

# A Genética Molecular da Resistência a Drogas em *Mycobacterium tuberculosis*

Cícero Carlos de Freitas<sup>1</sup> e Alexandre Gil de Freitas<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Professor Titular e Chefe do Laboratório de Antibióticos, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense (UFF), 24001-970 - Niterói, RJ

<sup>2</sup> Acadêmico de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

## Resumo:

A tuberculose (TB) é a mais devastadora das doenças infecciosas, em todo o mundo. O seu ressurgimento, em muitos países industrializados, agravado pelo aparecimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes às drogas usadas em sua terapia, despertou um grande interesse pelo entendimento dos mecanismos desta resistência. Por causa de uma relativa negligência nas pesquisas sobre a TB, no passado, e do lento desenvolvimento de técnicas genéticas para estudar as infecções por micobactérias, os mecanismos macromoleculares de resistência às drogas em *M. tuberculosis* eram desconhecidos até bem pouco tempo. Neste trabalho, nós discutimos os mais recentes avanços nos estudos sobre os mecanismos de resistência às três principais drogas anti-TB: isoniazida, rifampicina e estreptomicina. Enquanto os mecanismos de resistência à rifampicina e à estreptomicina são semelhantes àqueles encontrados em outras bactérias, a sensibilidade e a resistência à isoniazida são específicas da *M. tuberculosis*. Até agora, foi demonstrado o envolvimento de mutações em dois sítios cromossômicos: *katG* e *inhA*, com a resistência da *M. tuberculosis* à isoniazida. A identificação e a caracterização de mutações responsáveis por resistência abrem novas possibilidades para a rápida detecção de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos quimioterápicos. Além disto, o entendimento dos mecanismos moleculares desta resistência e da ação destas drogas pode, eventualmente, contribuir para uma modelagem, mais racional, de novos compostos anti-TB.

**Palavras-chaves:** antibioticoterapia, AIDS, HIV, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose.

## Summary

Tuberculosis (TB), one of the most harmful infectious diseases, has resurged during the past decade in many industrialized countries and strains of *Mycobacterium tuberculosis* (its etiological agent) that are resistant to one or more of the main antituberculous drugs are emerging. The recent resurgence of TB together with outbreaks of multidrug-resistant tuberculosis has focused attention on understanding the mechanisms of such drug resistance. Because of the relative neglect of TB research in the

past and late arrival of mycobacterial genetic tools, the molecular mechanisms of drug resistance in TB remained largely unknown until very recently. In this paper, we review recent progress on the mechanism of resistance to three major anti-TB drugs: isoniazid, rifampicin, and streptomycin. While the resistance mechanisms for rifampicin and streptomycin are similar to those found in other bacteria, isoniazid susceptibility and resistance are unique to *M. tuberculosis*. So far, mutations in two chromosomal loci, *katG* and *inhA* have been found to be involved in isoniazid resistance in TB. Identification and characterization of mutations responsible for resistance open up new possibilities for rapid detection of drug-resistant strains. Molecular understanding of drug resistance and drug action in *M. tuberculosis* may eventually lead to rational design of new anti-TB drugs. This is how Ying Zhang and Douglas Young summarize their report: Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (J. Antimicrob. Chemother., 34: 313-319, 1994).

**Key words:** antibiotic therapy, AIDS, HIV, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis.

## Introdução

O tratamento efetivo da tuberculose (TB), somente alcançado nos idos das décadas de 50 e 60, fez nascer a esperança de que esta doença seria logo controlada ou mesmo erradicada. Entretanto, embora uma dramática redução em sua incidência tenha sido conseguida na maioria dos países industrializados, a tuberculose continua sendo uma das doenças infecciosas com mais altos índices de mortalidade no mundo, matando, estimadamente, de 2 a 3 milhões de pacientes, a cada ano<sup>1</sup>. O recente ressurgimento da TB, associado, parcialmente, à pandemia do HIV, voltou a ser uma das maiores preocupações da saúde pública. Apesar da existência, na literatura, de relatos sobre cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes a drogas (TB-MRDs)<sup>2</sup>, a atual transmissão ativa destas cepas, nos Estados Unidos, não tem precedentes e representa um novo desafio à quimioterapia destes pacientes<sup>3</sup>. Após anos de relativo descaso, um esforço científico concentrado vem sendo feito, no sentido de aplicar os métodos modernos da genética bacteriana na análise de micobactérias patogênicas. Neste artigo, nós revisamos os recentes progressos no entendimento das bases genéticas da resistência a drogas em *M. tuberculosis* e discutimos o potencial da aplicação desses achados no desenvolvimento de meios que permitam o aprimoramento do controle da doença.

Com esta introdução, Ying Zhang e Douglas Young convenceram-nos da importância de levarmos aos leitores do JBDST o conteúdo de seu Trabalho: Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (J. Antimicrob. Chemother., 34: 313-319, 1994).

### Tratamento da tuberculose (TB)

A estreptomicina, descoberta por Selman Wakman em 1944, foi a primeira droga efetiva no tratamento da TB. Todavia, logo foi demonstrado que a terapia com um único antibiótico levava à seleção de cepas resistentes da bactéria e, portanto, uma série de tratamentos com associações de novas drogas foi posta em prática. Os chamados regimes de tratamento ótimo, usados correntemente, empregam a combinação de isoniazida, rifampicina e pirazinamida; enquanto algumas drogas secundárias, tais como: estreptomicina, etambutol e etionamida são utilizadas como terapia alternativa. A fim de eliminar as bactérias persistentes, o tratamento deve ser mantido por um período de pelo menos 6 meses. Embora o regime completo de tratamento com as três drogas iniba, efetivamente, o crescimento das variantes resistentes, tratamento parcial ou incompleto pode resultar na seleção de cepas da *M. tuberculosis* multirresistentes a drogas (TB-MRDs). Esta ocorrência foi demonstrada, de forma incontestável, em surtos epidêmicos de TB, nos Estados Unidos, frequentemente associados com infecção fatal de pacientes HIV positivos<sup>3,4,5</sup>. Com o objetivo de criar condições de diagnóstico e controle de TB-MRDs, um grande esforço está sendo feito, para o entendimento das bases genéticas da resistência a drogas em *M. tuberculosis*.

### Genética molecular das micobactérias

As micobactérias patogênicas, principalmente *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium avium-intracelular*; dificultam, bastante, os estudos dos geneticistas, devido à baixa velocidade de crescimento, à espessa parede celular e à tendência à formação de agregados celulares. O uso das técnicas da genética molecular, nos estudos das micobactérias, foi muito estimulado, na metade da década de 80, com os esforços realizados para produzir antígenos proteicos de *M. leprae*. A técnica do ADN-recombinante trouxe a solução para o problema do cultivo, *in vitro*, da *M. leprae*. Estes estudos evoluíram e permitiram tentativas para expressar os genes codificadores de antígenos na região daqueles da vacina BCG<sup>6</sup>. Hoje, já dispomos de uma considerável massa de informações sobre as estruturas dos genomas das *M. tuberculosis* e *M. leprae*, com determinações de suas sequências de nucleotídeos sendo o maior desafio atual para os estudiosos da genética dessas espécies. Uma variedade de técnicas permite a introdução de genes em micobactérias<sup>7</sup>; contudo, ainda não foi desenvolvida aquela que possibilite a separação dos genes dos cromossomos dessas células. As técnicas genéticas já disponíveis, entretanto, têm contribuído para o progresso dos estudos sobre mecanismos de ação e de resistência para as drogas usadas no combate às infecções provocadas por essas bactérias.

Existe um número bem definido de mecanismos, através dos quais as bactérias se tornam resistentes às drogas. A inativação da droga, pela ação de uma enzima inativadora específica, é um mecanismo comum, no caso dos antibióticos do grupo dos beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), por exemplo, com genes codificadores de enzimas relevantes sendo frequentemente disseminados por meio de elementos genéticos (ADNs) móveis: plasmídeos e transposons. Alternativamente, a resistência pode

ser gerada por alterações bioquímicas que resultem na modificação do alvo (receptor) da droga. Diminuição da concentração intracelular da droga, como decorrência da diminuição à sua permeabilidade ou de um aumento no seu efluxo (processo celular ativo de eliminação da droga do citoplasma), é outro mecanismo de resistência. Apesar de muitos estudos bioquímicos terem investigado ação de drogas em micobactérias (ver referência 8, para revisão), as bases genéticas da resistência às drogas nestes microrganismos eram completamente desconhecidas até bem recentemente, quando Martin et al., 1990<sup>9</sup> deram a primeira contribuição neste sentido, ao identificarem as bases genéticas da resistência a drogas em *Mycobacterium fortuitum*. A resistência à ulfonamida, em *M. fortuitum*, foi mostrado ser provocada por inativação através de uma enzima codificada em um transposon. Este é apenas um exemplo de mecanismo de resistência em micobactérias. Os estudos genéticos posteriores, descritos a seguir, enfocam todas as mutações que afetam as regiões do cromossoma, nas cepas resistentes, em vez de tratar das aquisições (via plasmídeos e transposons) das enzimas inativadoras.

### Resistência à isoniazida

A isoniazida tem uma marcante especificidade para a *M. Tuberculosis*, com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 0,2mg/ml. As CMIs para as outras espécies de micobactérias variam de 1 a 10mg/ml, enquanto para os outros gêneros de bactérias, são superiores a 500mg/ml. As explicações possíveis para esta especificidade incluem: a) a presença de um alvo sensível, na *M. tuberculosis*; b) a potencialização da ação da droga, nesta espécie, pelo aumento da captação ou por inativação intracelular da droga; e c) a presença de antagonistas, nas outras bactérias (ver Zhang & Young, 1993, para revisão)<sup>10</sup>. Evidências bioquímicas sugerem que a isoniazida pode, preferencialmente, inibir a síntese de ácidos graxos com cadeiras ramificadas, que são incorporados na estrutura da parede celular de micobactérias<sup>8</sup>. Há, também, indicações de que a toxicidade da isoniazida possa ser mediada por radicais oxidativos. A transformação com um gene, que codifica para o complexo enzimático catalase-peroxidase, na *M. tuberculosis*, confere uma limitada susceptibilidade à isoniazida, em cepas mutantes de *E. coli* não portadoras de atividade endógena de catalase<sup>11</sup>; mais interessante, ainda: cepas de *E. coli*, mutadas no sítio de regulação dos mecanismos de defesa por via oxidativa (mutantes oxyR), também perdem a sua resistência intrínseca à isoniazida<sup>12</sup>. Ainda não se sabe se a inibição da síntese de ácido micólico e a toxicidade oxidativa em *E. coli* são fenômenos interligados ou se representam modos distintos de ação da isoniazida. Estudos recentes identificaram dois genes de micobactérias, que estão alterados nos isolados resistentes à isoniazida.

### Gene KatG

Há muito, é sabido que o desenvolvimento da resistência à isoniazida está frequentemente associado à perda das atividades de catalase e de peroxidase<sup>13</sup>. Experiência genética recente permitiu demonstrar uma ligação entre a isoniazida e o complexo enzimático catalase-peroxidase. Por outro lado, foi mostrado que

cepas clínicas de *M. tuberculosis*, resistentes a altas concentrações de isoniazida (CMI > 50 mg/ml)<sup>11</sup>, não apresentavam o gene KatG, codificador daquele complexo, e que a transformação dessas cepas, com KatG funcional, restaurava a sensibilidade à droga<sup>14</sup>. Testes das cepas resistentes à isoniazida, com o uso da técnica "Southern blot", indicam que a deleção do gene KatG é um fato relativamente raro, observado em epanas 10 a 20% dos isolados catalase-peroxidase negativos; estudos posteriores, entretanto, revelaram pequenas deleções e pontos de mutações como as causas mais frequentes da mutação do KatG<sup>15</sup>. O papel do KatG na ação da isoniazida ainda não foi definido: a conversão da droga a um intermediário ativo (mediada pela peroxidase), no citoplasma da célula bacteriana, é uma hipótese levantada, que carece de comprovação<sup>8,10</sup>. Isolados de *M. tuberculosis*, resistentes a concentrações intermediárias de isoniazida, frequentemente apresentam alguma atividade de catalase e são, portanto, motivo de interesse de estudos de transformações com o gene KatG da cepa selvagem. Nós temos observado uma cepa catalase positiva, na qual a transformação com KatG restabeleceu a sensibilidade à droga, sugerindo a presença de um alelo do KatG, que retém a atividade enzimática, embora tendo perdido a habilidade para potencializar a ação da isoniazida; entretanto, em uma segunda cepa, a transformação com KatG não induziu resistência à droga (Zang & Young, dados não publicados). Esta última observação sugere que mutações fora do gene KatG podem, também, conferir resistência à isoniazida.

#### Gene inhA

O papel do gene KatG, na ação da isoniazida, foi inicialmente demonstrado em experiências nas quais foram usados clones de *M. tuberculosis*, obtidos pela técnica do ADN-recombinante, para transferir sensibilidade a um mutante de *Mycobacterium smegmatis* resistente àquela droga<sup>11</sup>. Em trabalho equivalente e recíproco, Banerjee et al., 1994<sup>16</sup> empregaram clones para transferir resistências. Um único gene (o inhA, que codifica para uma proteína de 32kd, homóloga a uma enzima bacteriana envolvida na biossíntese de ácido graxo) foi capaz de promover aumento de resistência à isoniazida, através de plasmídeo, em cepas de *M. smegmatis* e de *Mycobacterium bovis*. A análise da sequência do gene inhA, em isolados dessas duas micobactérias resistentes à isoniazida, revelou um único ponto de mutação: substituição de uma serina por uma alanina, na posição 94; uma experiência com troca de alelo, em *M. smegmatis*, levou à comprovação de que esta mutação foi a responsável pela resistência à droga. Estas observações sugerem, muito fortemente, que o gene inhA codifica para a síntese da enzima alvo da isoniazida e que resistência a esta substância pode ser desenvolvida por amplificação do alvo ou por mutação ponto específica<sup>16</sup>. Um dado experimental posterior e muito interessante, relacionado ao gene inhA, é que: a resistência à isoniazida é acompanhada de resistência à etionamida (uma droga antimicobactéria, estruturalmente relacionada àquela), cuja atividade bactericida é atribuída, também, à sua ação inibitória sobre a síntese de ácido micólico<sup>8</sup>. A enzima codificada pelo gene inhA pode representar o alvo comum para as duas drogas, embora resistência cruzada entre estes dois agentes tenha sido observada em

uma minoria de cepas; enquanto o gene KatG parece não exercer qualquer papel no caso da resistência à etionamida.

#### Resistência à rifampicina

A rifampicina (inicialmente isolada de *Streptomyces mediterranei*, em 1993) é um antibiótico de largo espectro, que, juntamente com a isoniazida, é fundamental no combate à tuberculose. Está bem definida, a nível de outras bactérias, que a rifampicina inibe a síntese de ARN, ao se ligar à subunidade beta da molécula da enzima ARN-polimerase. Mutações no gene rpoB da *M. tuberculosis*, que codifica para a subunidade beta, confere resistência à rifampicina. Recentemente, os genes rpoB da *M. tuberculosis*, e da *M. leprae* foram clonados e analisados, em cepas sensíveis e resistentes à rifampicina<sup>17,18</sup>. De 66 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina, 64 apresentaram pontos de mutação para um conjunto de 23 aminoácidos (correspondentes aos resíduos 511 a 533 do rpoB de *E. coli*), previamente reconhecidos como uma região proeminente para mutações que conferem resistência à rifampicina em *E. coli*. Quase 50% dos isolados tinham uma única mutação (serina para leucina, na posição 531), com a troca de histidina por tirosina (na posição 526) tendo sido identificada em 8 cepas independentes<sup>18</sup>. Semelhantemente, 8 de cada 9 isolados de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina tinham mutações que afetavam a serina da posição 531 (posição 425, na *M. leprae*)<sup>17</sup>. Mutações em uma segunda região do gene RpoB (aminoácidos 563 a 572) estão associados com resistência à rifampicina em *E. coli*<sup>19</sup>; fato que ressalta a importância do mapeamento desta região, em mutantes de *M. tuberculosis*.

#### Resistência à estreptomicina

A estreptomicina é, também, um antibiótico de largo espectro, com o seu modo de ação bem estabelecido e envolvendo a inibição da síntese de proteínas, através de sua interação com a subunidade ribossomal de 30S. Mutações que afetam 2 genes têm sido identificadas em isolados de *M. tuberculosis* resistentes à estreptomicina<sup>20, 21</sup>. De um total de 38 isolados, 20 (52,6%) exibiram pontos de mutação que resultaram na substituição de um único aminoácido (lisina-43 para argina ou treonina, ou lisina-88 para arginina), na proteína ribossomal S12, codificada pelo gene rpsL (ou StrA). Nove outros isolados resistentes apresentaram mutações no gene codificador do ARN ribossomal de 16S; destes, 6 tinham sofrido a conversão de A para C, na posição 513, enquanto nos outros 3, a conversão havia sido de C para T, na posição 518.

#### Múltipla resistência às drogas

A emergência de cepas multirresistentes às drogas (CMRDs) é um dos maiores desafios no tratamento e controle da TB e impõe a urgente necessidade de que entendamos os mecanismos por meio dos quais as cepas de *M. tuberculosis* adquirem esta multirresistência. A princípio, as CMRDs poderiam surgir pela aquisição sequencial de resistências individualizadas, ou por meio de troca única, que confira resistência pleiotrópica: um sistema de efluxo ativo, comparável ao locus mar nas enterobactérias, por exemplo<sup>22</sup>. Experiência clínica, documentado o desenvolvimento

saucioso de resistência isolada às drogas, durante terapia inadequada, vem ao encontro da hipótese de que este processo sequencial de aquisição de resistência é o mais provável mecanismo para o aparecimento de CMRDs; fato reforçado pelas descobertas das mutações individuais *KatG*, *rpoB* e *rpsL* em uma cepa multirresistente<sup>15</sup>. Em análise separada, entretanto, Morris et al.<sup>21</sup>, trabalhando com 5 isolados de *M. tuberculosis* multirresistentes, concluíram que a resistência à estreptomicina não poderia ser explicada por mutações no gene *rpsL*, nem no gene codificador do ARN ribossomal de 16S; deste modo, portanto, a possível existência de novos mecanismos de resistência em CMRDs, é perfeitamente concebível. Um aspecto importante das CMRDs, levantado em recente surto nos Estados Unidos, é que essas cepas parecem ser altamente infecciosas e completamente virulentas<sup>3,4</sup>. Os primeiros estudos com isolados monor-resistentes à isoniazida mostraram uma tendência para a diminuição da virulência, em modelos animais de infecções, talvez associada à perda do gene *KatG*<sup>23,24</sup>. A fim de melhor entender a disseminação de CMRDs de *M. tuberculosis*, é importante verificar se as diferentes mutações, que podem induzir resistência a drogas, diferem em seus efeitos sobre a virulência bacteriana. Diferentes mecanismos de desenvolvimento de resistência, tais como mutação do gene *inhA*, no caso da isoniazida, deveriam ter consequências bastante diferentes, em relação aos seus efeitos sobre a fisiologia e a virulência das cepas resistentes originadas.

### Rápida Identificação de Cepas de *M. tuberculosis* Resistentes

Por causa da baixa velocidade de crescimento da *M. tuberculosis*, os testes convencionais, usados pelos laboratório de Microbiologia Clínica, levam de 3 a 12 semanas, para determinar a sensibilidade desta bactéria às drogas. Em surtos recentes de TB, provocadas por CMRDs, o tempo médio de sobrevivência, após o diagnóstico, variou de 4 a 16 semanas<sup>5</sup>. Este dado mostrou, claramente, a necessidade do desenvolvimento de técnicas que permitissem ao clínico contar com um diagnóstico laboratorial da TB resistente em tempo bem baixo do usual (3 a 12 semanas). A identificação das bases genéticas da resistência às drogas possibilitou a criação de novos sistemas de detecção das cepas de *M. tuberculosis* resistentes, tendo como base o ADN da bactéria. No caso da resistência à rifampicina, a amplificação de uma região apropriada do gene *rpoB*, com a técnica da reação em cadeia pela polimerase, combinada com a procura de polimorfismos conformacionais de hélice única (PCR-SSCP), mostrou-se um eficiente e rápido sistema de identificação deste resistência à estreptomicina (genes *rpsL* e *ARNr16S*), bem assim, na determinação da resistência à isoniazida (genes *katG* e *inhA*). O sistema PCR-SSCP será particularmente efetivo, quando: a) toda (ou quase toda) resistência dos isolados clínicos for mediada por mutações em genes conhecidos; b) as mutações estiverem aglutinadas em uma região particular do gene; e c) não houver mutações "silenciosas" gerando polimorfismo natural entre as cepas completamente sensíveis. Uma aplicação alternativa da genética molecular, para a detecção rápida de cepas resistentes de *M. tuberculosis*, foi descrita por Jacob et al.<sup>25</sup>, com o emprego de um fago carreador

do gene *lux*, que codifica para a enzima luciferase. Os genes *lux* são inseridos em um fato micobacteriano, de modo que, um sinal quimioluminescente é gerado, quando o fato infecta o bacilo (víavel), da tuberculose. Segue-se uma breve incubação, na presença das drogas a serem testadas. Nestas condições, apenas as cepas resistentes proliferam e, conseqüentemente, emitem o sinal luminescente (decorrente da presença da luciferase). Além de permitir a identificação de cepas de *M. tuberculosis* resistentes, este sistema é útil na procura de novas drogas contra as CMRDs deste perigoso patógeno<sup>26</sup>.

### Reinfecção com *M. tuberculosis* Multirresistente em Pacientes com Avançada Infecção pelo HIV

Há cerca de 10 anos atrás, a identificação de cepas de *M. tuberculosis* resistente era um acontecimento raro em clínica, nos Estados Unidos<sup>4</sup>. A partir de 1987, entretanto, os surtos de infecções multirresistentes tornaram-se preocupantes, nas comunidades norte-americanas, com a maioria dos pacientes representada por pessoas infectadas com o vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV), nas quais a taxa de letalidade tem sido extremamente alta. A suposição de que esses pacientes haviam contraído tuberculose ao entrarem em contato com as cepas de *M. tuberculosis* resistentes, nas unidades médicas, levou Small et al., 1993<sup>4</sup> a estudarem os meios através dos quais a tuberculose era adquirida por aquelas pessoas.

Com o uso da técnica da eletroforese dos fragmentos de restrição do ADN (RFLPs) - "DNA fingerprinting" - aqueles pesquisadores examinaram a origem das infecções pela *M. tuberculosis* multirresistente, a fim de verificar se se tratava de infecção por organismo já resistente aos agentes antimicobacterianos (resistência primária) ou de infecção desenvolvida durante a terapia, por uma cepa que era originalmente sensível (resistência adquirida). Este último mecanismo é interpretado como sendo devido à seleção dos mutantes resistentes, cuja prevalência resulta de uma terapia inadequada. Estes mutantes são geralmente resistentes à isoniazida e à rifampicina, as drogas mais eficazes no combate à tuberculose.

Nesses estudos, Small e colaboradores confirmaram o desenvolvimento de resistência adquirida em 6 dos 17 pacientes (7 a 12) estudados. Mais significativo, entretanto, foi o achado de que 4 dos pacientes (14 a 17) exibiam tuberculose resistente, desenvolvida por um terceiro mecanismo, denominado reinfecção exógena, com uma nova cepa multirresistente de *M. tuberculosis*, durante ou depois da terapia contra uma tuberculose droga-sensível. Estes 4 pacientes estavam infectados com o HIV.

A observação de que pacientes infectados com o HIV, que foram curados de tuberculose, possam ter subsequentes episódios desta doença, como resultado de infecção exógena, complica a avaliação clínica dos regimes quimioterapêuticos e quimioprolifáticos da tuberculose. Normalmente, as reincidências pós-terápicas de um regime terapêutico inadequado ou da negligência dos pacientes. Entretanto, se a reinfecção exógena for uma ocorrência comum - afirmam os autores - a reincidência, na verdade, pode refletir a reinfecção de pessoas corretamente tratadas. As análises dos RFLPs, nos isolados iniciais e naqueles obti-

dos durante a reincidência da infecção, podem detectar uma infecção exógena. Do mesmo modo, pacientes com infecção (avanzada) por HIV, que tenham completado um regime profilático efetivo, podem ser susceptíveis a reinfeção, aparentemente atribuída a uma falha de quimioprofilaxia.

A falta de imunidade protetora contra a *M. tuberculosis*, após terapia em pacientes infectados com o HIV, também compromete o esforço para controlar a tuberculose. Pessoas que tenham sido previamente infectadas com *M. tuberculosis* são tidas como resistentes a reinfeção e, como tal, não são instruídas para evitar futuras exposições à bactéria, nem têm uma possível reinfeção avaliada. Todavia, essa aparente susceptibilidade dos pacientes infectados com o HIV a reinfeção exógena sugere que: aquelas pessoas com uma história de tuberculose ou de tuberculina positiva devem ser avaliadas quanto à possibilidade do desenvolvimento de um novo episódio de tuberculose, após contato com portador de doença infecciosa. Esta é uma recomendação dos Centros para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, que deve ser obedecida por todos os países.

Small e colaboradores concluíram o trabalho nos termos reproduzidos a seguir. Não é possível inferir desta pesquisa a frequência com a qual os pacientes são infectados com *M. tuberculosis*. Futuros estudos são necessários, para definir este ponto e, também, para estabelecer os fatores de risco, envolvidos no processo da reinfeção exógena com a *M. tuberculosis*. Se estes novos estudos demonstrarem que esta reinfeção é comum na população de pacientes imunocomprometidos, a atual política de controle da tuberculose deverá ser motivo de reavaliação. A ocorrência de uma susceptibilidade intensa e persistente à *M. tuberculosis*, em pacientes infectados com o HIV, imporia uma mudança na maneira atual de identificar e tratar pessoas com infecção latente e doença ativa. Uma tal mudança seria a identificação e eliminação das circunstâncias que favorecem a transmissão da *M. tuberculosis*.

### Conclusões

Considerável progresso tem sido feito, no sentido de elucidar as bases genéticas da resistência desenvolvida pela *M. tuberculosis* à isoniazida, rifampicina, estreptomina e etionamida. Evidências bioquímicas indicam uma ligação entre a resistência à pirazinamida e a perda de uma amidase<sup>27</sup>, justificando a necessidade de estudos genéticos para esclarecer os mecanismos envolvidos neste fenômeno. Análise genética da resistência ao etambutol está em andamento (J. Inamine, comunicação pessoal) e, embora as fluoroquinolonas somente recentemente tenham sido introduzidas no combate à tuberculose, estudos sobre os genes da ADN-girase (mais provável sítio de mutações que levam à resistência) já estão bem adiantados (H. Takff & W.R. Jacobs, comunicação pessoal). É certo que, pelo menos por enquanto, não se pode associar a resistência a drogas em *M. tuberculosis* com a aquisição de elementos genéticos transferíveis (plasmídios e transposons) ou com mecanismos pleiotrópicos. As micobactérias que fazem parte do complexo *M. avium-intracellulare* - uma importante causa de infecções em pacientes imunossuprimidos - são resistentes a várias drogas

antimicobacterianas. A diminuição da permeabilidade celular a droga é admitida como o mecanismo prevalente no desenvolvimento de resistência pleiotópica em *M. avium-intracellulare*. A princípio, também parece que este mecanismo prevalece na resistência desenvolvida pela *M. tuberculosis*: mutações induziriam a alteração da estrutura da parede celular, diminuindo a permeabilidade a droga. Em complementação às investigações sobre os mecanismos da resistência específica para cada agente antimicrobiano, um melhor entendimento das bases genético-bioquímicas da permeabilidade às drogas, em *M. tuberculosis*, deve ser uma das metas principais de futuras pesquisas na modelagem mais racional de novos agentes que possibilitem o combate, com total sucesso, das infecções provocadas pelas cepas multirresistentes desta bactéria.

### Relação das Drogas disponíveis contra a Tuberculose(TB):

- 1 - Ácido p-amino-salicílico
- 2 - Amicacina
- 3 - Canamicina
- 4 - Ciprofloxacina
- 5 - Esparfloxacina
- 6 - Estreptomina
- 7 - Etambutol
- 8 - Etionamida
- 9 - Isoniazida
- 10 - Pirazinamida
- 11 - Rifampicina
- 12 - Tiacetazona
- 13 - Viomicina

Fonte: Cole, S.T. *Mycobacterium tuberculosis*: drug resistance mechanisms. *Trends in Microbiology*, 2: 411-415, 1994.

### Referências:

- 1 - BLOOM, BR & MURRAY, CJL. Tuberculosis: commentary on reemerging killer. *Science*, 257: 1055-1064, 1992.
- 2 - CANNETTI, G. Recent aspects of bacterial resistance in tuberculosis. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 93: 687-803, 1965.
- 3 - EDLIN, BR; TOKARS, JI; GRIECO, MH et al. An outbreak of multi-drug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with acquired immunodeficiency syndrome. *N.Engl. J. Med.*, 326: 1514-1521, 1992.
- 4 - SMALL, PM; SHAFAR, RW; HOPEWELL, PC et al. Exogenous reinfection with multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N. Eng. J. Med.*, 328: 1137-1144, 1993.
- 5 - MMWR. Nosocomial transmission of multi-drug-resistant tuberculosis among HIV infected persons - Florida and New York, 1988-1991. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 40: 585-591, 1991.
- 6 - YOUNG, DB & COLE, ST. Leprosy tuberculosis, and the new genetics. *J. Bacteriol.*, 175: 1-6, 1993.
- 7 - HATFULL, GF. Genetic transformation of mycobacteria. *Trends in Microbiology*, 1: 310-314, 1993.
- 8 - WINDER, FG. Mode of action of antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the mycobacteria. In the *Biology of the Mycobacteria*, vol. I (RAGLEDGE, C & STANFORD,

J. Eds), pp. 354-438. Academic Press, London, 1982.

9 - **MARTIN, C; TIMM, J; RAUZIER, J. et al.** Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *nature*, 345: 739-743, 1990.

10 - **ZHANG, Y & YOUNG, D.** Molecular mechanisms of isoniazid: a, drug at the front line of tuberculosis control. *Trends in Microbiology*, 1: 109-113, 1993.

11 - **ZHANG, Y; HEYM, B; ALLEN, B. et al.** The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 358: 591-593, 1992.

12 - **ROSNER, JL.** Susceptibility of oxyR mutant of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to isoniazid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 2351-2253, 1993.

13 - **MIDDLEBROOK, G.** Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.*, 69: 471-472, 1954.

14 - **ZHANG, Y; GARBE, T & YOUNG, D.** Transformation with katG restores isoniazid sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Mol. Microbiol.*, 8: 521-524, 1993.

15 - **COLE, ST.** The molecular basis of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In *Tuberculosis, Back to the Future* (PORTER, JDH & McADAM, KPW Eds), pp. 233-235, 1994.

16 - **BANERJEE, A; DUBNAU, E; QUEMARD, A. et al.** inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 263: 227-230, 1994.

17 - **HONORE, N & COLE, ST.** Molecular basis of rifampicin resistant in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 414-418, 1993.

18 - **TELENTI, A; IMBODEN, P; MARCHESI, F. et al.** Detection of rifampicin-resistant mutation in *Mycobacterium tuberculosis* *Lancet*, 341: 647-650, 1993.

19 - **JIN, D & GROSS, C.** Mapping and sequencing of mutation in

the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance. *J. Med. Biol.*, 202: 45-58, 1988.

20 - **FINKEN, J; KIRSCHER, P; MEYER, A. et al.** Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Biol.*, 9: 1239-1246, 1993.

21 - **MORRIS, S; ROUSE, D & NAIR, J.** The ribosomal S12 protein and streptomycin resistance in single and multiple-drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Abstract of the Second International Conference*, p. 18, Stockholm, Sweden, 1993.

22 - **COLE, SP; HACHLER, H & LEVY, SB.** Genetic and functional analysis of the multiple-antibiotic-resistance (mar) locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 175: 1484-1482, 1993.

23 - **MIDDLEBROOK, G & COHN, ML.** Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science*, 118: 297-299, 1953.

24 - **MORSE, WC; WEISER, OL; KUHNS, DM et al.** Study of the virulence of isoniazid-resistant tubercle bacilli in guinea pigs and mice. *Am. Rev. Tuberc.*, 69: 464-468, 1954.

25 - **JACOBS, WR; BARLETTA, RG; UDANI, R. et al.** Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science*, 260: 819-822, 1993.

26 - **COOKSEY RC; CRAWFORD, JT; JACOBS, WR & SHINNICK, TM.** A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of *Mycobacterium tuberculosis* expressing firefly luciferase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 1348-1352, 1993.

27 - **KONNO, K; FELDMAN, FM & McDERMOTT, W.** Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev. Dis.*, 95: 461-469, 1967.

## VIII Encontro Científico do Instituto Biomédico

Universidade Federal Fluminense

Centro de Ciências Médicas

Instituto Biomédico

Departamentos: Morfologia, Fisiologia e Microbiologia

### II Semana Científica Prof. Roched Seba

de 27 a 30 de Novembro de 1995 - Niterói - RJ

Mesas Redondas - Painéis - Palestras - Cursos

Informações e Inscrições:

Rua prof. Hernani Melo, 101

São Domingos - Niterói - RJ

Tels.: 722-4266/ 722- 0623/ 722- 0373 Ramal 200

