesar de um único grupo conter 7 das 8 cepas MDR testadas, este grupo também incluiu 4 cepas não-MDR, sendo duas destas XDR e as outras duas sensíveis (Figura 5.4).

Em modo negativo, por sua vez, houve uma boa separação das amostras S, mas não houve uma boa separação entre as amostras MDR e XDR, mostrando mais uma vez que os dados em ionização positiva apresentaram resultados claramente mais satisfatórios do que aqueles obtidos em ionização negativa (Figura 5.5).

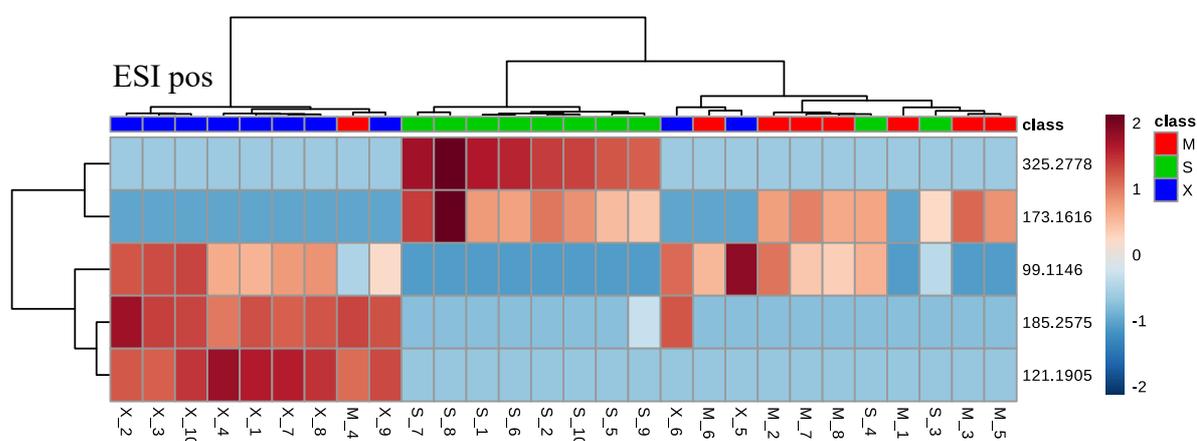


Figura 5.4 – Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst em modo positivo no primeiro experimento. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo positivo, com base nos 5 íons com maior poder discriminatório. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de *m/z* detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

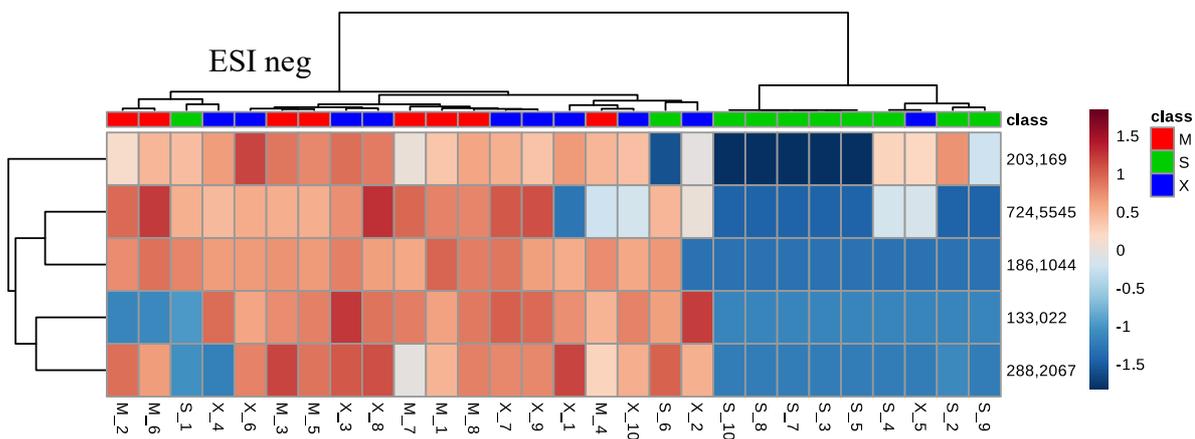


Figura 5.5 – Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst em modo negativo no primeiro experimento. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo negativo, com base nos 5 íons com maior poder discriminatório. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de *m/z* detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Com o objetivo de se obter uma melhor separação dos grupos foram também realizadas análises binárias de agrupamentos hierárquicos comparando apenas dois dos três grupos testados, tais análises foram realizadas baseando-se apenas no grau de similaridade dos perfis de abundância dos 5 metabólitos com maior poder discriminatório de modo a gerar dendrogramas e *heat maps* (Figuras 5.6, 5.7, 5.8).

Inicialmente, apenas cepas dos grupos sensível e MDR foram comparadas, excluindo cepas do grupo XDR. Tal análise permitiu uma excelente separação entre estes grupos, que pode ser claramente observada na Figura 5.6. Todas as cepas MDR foram reunidas em um único grupo. Já com relação às cepas sensíveis 9 cepas se agruparam, enquanto uma única cepa sensível foi agrupada com as cepas MDR.

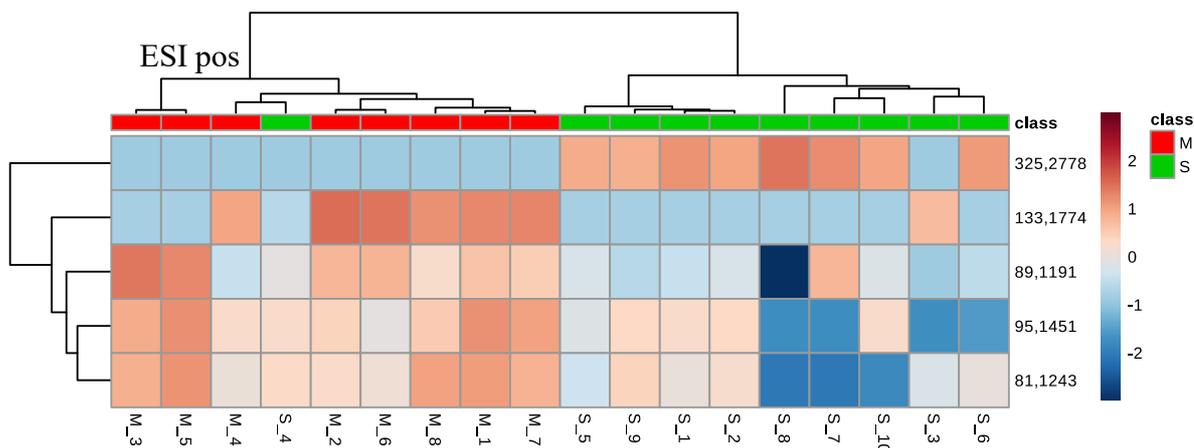


Figura 5.6 – Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do primeiro experimento na comparação S vs MDR. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo positivo, com base nos 5 íons com maior poder discriminatório entre os grupos de cepas sensíveis e MDR. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de m/z detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; M: multirresistente.

Em seguida, foram comparadas apenas cepas dos grupos sensível e XDR do primeiro experimento, excluindo cepas do grupo MDR. Mais uma vez, foi observada uma excelente separação entre os grupos, como pode ser visto na Figura 5.7. Nesta análise, as cepas analisadas se agruparam de maneira inequívoca, com um grupo sendo constituído por todas as cepas sensíveis e outro pelas cepas XDR.

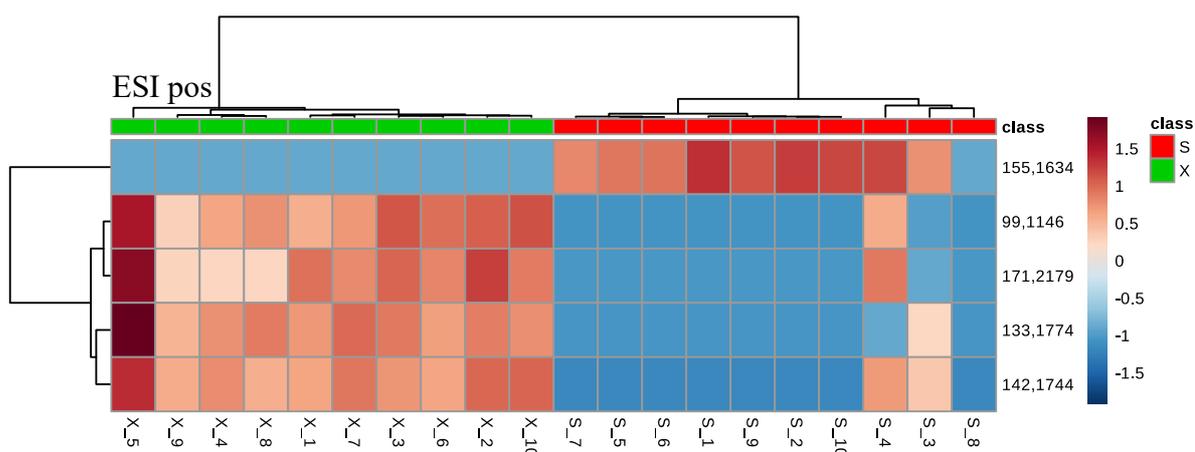


Figura 5.7 – Análises de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do primeiro experimento na comparação S vs XDR. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo positivo, com base nos 5 íons com maior poder discriminatório entre os grupos de cepas sensíveis e XDR. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de m/z detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; X: extensivamente resistente.

A terceira e última análise dos dados obtidos no primeiro experimento foi realizada comparando apenas cepas dos grupos MDR e XDR, excluindo cepas do grupo sensível. Novamente, uma excelente separação entre os grupos pôde ser observada (Figura 5.8). Nesta análise, todas as cepas XDR foram agrupadas, com este grupo contendo, entretanto, uma cepa MDR. Por consequência, 7 das 8 cepas MDR formaram um grupo à parte.

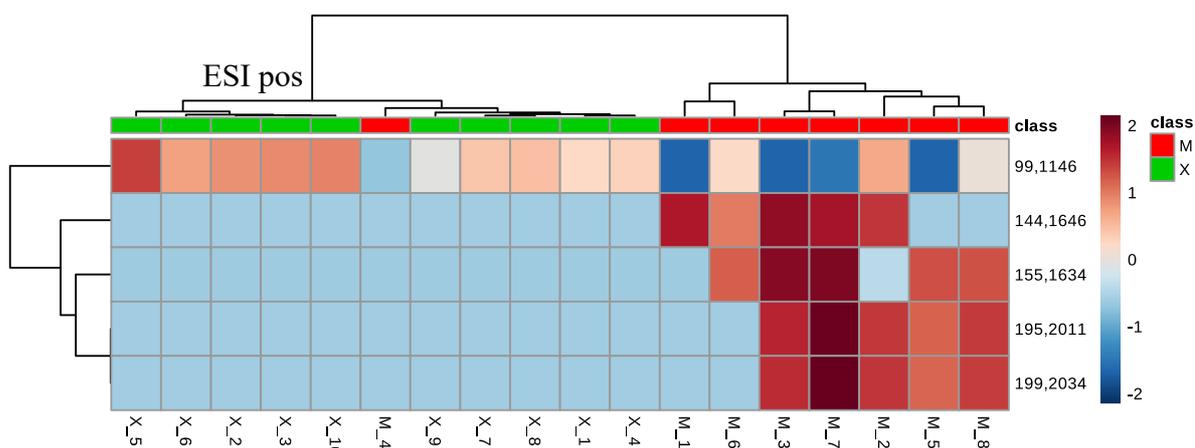


Figura 5.8 – Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do primeiro experimento na comparação MDR vs XDR. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo positivo, com base nos 5 íons com maior poder discriminatório entre os grupos de cepas MDR e XDR. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de m/z detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). MDR: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Após a realização das comparações binárias descritas acima, observando a separação em grupos obtida com o MetaboAnalyst, os níveis relativos de abundância dos íons selecionados pelo software no primeiro experimento foram comparados manualmente entre os grupos de cepas (Figuras 5.9, 5.10, 5.11) para que as diferenças em níveis relativos pudessem ser observadas diretamente.

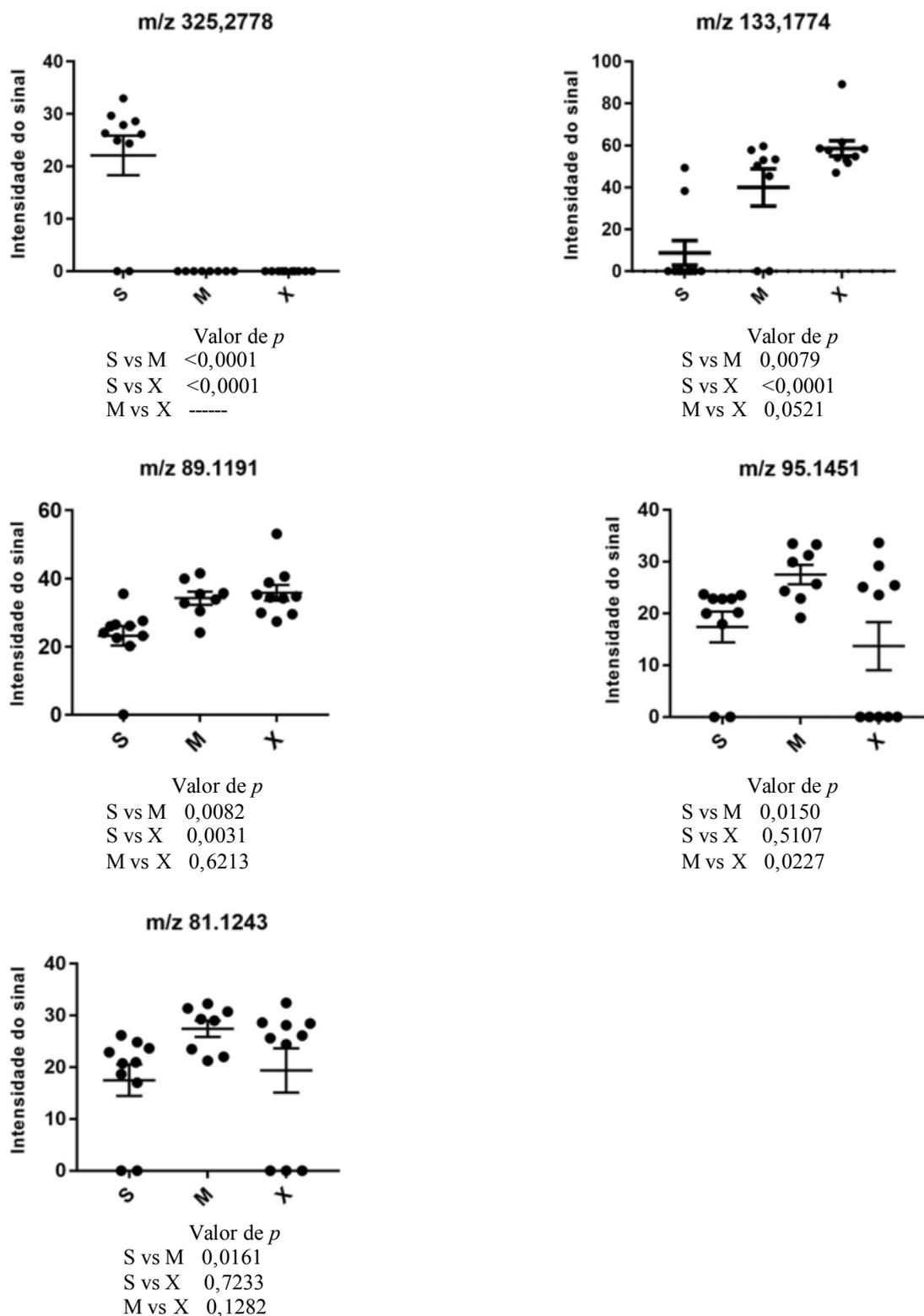


Figura 5.9 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação S vs MDR no primeiro experimento. A análise se baseia no valor de p e no poder discriminatório apenas em modo positivo entre os grupos de amostras sensíveis e MDR. S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

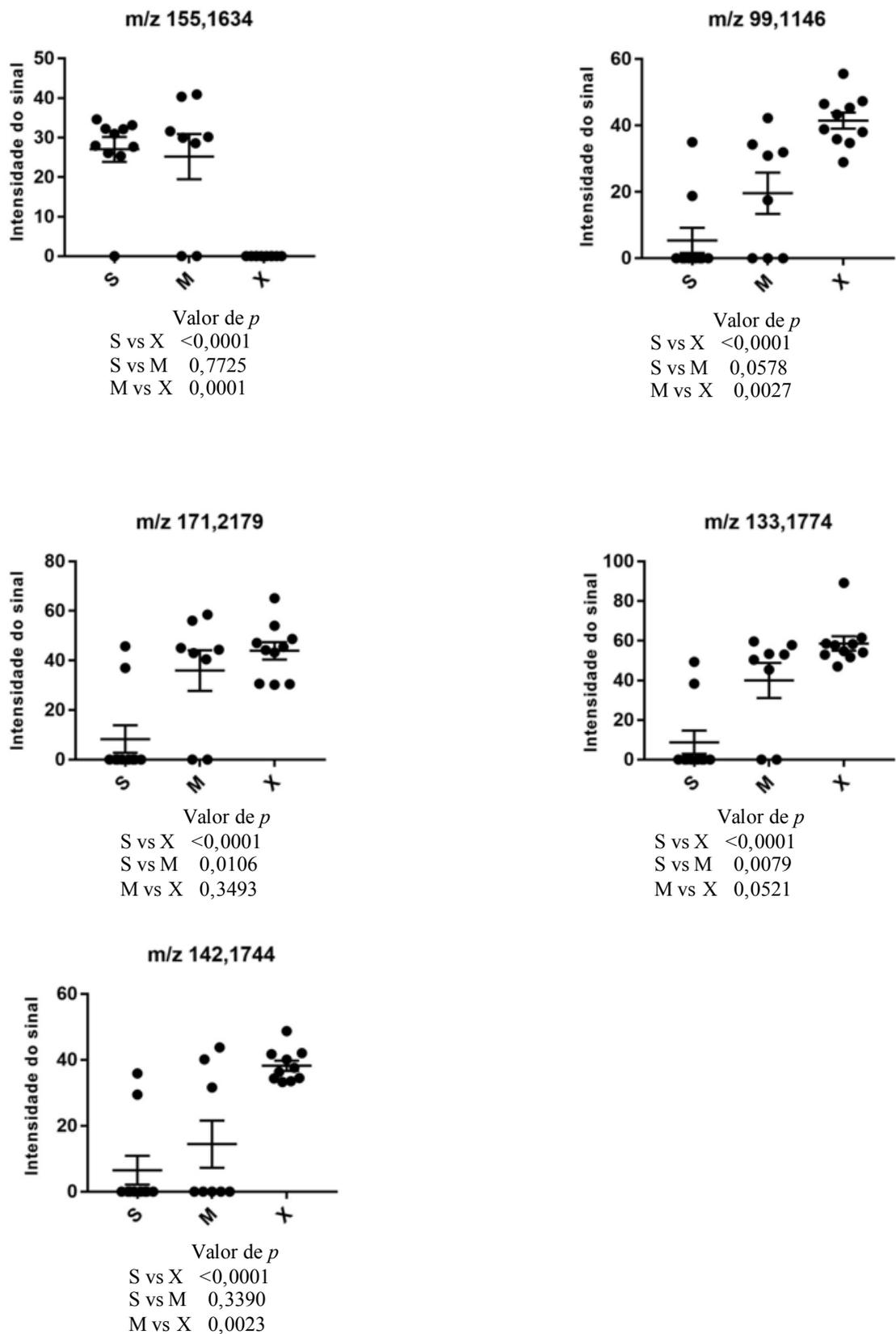


Figura 5.10 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação S vs XDR no primeiro experimento. A análise se baseia no valor de p e no poder discriminatório apenas em modo positivo entre os grupos de amostras sensíveis e XDR. S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

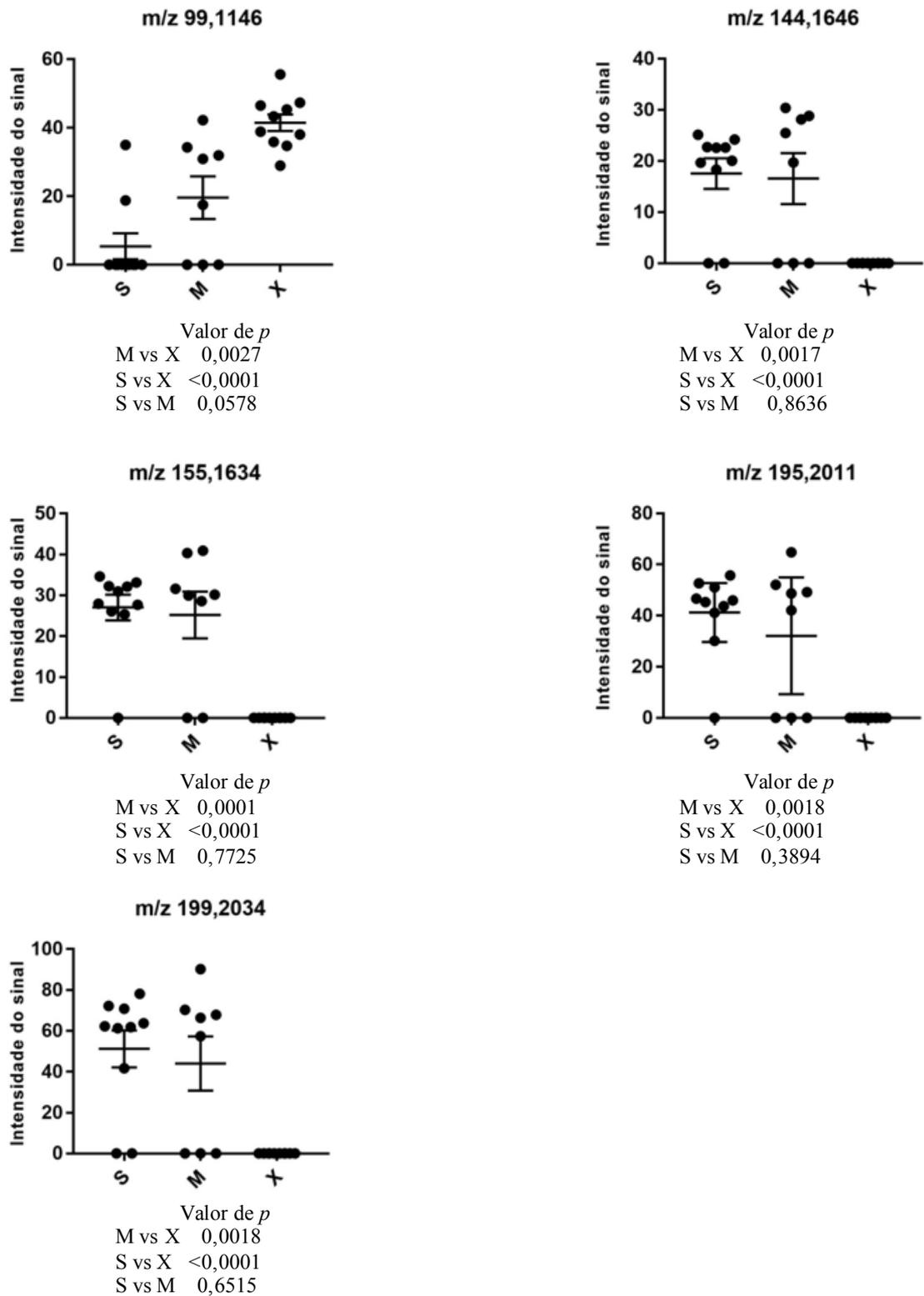


Figura 5.11 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação MDR vs XDR no primeiro experimento. A análise se baseia no valor de p e no poder discriminatório apenas em modo positivo entre os grupos de amostras MDR e XDR. S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Além dos resultados dos íons selecionados pelo software MetaboAnalyst, análises manuais dos dados de metabolômica também foram realizadas, de modo a gerar listas de íons baseadas em seu poder preditivo. Primeiramente, foram calculadas médias dos níveis relativos de cada metabólito em cada um dos grupos de amostras, e razões entre as médias obtidas em cada grupo foram também calculadas, testes *t* de Student foram realizados para avaliar a significância estatística de cada resultado obtido (valor de *p*). Após, foram utilizados como critério de seleção os valores de razão obtidos quando dois grupos foram comparados, selecionando íons para os quais os valores de intensidade entre os grupos comparados foram alterados pelo menos 2 vezes. Além disso, metabólitos que foram detectados em um dos grupos, mas não em outro durante as comparações binárias foram também selecionados. Através de tais comparações notou-se diferenças metabólicas significativas entre amostras dos diferentes grupos testados (S, MDR, XDR) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Resumo dos resultados de metabolômica do primeiro experimento.

	Modo negativo	Modo positivo
Total de metabólitos detectados	1958	1414
Metabólitos presentes em 80% das cepas de pelo menos um grupo	1117	56
S versus MDR (≥2-vezes, <i>p</i> <0,05)	155	13
S versus XDR (≥2-vezes, <i>p</i> <0,05)	116	33
MDR versus XDR (≥2-vezes, <i>p</i> <0,05)	2	24

Após a separação em grupos, os níveis relativos de abundância dos íons selecionados manualmente através dos critérios estabelecidos acima no primeiro experimento foram comparados manualmente entre os grupos de cepas (Figuras 5.12, 5.13, 5.14). Para estas análises, os níveis relativos dos metabólitos considerados com maior poder discriminatório através de análise manual (5 maiores razões obtidas em casa comparação entre grupos, sendo razões ≥2, e *p*<0,05) foram comparados entre os diferentes grupos de amostras.

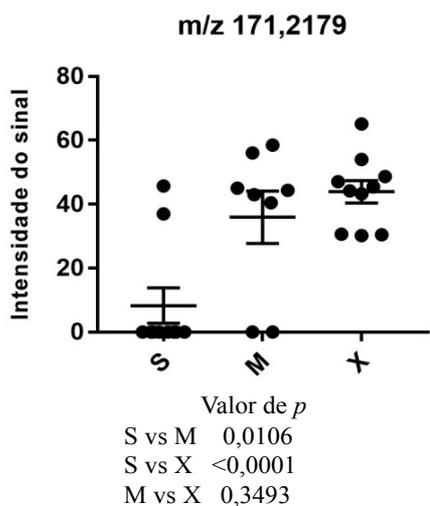
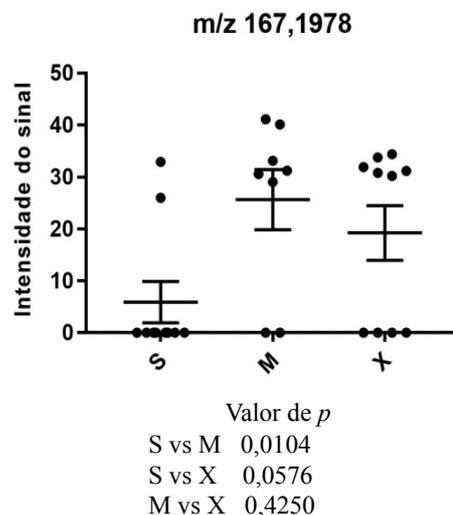
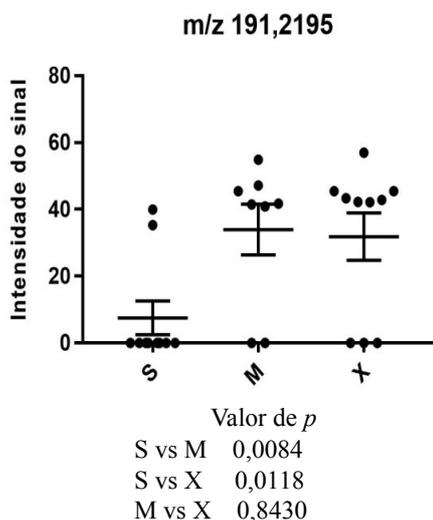
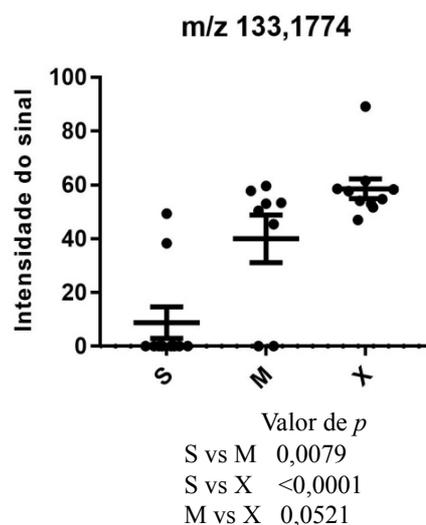
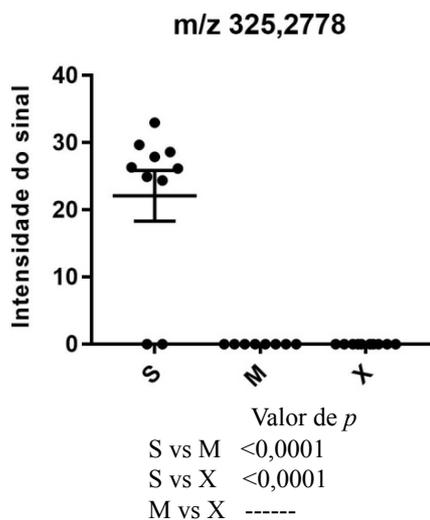


Figura 5.12 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do primeiro experimento na comparação S vs MDR. Análise de íons do primeiro experimento apenas em modo positivo entre os grupos sensível e MDR. A análise se baseia no valor de p e na razão entre as médias de cada comparação binária entre grupos, sendo considerados com alto poder discriminatório aqueles com valor de $p < 0,05$ e razão ≥ 2 . S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

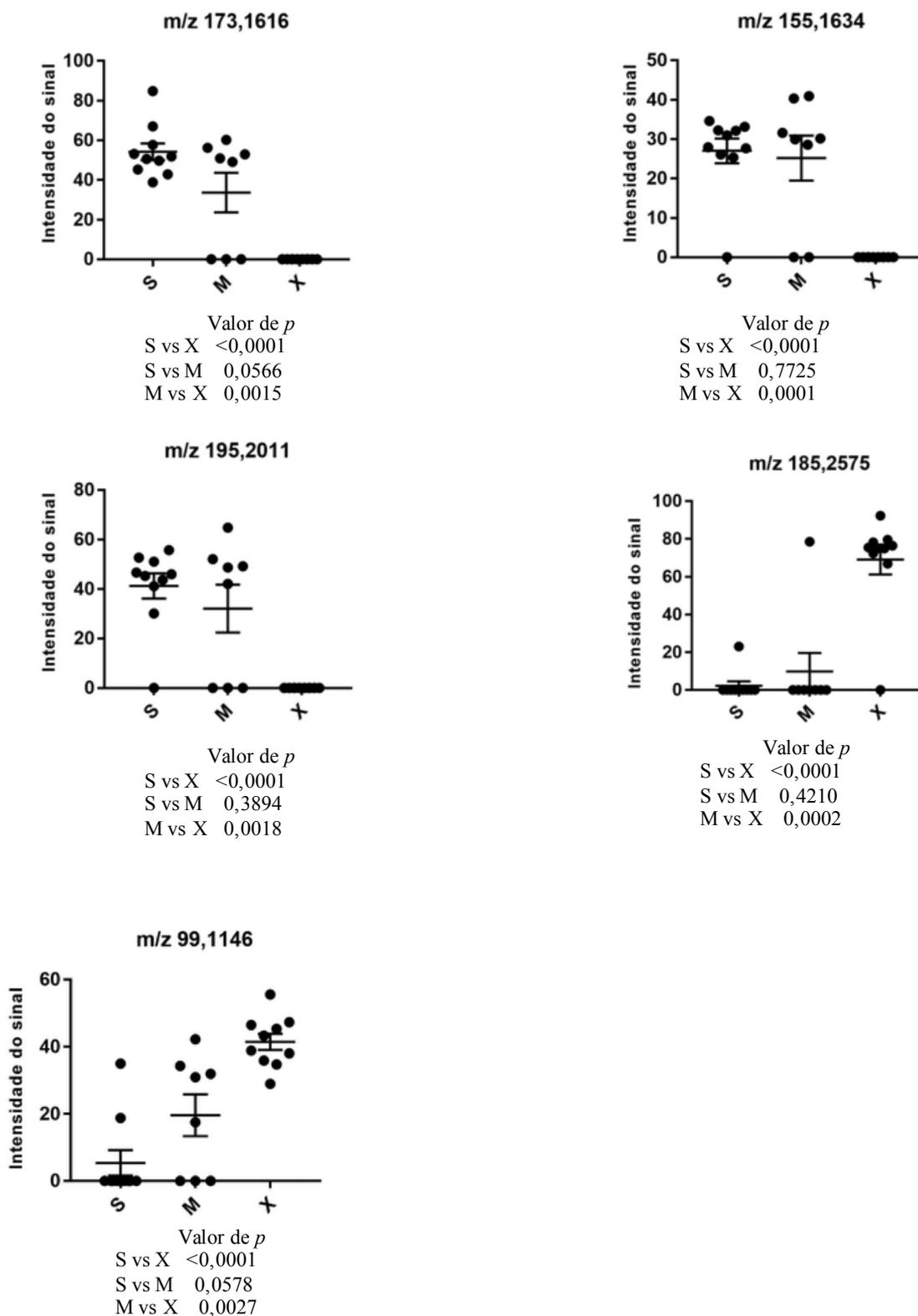


Figura 5.13 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do primeiro experimento na comparação S vs XDR. Análise de íons do primeiro experimento apenas em modo positivo entre os grupos sensível e XDR. A análise se baseia no valor de p e na razão entre as médias de cada comparação binária entre grupos, sendo considerados com alto poder discriminatório aqueles com valor de $p < 0,05$ e razão ≥ 2 . S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

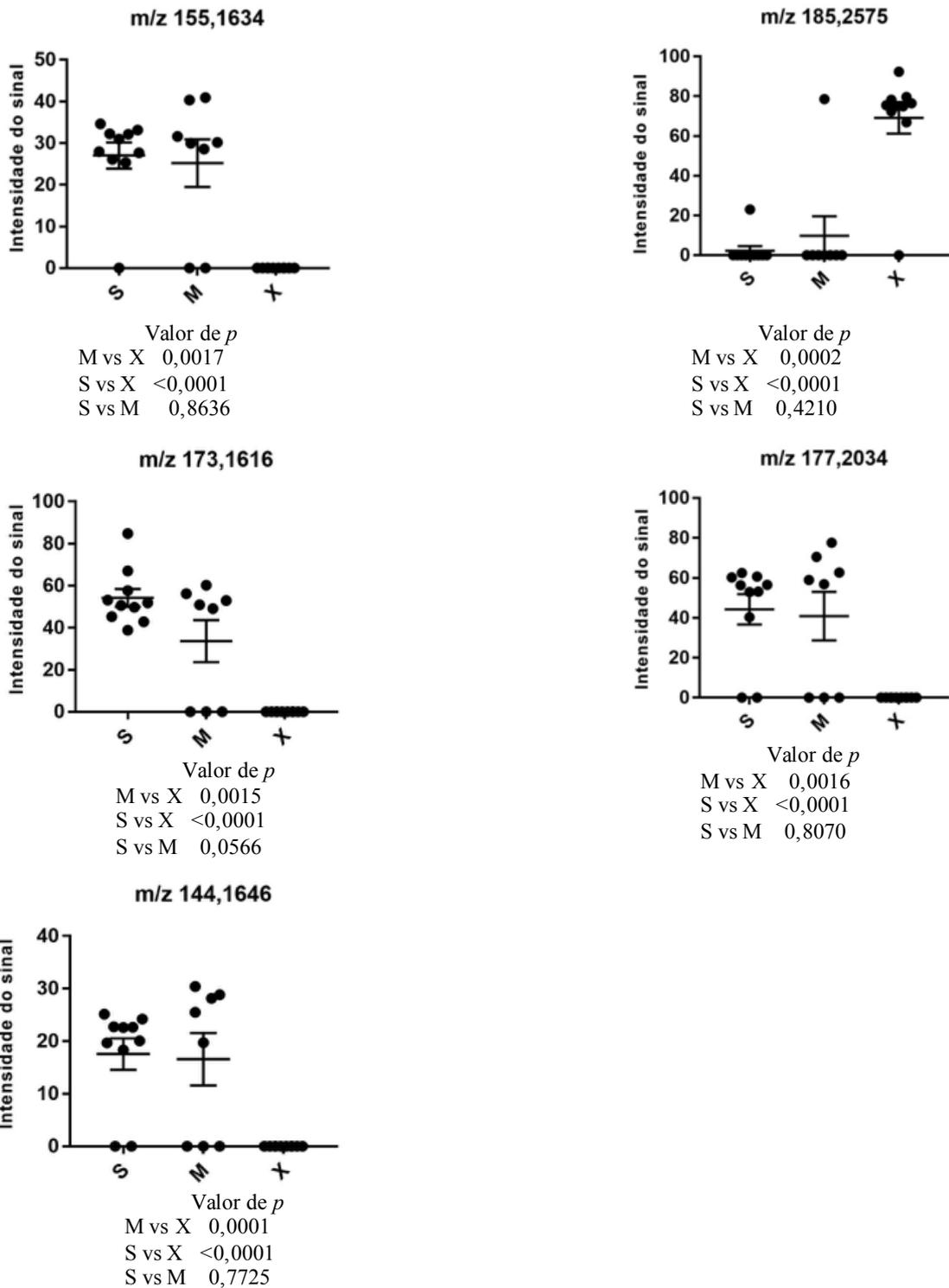


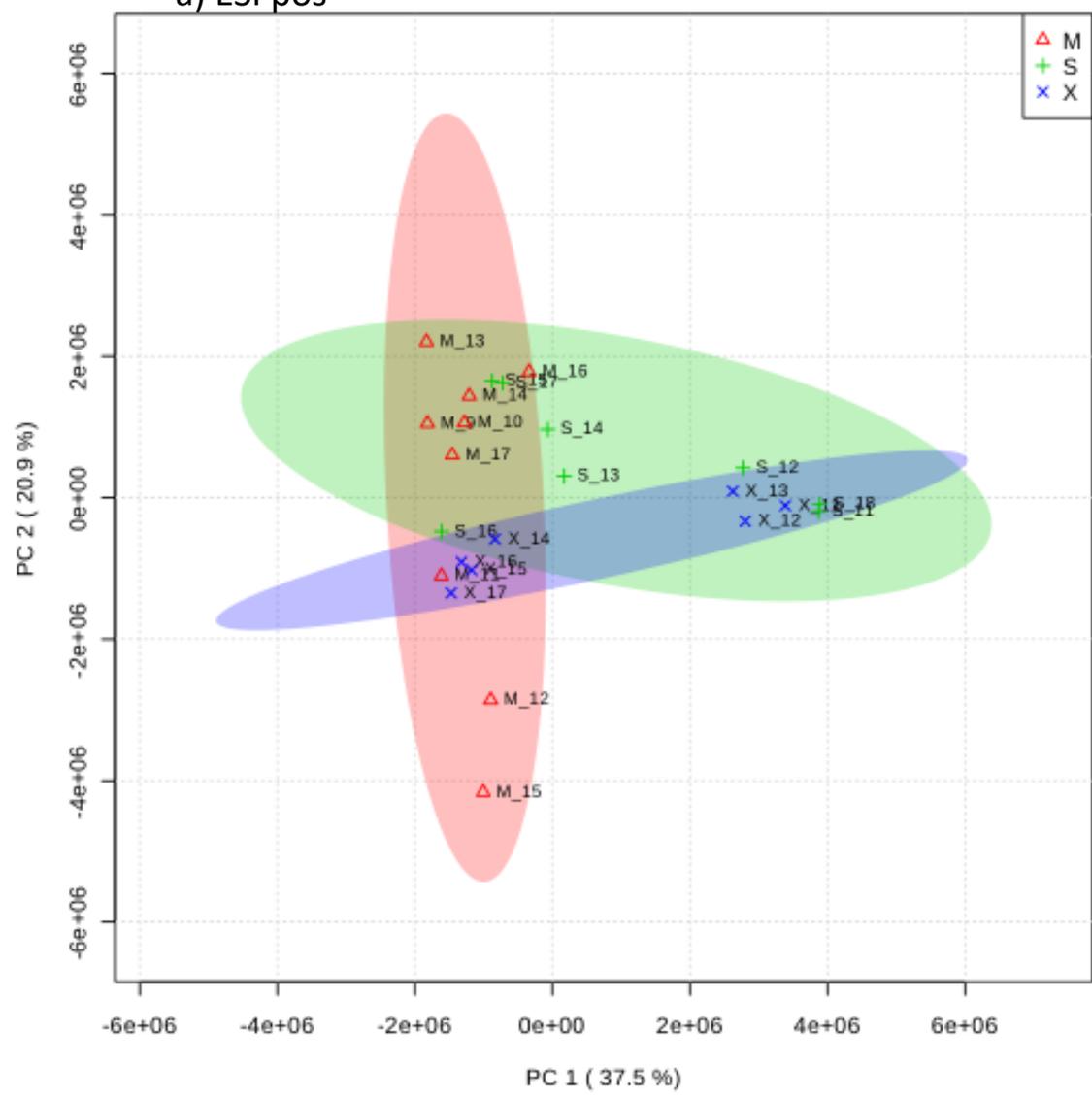
Figura 5.14 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do primeiro experimento na comparação MDR vs XDR. Análise de íons do primeiro experimento apenas em modo positivo entre os grupos MDR e XDR. A análise se baseia no valor de p e na razão entre as médias de cada comparação binária entre grupos, sendo considerados com alto poder discriminatório aqueles com valor de $p < 0,05$ e razão ≥ 2 . S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Com objetivo de confirmar as análises do primeiro experimento, foi realizada outra análise metabolômica com um segundo grupo de amostras (segundo experimento), conforme descrito anteriormente para o primeiro experimento. Nesta análise, foram detectados 3.027 metabólitos, destes, 1.177 foram detectados em ionização negativa e 1840 em ionização positiva como pode ser visto na Tabela 5.4.

Assim como no primeiro experimento, a primeira etapa de avaliação dos resultados brutos obtidos por espectrometria de massas com cepas selecionadas para o segundo experimento envolveu a realização de análises de componentes principais, com o objetivo de identificar diferenças globais em padrões metabólicos de diferentes grupos de amostras. Gráficos de PCA foram gerados utilizando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) baseando-se nos dados brutos obtidos em ionização positiva ou negativa, separadamente. O gráfico de PCA dos dados de ionização negativa não revelaram uma separação significativa entre os diferentes grupos, e o perfil metabólico de todos os isolados mostrou-se semelhante. Já o gráfico de PCA dos dados de ionização positiva revelou uma separação mais proeminente entre os grupos de amostras, pode-se observar neste gráfico que parece haver uma alteração metabólica em cepas com diferentes níveis de resistência aos antimicrobianos (Figura 5.15). No entanto, os gráficos de PCA não foram capazes de discriminar com clareza amostras pertencentes aos diferentes grupos.

a) ESI pos

Scores Plot



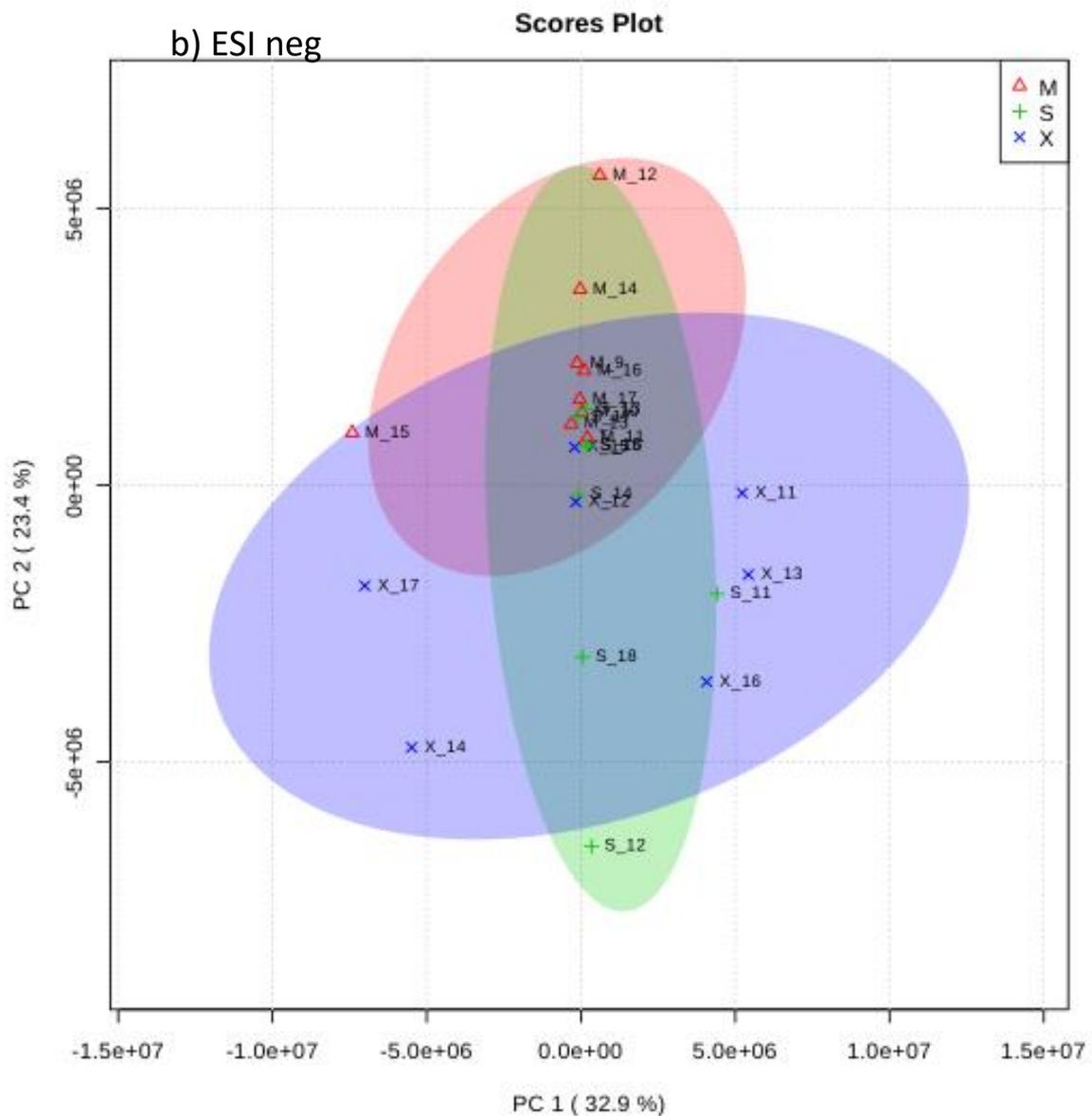


Figura 5.15 – Análises de componentes principais (PCA) do segundo experimento. Gráficos de PCA gerados com o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) de todos os íons detectados em modo positivo e negativo dos três grupos de amostras de *M. tuberculosis* (S, MDR e XDR). S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente. a) ESI pos; b) ESI neg. + verde: sensível; x azul: XDR; triângulo vermelho: MDR.

Pode-se observar através do gráfico de PCA de ionização positiva que parece haver uma alteração metabólica em cepas com diferentes níveis de resistência a antimicrobianos. Logo, assim como no primeiro experimento, a etapa subsequente envolveu a avaliação de metabólitos que foram detectados em um número mínimo de amostras de pelo menos um dos grupos testados. Assim, os dados foram filtrados para incluir apenas metabólitos que foram detectados

em pelo menos 80% das amostras de um ou mais dos grupos avaliados (S, MDR, XDR). Ao fazer essa filtragem, obteve-se um total de 236 metabólitos, sendo todos eles em modo positivo.

A partir destes dados foram realizadas análises de agrupamentos hierárquicos com base no grau de similaridade dos perfis de abundância dos 25 (Figura 5.16) e 5 (Figura 5.17) metabólitos com maior poder discriminatório entre os grupos de modo a gerar dendrogramas. Estas análises foram realizadas no software MetaboAnalyst. Pode-se notar nos dendrogramas e *heat maps* gerados em modo positivo que, ao considerar os 25 íons com maior poder discriminatório detectados, houve uma boa separação do grupo de cepas MDR com relação aos grupos de cepas XDR e sensível, com 7 cepas MDR sendo agrupadas, e apenas uma cepa não-MDR integrando este grupo (Figura 5.16).

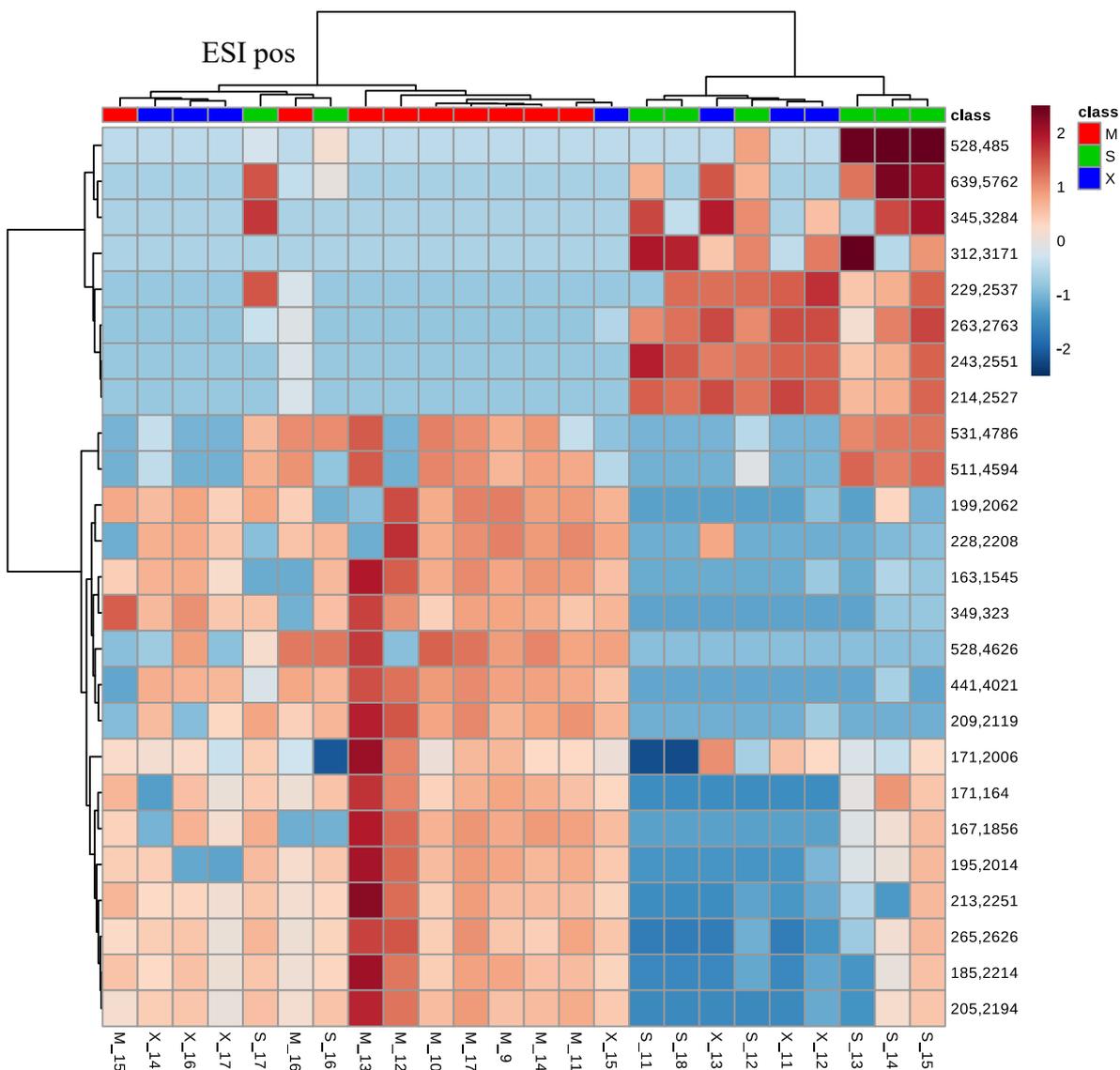


Figura 5.16 – Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo do segundo experimento. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo positivo, com base nos 25 íons com maior poder discriminatório. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de m/z detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Quando considerados os 5 íons com maior poder discriminatório foi observado que houve uma separação razoável do grupo de cepas MDR com relação aos grupos de cepas sensíveis e XDR; 8 das 9 cepas MDR fizeram parte de um único grupo, mas que também agrupou 3 cepas não-MDR. Os resultados obtidos foram insatisfatórios quando levados em consideração as amostras sensíveis e XDR, que não puderam ser separadas utilizando estas análises (Figura 5.17).

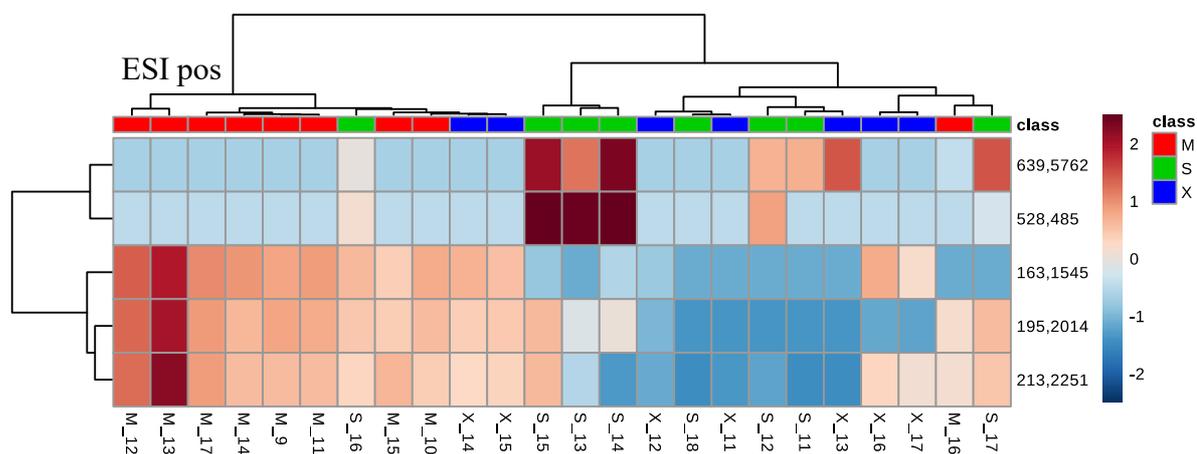


Figura 5.17 – Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst no segundo experimento. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo positivo, com base nos 5 íons com maior poder discriminatório. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de *m/z* detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Com o objetivo de se obter uma melhor separação dos grupos foram também realizadas análises binárias de agrupamentos hierárquicos comparando apenas dois dos três grupos testados por vez; tais análises foram realizadas baseando-se apenas no grau de similaridade dos perfis de abundância dos 5 metabólitos com maior poder discriminatório, de modo a gerar dendrogramas e *heat maps* (Figuras 5.18, 5.19, 5.20).

Inicialmente, apenas cepas dos grupos sensível e MDR foram comparadas, excluindo cepas do grupo XDR. Os resultados dessa análise produziram uma excelente separação entre estes grupos, que pode ser observado na Figura 5.18. Nesta análise, cepas sensíveis foram quase que em sua totalidade (7 de 8 cepas) reunidas em um único grupo. Todas as cepas MDR foram também agrupadas; entretanto, uma cepa sensível foi incluída no grupo.

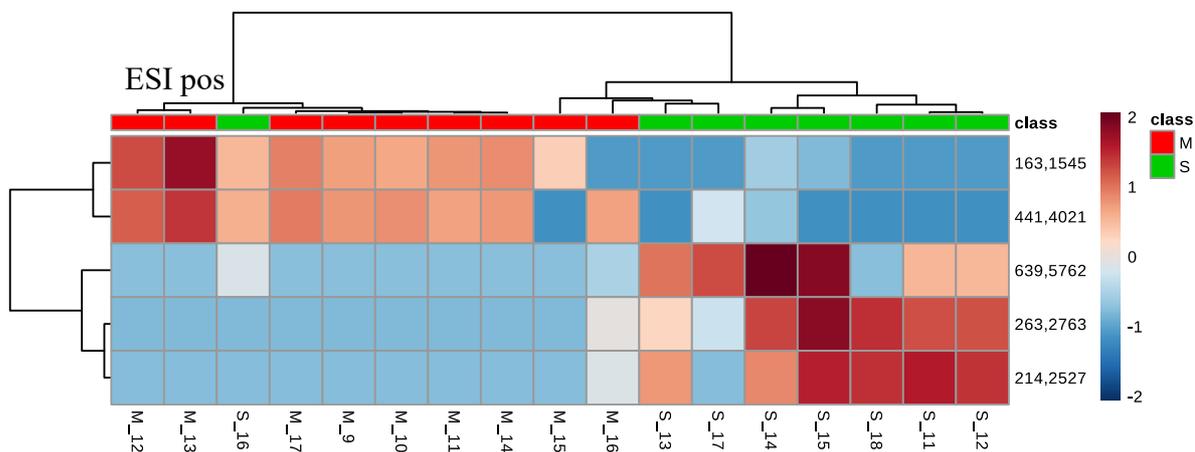


Figura 5.18 – Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do segundo experimento na comparação S vs MDR. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metabanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo positivo, com base nos 5 íons com maior poder discriminatório entre os grupos sensível e MDR. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de m/z detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; M: multirresistente.

A segunda análise comparando apenas dois grupos do segundo experimento foi realizada comparando apenas cepas dos grupos sensível e XDR, excluindo cepas do grupo MDR. Nesta análise, observou-se uma separação mediana entre os dois grupos, muito aquém da discriminação obtida com os dados do primeiro experimento (Figura 5.19). Nesta análise, apesar de todas as amostras XDR terem sido reunidas em um grupo, este mesmo grupo compreendeu também 4 das 8 cepas sensíveis. Em outras palavras, metade das cepas sensíveis foi reunida em um grupo específico, enquanto a outra metade foi agrupada com as cepas XDR.

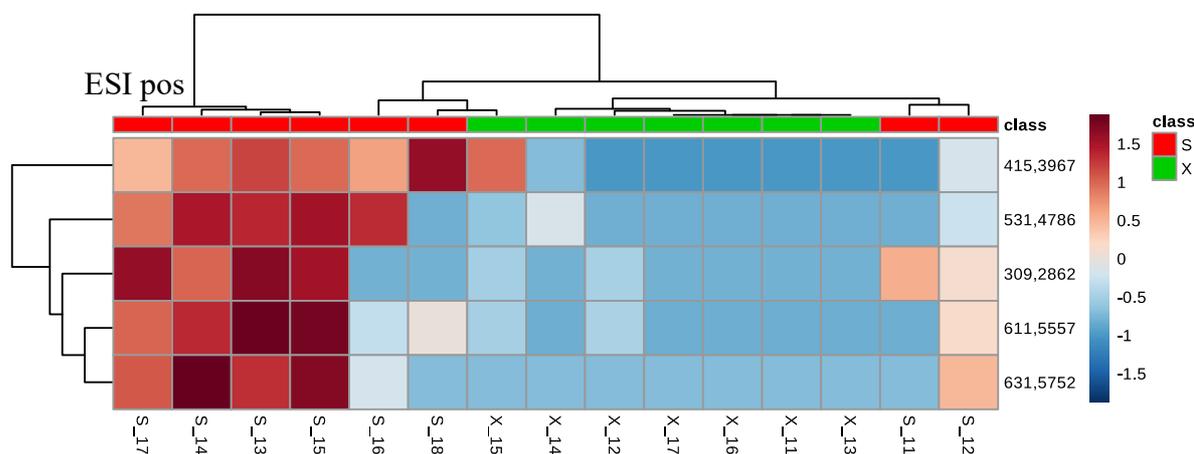


Figura 5.19 – Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do segundo experimento na comparação S vs XDR. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo positivo, com base nos 5 íons com maior poder discriminatório entre os grupos sensível e XDR. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de *m/z* detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; X: extensivamente resistente.

A terceira e última análise dos dados obtidos no segundo experimento foi realizada comparando apenas cepas dos grupos MDR e XDR, excluindo cepas do grupo sensível. Novamente, uma excelente separação entre os grupos pode ser observada na Figura 5.20. Nesta análise, todas as cepas XDR foram agrupadas; já entre as cepas MDR, 7 de 9 cepas foram agrupadas corretamente, enquanto 2 foram agrupadas com as cepas XDR.

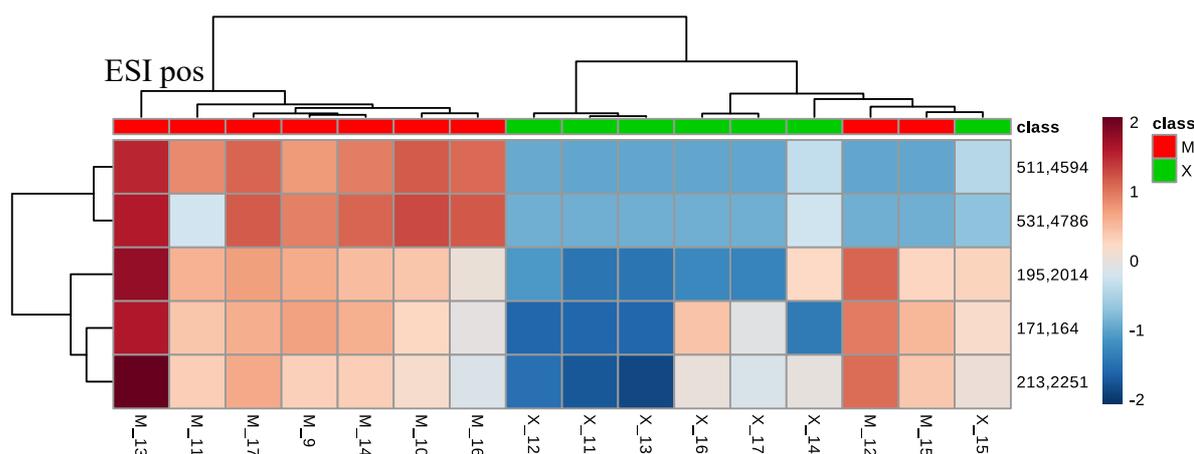


Figura 5.20 – Análise de agrupamento hierárquico em modo positivo utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do segundo experimento na comparação MDR vs XDR. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) dos dados obtidos em modo positivo, com base nos 5 íons com maior poder discriminatório entre os grupos MDR e XDR. Cada barra horizontal representa um metabólito, com respectivo valor de *m/z* detectado indicado ao lado. A intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). S: sensível; X: extensivamente resistente.

Após a realização das comparações binárias descritas acima, observando a separação em grupos obtida com o MetaboAnalyst, os níveis relativos de abundância dos íons selecionados pelo software no segundo experimento foram comparados manualmente entre os grupos de cepas (Figuras 5.21, 5.22, 5.23) para que as diferenças em níveis relativos pudessem ser observadas diretamente.

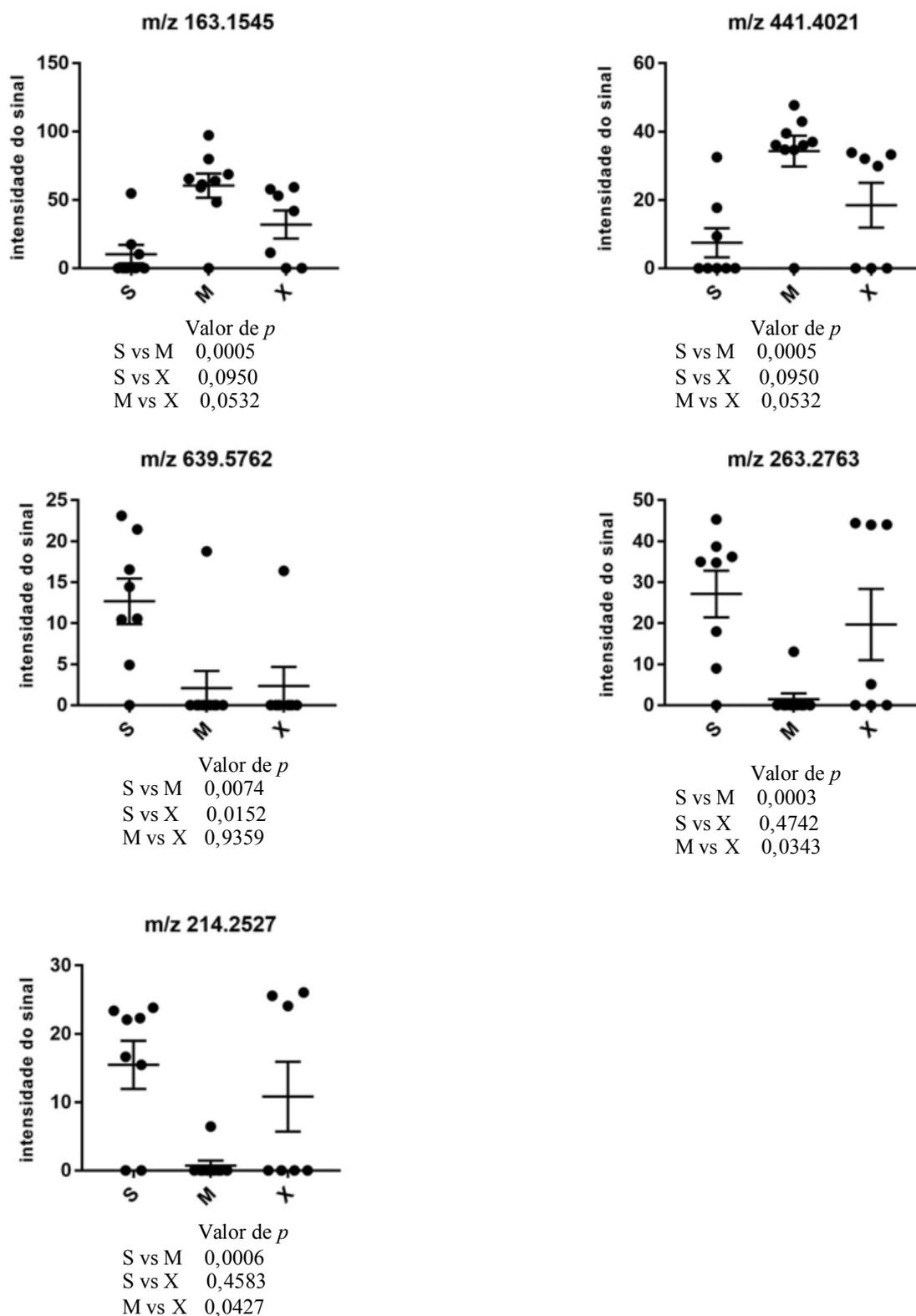


Figura 5.21 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação S vs MDR no segundo experimento. A análise se baseia no valor de p e no poder discriminatório apenas em modo positivo entre os grupos de amostras sensíveis e MDR. S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

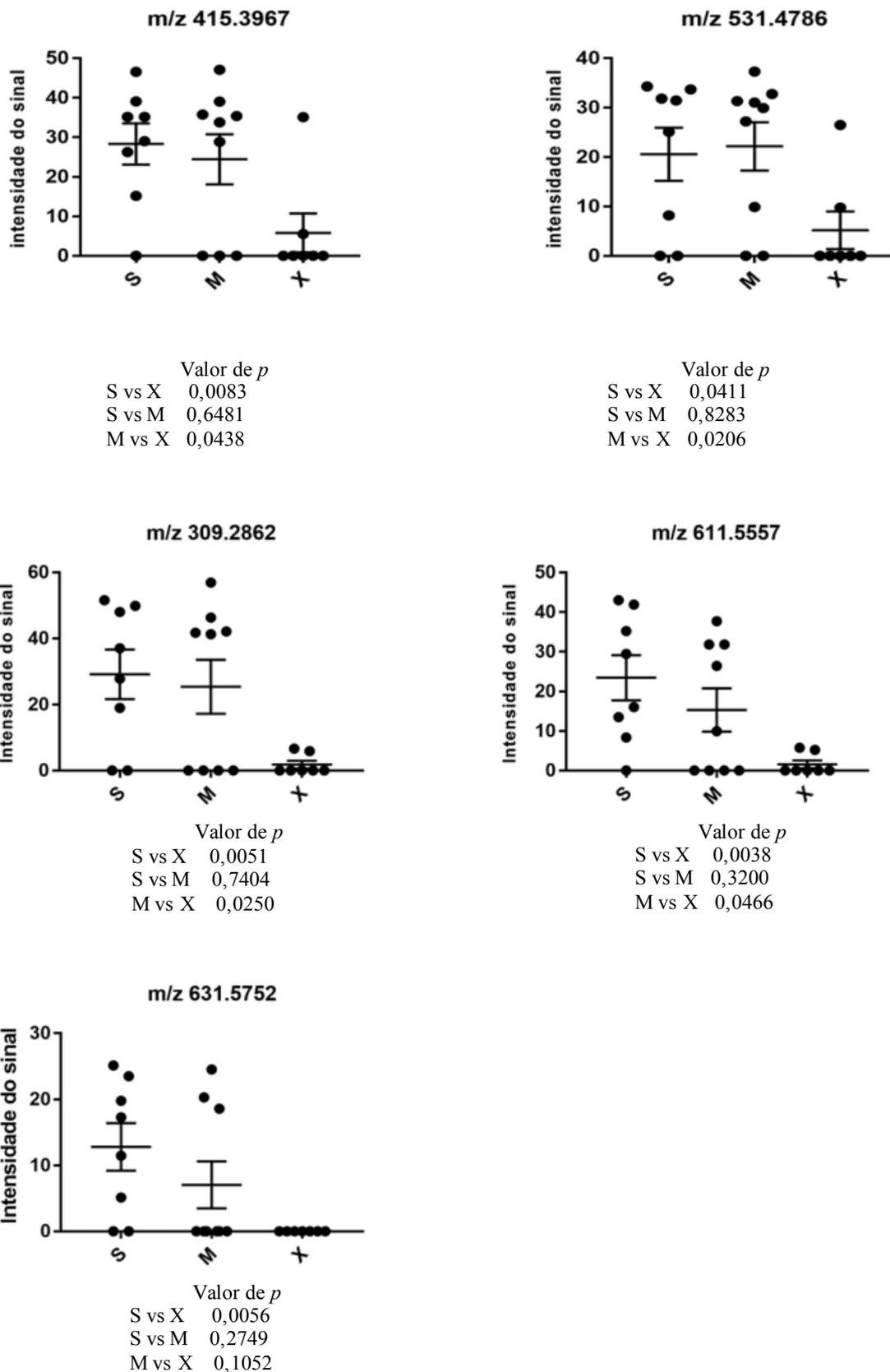


Figura 5.22 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação S vs XDR no segundo experimento. A análise se baseia no valor de p e no poder discriminatório apenas em modo positivo entre os grupos de amostras sensíveis e XDR. S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

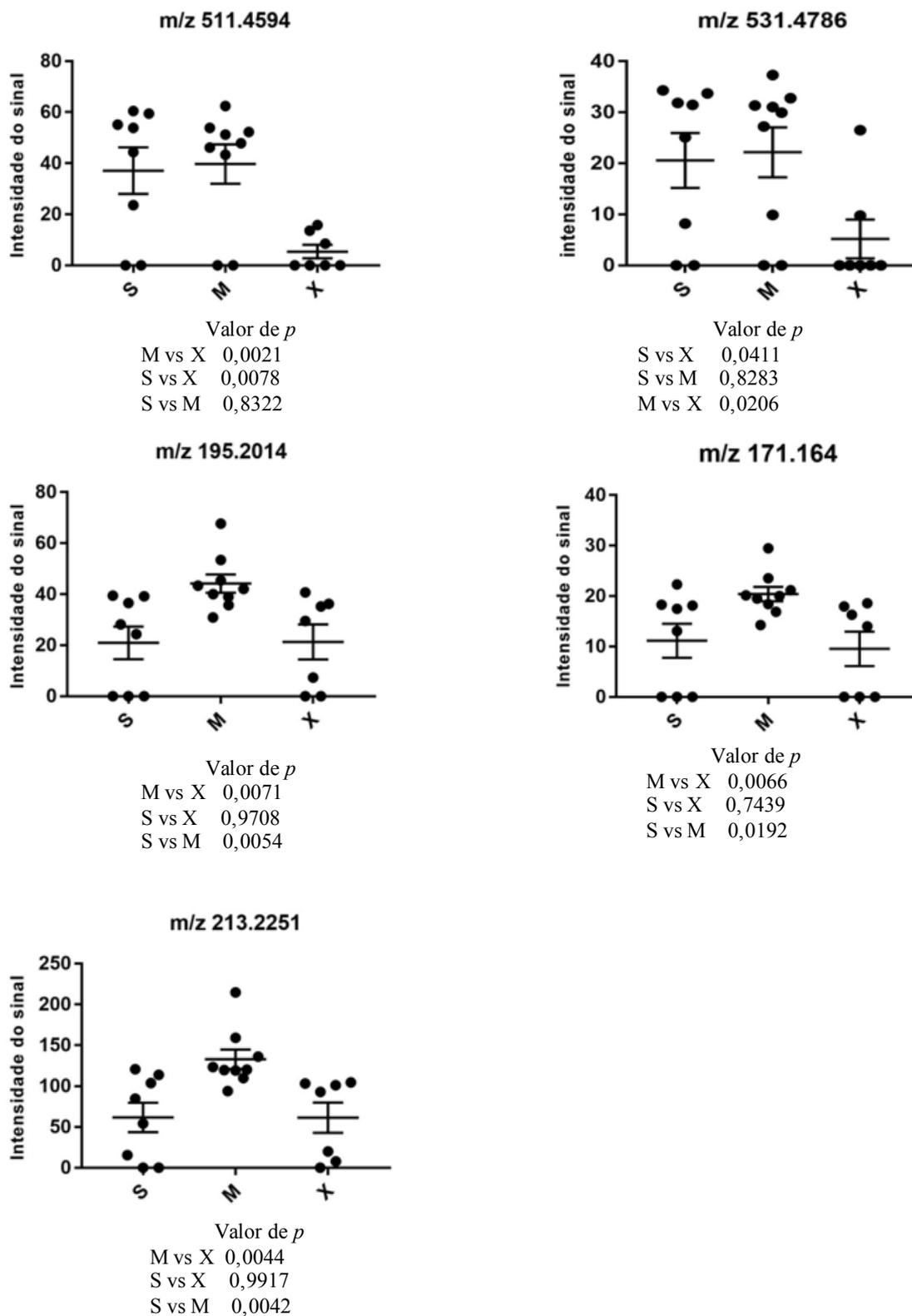


Figura 5.23 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst na comparação MDR vs XDR no segundo experimento. A análise se baseia no valor de p e no poder discriminatório no segundo experimento apenas em modo positivo entre os grupos de amostras MDR e XDR. S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Assim como no primeiro experimento, além dos resultados dos íons selecionados pelo software MetaboAnalyst, foram realizadas análises manuais dos dados de metabolômica. Primeiramente, testes *t* de Student foram realizados para avaliar a significância estatística de cada resultado obtido (valor de *p*), médias dos níveis relativos de cada metabólito em cada um dos grupos de amostras e razões entre as médias obtidas em cada grupo foram também calculadas. Então, metabólitos que foram detectados em um dos grupos, mas não em outro durante as comparações binárias e que os valores de intensidade entre os grupos comparados foram alterados pelo menos 2 vezes foram selecionados. Através de tais comparações notou-se diferenças metabólicas significativas entre amostras dos diferentes grupos testados (S, MDR, XDR) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Resumo dos resultados de metabolômica do segundo experimento.

	Modo negativo	Modo positivo
Total de metabólitos detectados	1177	1840
Metabólitos presentes em 80% das cepas de pelo menos um grupo	0	236
S versus MDR (≥2-vezes, <i>p</i> <0,05)	0	65
S versus XDR (≥2-vezes, <i>p</i> <0,05)	0	31
MDR versus XDR (≥2-vezes, <i>p</i> <0,05)	0	37

Após a separação em grupos, os níveis relativos dos metabólitos considerados com maior poder discriminatório através de análise manual (5 maiores razões obtidas em cada comparação entre grupos, sendo razões ≥ 2 , e *p*<0,05) foram comparados entre os diferentes grupos de amostras (Figuras 5.24, 5.25, 5.26).

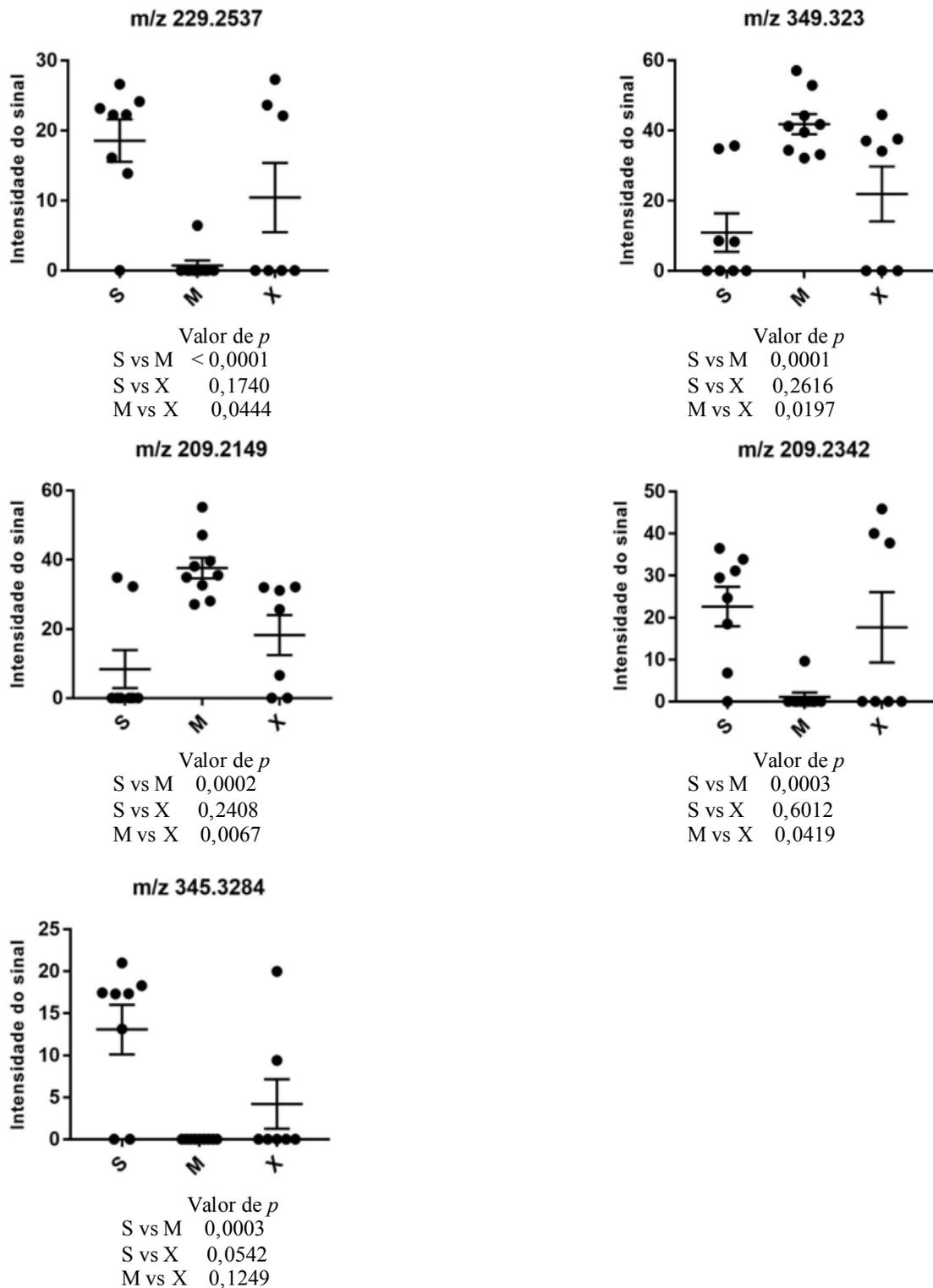


Figura 5.24 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do segundo experimento na comparação S vs MDR. Análise de íons do segundo experimento apenas em modo positivo entre os grupos sensível e MDR. A análise se baseia no valor de p e na razão entre as médias de cada comparação binária entre grupos, sendo considerados com alto poder discriminatório aqueles com valor de $p < 0,05$ e razão ≥ 2 . S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

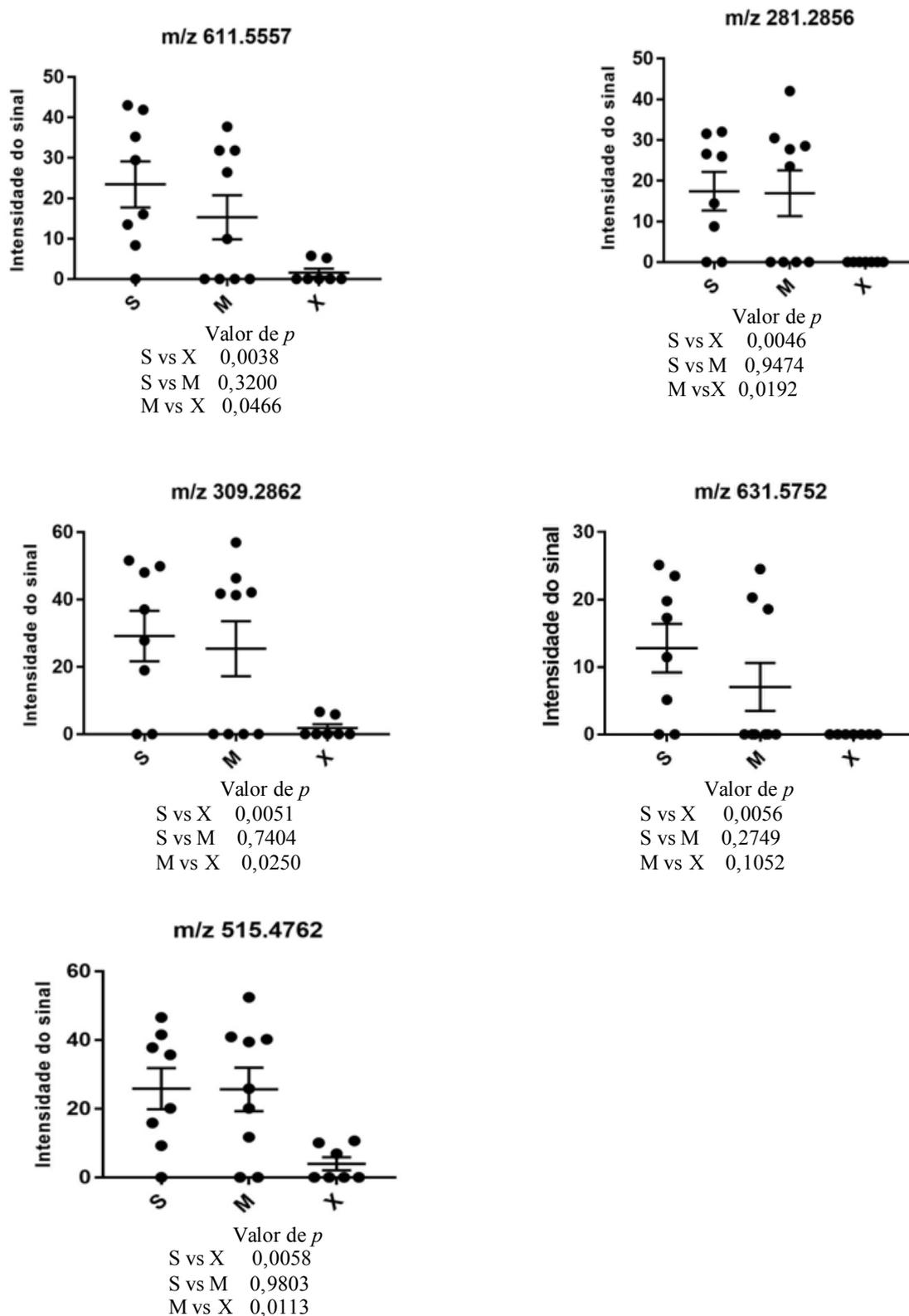


Figura 5.25 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do segundo experimento na comparação S vs XDR. Análise de íons do segundo experimento apenas em modo positivo entre os grupos sensível e XDR. A análise se baseia no valor de p e na razão entre as médias de cada comparação binária entre grupos, sendo considerados com alto poder discriminatório aqueles com valor de $p < 0,05$ e razão ≥ 2 . S: sensível; M: multiresistente; X: extensivamente resistente.

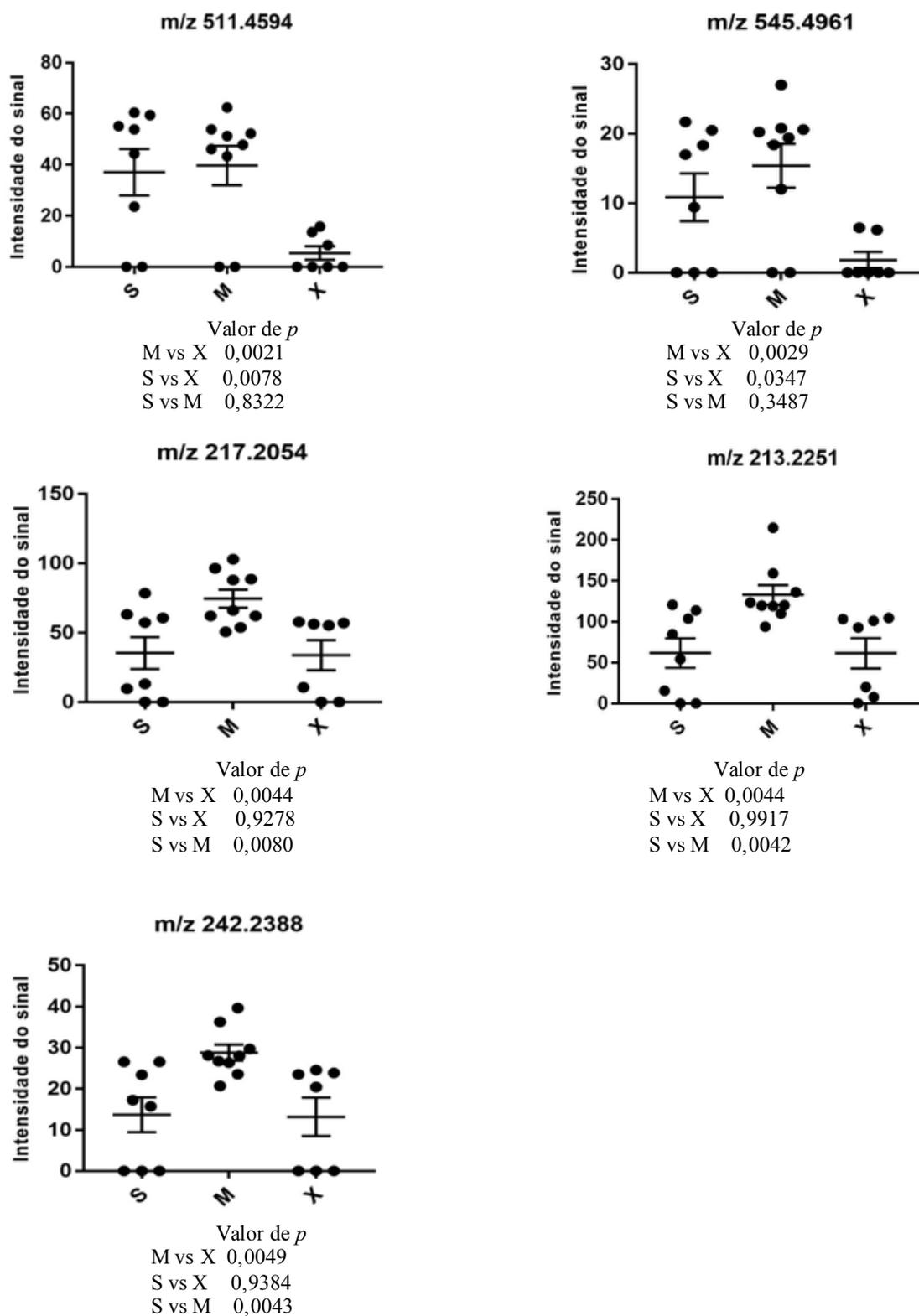


Figura 5.26 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos 5 íons considerados com maior poder discriminatório por análise manual do segundo experimento na comparação MDR vs XDR. Análise de íons do segundo experimento apenas em modo positivo entre os grupos MDR e XDR. A análise se baseia no valor de p e na razão entre as médias de cada comparação binária entre grupos, sendo considerados com alto poder discriminatório aqueles com valor de $p < 0,05$ e razão ≥ 2 . S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Com o objetivo de investigar o motivo pelo qual algumas cepas não se agruparam com cepas com o mesmo perfil de susceptibilidade, foi realizada uma análise das mutações associadas à resistência a alguns fármacos de primeira e segunda linha através de sequenciamento dos *loci* genéticos envolvidos, onde foi possível observar a presença de mutações e compará-las aos resultados obtidos no teste fenotípico realizado após a seleção das cepas.

Nos resultados da análise por sequenciamento dos genes comumente associados à resistência, pode-se observar algumas mutações em cepas consideradas como sensíveis no teste de sensibilidade, assim como ausência de mutações em cepas consideradas como resistentes pelo teste de sensibilidade (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Resumo dos resultados de sequenciamento de determinantes genéticos de resistência a drogas nas cepas utilizadas neste estudo.

Cepa	Genes				
	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>gyrA</i>	<i>rrs</i>
S1	WT	WT	c-15t	G21G/ S95T	WT
S2	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S3	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S4	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S5	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S6	WT	WT	WT	WT	WT
S7	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S8	P497T	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S9	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S10	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S11	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S12	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S13	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S14	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S15	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S16	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S17	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
S18	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 1	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 2	H526T	S315T	t-161INS	G21G/ S95T	WT
MDR 3	A516V	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 4	H526C	S315T	WT	G21G/ S95T/ S91P	WT
MDR 5	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 6	S531L	WT	WT	G21G/ S95T	WT

MDR 7	S531L/ V577A	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 8	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 9	H526A	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 10	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 11	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 12	WT	WT	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 13	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 14	G513P	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 15	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
MDR 16	S531L	S315T	WT	G21G	WT
MDR 17	G510L/ A516T	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
XDR 1	H526A/ G562A	WT	WT	G21G/ S95T/ S91P	a1401g
XDR 2	S531L	WT	WT	G21G/ S95T/ A94G	a1401g
XDR 3	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T/ A90V/ H70G	a1401g
XDR 4	S531L	S315T	WT	Glu21Gln/ A94G	a1401g
XDR 5	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T/ A90V	a1401g
XDR 6	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T/ A94A	WT
XDR 7	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T/ A94G	a1401g
XDR 8	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T/ A94G	a1401g
XDR 9	S531L/ P514V	S315T	WT	G21G/ S95T/ A90V	WT
XDR 10	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T/ A94G	WT
XDR 11	S531L/ P514V	S315T	WT	G21G/ S95T/ A94H	a1401g
XDR 12	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T/ A94A	WT
XDR 13	S531L	S315T	WT	G21G/ A94G	a1401g
XDR 14	S531L	WT	WT	G21G/ S95T/ A94G	a1401g
XDR 15	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T	WT
XDR 16	S531L	S315T	WT	G21G/ S95T/ A94A	WT
XDR 17	S531L	WT	WT	G21G/ S95T/ A94G	a1401g

WT (*Wild type*) - Cepa selvagem (cepa com DNA idêntico à cepa padrão). Em vermelho encontram-se mutações que conferem resistência. Em verde encontram-se mutações que não conferem resistência. Azul representa mutações que não foram encontradas na literatura. Letras maiúsculas representam aminoácidos da sequência proteica, enquanto letras minúsculas representam nucleotídeos da sequência do gene codificante. INS: inserção.

A comparação dos resultados obtidos pelo sequenciamento com os dados da resistência fenotípica observados no MGIT resultou em algumas discordâncias. Dentre os resultados discordantes, foi possível observar a ausência de mutações no gene *rrs* de cepas caracterizadas como fenotipicamente resistentes à amicacina e canamicina (XDR6, XDR9, XDR10, XDR12, XDR15 e XDR16), ausência de mutações que conferem resistência no gene *gyrA* em cepa fenotipicamente resistente à ofloxacina (XDR15), ausência de mutação que caracteriza resistência tanto em *katG*, quanto em *inhA* em cepas fenotipicamente resistentes à isoniazida

(MDR6 e MDR12, XDR1, XDR2, XDR14 e XDR17), ausência de mutação que caracteriza resistência em *rpoB* em uma cepa fenotipicamente resistente à rifampicina (MDR12) e mutação que confere resistência à isoniazida no gene *inhA* em uma cepa fenotipicamente sensível (S1). Uma possível explicação para os casos em que se detecta resistência fenotípica a antibióticos porém não são encontradas mutações genéticas é o mecanismo de resistência através de bombas de efluxo, que podem expulsar os antibióticos do interior da bactéria, reduzindo a sua ação e tornando possível a sobrevivência bacteriana (43). Para os casos em que se detecta resistência fenotípica à Amk e Kan, porém não são encontradas mutações genéticas no gene *rrs*, mutações podem estar situadas no promotor do gene *eis*, e estas também podem conferir resistência a estas duas drogas, embora sejam mais raras. Já no caso da ausência de mutação no gene *gyrA* e resistência fenotípica à ofloxacina, uma hipótese é de que a resistência possa ser causada em função de mutações no gene *gyrB*.

Já quanto ao resultado de susceptibilidade fenotípica em cepa contendo marcador genético de resistência, não podemos afirmar com certeza o motivo da discrepância; entretanto, é provável que o mesmo tenha ocorrido por falha no teste de susceptibilidade, apesar de não podermos descartar por completo a possibilidade de que tenha havido contaminação do DNA da cepa sensível com o DNA de uma cepa resistente. Apesar de algumas discordâncias encontradas entre os resultados do teste fenotípico e do sequenciamento, a maioria das cepas discordantes não foram aquelas que destoaram de seus grupos na construção dos agrupamentos hierárquicos. Uma exceção a esta afirmação encontra-se na cepa MDR4, que apesar de ter sido inicialmente categorizada como MDR, sendo sensível às drogas de segunda linha, apresentou mutação no gene *gyrA*, que confere resistência à ofloxacina. No dendograma foi possível observar seu agrupamento com o grupo de cepas XDR, resultado parcialmente condizente com a presença de um marcador de resistência a uma droga de segunda linha (Figuras 5.2, 5.4 e 5.8).

Com o objetivo de validar os resultados obtidos através das análises de metabolômica descritas anteriormente, foi realizado também análises de metabolômica de cepas com

diferentes perfis de susceptibilidade utilizando outra metodologia de espectrometria de massas. Nestas novas análises, foi utilizada a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida de alta performance, e foram realizadas análises adicionais usando 3 cepas de cada grupo (Tabela 5.6). As cepas selecionadas foram cepas que apresentaram maior similaridade genotípica e cujos resultados genéticos corroboraram os resultados obtidos no teste fenotípico de susceptibilidade a drogas. As cepas selecionadas foram então submetidas a análises por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida de alta performance com o intuito de se obter uma separação de acordo com sua natureza química, o que auxilia na identificação dos compostos ali presentes. Para isso, metabólitos extraídos das diferentes amostras foram injetados em triplicata técnica em uma coluna C₁₈ Zorbax 2.1 x 50 mm, com poro de 1,8 µm (Agilent) em um fluxo de 500 µL/min durante uma corrida cromatográfica de 15 min e os espectros foram adquiridos na faixa de *m/z* 67 a 1005 em um espectrômetro de massas Quadrupolo – Orbitrap (Q Exactive™ Plus). Neste terceiro experimento, foram detectados 2.234 metabólitos apenas em modo positivo.

Tabela 5.6 – Cepas selecionadas para o terceiro experimento e seus resultados de detecção do antígeno MPT64 e testes de susceptibilidade.

Cepa	MPT64	Sm	Inh	Rif	Emb	Amk	Oflo	Kan	Cap
S7	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S9	+	S	S	S	S	S	S	S	S
S12	+	S	S	S	S	S	S	S	S
MDR1	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR8	+	S	R	R	S	S	S	S	S
MDR11	+	S	R	R	S	S	S	S	S
XDR5	+	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR13	+	R	R	R	R	R	R	R	R
XDR16	+	S	R	R	S	R	R	R	R

Tabela demonstrando o perfil de susceptibilidade das cepas utilizadas no terceiro experimento. +: resultado positivo no ensaio de detecção do antígeno MPT64. Sm: estreptomicina; Inh: isoniazida; Rif: rifampicina; Emb: etambutol; Amk: amicacina; Oflo: ofloxacina; Kan: canamicina; Cap: capreomicina. R: resistente; S: sensível.

Os resultados brutos obtidos nesta etapa foram processados como já descrito anteriormente. Um gráfico de PCA foi gerado utilizando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) baseando-se nos dados brutos obtidos. O gráfico de PCA dos dados não revelaram uma separação significativa, e o perfil metabólico de todos os isolados mostrou-se semelhante, como demonstrado na Figura 5.27.

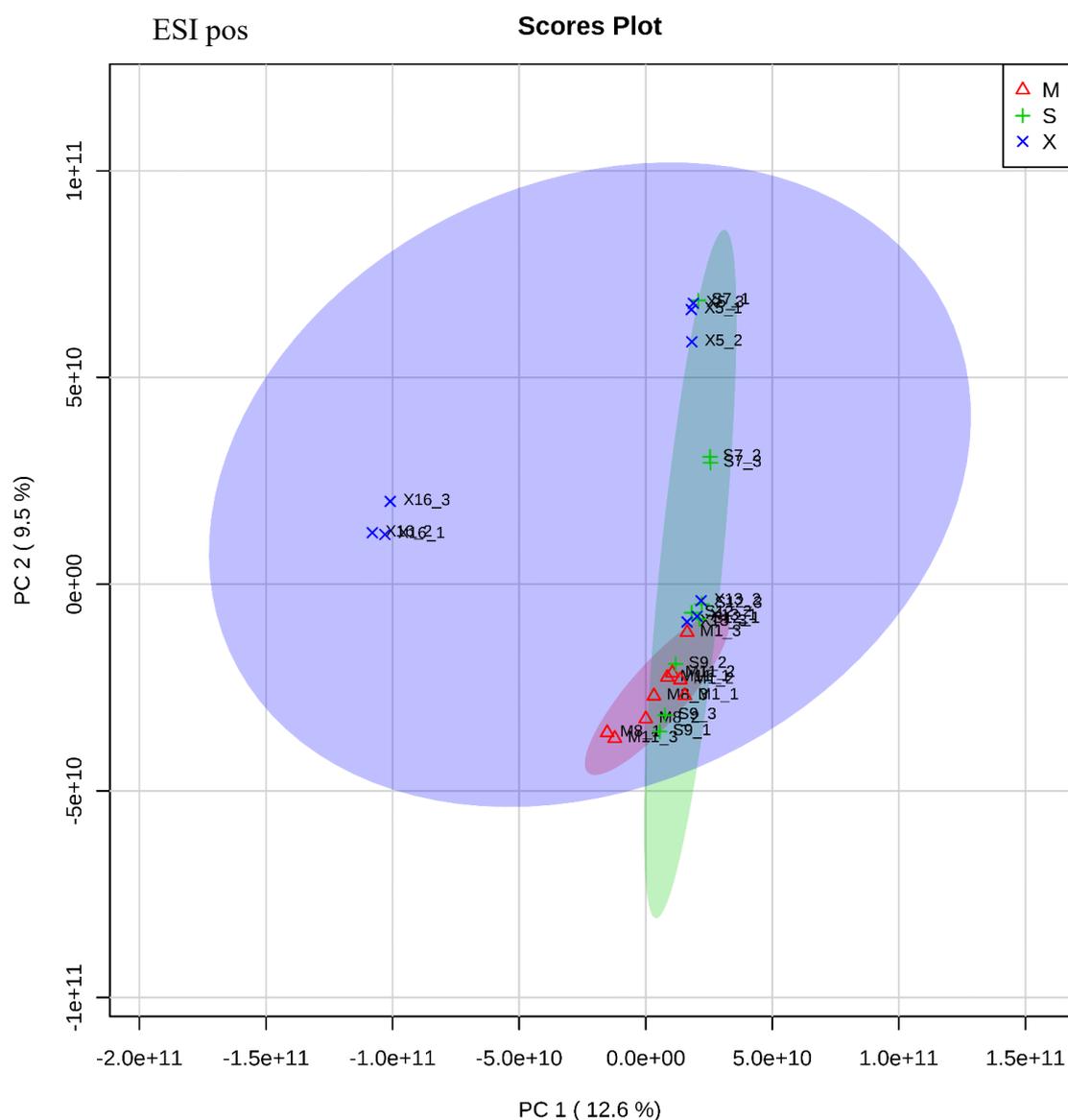


Figura 5.27 – Análise de componentes principais (PCA) do terceiro experimento. Gráficos de PCA gerados com o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) de todos os íons detectados em modo positivo e negativo dos três grupos de amostras de *M. tuberculosis* (S, MDR e XDR). S: sensível; M: multiresistente; X: extensivamente resistente. a) ESI pos; b) ESI neg. + verde: sensível; x azul: XDR; triângulo vermelho: MDR.

Após análise do gráfico de PCA, foram realizadas análises de agrupamentos hierárquicos com base no grau de similaridade dos perfis de abundância dos 25 (Figura 5.28) e 5 (Figura 5.29) metabólitos com maior poder discriminatório entre os grupos, de modo a gerar dendrogramas. Pode-se observar no dendrograma que considera os 25 íons com maior poder discriminatório que de fato há uma notável separação entre os três grupos de cepas (Figura 5.28). Já quando considerados apenas os 5 íons com maior poder discriminatório há uma separação evidente do grupo de cepas sensíveis com relação aos grupos de cepas XDR e MDR e uma separação não tão evidente entre os grupos MDR e XDR, o que é esperado devido a maior similaridade em seu perfil de resistência aos antibióticos (Figura 5.29).

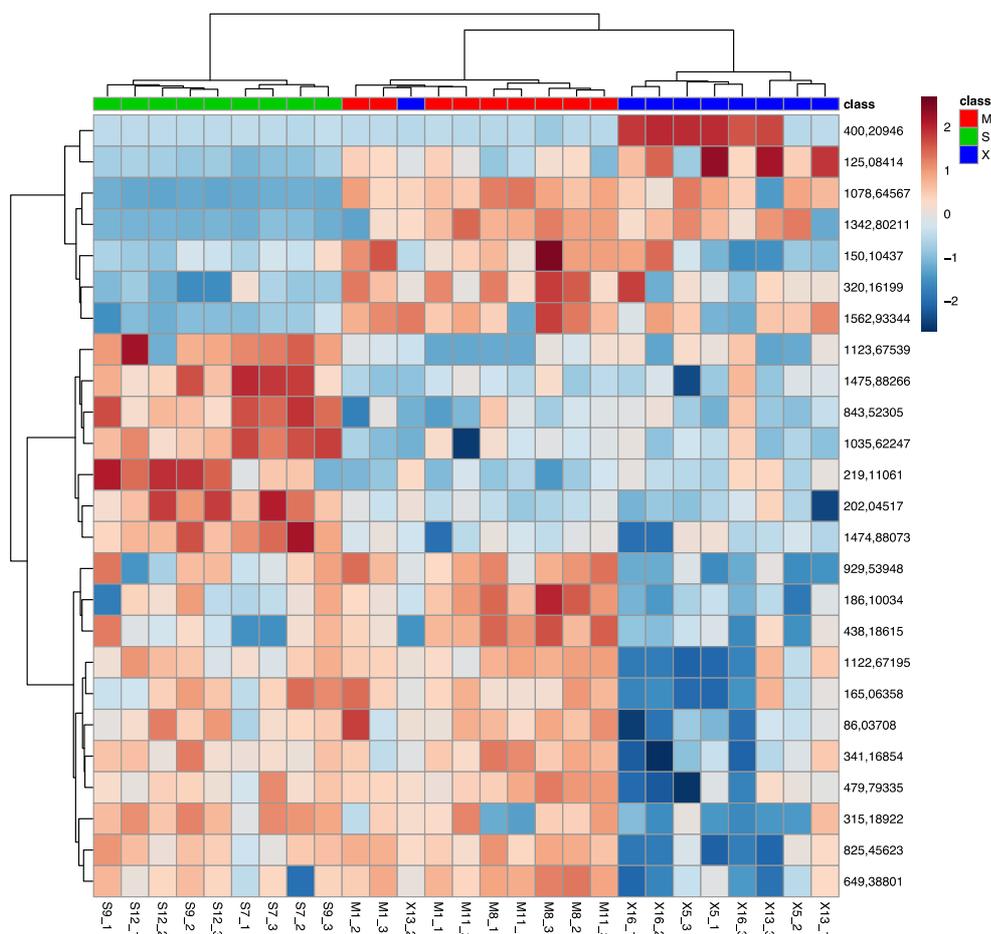


Figura 5.28 – Análise de agrupamento hierárquico do terceiro experimento. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) em modo positivo com base nos 25 íons com maior poder discriminatório, onde cada barra horizontal representa um metabólito, e a intensidade destes em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). Cada amostra foi injetada 3 vezes, sendo assim temos 9 barras verticais para cada grupo. S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

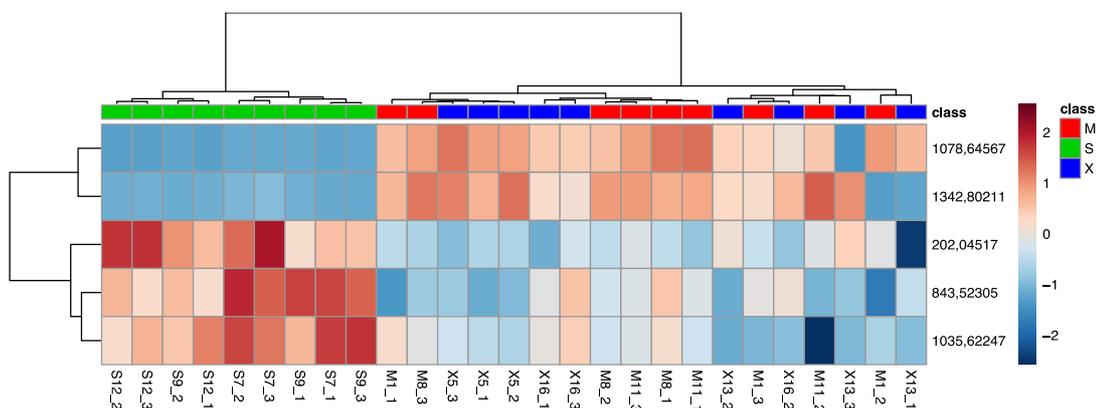


Figura 5.29 – Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório determinados pelo software MetaboAnalyst no terceiro experimento. Dendrograma e *heat map* gerado usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) em modo positivo com base nos 5 íons com maior poder discriminatório, onde cada barra horizontal representa um metabólito, e a intensidade destes em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). Cada amostra foi injetada 3 vezes, sendo assim temos 9 barras verticais para cada grupo. S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Com o objetivo de se obter uma melhor separação dos grupos foram também realizadas análises de agrupamentos hierárquicos comparando apenas dois dos três grupos testados, desta vez baseando-se apenas no grau de similaridade dos perfis de abundância dos 5 metabólitos com maior poder discriminatório, de modo a gerar dendrogramas (Figuras 5.30, 5.32 e 5.32).

A primeira análise comparando apenas dois grupos do terceiro experimento foi realizada comparando apenas cepas dos grupos sensível e MDR, excluindo cepas do grupo XDR. Isso permitiu uma excelente separação entre estes grupos, que pode ser claramente observada na Figura 5.30.

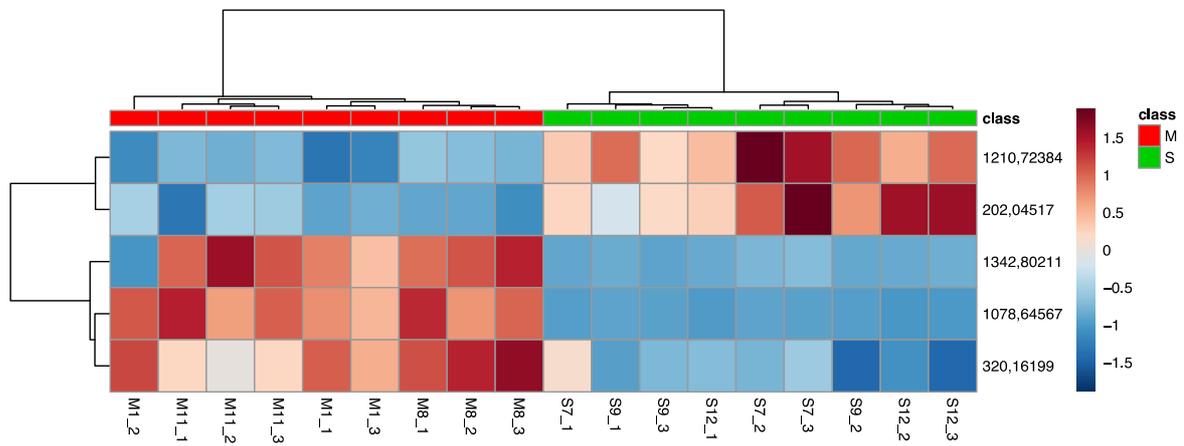


Figura 5.30 – Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do terceiro experimento na comparação S vs MDR. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) apenas em modo positivo com base nos 5 íons com maior poder discriminatório entre os grupos sensível e MDR, onde cada barra horizontal representa um metabólito, e a intensidade destes em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). Cada amostra foi injetada 3 vezes, sendo assim temos 9 barras verticais para cada grupo. S: sensível; M: multiresistente.

A segunda análise comparando apenas dois grupos do terceiro experimento foi realizada comparando apenas cepas dos grupos sensível e XDR, excluindo cepas do grupo MDR. Mais uma vez uma excelente separação entre os grupos pode ser claramente observada (Figura 5.31).

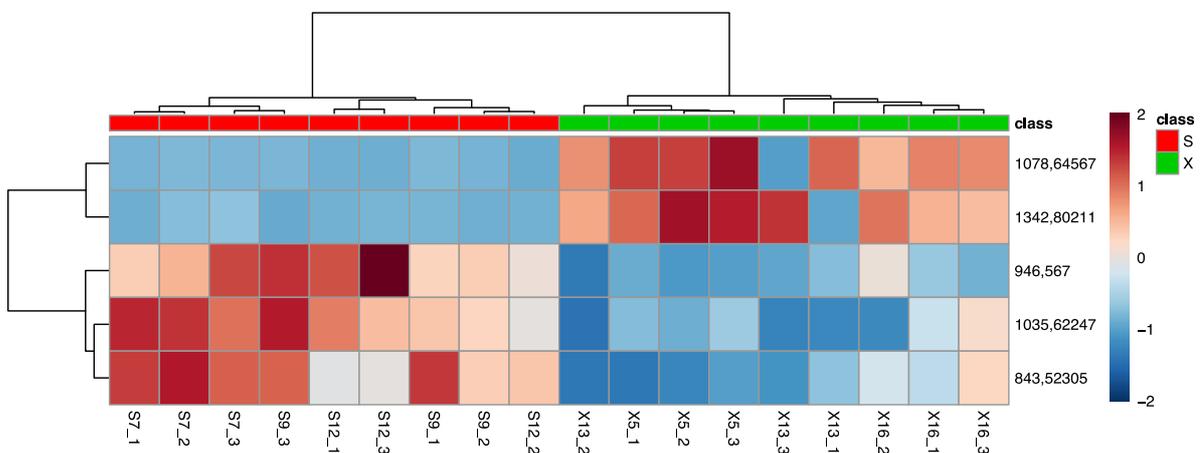


Figura 5.31 – Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do terceiro experimento na comparação S vs XDR. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) apenas em modo positivo com base nos 5 íons com maior poder discriminatório entre os grupos sensível e XDR, onde cada barra horizontal representa um metabólito, e a intensidade destes em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). Cada amostra foi injetada 3 vezes, sendo assim temos 9 barras verticais para cada grupo. S: sensível; X: extensivamente resistente.

A terceira e última análise do terceiro experimento foi realizada comparando apenas cepas dos grupos MDR e XDR, excluindo cepas do grupo sensível. Novamente, uma excelente separação entre os grupos pode ser observada (Figura 5.32).

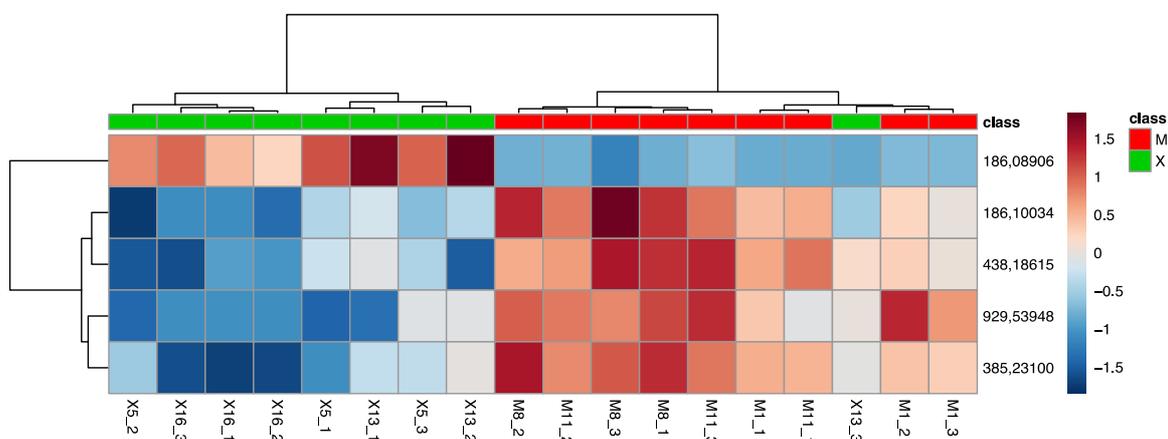


Figura 5.32 – Análise de agrupamento hierárquico utilizando os 5 íons com maior poder discriminatório do terceiro experimento na comparação MDR vs XDR. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) apenas em modo positivo com base nos 5 íons com maior poder discriminatório entre os grupos MDR e XDR, onde cada barra horizontal representa um metabólito, e a intensidade destes em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). Cada amostra foi injetada 3 vezes, sendo assim temos 9 barras verticais para cada grupo. M: multiresistente; X: extensivamente resistente.

Além das análises de detecção de m/z parentais, foram realizados também análises dos íons gerados por dissociação induzida por colisão. Após obtenção dos dados brutos de fragmentação iônica, identidades putativas foram obtidas através de comparações dos perfis de fragmentação utilizando o software *Compound Discoverer*. Alguns compostos de interesse foram então selecionados manualmente com base nos dados de valor de p , razão entre médias de intensidades e identidade do composto, com o objetivo de identificar compostos que tiveram grande poder discriminatório e características moleculares que possivelmente permitiriam sua detecção em cepas de *M. tuberculosis* através de métodos moleculares simples. Em seguida, foram realizadas comparações binárias entre os grupos através de análises de agrupamentos hierárquicos com base no grau de similaridade dos perfis de abundância dos compostos selecionados, de modo a gerar dendrogramas e *heat maps* (Figuras 5.33, 5.34 e 5.35). Pode-se observar nas figuras em que são apresentadas comparações entre os grupos MDR e sensível e

os grupos XDR e sensível que de fato houve uma notável separação entre os grupos (Figuras 5.33 e 5.35). Já quando comparamos os grupos XDR e MDR (Figura 5.34) houve uma separação não tão evidente, o que é esperado devido a maior similaridade em seu perfil de resistência aos antibióticos.

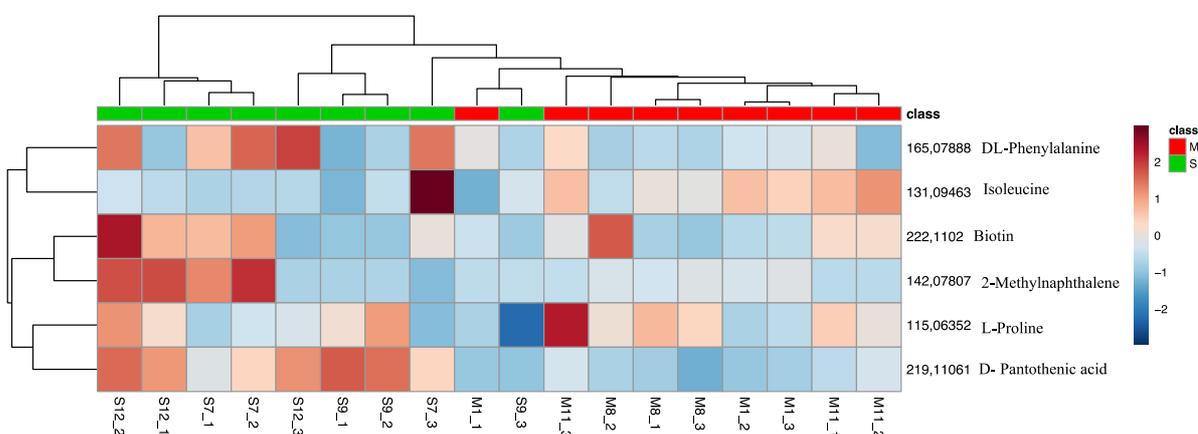


Figura 5.33 – Análise de agrupamento hierárquico do terceiro experimento na comparação S vs MDR baseado-se nos compostos com identificações putativas escolhidas. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) apenas em modo positivo, cada barra horizontal representa um metabólito, e a intensidade destes em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). Cada amostra foi injetada 3 vezes, sendo assim temos 9 barras verticais para cada grupo. S: sensível; M: multirresistente.

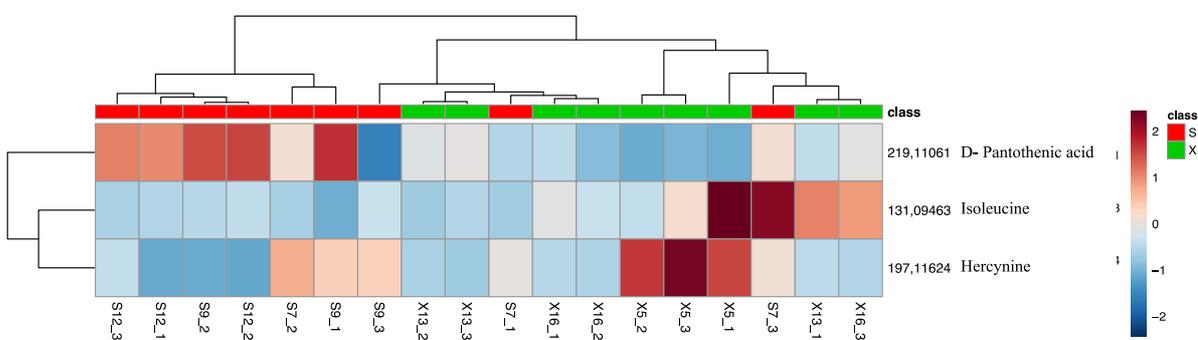


Figura 5.34 – Análise de agrupamento hierárquico do terceiro experimento na comparação S vs XDR baseado-se nos compostos com identificações putativas escolhidas. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) apenas em modo positivo, cada barra horizontal representa um metabólito, e a intensidade destes em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). Cada amostra foi injetada 3 vezes, sendo assim temos 9 barras verticais para cada grupo. S: sensível; X: extensivamente resistente.

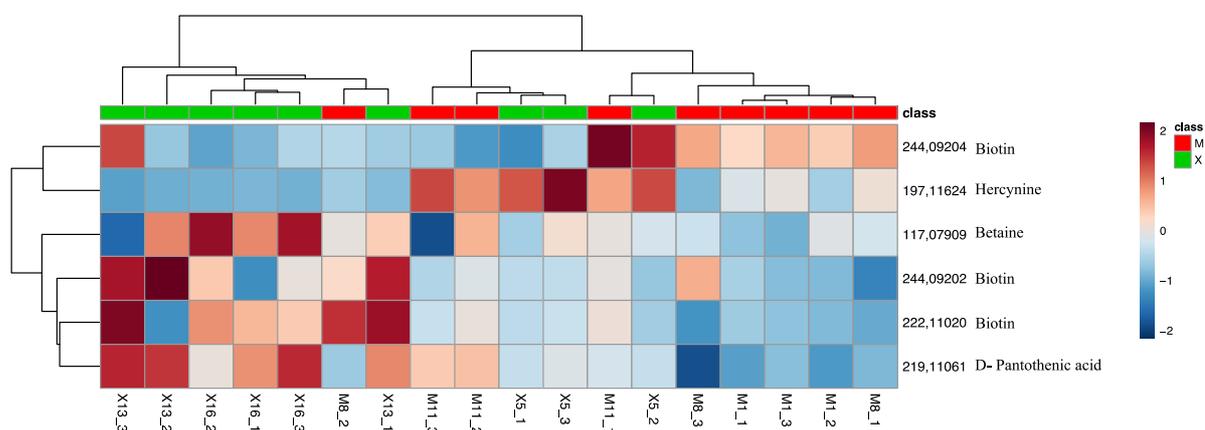


Figura 5.35 – Análise de agrupamento hierárquico do terceiro experimento na comparação S vs XDR baseando-se nos compostos com identificações putativas escolhidas. Dendrograma e *heat map* gerados usando o software online MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) apenas em modo positivo, cada barra horizontal representa um metabólito, e a intensidade destes em cada amostra é representada em escala normalizada de azul (menor intensidade) para vermelho (maior intensidade). Cada amostra foi injetada 3 vezes, sendo assim temos 9 barras verticais para cada grupo. M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

Os níveis relativos dos compostos identificados como prolina, isoleucina, hercinina, betaina, ácido pantotênico e biotina considerados com alto poder discriminatório e boa identificação putativa foram então comparados entre os diferentes grupos de amostras. Primeiramente, testes *t* de Student foram realizados para avaliar a significância estatística de cada resultado obtido (valor de *p*). Além disso, foram calculadas médias dos níveis relativos de cada metabólito em cada um dos grupos de amostras, e razões entre as médias obtidas em cada grupo foram também calculadas. Os resultados destas análises são representados na Figura 5.36.

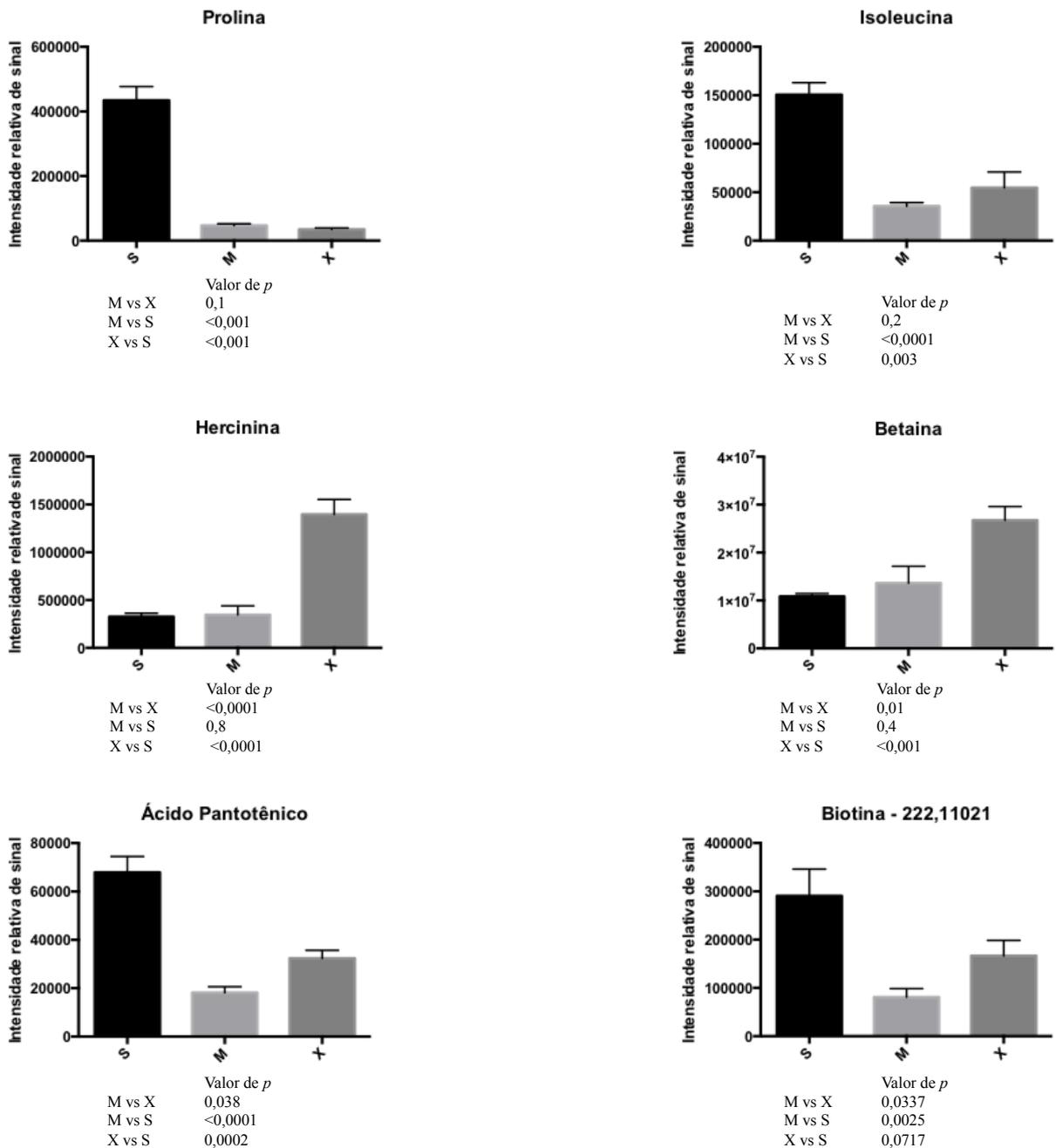


Figura 5.36 – Gráficos representativos dos níveis relativos dos compostos considerados com alto poder discriminatório e boa identificação putativa no terceiro experimento. Análise de compostos do terceiro experimento apenas em modo positivo. A análise se baseia no valor de p e razão entre as médias de cada comparação binária entre grupos, sendo considerados com alto poder discriminatório aqueles com valor de $p < 0,05$ e razão ≥ 2 . S: sensível; M: multirresistente; X: extensivamente resistente.

6. DISCUSSÃO

Como dito anteriormente, a resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos pode ser decorrente de um fenômeno genético ou fenotípico. A primeira ocorre devido a mutações em genes cromossômicos das bactérias, resultando em cepas MDR ou XDR. Por outro lado, a resistência derivada de fenótipos é devida a alterações epigenéticas na expressão gênica e modificações de proteínas, resultando em cepas com alta tolerância aos fármacos anti-TB (71). Seja qual for o mecanismo envolvido, a resistência a drogas por uma célula invariavelmente representa um impacto no metabolismo celular. A produção, por exemplo, de uma enzima degradadora de antibiótico ou de uma bomba de efluxo, consome recursos energéticos, que devem vir de alguma outra via celular. Isso pode provocar um efeito cascata no metabolismo bacteriano, de modo que a resistência a drogas gere alterações que possam ser detectadas e medidas por métodos suficientemente sensíveis.

Recentemente, o advento das tecnologias ômicas permitiu o desenvolvimento de uma série de novos estudos sobre aspectos de biologia celular, como o metabolismo por exemplo, de maneira muito mais refinada e sensível. Tais métodos, como a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, permitem agora que o metabolismo bacteriano seja avaliado de maneira global, com dezenas de vias metabólicas sendo monitoradas simultaneamente. Além de permitir um maior entendimento da biologia microbiana e os diversos fenômenos envolvidos, este nível de sensibilidade e precisão permite também que perfis metabólicos complexos sejam definidos, podendo ser utilizados como marcadores do estado fisiológico das células estudadas. Estes perfis, por sua vez, podem ser empregados como marcadores de propriedades específicas, de modo que o estado metabólico celular, por exemplo, possa ser predito de acordo com o perfil encontrado em análises ômicas. Dadas as alterações metabólicas causadas pela resistência a drogas em *M. tuberculosis*, torna-se possível, através da determinação de biomarcadores que possam ser correlacionados com o perfil de resistência, a

definição do diagnóstico da resistência ou susceptibilidade via métodos globais de análise, possivelmente em tempo mais curto, permitindo que o tratamento adequado seja iniciado mais rapidamente, interrompendo portanto, a cadeia de transmissão da doença e evitando a ocorrência de falha terapêutica.

O metaboloma se refere ao conjunto de pequenas moléculas (metabólitos) presentes em uma amostra biológica, sendo estas substâncias consideradas os produtos finais dos processos metabólicos celulares (72). A abordagem metabolômica visa avaliar mudanças globais nos perfis de metabólitos, que são impressões químicas únicas de processos biológicos. Como sugerido acima, dados da literatura indicam que cepas de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos tem perfis metabólicos distintos, dado o impacto de mutações associadas à resistência a drogas no metabolismo celular e no *fitness* bacteriano (69, 73, 74).

Ao iniciar este estudo foi levantada a hipótese de que, ao estudar as atividades metabólicas de cepas de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de susceptibilidade a drogas, seria possível realizar associações interessantes e definir um perfil de metabólitos característicos de cepas com perfis de susceptibilidade a drogas distintos (MDR, XDR e sensível), que futuramente pudessem ser utilizados como biomarcadores de resistência. Assim, foram realizadas avaliações dos perfis metabólicos de cepas de *M. tuberculosis* com diferentes níveis de resistência a drogas através de espectrometria de massas (MS), além da análise dos dados gerados utilizando diversas metodologias, foram realizadas análises de agrupamento hierárquico, que permitiu uma boa separação dos grupos com diferentes perfis de resistência em múltiplos experimentos, principalmente quando foi realizada a comparação de dois grupos separadamente utilizando um número limitado de íons considerados com maior poder discriminatório em ambos os experimentos. Isto foi observado tanto por análise manual como pelo software MetaboAnalyst. Metabólitos com maior poder discriminatório foram selecionados e analisados separadamente, demonstrando que de fato há metabólitos que são

significativamente mais abundantes em grupos com perfis de resistência específicos. As análises deste estudo demonstram que a abordagem metabolômica consegue distinguir claramente grupos com diferentes perfis de resistência (S, MDR e XDR). Apesar dos dados do segundo experimento estarem muito aquém do primeiro experimento, os dados aqui apresentados demonstram a possibilidade de que perfis de resistência de *M. tuberculosis* possam ser preditos através das análises metabólicas. Entretanto, devido a impossibilidade de se encontrar metabólitos com m/z idênticos no primeiro e segundo experimentos, é necessário que amostras com perfis conhecidos sejam utilizadas em paralelo a amostras teste, de modo que possam atuar como controles em experimentos subsequentes. Além disso, os resultados obtidos utilizando espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida de alta performance e análise de perfis de fragmentação de íons com busca em base de dados para identificação putativa de compostos, identificaram alguns metabólitos específicos que podem vir a ser utilizados futuramente como biomarcadores. Tal possibilidade representaria um avanço significativo no estado da arte do diagnóstico da resistência a drogas em *M. tuberculosis*, visto que os resultados aqui obtidos poderão no futuro contribuir para o desenvolvimento de métodos simples, *point-of-care*, de diagnóstico da resistência.

Existem vias metabólicas em *M. tuberculosis* que são essenciais para a sobrevivência bacteriana, e muitas delas são alvos importantes para drogas anti-TB. O fármaco de primeira linha Inh inibe a síntese de ácidos micólicos, interferindo diretamente na estrutura da parede celular (75, 76). A Rif, outra droga de primeira linha, inibe a transcrição do DNA bacteriano através da ligação à subunidade da RNA polimerase codificada pelo gene *rpoB* (77, 78), outro processo absolutamente fundamental para a sobrevivência bacteriana.

Os dados obtidos neste estudo corroboram estudos focados na análise de mutações na subunidade da RNA polimerase codificada pelo gene *rpoB*, e sua relação com o metabolismo dos ácidos graxos. O primeiro estudo a associar um metabolismo alterado de ácidos graxos à resistência à rifampicina foi realizado em 2012 por Du Preez e Loots, utilizando tecnologia

metabolômica de GC-MS para comparar uma cepa *M. tuberculosis* wt totalmente suscetível a drogas com duas cepas mutantes para *rpoB* (S522L e S531L). As duas cepas mutantes mostraram uma síntese reduzida de certos ácidos graxos de cadeia ramificada necessários para a síntese de ácido micólico, além de um aumento da dependência de ácidos graxos de cadeia curta como fonte de carbono. Além disso, o mutante *rpoB* S531L apresentou maior capacidade de utilização dessas fontes alternativas de carbono quando comparado com o *rpoB* S522L (68). Em um estudo posterior, o mesmo grupo (79) observou uma perda total de ácido aconítico nas cepas mutantes em *rpoB*, levando a uma perturbação na funcionalidade da enzima aconitase, importante no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e na estabilização e proteção do mRNA contra sua degradação durante condições de baixa concentração de ferro ou estresse oxidativo. Assim, essa depleção de ácido aconítico pode ser uma resposta à mutação primária que causa resistência e explica a baixa viabilidade das cepas resistentes à rifampicina, uma vez que a produção de energia e o crescimento são prejudicados pela mutação. Outro importante achado nas cepas mutantes em *rpoB* foi a redução da capacidade de síntese da parede celular, que interfere diretamente na homeostase celular e estresse oxidativo. Confirmando estes achados, Loots e colaboradores também encontraram alterações em vários metabólitos relacionados à manutenção de parede celular observadas durante as análises metabolômicas, como por exemplo altos níveis de ácido treônico, produto natural da síntese de ácido ascórbico, o que indica nível elevado de estresse oxidativo. Outro metabólito identificado diferencialmente foi o metilmalionil-CoA, este composto foi detectado em quantidades reduzidas e está diretamente relacionado à manutenção da parede celular devido ao seu envolvimento na síntese de fiticerol dimicocerosato (*phthiocerol dimycocerate*, PDIM) (79) e como a parede celular de cepas resistentes é comprometida devido à mutação no gene *rpoB*, conforme Bisson e colaboradores já haviam observado, essa redução pode ser explicada pela regulação positiva da síntese de PDIM na tentativa de manter ou remodelar a parede celular (73).

Em 2014, Loots e colaboradores usaram a mesma abordagem (GCxGC-TOF-MS), para investigar mutações no gene *katG* que conferem monoresistência à Inh, e elucidar os mecanismos relacionados à resistência à Inh sob o ponto de vista da metabolômica. Este estudo identificou novas vias metabólicas e biomarcadores comparando os perfis de metabólitos entre duas cepas resistentes à Inh e a cepa do tipo selvagem. Os resultados demonstraram uma concentração elevada de ácidos graxos, alcanos e álcoois conhecidos por estarem associados ao estresse oxidativo nas cepas resistentes à Inh. Esses achados revelaram uma maior susceptibilidade ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, a regulação positiva de alguns mecanismos associados à redução do estresse oxidativo, incluindo uma via de degradação do ácido ascórbico nas cepas resistentes à Inh, uma via nunca proposta anteriormente em *M. tuberculosis*. Em conclusão, os metabólitos identificados neste estudo corroboram o pressuposto de que *M. tuberculosis* possui mecanismos compensatórios, incluindo a captação e utilização de alcanos e ácidos graxos como fontes adicionais de carbono e energia (69).

Foi possível perceber no presente estudo que cepas sensíveis possuem em seu perfil metabólico mais ácido pantotênico e biotina do que cepas resistentes, duas moléculas que estão diretamente relacionadas com a síntese de ácidos graxos. O ácido pantotênico é uma molécula essencial para síntese de coenzima A e de proteína transportadora de acil, que desempenham importante papel como carreadores do grupo acil no metabolismo de ácidos graxos, no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) e várias outras reações associadas ao metabolismo intermediário (80). Logo, podemos postular que a presença em baixos níveis de ácido pantotênico em cepas resistentes e a conseqüente baixa na síntese de de coenzima A e proteína transportadora de acil está interferindo diretamente na síntese de ácido micólico que por sua vez é um importante componente da parede celular. Já a biotina é um cofator essencial para duas importantes enzimas de *M. tuberculosis*; uma delas é a piruvato carboxilase, que embora não tenha um papel bem elucidado em *M. tuberculosis*, desempenha um importante papel no metabolismo central em muitas espécies bacterianas, repondo o TCA com oxaloacetato. Outra importante enzima é

a acil-coA carboxilase que, como o próprio nome já diz, catalisa a carboxilação de vários substratos de acil-coA, cujos produtos alimentam as vias que resultam na produção de ácidos micólicos (81). Então, tendo em vista que a biotina é cofator essencial para síntese de piruvato carboxilase e acil-coA carboxilase, podemos postular que os baixos níveis de destes compostos em cepas resistentes resultam em perturbação no TCA e em baixa síntese de ácido micólico na parede celular respectivamente. Foi possível identificar altos níveis de hercinina e betaína no perfil metabólico das cepas XDR quando comparadas aos demais grupos. A catálise de hercinina é um passo intermediário na via de biossíntese de ergotioneína que por sua vez, é um dos principais tampões redox que protege as bactérias contra agentes oxidativos, além de regular a fisiologia microbiana, o metabolismo celular e a patogenicidade (82, 83). Esses dados corroboram em parte com os achados de Genghof e Damme, que em 1964 demonstraram que cepas resistentes a Inh produzem níveis consideráveis de hercinina (84). Logo, é possível postular que o acúmulo de hercinina esteja acontecendo devido a alta demanda de síntese de ergotioneína a fim de combater o alto estresse oxidativo que está ocorrendo devido as mutações em genes críticos para sobrevivência bacteriana que além de conferir resistência à drogas nas cepas XDR, têm efeitos em importantes processos celulares.

Além das importantes moléculas descritas acima, dois aminoácidos, prolina e isoleucina, também foram encontrados em níveis diferenciados entre o grupo de cepas sensíveis e o grupo de cepas resistentes. Tais moléculas, por serem estáveis e de identificação potencialmente simples, são importantes candidatos a biomarcadores. Assim, o presente estudo representa um avanço significativo no atual entendimento do efeito da resistência a drogas no metabolismo bacteriano, apresenta possíveis avenidas a serem seguidas para a confirmação de marcadores específicos de resistência a drogas, em pelo menos dois níveis MDR e XDR. Além disto, pode contribuir de forma significativa para o desenvolvimento de métodos diagnósticos baseados em dados de metaboloma. Entretanto, vale frisar que estudos adicionais serão necessários para que alguns de nossos achados sejam validados, visto que, as moléculas aqui

citadas constituem apenas possibilidades de biomarcadores que podem vir a ser explorados dos nossos dados, entre muitos outros. Além disso, os achados deste estudo destacam a importância do metabolismo dos ácidos graxos e ácidos micólicos, essenciais para a estrutura da parede celular e para a resposta ao estresse oxidativo, como vias de resistência de *M. tuberculosis* e abrem um leque de possíveis empregos de técnicas de metabolômica como importantes ferramentas para a detecção de resistência a drogas através de biomarcadores. Tais ferramentas devem continuar a ser utilizadas não só em *M. tuberculosis*, mas em diversas outras bactérias resistentes, pois além de ampliar o conhecimento a respeito de mecanismos de resistência, podem também auxiliar o avanço do diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas para as quais a resistência a drogas mostra-se como um problema significativo.

7. CONCLUSÃO

Com a realização desse trabalho, foi possível observar que de fato existem diferenças significativas entre os perfis metabólicos os distintos grupos de resistência aos fármacos (S, MDR e XDR) e que é possível observar tais diferenças através de espectrometria de massas de alta vazão. Logo, é possível afirmar que esta ferramenta pode vir a ser utilizada como método de triagem no diagnóstico de resistência, para que na clínica o tratamento possa ser iniciado com mais dados empíricos, evitando a escolha de drogas incorretas para o tratamento e o desenvolvimento e espalhamento da resistência.

Além disso, este estudo demonstra que moléculas estáveis e de identificação possivelmente simples podem representar possíveis candidatos a biomarcadores de resistência, o que nos leva a crer que futuramente esses compostos possam ser utilizados em testes imunocromatográficos rápidos para detecção de resistência, o que resultaria em rapidez no diagnóstico e conseqüentemente em um bloqueio mais efetivo da cadeia de transmissão da doença, devido ao início mais rápido de um tratamento adequado e eficaz de acordo com a cepa infectante.

8. PERSPECTIVAS

Visa-se prosseguir o projeto com a realização das seguintes etapas:

- Avaliar novamente os extratos de metabólitos de amostras do segundo experimento utilizando a mesma abordagem, com o intuito de verificar se não houve erro no processamento anterior;
- Utilizar amostras com perfil de resistência desconhecido e amostras com perfil conhecido em uma mesma injeção, com o intuito de agrupar as mesmas, de modo que possamos prever qual o perfil de resistência de dada amostra desconhecida;
- Utilizar uma abordagem de *targeted metabolomics*, com o intuito de se identificar íons considerados com alto poder discriminatório e boa identidade putativa em novas amostras;
- Treinar um classificador de árvore de decisão para prever o perfil de resistência da cepa baseado nos perfis metabólicos gerados por MS;
- Utilizar uma abordagem quantitativa dos compostos previamente identificados através de *Stable Isotope Labeling* utilizando padrão marcado com deutério, a fim de se obter a quantificação absoluta do composto em uma dada amostra biológica.

BIBLIOGRAFIA

1. Saravanan M, Niguse S, Abdulkader M, Tsegay E, Hailekiros H, Gebrekidan A, et al. Review on emergence of drug-resistant tuberculosis (MDR & XDR-TB) and its molecular diagnosis in Ethiopia. *Microb Pathog*. 2018;117:237-42.
2. Talip BA, Sleator RD, Lowery CJ, Dooley JS, Snelling WJ. An Update on Global Tuberculosis (TB). *Infect Dis (Auckl)*. 2013;6:39-50.
3. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. 2014.
4. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16076.
5. WHO. World Health Organization. The Global Plan to Stop TB 2006-2015. 2006.
6. WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. 2016.
7. WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. 2017.
8. Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. 1992;257(5073):1055-64.
9. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. 3ª ed. São Paulo ed1999.
10. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013;4(1):3-66.
11. Morrone N, Cruvinel MC, Morrone NJ, Freire JAS, Oliveira LML, Gonçalves C. Pneumopatia causada por *Mycobacterium kansasii*. 2003. p. 341-9.
12. Rastogi N, David HL. Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria. *Biochimie*. 1988;70(8):1101-20.
13. Tortora GJ. *Microbiologia*. 8ª ed. Artmed. 2005.
14. Brasil, Ministério da Saúde, SVS, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. 1ª ed. 2008.
15. Brasil, MS, FUNASA, CRPHF, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5ª ed. 2002.
16. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia* 10ª ed. Artmed. 2012.
17. Cardona PJ. The Progress of Therapeutic Vaccination with Regard to Tuberculosis. *Front Microbiol*. 2016;7:1536.

18. Brasil, MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.. **Cartilha para o agente comunitário de saúde - Tuberculose**. 1ª ed. 2017.
19. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*. 1999;353(9151):444-9.
20. Brasil, MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose do Brasil. 2011.
21. Prevention CDC. Latent Tuberculosis Infection: A Guide of a Primary Health Care Providers. 2013.
22. Pai M, Nicol MP, Boehme CC. Tuberculosis diagnostics: state of the art and future directions. *Microbiol Spectr*. 2016;4(5).
23. Ferri AO, Aguiar B, Wilhelm CM, Schimidt D, Picoli SU. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. *Revista Liberato*2014. p. 105-212.
24. Guerra RL, Rego L, Conde MB. Diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with negative acid-fast staining in sputum. *Pulmão RJ*2008. p. 87-90.
25. Bento J, Silva AS, Rodrigues F, Duarte R. [Diagnostic tools in tuberculosis]. *Acta Med Port*. 2011;24(1):145-54.
26. Pantoja A, Fitzpatrick C, Vassall A, Weyer K, Floyd K. Xpert MTB/RIF for diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis: a cost and affordability analysis. *Eur Respir J*. 2013;42(3):708-20.
27. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*. 2010;363(11):1005-15.
28. Islam MM, Hameed HM, Mugweru J, Chhotaray C, Wang C, Tan Y, et al. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy. *J Genet Genomics*. 2017;44(1):21-37.
29. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(2):267-74.
30. Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*. 2011;469(7331):483-90.
31. Braga JU, Trajman A. Effectiveness of RHZE-FDC (fixed-dose combination) compared to RH-FDC + Z for tuberculosis treatment in Brazil: a cohort study. *BMC Infect Dis*. 2015;15:81.
32. Fortes PB . The fair measure of treatment: compulsory treatment of tuberculosis in debate. *Interface (Botucatu)*. 2016;20(58):743-51.
33. Cohen KA, Bishai WR, Pym AS. Molecular Basis of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr*. 2014;2(3).

34. Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat Med.* 2007;13(3):295-8.
35. D'Ambrosio L, Centis R, Sotgiu G, Pontali E, Spanevello A, Migliori GB. New anti-tuberculosis drugs and regimens: 2015 update. *ERJ Open Res.* 2015;1(1).
36. Arbex MA, Siqueira HR, D'Ambrosio L, Migliori GB. The challenge of managing extensively drug-resistant tuberculosis at a referral hospital in the state of São Paulo, Brazil: a report of three cases. *J Bras Pneumol.* 2015;41(6):554-9.
37. Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(7):432-42.
38. Konno K, Feldmann FM, McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis.* 1967;95(3):461-9.
39. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119628.
40. Yang J, Liu Y, Bi J, Cai Q, Liao X, Li W, et al. Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of *Mycobacterium tuberculosis* by pyrazinamide. *Mol Microbiol.* 2015;95(5):791-803.
41. Chambers HF, Moreau D, Yajko D, Miick C, Wagner C, Hackbarth C, et al. Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(12):2620-4.
42. Machado D, Coelho TS, Perdigão J, Pereira C, Couto I, Portugal I, et al. Interplay between Mutations and Efflux in Drug Resistant Clinical Isolates of. *Front Microbiol.* 2017;8:711.
43. De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni M, Silva PA, Martín C, Ainsa JA, et al. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med.* 2002;8(11):714-24.
44. Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, et al. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ.* 1963;29:565-78.
45. Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes. S. MGIT™ Procedure Manual For BACTEC™ MGIT 960™ TB System. FIND. 2006.
46. Alves da Silva D, Ferreira NV, Rego AM, Barbosa PCP, Machado RF, Pimentel A, et al. Integrated analysis of ethionamide resistance loci in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Jornal Tuberculosis.* 2018.
47. Pankhurst LJ, Del Ojo Elias C, Votintseva AA, Walker TM, Cole K, Davies J, et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. *Lancet Respir Med.* 2016;4(1):49-58.
48. Freitas FAD SH, Albano RM. Métodos moleculares na tuberculose e resistência do *Mycobacterium tuberculosis*. *Pulmão.* 2009. p. 96-101.

49. Broude NE, Zhang L, Woodward K, Englert D, Cantor CR. Multiplex allele-specific target amplification based on PCR suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(1):206-11.
50. Ryals J. Metabolomics – an important emerging science. In: PharmaTech BB, editor. *Drug Discovery*. 2004.
51. Parida SK, Kaufmann SH. The quest for biomarkers in tuberculosis. *Drug Discov Today*. 2010;15(3-4):148-57.
52. Canuto GA, Costa JL, Cruz PL, Souza AR, Faccio AT, Klassen A, et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Quim Nova*. 2018;41(1):75-91.
53. Han J, Antunes LC, Finlay BB, Borchers CH. Metabolomics: towards understanding host-microbe interactions. *Future Microbiol*. 2010;5(2):153-61.
54. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181-9.
55. Mirsaeidi M, Banoei MM, Winston BW, Schraufnagel DE. Metabolomics: applications and promise in mycobacterial disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(9):1278-87.
56. Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 2002;48(1-2):155-71.
57. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*. 1998;16(9):373-8.
58. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol*. 2012;Chapter 30:Unit 30.2.1-24.
59. Villas-Bôas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2005;24(5):613-46.
60. Jansen RS, Rhee KY. Emerging approaches to tuberculosis drug development: at home in the metabolome. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(4):393-405.
61. Griffin JL, Bollard ME. Metabonomics: its potential as a tool in toxicology for safety assessment and data integration. *Curr Drug Metab*. 2004;5(5):389-98.
62. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers*. 2004;9(1):1-31.
63. van Ravenzwaay B, Cunha GC, Leibold E, Looser R, Mellert W, Prokoudine A, et al. The use of metabolomics for the discovery of new biomarkers of effect. *Toxicol Lett*. 2007;172(1-2):21-8.
64. Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:653-83.

65. Putri SP, Yamamoto S, Tsugawa H, Fukusaki E. Current metabolomics: technological advances. *J Biosci Bioeng.* 2013;116(1):9-16.
66. Luies L, du Preez I, Loots DT. The role of metabolomics in tuberculosis treatment research. *Biomark Med.* 2017;11(11):1017-29.
67. Prosser GA, Larrouy-Maumus G, de Carvalho LP. Metabolomic strategies for the identification of new enzyme functions and metabolic pathways. *EMBO Rep.* 2014;15(6):657-69.
68. du Preez I, Loots dT. Altered fatty acid metabolism due to rifampicin-resistance conferring mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: mapping the potential of pharmaco-metabolomics for global health and personalized medicine. *OMICS.* 2012;16(11):596-603.
69. Loots dT. An altered *Mycobacterium tuberculosis* metabolome induced by *katG* mutations resulting in isoniazid resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2144-9.
70. Nandakumar M, Nathan C, Rhee KY. Isocitrate lyase mediates broad antibiotic tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun.* 2014;5:4306.
71. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015;19(11):1276-89.
72. Antunes LC, Davies JE, Finlay BB. Chemical signaling in the gastrointestinal tract. *F1000 Biol Rep.* 2011;3:4.
73. Bisson GP, Mehaffy C, Broeckling C, Prenni J, Rifat D, Lun DS, et al. Upregulation of the phthiocerol dimycocerosate biosynthetic pathway by rifampin-resistant, *rpoB* mutant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 2012;194(23):6441-52.
74. Lahiri N, Shah RR, Layre E, Young D, Ford C, Murray MB, et al. Rifampin resistance mutations are associated with broad chemical remodeling of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2016;291(27):14248-56.
75. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2003;83(1-3):91-7.
76. Zhang N, Torrelles JB, McNeil MR, Escuyer VE, Khoo KH, Brennan PJ, et al. The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. *Mol Microbiol.* 2003;50(1):69-76.
77. Olivier I, Loots D. An overview of tuberculosis treatment and diagnostics. What role could metabolomics play? *J Cell Tissue Res.* 2011;11(1).
78. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 1993;341(8846):647-50.
79. Loots dT. New insights into the survival mechanisms of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(3):655-60.

80. Sambandamurthy VK, Wang X, Chen B, Russell RG, Derrick S, Collins FM, et al. A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med.* 2002;8(10):1171-4.
81. Salaemae W, Azhar A, Booker GW, Polyak SW. Biotin biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*: physiology, biochemistry and molecular intervention. *Protein Cell.* 2011;2(9):691-5.
82. Ta P, Buchmeier N, Newton GL, Rawat M, Fahey RC. Organic hydroperoxide resistance protein and ergothioneine compensate for loss of mycothiol in *Mycobacterium smegmatis* mutants. *J Bacteriol.* 2011;193(8):1981-90.
83. Cumming BM, Chinta KC, Reddy VP, Steyn AJC. Role of Ergothioneine in Microbial Physiology and Pathogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 2018;28(6):431-44.
84. Genghof DS, Vandamme O. Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by mycobacteria. *J Bacteriol.* 1964;87:852-62.