



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM



LUIS FILIPE OLIVEIRA GOMES

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE ISONIAZIDA E
MIELOPEROXIDASE SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE *Mycobacterium*
smegmatis

VITÓRIA DA CONQUISTA - BA
MAIO - 2020

LUIS FILIPE OLIVEIRA GOMES

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE ISONIAZIDA E
MIELOPEROXIDASE SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE *Mycobacterium
smegmatis***

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz

VITÓRIA DA CONQUISTA - BA

MAIO - 2020

G615e

Gomes, Luis Filipe Oliveira.

Estudo da interação entre isoniazida e mieloperoxidase sobre a sobrevivência de *Mycobacterium smegmatis*. / Luis Filipe Oliveira Gomes, 2020.

46f.; il. (algumas color.)

Orientador (a): Dr. Raphael Ferreira Queiroz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBQBM, Vitória da Conquista, 2020.

Inclui referência F. 29 – 46.

1. Isoniazida - Fármaco. 2. Mieloperoxidase. 3. Neutrófilos humanos. 4. *Mycobacterium smegmatis*. I. Queiroz, Raphael Ferreira. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBQBM. T. III.

CDD: 615.1

Catálogo na fonte: Juliana Teixeira de Assunção – CRB 5/1890

Biblioteca UESB- Campus Vitória da Conquista - Ba

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Estudo da interação entre isoniazida e mieloperoxidase sobre a sobrevivência de *Mycobacterium smegmatis*.”.

Autor (a): Luis Filipe Oliveira Gomes

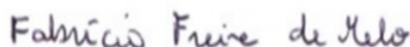
Orientador (a): Professor Dr. Raphael Ferreira Queiroz

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, pela Banca Examinadora:



Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



Prof. Dr. Fabrício Freire de Melo

Universidade Federal da Bahia



Dra. Verônica Paviani Sampaio

Robert H Lurie Cancer Center da Northwestern University

Data de realização: 22 de maio de 2020.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelo amor mais sublime e imerecido com que me amou, pelo cuidado constante e por me fazer compreender que todas as coisas possuem seu propósito e sua razão de ser. Em Ti tudo existe e subsiste.

Aos meus pais, Vivian e Gil, pelo amor incondicional, pelo exemplo de perseverança em meio às dificuldades, pelo apoio em cada etapa da vida e por abdicarem de si mesmos por mim e por meus irmãos. Obrigado por me ensinarem o verdadeiro significado da palavra família. Amo vocês.

Às minhas irmãs Viviane e Ana Luísa, ao meu irmão Elizeu, ao meu primo Thiago e à minha avó Otavina, por tornarem melhores os meus dias e menos árdua a caminhada. À toda minha família pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador, professor Raphael Queiroz, pela oportunidade, paciência e suporte durante todo o período de realização deste trabalho.

A Leo, pela amizade que se estende desde a graduação, pela paciência em escutar minhas reclamações, pela ajuda nos experimentos, pelas discussões científicas e sobre a vida, pelos conselhos e por estar presente nos bons e maus momentos.

A Paulo, pelo grande amigo que é, por me ouvir e sempre estar presente quando preciso, pelos sábios conselhos, pela força que me deu para seguir em frente, por me ensinar a amar a música, pelas discussões acadêmicas, filosóficas e teológicas e pelo cuidado constante para comigo. Sou grato a Deus pela sua vida, meu amigo!

A Jader, pela grande amizade que construímos, por me arrancar boas risadas até mesmo nos momentos mais tensos e difíceis, pela confiança, pelos conselhos, pelas discussões acadêmicas e teológicas, e pela convivência nos últimos anos.

À Tássia, pela amizade, companheirismo no laboratório, discussões científicas e por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório e pesquisa, Camila, Aline, Dani e Thiago, pela convivência e auxílio em todos os momentos. Obrigado por ouvirem meus desabafos, compartilharem conhecimentos e tornarem os dias de trabalho mais leves.

Aos colegas do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, em especial Ramon, Pâmala e Mahala, pela amizade, por compartilharmos nossas experiências e pelas muitas resenhas nos últimos dois anos.

À minha segunda família, família presbiteriana, família que amei desde o momento em que conheci esta Igreja, família que esteve do meu lado em cada etapa do meu crescimento pessoal e profissional. Ao reverendo Marcelo Crispim por ser mais que um professor doutrinário, mas um amigo, obrigado pelos conselhos sobre a vida e pelo tempo dispendido tantas vezes para me escutar. À Darlene e Hanna pela amizade construída desde a graduação e por fazerem parte dos melhores momentos da minha vida. À minha amada equipe de música, em especial, Tâmia, Dinho, Mari, Gabriel, Luana, Mateus, Elenisio, Sandra e Jéssica, obrigado por compartilharem tantas notas e acordes comigo em momentos difíceis. A Daniel pela amizade e companheirismo, pelas conversas e pelo cuidado para comigo. A John, Ivan, Gustavo e Eléo pela amizade. A Rubão por ser o professor mais “fantárdigo” que já tive. Certamente é difícil citar todos, mas são igualmente importantes para mim.

A Alex, que mostra que a distância não é empecilho para uma grande amizade. Muito obrigado por tudo irmão!

Aos docentes do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, professores Rafael, Gildomar e Carlos Bernard, e aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biociências, professor Braga Jr. e professora Amélia, pelas aulas enriquecedoras.

Ao professor Guilherme Campos pela oportunidade e orientação durante o estágio de tirocínio à docência.

Ao professor Matheus Cortes, por me escutar e me aconselhar, por não me permitir desistir desta caminhada nos momentos mais árduos e sobretudo pela amizade.

À professora Flávia Meotti do IQ-USP por disponibilizar seu laboratório para a realização de experimentos e por me receber tão bem.

A Ray, Albert e Beatriz pelo suporte nos experimentos, discussões e auxílio durante minha estadia em São Paulo.

Ao professor André Kipnis do IPTSP-UFG por ceder gentilmente a cepa bacteriana de interesse ao estudo.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela estrutura, suporte e viabilidade para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal da Bahia, minha *alma mater*, minha segunda casa. Minha gratidão a todos os docentes, funcionários e estudantes que fizeram e continuam fazendo parte da minha caminhada profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia pela concessão da bolsa e suporte ao projeto, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico também pelo suporte ao projeto.

Enfim, a todos os que contribuíram de forma direta ou indireta para que eu pudesse chegar até aqui, meu muito obrigado!

*“Não a nós, SENHOR, nenhuma glória para nós, mas
sim ao Teu nome, por Teu amor e por Tua fidelidade!”*

Salmos 115:1

RESUMO

A isoniazida é o fármaco de primeira linha para o tratamento da tuberculose. Estudos recentes sugerem a existência de interações entre o sistema imune e a isoniazida que podem reduzir a atividade microbicida de neutrófilos e/ou formar adutos com aminoácidos específicos do hospedeiro. A mieloperoxidase, enzima abundante em neutrófilos, tem papel central nesse processo ao catalisar a oxidação da isoniazida a intermediários radicalares. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar as consequências da interação entre mieloperoxidase e isoniazida sobre a sobrevivência de *Mycobacterium smegmatis* (cepa mc²155). Desse modo, a concentração bactericida mínima e o IC₅₀ do HOCl, isoniazida e H₂O₂ foram inicialmente determinados. Em seguida, HOCl e isoniazida foram pré-incubados *in vitro* antes das incubações com *M. smegmatis* no intuito de investigar reação entre as duas moléculas. Os efeitos da INH sobre a atividade bactericida da mieloperoxidase purificada e de neutrófilos humanos foram avaliados. Por fim, a formação de O₂⁻ pelos neutrófilos na presença da isoniazida também foi determinada. Os valores de IC₅₀ obtidos foram de 21 e 25 µM e de concentração bactericida mínima de 50 e 75 µM para o HOCl e isoniazida, respectivamente. Nós observamos que a interação entre HOCl e isoniazida inibiu completamente a atividade bactericida do HOCl ($p < 0,0001$), mas reduziu a eficácia da isoniazida em 13% ($p < 0,01$) na concentração relativa ao IC₅₀. A constante de velocidade da reação entre HOCl e isoniazida foi calculada em $3,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Nas incubações com a enzima purificada, a isoniazida restaurou significativamente a sobrevivência da bactéria em cerca de 39 % ($p < 0,0001$), 52% ($p < 0,0001$) e 71% ($p < 0,0001$) nas concentrações de 5, 7,5 e 10 µM, respectivamente. Nas incubações com neutrófilos, a isoniazida restaurou a sobrevivência bacteriana em 33% ($p < 0,0001$) nas concentrações de 25 e 75 µM, mas não interferiu na formação de O₂⁻ por essas células. Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que a reação entre a isoniazida e mieloperoxidase, bem como isoniazida e HOCl, prejudica a atividade bactericida oxidativa de neutrófilos, o que pode interferir no papel do sistema imunológico em limitar a infecção por microbactéria.

Palavras-chave: isoniazida, mieloperoxidase, neutrófilos humanos, *Mycobacterium smegmatis*.

ABSTRACT

Isoniazid is the drug in the first line of treatment for tuberculosis. Recent studies suggest that interactions between the immune system and isoniazid may reduce the microbiological activity of neutrophils and/or form adducts with host's amino acids. Myeloperoxidase, an abundant enzyme in neutrophils, plays a central role in this process by catalyzing the oxidation of isoniazid to respective radical. In this context, our aim was to investigate the consequences of the interaction between myeloperoxidase and isoniazid on *Mycobacterium smegmatis* (mc²155) survival. Firstly, minimum bacterial concentration and IC₅₀ of HOCl, isoniazid and H₂O₂ were determined. HOCl and isoniazid were then pre-incubated *in vitro* before incubations with *M. smegmatis* in order to investigate the reaction between these molecules. In addition, we evaluated the effects of isoniazid on bactericidal activity of purified myeloperoxidase and human neutrophils. Finally, formation of O₂⁻ by neutrophils in the presence of isoniazid was investigated. IC₅₀ values for HOCl and isoniazid were 21 and 25 μM, respectively. In parallel, minimum bacterial concentration for HOCl and isoniazid was 50 and 75 μM, respectively. We observed that the interaction between HOCl and isoniazid abrogated the bactericidal activity of HOCl ($p < 0.0001$) while reduced the isoniazid efficacy by 13% ($p < 0.01$) at IC₅₀ concentrations. A second order rate constant for the reaction between HOCl and isoniazid was estimated as $3.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. When incubated with myeloperoxidase, isoniazid at 5, 7.5 and 10 μM restored the bacterial survival by nearly 39% ($p < 0.0001$), 52% ($p < 0.0001$) and 71% ($p < 0.0001$), respectively. In incubations with neutrophils, isoniazid at 25 and 75 μM equally rescued the bacterial survival by 33% ($p < 0.0001$), with no effect O₂⁻ production. Our results demonstrated, by the first time, that the reaction between isoniazid and myeloperoxidase and directly with HOCl impairs the oxidative bactericidal machinery of neutrophils and, consequently, it may interfere with host immune response against mycobacterial infections.

Keywords: isoniazid, myeloperoxidase, human neutrophils, *Mycobacterium smegmatis*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. DESENVOLVIMENTO	4
3.1 Capítulo 01: Revisão de literatura	4
3.1.1 Epidemiologia da tuberculose	4
3.1.2 Etiologia e características do micro-organismo	4
3.1.3 Terapêutica	5
3.1.4 Imunopatologia	6
3.1.5 Mieloperoxidase	7
3.1.6 Referências	8
3.2 Capítulo 02: Artigo	13
3.2.1 Introdução	15
3.2.2 Materiais e métodos	16
3.2.2.1 Materiais e reagentes	16
3.2.2.2 Cepa bacteriana	16
3.2.2.3 Atividade bactericida do HOCl	17
3.2.2.4 Atividade bactericida do H ₂ O ₂	17
3.2.2.5 Atividade bactericida da INH	17
3.2.2.6 Efeito da incubação da INH com HOCl sobre a atividade bactericida do HOCl	18
3.2.2.7 Efeito da incubação da INH com HOCl sobre a atividade bactericida da INH	18
3.2.2.8 Cinética competitiva da reação entre INH e HOCl	18
3.2.2.9 Atividade bactericida da MPO	19
3.2.2.10 Isolamento de neutrófilos do sangue humano periférico	19
3.2.2.11 Atividade bactericida de neutrófilos	20
3.2.2.12 Formação de O ₂ ^{•-} por neutrófilos	20
3.2.2.13 Análise estatística	20
3.2.3 Resultados	21
3.2.4 Discussão	26
3.2.5 Agradecimentos	28
3.2.6 Fontes de financiamento	28
REFERÊNCIAS	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inibição de crescimento de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 por HOCl, INH e H ₂ O ₂	21
Figura 2. Efeito da interação entre HOCl e INH sobre a atividade micobactericida do HOCl e INH	22
Figura 3. Cinética competitiva da reação entre HOCl e INH ou glutathiona	23
Figura 4. Efeito da INH sobre a atividade bactericida da mieloperoxidase	24
Figura 5. Efeito da INH sobre a atividade bactericida de neutrófilos isolados do sangue humano	25
Figura 6. Efeito da INH sobre a formação de O ₂ ^{•-} por neutrófilos isolados do sangue humano	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABAH – Ácido 4-aminobenzóico hidrazida;
- APO – Apocinina;
- AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês;
- ANOVA – Análise de variância, do inglês;
- DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês;
- DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico, do inglês;
- DTPA – Ácido dietilenotriaminopentacético, do inglês;
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio;
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana, do inglês;
- HOCl – Ácido hipocloroso;
- HOX – ácido de halogênio;
- INH – Isoniazida;
- M7H9 – Middlebrook 7H9;
- M7H10 – Middlebrook 7H10;
- MBC – Concentração bactericida mínima, do inglês;
- MIC – Concentração inibitória mínima, do inglês;
- MPO – Mieloperoxidase;
- NaCl – Cloreto de sódio;
- NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada;
- NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada;
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida;
- NADPH oxidase – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase;
- O₂^{•-} – Ânion radical superóxido;
- PBS – Tampão fosfato salino;
- PBS-g – Tampão fosfato salino glicose;
- ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês;
- RNS – Espécies reativas de nitrogênio;
- SOD – Superóxido dismutase;
- TB – Tuberculose;
- TNB – Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, do inglês;
- UFC – Unidade formadora de colônia;
- WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é a principal causa global de mortalidade por agente infeccioso, superando inclusive a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e, no Brasil, foi responsável por cerca de 5400 óbitos em 2016 (WHO, 2017). Trata-se de uma infecção bacteriana desencadeada quase que exclusivamente por *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo transmitido principalmente por aerossóis expelidos pelo indivíduo infectado para o indivíduo susceptível (Churchyard et al., 2017). De acordo com estimativas atuais, aproximadamente 24% da população global está infectada pelo *M. tuberculosis*, porém os bacilos permanecem latentes na maioria dos casos (Houben & Dodd, 2016).

Em indivíduos imunocompetentes, a atividade fagocítica é essencial para impedir o avanço da infecção. Nos alvéolos, *M. tuberculosis* é fagocitado por macrófagos residentes, onde ocorrerá produção de citocinas e quimiocinas, recrutamento de fagócitos auxiliares, principalmente neutrófilos, e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) na tentativa de eliminar a bactéria (Kaufmann, 2001; Guirado & Schlesinger, 2013). No entanto, o bacilo apresenta componentes na parede celular que bloqueiam a resposta efetiva de macrófagos e inibem a maturação do fagossoma, o que resulta na sobrevivência da bactéria e, conseqüentemente, formação de granuloma pulmonar (Shaler et al., 2012; Philips & Ernst, 2012).

No granuloma o bacilo inativo pode permanecer viável por décadas e ser reativado em certas condições clínicas específicas como desnutrição, infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), câncer, senescência e outras situações de comprometimento imunológico, o que caracteriza o processo agudo (Guirado & Schlesinger, 2013). Nesse contexto, os neutrófilos desempenham papel essencial no controle do processo infeccioso na TB ativa ao constituir linha de defesa predominante nessa fase (Eum et al., 2010). O principal sistema microbicida de neutrófilos associa-se à atividade da mieloperoxidase (MPO), uma hemeperoxidase capaz de amplificar o potencial redox do H_2O_2 ao formar HOCl e radicais livres a partir de substratos endógenos (Hampton et al., 1998; Winterbourn et al., 2016).

Na maioria dos casos agudizados também é necessária a utilização de terapia farmacológica específica, cujo esquema rotineiro consiste no emprego concomitante de quatro fármacos: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZN) e etambutol (ETB) (MS/SVS, 2019). Dentre estes, a INH persiste, desde sua descoberta em 1945, como fármaco de primeira linha para o tratamento da TB, bem como na quimioprofilaxia da doença em portadores de HIV (Gourevitch et al., 1999; Budha et al., 2008). Esse fármaco inibe

seletivamente a enzima bacteriana *trans*-2-enoil-ACP redutase, responsável pela síntese dos ácidos micólicos presentes na parede celular de micobactérias, embora mecanismos complementares também já tenham sido propostos (Slayden et al., 2000; Timmins et al., 2004).

Na bactéria, INH é oxidada pelo domínio peroxidásico da enzima catalase-peroxidase ao radical INH^\bullet que, por sua vez, reage covalentemente com NAD^+ e esse aduto é capaz de se ligar ao sítio ativo da enzima *trans*-2-enoil-ACP redutase, inibindo-a (Johnsson & Schultz, 1994; Rozwaskiet al., 1998). No contexto inflamatório, INH inibe a produção de HOCl pela MPO ao desviar para o ciclo peroxidásico, sendo oxidada a radicais que formam adutos biológicos, particularmente com grupamentos amino de aminoácidos (Forbes et al., 2012) e NAD^+ (Khan et al., 2016). As enzimas microssomais também são capazes de promover a formação a oxidação da INH ao INH^\bullet , que se liga covalentemente ao NADP^+ (Meng et al., 2015).

As interações entre INH e MPO podem, portanto, aumentar a sobrevivência bacteriana na inflamação aguda ao reduzir a produção de HOCl (Forbes et al., 2012) e/ou a disponibilidade do fármaco (Hofstra et al., 1992). Além disso, adutos potencialmente imunogênicos com proteínas do hospedeiro podem ser originados na presença de MPO e INH, uma vez que os produtos dessa reação são capazes de formar adutos com aminoácidos, principalmente lisina e metionina (Forbes et al., 2012). Considerando a importância clínica e epidemiológica da tuberculose bem como as interações descritas entre o sistema imune e INH, o objetivo deste trabalho foi, portanto, investigar as implicações da interação MPO *versus* INH sobre a sobrevivência micobacteriana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da interação entre INH e MPO sobre a sobrevivência de *Mycobacterium smegmatis* e na formação de adutos com proteína.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações inibitória mínima (MIC) e bactericida mínima (MBC) da INH e do HOCl;
- Investigar o efeito da interação entre HOCl e INH sobre a atividade bactericida de ambos;
- Determinar a cinética de reação entre HOCl e INH;
- Investigar o efeito da INH sobre a capacidade micobactericida da MPO *in vitro*;
- Avaliar o efeito da INH sobre a capacidade micobactericida de neutrófilos humanos;
- Determinar o efeito da INH sobre a formação de $O_2^{\bullet -}$ em neutrófilos humanos ativadas.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 CAPÍTULO 01: REVISÃO DE LITERATURA

3.1.1 Epidemiologia da tuberculose

A TB superou o HIV como infecção mais mortal em 2015, sendo responsável por 1,4 milhões de óbitos contra 1,1 milhões entre indivíduos HIV-positivos (WHO, 2016). Dados atuais revelam uma redução de 2% ao ano na incidência da doença, contudo, ainda representa um desafio para a saúde pública (WHO, 2017). No ano de 2016, cerca de 10,4 milhões de pessoas adoeceram por TB, sendo que 1,3 milhões foram vítimas fatais entre indivíduos HIV-negativos. As principais causas da mortalidade são a falta de acesso ao diagnóstico e tratamento em alguns países, e a multirresistência do micro-organismo ao tratamento farmacológico (WHO, 2017).

No Brasil o panorama é igualmente preocupante e registrou em 2016 cerca de 76.000 novos casos de TB (excluindo portadores de HIV), sendo 5.400 fatais (WHO, 2017). A variabilidade de ocorrências entre as unidades da federação é grande, com maior número de óbitos notificados no Rio de Janeiro, Pernambuco, Amazonas e Pará, o que revela homogeneidade na distribuição geográfica da doença pelo país (MS/SVS, 2017). No ano de 2015, a Bahia apresentou uma incidência de 26,1 a cada 100.000 habitantes, o que representa um total de quase 4.000 novos casos e 380 óbitos (MS/SVS, 2017). Outro dado a ser considerado foi o aumento no número de TB resistente aos múltiplos fármacos (MDR) no Brasil, que passou de 2.300 em 2015 para 2.400 casos em 2016 (WHO, 2017).

3.1.2 Etiologia e características do micro-organismo

Os agentes etiológicos da TB pertencem a um grupo comum denominado complexo *M. tuberculosis*, constituído pelas espécies *M. bovis*, *M. africanum*, *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* sendo apenas as três primeiras causadoras de TB em seres humanos (Orgeur & Brosch, 2018). *M. tuberculosis* é um bacilo aeróbico, classificado como álcool-ácido resistente, parasita intracelular facultativo, de crescimento lento (tempo de geração de 12 a 24 h) e o principal micro-organismo do complexo ligado ao desenvolvimento de TB (Akinola et al., 2013).

Os principais fatores relacionados à virulência desse bacilo estão associados à natureza lipídica de sua parede celular, composta principalmente por longas cadeias de ácidos graxos, glicolipídios e ácidos micólicos, o que contribui para sua sobrevivência no interior de fagócitos

por décadas. Tal fato constitui a base para a cronicidade da TB, seu difícil diagnóstico e longo período de tratamento (Kaufmann, 2001). Segundo estimativas atuais, cerca de 24% da população mundial está infectada pelo *M. tuberculosis*, no entanto, os bacilos permanecem latentes na maioria dos casos (Houben & Dodd, 2016).

A pesquisa envolvendo micobactérias como *M. tuberculosis* e *M. leprae* ainda é um desafio devido a patogenicidade e crescimento lento de ambas cepas. Contudo, para contornar essa situação, pesquisadores têm optado por utilizar como modelo a *M. smegmatis*, uma micobactéria aeróbica, não patogênica, de crescimento rápido e que compartilha diversas características comuns com espécies patogênicas como *M. tuberculosis* e *M. leprae* (He & Buck., 2010; Akinola et al., 2013). Além disso, *M. smegmatis* é capaz de sobreviver por longos períodos de tempo em baixas concentrações de oxigênio e nutrientes reduzindo seu metabolismo, e permanecendo em estado de latência assim como *M. tuberculosis* (Cordone et al., 2011). Ainda, essa cepa possui um tempo de geração de três a quatro horas, formando colônias visíveis em três a quatro dias, em contraste com *M. tuberculosis* que necessita de três a quatro semanas para formar colônias visíveis em meio de cultura sólido (Akinola et al. 2013).

3.1.3 Terapêutica

Na maioria dos casos agudizados, devido à falibilidade do sistema imune em eliminar *M. tuberculosis*, é necessária a utilização de terapia farmacológica específica para doença. No Brasil, o esquema para casos incidentes e reincidentes quase sempre consiste no emprego concomitante de quatro fármacos: INH, RIF, PZN e ETB. O tratamento é realizado por um período de seis meses e é dividido em duas fases: a fase intensiva dura dois meses e o indivíduo com TB ativa é submetido a doses fixas dos quatro fármacos; nos quatro meses restantes de tratamento ou fase de manutenção, apenas a INH e a RIF são utilizadas (MS/SVS, 2019).

Dentre os fármacos utilizados no tratamento da TB, destaca-se a INH, utilizada desde 1945 como agente antimicobacteriano de primeira linha e também na quimioprofilaxia para portadores de HIV (Gourevitch et al., 1999; Budha et al., 2008). É rapidamente absorvida e atinge seu pico no soro cerca de 2 h após administração oral, sendo amplamente distribuída pelos fluidos corporais, incluindo o líquido, e possui atividade bacteriostática para os bacilos em latência e bactericida para aqueles em atividade (Budha et al., 2008).

A INH é um pró-fármaco e seus mecanismos de ação são complexos e envolvem alvos diversos, contudo sua principal atividade relaciona-se aos genes *katG* e *InhA* da micobactéria (Budha et al., 2008). O gene *katG* é responsável pela codificação da catalase-peroxidase, enzima heme bifuncional pertencente à classe I da superfamília das peroxidases, e exibe tanto

atividade catalásica quanto peroxidásica. Essa enzima limita o estresse redox no interior do fagócito e detoxifica peróxidos orgânicos gerados pela respiração não fermentativa da micobactéria, sendo assim relacionada a sua virulência (Welinder, 1992; Manca et al., 1999).

O gene *InhA* codifica a enzima *trans*-2-enoil-ACP redutase, componente de um complexo multienzimático bacteriano denominado *Fatty Acid Synthase* II responsável pela síntese e alongação de ácidos graxos por ciclos repetitivos de condensação, redução, desidratação e redução (Marrakchi et al., 2002). A *trans*-2-enoil-ACP redutase é particularmente importante nesse processo, pois catalisa a reação principal de síntese dos ácidos micólicos, importante componente da parede celular micobacteriana (Barry et al., 1998; Rozwaskiet al., 1998).

A INH é ativada pela catalase-peroxidase da micobactéria e os produtos dessa reação incluem espécies orgânicas reativas e o radical INH^\bullet , responsáveis pela inibição da síntese de ácidos micólicos e por danos ao DNA bacteriano (Johnsson & Schultz, 1994; Budha et al., 2008). INH^\bullet comumente conjuga-se com o NAD^+ originando o complexo INH-NAD^+ que, por sua vez, ao ligar-se ao sítio ativo da enzima *trans*-2-enoil-ACP redutase promove a inibição da síntese de ácidos micólicos, acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa na célula bacteriana e, consequentemente, morte do micro-organismo (Rozwaskiet al., 1998; Slayden et al., 2000).

3.1.4 Imunopatologia

Portadores de TB pulmonar ativa expõem minúsculas gotículas contendo o bacilo, que suspenso no ar é inalado por hospedeiros saudáveis. Em contato com os alvéolos pulmonares, *M. tuberculosis* é reconhecido por receptores do tipo *toll-like* e outros receptores de reconhecimento padrão presentes na superfície de macrófagos alveolares que induzem à fagocitose do patógeno (Kaufmann, 2001; Shaler et al., 2012). O glicolípido lipoarabinomanana, abundante na parede celular do bacilo, pode impedir a fusão do fagossomo ao lisossomo celular e, assim, promover a evasão dos mecanismos microbicidas macrofágicos. Dessa forma, ocorre a ativação de uma cascata de eventos inflamatórios, que culmina na produção de citocinas, principalmente o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6), 12 (IL-12) e 18 (IL-18), quimiocinas, recrutamento de células auxiliares e formação de granulomas no tecido pulmonar (Shaler et al., 2012; Domingo-Gonzalez et al., 2016).

O granuloma tuberculoso é uma estrutura densa em células e organizada de forma a conter o bacilo que não pode ser eliminado. Ele se constitui, principalmente, por macrófagos infectados ou não infectados, linfócitos T e B, células epitelioides, células gigantes

multinucleadas de *Langerhans*, fibroblastos e tecido fibroso (Guirado & Schlesinger, 2013). O ambiente no interior do granuloma é ideal para a sobrevivência de *M. tuberculosis* por longo período. No interior dos endossomas o bacilo tem acesso ao ferro, nutriente essencial às atividades metabólicas, além de reduzir o metabolismo basal e passar a utilizar lipídios como fonte energética, que são nutrientes abundantes nos resíduos caseosos do granuloma (Kaufmann, 2001).

No granuloma, o micro-organismo pode permanecer em estado de latência por décadas e ser reativado em condições de comprometimento imunológico como desnutrição, infecção por HIV, câncer e senescência o que caracteriza o processo agudo da TB. Nessas condições, o acúmulo do cáseo tuberculoso no centro do granuloma conduz ao colapso do mesmo, com disseminação dos bacilos pelo tecido pulmonar e início a um novo ciclo de infecções. Esse padrão de necrose é conhecido como caseosa e é característico da doença ativa (Guirado & Schlesinger, 2013).

Os neutrófilos desempenham papel essencial no controle de diversos processos infecciosos, inclusive na TB ativa ao constituir linha de defesa predominante na fase aguda, além de serem abundantes no sangue e no fluido broncoalveolar (Eum et al., 2010; Parker et al., 2016). Durante a ativação de neutrófilos, há grande consumo de O_2 num processo denominado *burst* oxidativo cujas principais implicações são a produção dos genericamente chamados ROS e RNS, reações catalisadas essencialmente pelas enzimas NADPH oxidase, superóxido dismutase (SOD) e MPO. Esses produtos estão associados com a oxidação e destruição do micro-organismo invasor (Hampton et al., 1998; Babior, 2004; Klebanoff, 2005). Além da atividade oxidativa, os neutrófilos dispõem de um maquinário microbicida não oxidativo que é constituído por enzimas como lisozima, catepsina G, elastase e lactoferrina (Teng et al., 2017).

3.1.5 Mieloperoxidase

O principal sistema microbicida de neutrófilos associa-se à atividade da MPO, uma hemeperoxidase abundante nos grânulos azurofílicos do fagócito e capaz de amplificar seu potencial oxidativo ao formar ácidos de halogênio (HOX), principalmente HOCl, e radicais livres através de vias chamadas clorinante e peroxidásica, respectivamente. O ciclo clorinante consiste na oxidação do cloreto e outros halogênios ao seu respectivo HOX, enquanto que o ciclo peroxidásico é responsável pela conversão de substratos como aminoácidos, ascorbato e glutatona nos respectivos radicais livres e peróxidos orgânicos. Ambos os ciclos convergem

para o propósito comum de eliminar o patógeno (Hampton et al., 1998; Klebanoff, 2005; Winterbourn et al., 2016).

O surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes à INH é comumente associado a mutações nos genes *katG* e *InhA* (Budha et al., 2008). Entretanto, alguns estudos têm demonstrado o papel do sistema imune na redução da eficiência do fármaco. Recentemente, Forbes e colaboradores (2012) demonstraram que INH poderia atuar como substrato e/ou inibidor da MPO, a depender da concentração, ao passo que reduziria a produção de HOCl, embora a relevância clínica desse efeito não foi explorada.

Adicionalmente, estudos cinéticos demonstraram que a atividade peroxidásica da MPO é da ordem de 10^4 vezes mais rápida que aquela realizada pela catalase-peroxidase bacteriana, o que sugere o possível papel dessa enzima na rápida oxidação de INH ao radical INH• em neutrófilos (Hillar & Loewen 1995; Sampson et al 1998; Khan et al., 2016). Dessa forma, a reação entre MPO e INH pode limitar a biodisponibilidade do fármaco o que, possivelmente, pode aumentar a sobrevivência bacteriana (Forbes et al., 2012). Além disso, o INH• pode reagir covalentemente com NAD^+ e NADP^+ , importantes coenzimas intracelulares (Meng et al., 2015; Khan et al., 2016). A formação do aduto INH- NADP^+ poderia inibir a reciclagem do NADPH, importante cofator da enzima NADPH oxidase e, conseqüentemente, aumentar a sobrevivência bacteriana (Babior, 2004; Meng et al., 2015), embora esse mecanismo ainda não tenha sido estudado.

Os adutos de aminoácidos, especialmente lisina e metionina, com INH• também foram descritos (Forbes et al., 2012), o que suporta achados anteriores de que a reação do INH com proteínas de superfície de leucócitos estejam associados ao desenvolvimento de reações auto-imunes durante o tratamento, a exemplo do lúpus iatrogênico (Hofstra et al., 1992). Diante da complexidade da associação entre INH e MPO *in vivo*, ainda há necessidade de mais estudos para compreender os mecanismos pelos quais essa reação ocorre e as implicações na infecção causada por *M. tuberculosis*.

3.1.6 Referências

AKINOLA, RO.; MAZANDU, GK. & MULDER, NJ. 2013. A Systems Level Comparison of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium smegmatis* Based on Functional Interaction Network Analysis. *Journal of Bacteriology a Parasitology*, v. 4, n. 4, p. 1-11.

BABIOR, BM. 2004. NADPH oxidase. *Current Opinion In Immunology*, v. 16, p. 42-47.

BARRY, CE.; LEE, RE.; MDLULI, K.; SAMPSON, AE.; SCHROEDER, BG.; SLAYDEN, RA. & YUAN, Y. 1998. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in Lipid Research*, v. 37, n. 2/3, p. 143-179.

BUDHA, NR.; LEE, RE. & MEIBOHM, B. 2008. Biopharmaceutics, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antituberculosis Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 8, p. 809-825.

CORDONE, A.; AUDRAIN, B.; CALABRESE, I.; EUPHRASIE, D.; REYRAT, JM. 2011. Characterization of a *Mycobacterium smegmatis* *uvrA* mutant impaired in dormancy induced by hypoxia and low carbon concentration. *BMC Microbiology*, v. 11, n. 231, p. 1-9.

CHURCHYARD, G.; KIM, P.; SHAH, NS.; RUSTOMJEE, R.; GANDHI, N.; MATHEMA, B.; DOWDY, D.; KASMAR, A. & CARDENAS, V. 2017. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, p. 629-635.

DOMINGO-GONZALEZ, R.; PRINCE, O.; COOPER, A.; KHADER, S. 2016. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 5, p. 1-58.

EUM, SY.; KONG, JH.; HONG, MS.; LEE, YJ.; KIM, JH.; HWANG, SH.; CHO, SN.; VIA, LE. & BARRY, CE. 2010. Neutrophils Are the Predominant Infected Phagocytic Cells in the Airways of Patients With Active Pulmonary TB. *Chest Journal*, v. 137, p. 122-128.

FORBES, LV.; FURTMULLER, PG.; KHALILOVA, I.; TURNER, F.; OBINGER, C. & KETTLE, AJ. 2012. Isoniazid as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: Identification of amine adducts and the influence of superoxide dismutase on their formation. *Biochemical Pharmacology*, v. 84, p. 949-960.

GOUREVITCH, MC.; HARTEL, D.; SELWYN, PA.; SCHOENBAUM, EE. & KLEIN, RS. 1999. Effectiveness of isoniazid chemoprophylaxis for HIV-infected drug users at risk for active tuberculosis. *AIDS*, v. 13, p. 2069-2074.

GUIRADO, E & SCHLESINGER, LS. 2013. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma – the critical battlefield in host immunity and disease. *Frontiers in Immunology*, v. 4, n. 98, p. 1-7.

HAMPTON, MB.; KETTLE, AJ & WINTERBOURN, CC. 1998. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood Journal*, v. 92, n. 9, p. 3007-3017.

HE, Z.; & BUCK, JD. 2010. Research article Cell wall proteome analysis of *Mycobacterium smegmatis* strain mc² 155. *BMC Microbiology*, v. 10, n. 121, p. 1-10.

HILLAR, A. & LOEWEN, PC. 1995. Comparison of Isoniazid Oxidation Catalyzed by Bacterial Catalase–Peroxidases and Horseradish Peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 323, n. 2, p. 438-446.

HOFSTRA, AH.; LI-MULLER, SMA. & UETRECHT, JP. 1992. Metabolism Of Isoniazid By Activated Leukocytes: Possible Role in Drug-Induced Lupus. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 20, n. 2, p. 205-210.

HOUBEN, RMH. & DODD, PJ. 2016. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *Plos Medicine*, v. 13, n. 10, p. 1-13.

JOHNSSON, K. & SHULTZ, PG. 1994. Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid by the Catalase Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. v. 116, p. 7425-7426.

KAUFMANN, SHE. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews*, v. 1, p. 20-30.

KHAN, SR.; MORGAN, AGM.; MICHAIL, K.; SRIVASTAVA, N.; WHITALL, RM.; ALJUHANI, N. & SIRAKI, AG. 2016. Metabolism of isoniazid by neutrophil myeloperoxidase

leads to isoniazid-NAD⁺ adduct formation: A comparison of the reactivity of isoniazid with its known human metabolites. *Biochemical Pharmacology*, v. 106, p. 46-55.

KLEBANOFF, SJ. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, n. 5, p. 598-625.

MANCA, C.; PAUL, S.; BARRY, CE.; FREEDMAN, VH. & KAPLAN, G. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* Catalase and Peroxidase Activities and Resistance to Oxidative Killing in Human Monocytes In Vitro. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 1, p. 74-79.

MARRAKCHI, H.; ZHANG, YM. & ROCK, CO. 2002. Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochemical Society Transactions*, v. 30, p. 1050-1055.

MENG, X.; MAGGS, JL.; USUI, T.; WHITAKER, P.; FRENCH, NS.; NAISBITT, DJ. & PARK, BK. 2015. Auto-oxidation of Isoniazid Leads to Isonicotinic-Lysine Adducts on Human Serum Albumin. *Chemical Research in Toxicology*, v. 28, p. 51-58.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. 2017. Boletim Epidemiológico: Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil, v. 48, n. 8, 11 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. 2019. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil, 366 p.

ORGEUR, M. & BROSCHE, R. 2018. Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Current Opinion in Microbiology*, v. 41, p. 68-75.

PARKER, D.; AHN, D.; COHEN, T. & PRINCE, A. 2015. Innate immune signaling activated by MDR bacteria in the airway. *Physiological Reviews*, v. 96, p. 19-56.

PHILIPS, JA. & ERNST, JD. 2012. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annual Review of Pathology*, v. 7, p. 353-384.

ROZWARSKI, DA.; GRANT, GA.; BARTON, DHR.; JACOBS, WR. & SACCHETTINI, JC. 1998. Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, v. 279, p. 98-102.

SAMPSON, JB.; YE, Y.; ROSEN, H. & BECKMAN, JS. 1998. Myeloperoxidase and Horseradish Peroxidase Catalyze Tyrosine Nitration in Proteins from Nitrite and Hydrogen Peroxide. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, v. 356, n. 2, p. 207-213.

SHALER, CR.; HORVATH, C.; LAI, R. & XING, Z. 2012. Understanding Delayed T-Cell Priming, Lung Recruitment, and Airway Luminal T-Cell Responses in Host Defense against Pulmonary Tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, p. 1-13.

SLAYDEN, RA.; LEE, RE; & BARRY, CE. 2000. Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, v. 38, n. 3, p. 514-525.

TENG, TS.; J, AL.; J, XY.; L, YZ. 2017. Neutrophil and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *Journal of Immunology Research*, p. 1-14.

TIMMINS, GS.; MASTER, S.; RUSNAK, S. & DERETIC, V. 2004. Nitric Oxide Generated from Isoniazid Activation by KatG: Source of Nitric Oxide and Activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 8, p. 3006-3009.

WELINDER, KG. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Biology*, v. 2, p. 388-393.

WINTERBOURN, CC.; KETTLE, AJ.; HAMPTON, MB. 2016. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annual Review Biochemistry*, v. 14, n. 21, p. 15.1-15.28.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2016. Global Tuberculosis Report, 214 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017. Global Tuberculosis Report, 262 p.

3.2 CAPÍTULO 02: ARTIGO A SER SUBMETIDO NA *Chemico-Biological Interactions*

Inibição do *burst* oxidativo de neutrófilos pela isoniazida induz ao aumento na sobrevivência da *Mycobacterium smegmatis* mc²155.

Luis Filipe Oliveira Gomes^a, Railmara Pereira da Silva^b, Beatriz Pereira da Silva^b, Flávia Carla Meotti^b, Raphael Ferreira Queiroz^{a,c,*}.

^a Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Estrada Bem Querer – km 04, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes – 748, Butantã, São Paulo, São Paulo, Brasil.

^c Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Estrada Bem Querer – km 04, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

*Autor correspondente: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz, Departamento de Ciências Naturais, Estrada do Bem Querer, km 4, Caixa Postal 95, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, CEP 45031-900, Vitória da Conquista, Brasil. E-mail: rfqueiroz@uesb.edu.br

Link Guia ao Autor: <https://www.elsevier.com/journals/chemico-biological-interactions/0009-2797/guide-for-authors>

Resumo:

A isoniazida é o fármaco de primeira linha para o tratamento da tuberculose. Estudos recentes sugerem a existência de interações entre o sistema imune e a isoniazida que podem reduzir a atividade microbicida de neutrófilos e/ou formar adutos com aminoácidos específicos do hospedeiro. A mieloperoxidase, enzima abundante em neutrófilos, tem papel central nesse processo ao catalisar a oxidação da isoniazida a intermediários radicalares. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar as consequências da interação entre mieloperoxidase e isoniazida sobre a sobrevivência de *Mycobacterium smegmatis* (cepa mc²155). Desse modo, a concentração bactericida mínima e o IC₅₀ do HOCl, isoniazida e H₂O₂ foram inicialmente determinados. Em seguida, HOCl e isoniazida foram pré-incubados *in vitro* antes das incubações com *M. smegmatis* no intuito de investigar reação entre as duas moléculas. Os efeitos da INH sobre a atividade bactericida da mieloperoxidase purificada e de neutrófilos

humanos foram avaliados. Por fim, a formação de $O_2^{\cdot-}$ pelos neutrófilos na presença ou não da isoniazida também foi determinada. Os valores de IC_{50} obtidos foram de 21 e 25 μM e de concentração bactericida mínima de 50 e 75 μM para o HOCl e isoniazida, respectivamente. Nós observamos que a interação entre HOCl e isoniazida inibiu completamente a atividade bactericida do HOCl ($p < 0,0001$), mas reduziu a eficácia da isoniazida em 13% ($p < 0,01$) na concentração relativa ao IC_{50} . A constante de velocidade da reação entre HOCl e isoniazida foi calculada em $3,7 \times 10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$. Nas incubações com a enzima purificada, a isoniazida restaurou significativamente a sobrevivência da bactéria em aproximadamente 39 % ($p < 0,0001$), 52% ($p < 0,0001$) e 71% ($p < 0,0001$) nas concentrações de 5, 7,5 e 10 μM , respectivamente. Nas incubações com neutrófilos, a isoniazida restaurou a sobrevivência bacteriana em 33% ($p < 0,0001$) nas concentrações de 25 e 75 μM , mas sem interferir na formação de $O_2^{\cdot-}$ pelas células. Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que a reação entre a isoniazida e mieloperoxidase, bem como isoniazida e HOCl, prejudica a atividade bactericida oxidativa de neutrófilos, o que pode interferir no papel do sistema imunológico em limitar a infecção por microbactéria.

Palavras-chave: isoniazida, mieloperoxidase, neutrófilos humanos, *Mycobacterium smegmatis*.

3.2.1 Introdução

A tuberculose (TB) é a principal causa global de mortalidade por agente infeccioso, superando inclusive a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) [1]. Trata-se de uma infecção bacteriana desencadeada quase que exclusivamente por *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo transmitido principalmente por aerossóis expelidos pelo indivíduo infectado para um indivíduo susceptível [2]. De acordo com estimativas atuais, aproximadamente 24% da população global está infectada pelo *M. tuberculosis*, porém os bacilos permanecem latentes na maioria dos casos [3].

Em indivíduos imunocompetentes, a atividade fagocítica é essencial para limitar o avanço da infecção. Nos alvéolos, *M. tuberculosis* é fagocitado por macrófagos residentes, onde ocorrerá produção de citocinas, principalmente o fator de necrose tumoral alfa, interleucinas 1, 6, 12 e 18, quimiocinas, recrutamento de fagócitos auxiliares, sobretudo neutrófilos, e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) na tentativa de eliminar a bactéria [4,5,6]. No entanto, o bacilo apresenta componentes na parede celular que bloqueiam a resposta imunológica dos macrófagos e inibem a maturação do fagossoma, o que resulta na sobrevivência da bactéria e, conseqüentemente, formação de granuloma pulmonar [7,8].

No granuloma o bacilo inativo pode permanecer viável por décadas e ser reativado em certas condições clínicas específicas como desnutrição, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), câncer, senescência e outras situações de comprometimento imunológico, o que caracteriza o processo agudo [5]. Nesse contexto, os neutrófilos desempenham papel essencial no controle do processo infeccioso na tuberculose ativa ao constituir linha de defesa predominante nessa fase [9]. O principal sistema microbicida de neutrófilos associa-se à atividade da mieloperoxidase (MPO), uma hemeperoxidase capaz de amplificar o potencial redox do H_2O_2 ao formar HOCl e radicais livres a partir de substratos endógenos [10,11].

Na maioria dos casos agudizados também é necessária a utilização de terapia farmacológica específica, cujo esquema rotineiro consiste no emprego concomitante de quatro fármacos: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZN) e etambutol (ETB) [12]. Dentre estes, a INH persiste, desde sua descoberta em 1945, como fármaco de primeira linha para o tratamento da TB, bem como na quimioprofilaxia da doença em portadores de HIV [13,14]. Esse fármaco inibe seletivamente a enzima bacteriana *trans*-2-enoil-ACP redutase, responsável pela síntese dos ácidos micólicos presentes na parede celular de micobactérias, embora mecanismos complementares também já tenham sido propostos [15,16].

Na bactéria, INH é oxidada pelo domínio peroxidásico da enzima catalase-peroxidase ao radical INH^\bullet que, por sua vez, reage covalentemente com NAD^+ e esse aduto é capaz de se

ligar ao sítio ativo da enzima *trans*-2-enoil-ACP redutase, inibindo-a [17,18]. No contexto inflamatório, INH também é oxidada pela MPO à produtos radicalares que formam adutos biológicos, particularmente com grupamentos amino de aminoácidos e NAD^+ [19], ao passo que inibe a produção de HOCl pela enzima [20]. As enzimas microsossomais também são capazes de promover a formação a oxidação da INH ao INH^\bullet , que se liga covalentemente ao NADP^+ [21].

As interações entre INH e MPO podem, portanto, aumentar a sobrevivência bacteriana na inflamação aguda ao reduzir a produção de HOCl [20] e/ou a disponibilidade do fármaco [22]. Além disso, adutos potencialmente imunogênicos com proteínas do hospedeiro podem ser originados na presença de MPO e INH, uma vez que os produtos dessa reação são capazes de formar adutos com aminoácidos, principalmente lisina e metionina [20]. Considerando a importância clínica e epidemiológica da tuberculose bem como as interações descrita entre o sistema imune e a INH, o objetivo deste trabalho foi investigar as implicações da interação MPO *versus* INH sobre a sobrevivência micobacteriana.

3.2.2 Materiais e métodos

3.2.2.1 Materiais e reagentes

Glicose anidra, glicerol, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de sódio, fosfato monopotássico, peróxido de hidrogênio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, azul de tripan, citocromo C, taurina, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), Histopaques 1077 e 1119, INH (I3377), Tween 80, Triton X-100, SOD (S9636), MPO (M6908), catalase de fígado bovino (C9322), e as células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikiticus* (M0508) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os meios de cultura Middlebrook 7H9 e 7H10 foram obtidos da Interlab. O HOCl foi obtido a partir de preparação comercial de hipoclorito de sódio e sua concentração determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{290\text{nm}} = 3,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [23]. O tampão fosfato-salino-glicose (PBS-g) (10 mM, pH 7,4) continha fosfato dibásico de sódio (10 mM), fosfato monopotássico (1,8 mM), cloreto de sódio (137 mM), cloreto de potássio (2,7 mM) e glicose anidra (1%). Os meios de cultura, solução salina e tampões foram esterilizados por autoclavagem.

3.2.2.2 Cepa bacteriana

M. smegmatis, uma cepa não patogênica, de rápido crescimento e que compartilha várias características estruturais, metabólicas e genéticas com *M. tuberculosis*, foi utilizada nos experimentos [24]. A cepa de *M. smegmatis* mc²155 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. André

Kipnis do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil. A bactéria foi cultivada em caldo Middlebrook 7H9 (M7H9) adicionado de glicose (0,2%), glicerol (0,2%), cloreto de sódio (0,085%) e Tween 80 (0,05%) ou em ágar Middlebrook 7H10 (M7H10) adicionado de glicose (0,2%) e cloreto de sódio (0,085%) a 37 °C em incubadora bacteriológica (Sterilifer SX 1.2 - DTMC, São Paulo - Brasil) por 48 h. Posteriormente, o meio foi diluído em caldo M7H9 para o $OD_{600} = 0,1$ e incubado por 5 h para reativação da cepa, seguida de uma nova diluição ($OD_{600} = 0,1$), o que equivale a $3,5 \times 10^6$ UFC/mL, exceto quando descrito diferente.

3.2.2.3 Atividade bactericida do HOCl

As bactérias ($3,5 \times 10^6$ UFC/mL) foram centrifugadas (2000 xg) por 10 min (Fanem 206-LB, São Paulo - Brasil) e ressuspensas em igual volume de PBS-g. Em seguida, foram diluídas em PBS-g para a concentração de $1,8 \times 10^6$ UFC/mL e desafiadas com HOCl (10-50 μM) a 37 °C por 30 min, num volume final de 200 μL . O meio reacional foi então diluído 500 vezes em PBS-g, e 10 μL foram estriados em placas contendo ágar M7H10. As placas foram então incubadas a 37 °C por 48 h e a atividade bactericida foi estimada pela contagem do número de colônias residuais sobre a placa [25].

3.2.2.4 Atividade bactericida do H₂O₂

As bactérias ($3,5 \times 10^6$ UFC/mL) foram centrifugadas (2000 xg) por 10 min (Fanem 206-LB, São Paulo - Brasil) e ressuspensas em igual volume de PBS-g. Em seguida, foram diluídas em PBS-g para a concentração de $1,8 \times 10^6$ UFC/mL e desafiadas com H₂O₂ (50-500 μM) a 37 °C por 1 h, num volume final de 200 μL . O meio reacional foi então diluído 500 vezes em PBS-g e 10 μL foram estriados em placas contendo ágar M7H10. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e a atividade bactericida foi estimada pela contagem do número de colônias residuais sobre a placa [25].

3.2.2.5 Atividade bactericida da INH

As bactérias padronizadas na $OD_{600} = 0,1$ ($3,5 \times 10^6$ UFC/mL) foram diluídas para $2,5 \times 10^5$ UFC/mL em caldo M7H9 de acordo com o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e desafiadas com INH (10-75 μM) a 37 °C por 24 h, num volume final de 200 μL . Em seguida, o meio reacional foi diluído 5.000 vezes em caldo M7H9, e 10 μL foram estriados em placas contendo ágar M7H10. As placas foram então incubadas a 37 °C

por 48 h, e a atividade bactericida foi também estimada pela contagem do número de colônias residuais sobre a placa [26].

3.2.2.6 Efeito da incubação da INH com HOCl sobre a atividade bactericida do HOCl

INH (1 mM) foi pré-incubada por 10 min com HOCl (1 mM) à temperatura ambiente. As bactérias ($3,5 \times 10^6$ UFC/mL) foram centrifugadas (2000 xg) por 10 min (Fanem 206-LB, São Paulo - Brasil) e ressuspensas em igual volume de PBS-g. Em seguida, as bactérias foram diluídas em PBS-g para a concentração de $1,8 \times 10^6$ UFC/mL e o HOCl pré-incubado com INH foi adicionado nas concentrações equivalentes a 21 e 50 μ M, num volume final de 200 μ L. Após 30 min a 37 °C, a mistura reacional foi diluída 500 vezes em PBS-g, e 10 μ L foram estriados em placas contendo ágar M7H10. As placas foram então incubadas a 37 °C por 48 h e a atividade bactericida foi estimada pela contagem do número de colônias residuais sobre a placa.

3.2.2.7 Efeito da incubação da INH com HOCl sobre a atividade bactericida da INH

INH (1 mM) foi pré-incubada por 10 min com HOCl (1 mM) à temperatura ambiente. As bactérias padronizadas na $OD_{600} = 0,1$ ($3,5 \times 10^6$ UFC/mL) foram diluídas para $2,5 \times 10^5$ UFC/mL em caldo M7H9 de acordo com protocolos do CLSI. Em seguida, INH pré-incubada com HOCl foi adicionada às bactérias nas concentrações de 25 e 75 μ M, num volume final de 200 μ L. Após 24 h a 37 °C, a mistura reacional foi diluída serialmente em 5.000 vezes usando caldo M7H9, e 10 μ L foram estriados em placas contendo ágar M7H10. As placas foram então incubadas a 37 °C por 48 h e a atividade bactericida foi estimada pela contagem do número de colônias residuais sobre a placa.

3.2.2.8 Cinética competitiva da reação entre INH e HOCl

INH (1-100 μ M) foi incubada com taurina (15 mM) em PBS, seguida da adição de HOCl (50 μ M), num volume final de 300 μ L. O meio reacional foi então diluído em uma solução de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) ($OD_{412nm} = 0,5$), preparada a partir da hidrólise básica do DTNB. A absorvância foi medida a 412 nm após 5 min. A concentração final de HOCl (μ M) foi calculada pela fórmula: [(controle negativo – controle positivo) x fator de diluição x 10^6]/ ϵ , sendo controle negativo a absorvância do meio reacional sem HOCl; controle positivo a absorvância do meio reacional contendo HOCl; coeficiente de extinção molar (ϵ) do TNB de $2,82 \times 10^4$ M⁻¹.cm⁻¹; fator de diluição = 5. O resultado foi expresso por meio de uma curva do rendimento máximo [HOCl na ausência de INH] x [taurina] dividido pelo rendimento na presença da INH (*scavenger*) versus concentração da INH (eixo x). O ajuste linear da curva

obtida permitiu o cálculo da constante de velocidade multiplicando o valor da inclinação pela constante de reação da taurina com HOCl ($4,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [27,28]. Como controle, a constante de reação da glutatona ($1-25 \text{ } \mu\text{M}$) com HOCl foi determinada.

3.2.2.9 Atividade bactericida da MPO

As bactérias ($3,5 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$) foram centrifugadas a $2000 \text{ } \times\text{g}$ (Fanem 206-LB, São Paulo - Brasil) durante 10 min, ressuspensas em volume necessário de PBS-g para a concentração de $1 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$. Em seguida, as bactérias ($1 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$) foram incubadas num sistema contendo MPO (20 nM) e diferentes concentrações de INH (2,5 a $10 \text{ } \mu\text{M}$) a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ por 20 min, sendo a reação iniciada pela adição de H_2O_2 ($50 \text{ } \mu\text{M}$). O meio reacional foi então diluído 500 vezes em PBS-g e $10 \text{ } \mu\text{L}$ foram estriados em placas contendo ágar M7H10. As placas foram incubadas a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ por 48 h e a atividade bactericida foi estimada pela contagem do número de colônias residuais sobre a placa [20].

3.2.2.10 Isolamento de neutrófilos do sangue humano periférico

As amostras de sangue humano foram obtidas de doadores voluntários, saudáveis, de ambos os sexos, com idade média de $28,5 \pm 2,5$ anos, não fumantes, através de punção venosa periférica por protocolos previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia sob parecer de número CAAE 46135315.4.0000.0055. O isolamento de granulócitos foi realizado como descrito por English & Andersen [29] com pequenas adaptações. O sangue foi inicialmente coletado em tubos plásticos estéreis contendo heparina sódica e homogeneizado por inversão. Em seguida, 2 mL de Histopaque 1077 foi cuidadosamente vertido em 3 mL de Histopaque 1119 em um tubo cônico estéril de 15 mL, em temperatura ambiente, seguido da adição de 4 mL do sangue coletado. Após centrifugação a $700 \text{ } \times\text{g}$ (Fanem 206-LB, São Paulo - Brasil) por 30 min à temperatura ambiente, o material sobrenadante foi descartado e a camada de granulócitos, localizada entre os dois gradientes, aspirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur, lavada com 10 mL de salina estéril (0,9%) e novamente centrifugada a $300 \text{ } \times\text{g}$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o infranadante foi submetido à hemólise hipotônica, pela adição de 5 mL de água destilada gelada, para eliminar quaisquer resquícios de eritrócitos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a $300 \text{ } \times\text{g}$ por 10 min, o sobrenadante descartado e o infranadante ressuspensado em 2 mL de tampão PBS-g acrescido de cloreto de cálcio (1 mM) e cloreto de magnésio (0,5 mM). A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer (Global Optics, SP - Brasil) e a viabilidade celular confirmada pelo método de exclusão por azul de

tripan a 0,2% [30], sendo 98% do total de granulócitos constituído por neutrófilos. Por esse motivo, as células utilizadas para as incubações foram identificadas como neutrófilos.

3.2.2.11 Atividade bactericida de neutrófilos

As bactérias ($3,5 \times 10^6$ UFC/mL) foram centrifugadas a 2.000 xg (Fanem 206-LB, São Paulo - Brasil) durante 10 min, ressuspensas em volume necessário de tampão de opsonização (50% de PBS-g e 50% de soro humano autólogo inativado) para a concentração de 1×10^8 UFC/mL, e incubadas a 37 °C por 20 min. Os neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram então incubados com as bactérias opsonizadas (1×10^6 UFC/mL, multiplicidade de infecção = 1:1) em PBS-g na ausência ou presença de INH (25 e 75 μ M), ácido 4-aminobenzóico hidrazida (ABAH) (50 μ M), um inibidor da MPO [31,32], ou apocinina (APO) (1 mM), um inibidor da NADPH oxidase [33,34], num volume final de 500 μ L. Após 1 h, Triton X-100 (0,5%) foi adicionado, a mistura reacional homogeneizada e mantida em gelo por 10 min para lise total dos neutrófilos. O homogenato total foi diluído 500 vezes em PBS-g e 10 μ L foram estriados em placas contendo ágar M7H10. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, e a atividade bactericida foi estimada pela contagem do número de colônias residuais sobre a placa [35]. Nessas condições, Triton X-100 não causa redução da viabilidade bacteriana.

3.2.2.12 Formação de $O_2^{\bullet-}$ por neutrófilos

A formação de $O_2^{\bullet-}$ por neutrófilos foi determinada espectrofotometricamente pela redução do citocromo C [36]. Neutrófilos ($3,3 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com INH (5, 10, 25 e 50 μ M), APO (1 mM) ou SOD (100 μ g/mL), na presença de taurina (15 mM) em PBS-g a 37 °C, num volume final de 300 μ L. Posteriormente, citocromo C (40 μ M) foi adicionado ao meio e as células foram ativadas com acetato de forbol miristato (PMA) (100 ng/mL). A redução de citocromo C foi acompanhada a 550 nm ($\epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante 10 min, e o dado foi expresso como concentração de citocromo C reduzido.

3.2.2.13 Análise estatística

Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism versão 5.0. Os experimentos foram descritos pela média \pm erro padrão das replicatas independentes e analisados por *One-way ANOVA* seguido pelo *pos-test* de Newman-Keuls quando apropriado, sendo atribuída significância às diferenças com $p < 0,05$.

3.2.3 Resultados

M. smegmatis mc²155 foi incubada com HOCl, INH e H₂O₂ por 30 min, 24 h e 1 h, respectivamente, e as colônias residuais foram determinadas. O ajuste dos dados na curva dose-resposta permitiu o cálculo do IC₅₀ de 21 e 25 μM para HOCl (Fig. 1A) e INH (Fig. 1B), respectivamente. Além disso, o MBC do HOCl e INH foi estimado em 50 e 75 μM, respectivamente, não sendo possível determinar o MIC devido à reatividade dos compostos com a resazurina. No caso do H₂O₂, até a concentração de 500 μM, a sobrevivência da bactéria foi reduzida em apenas 43% ($p < 0,0001$) (Fig. 1C), não sendo determinado o IC₅₀.

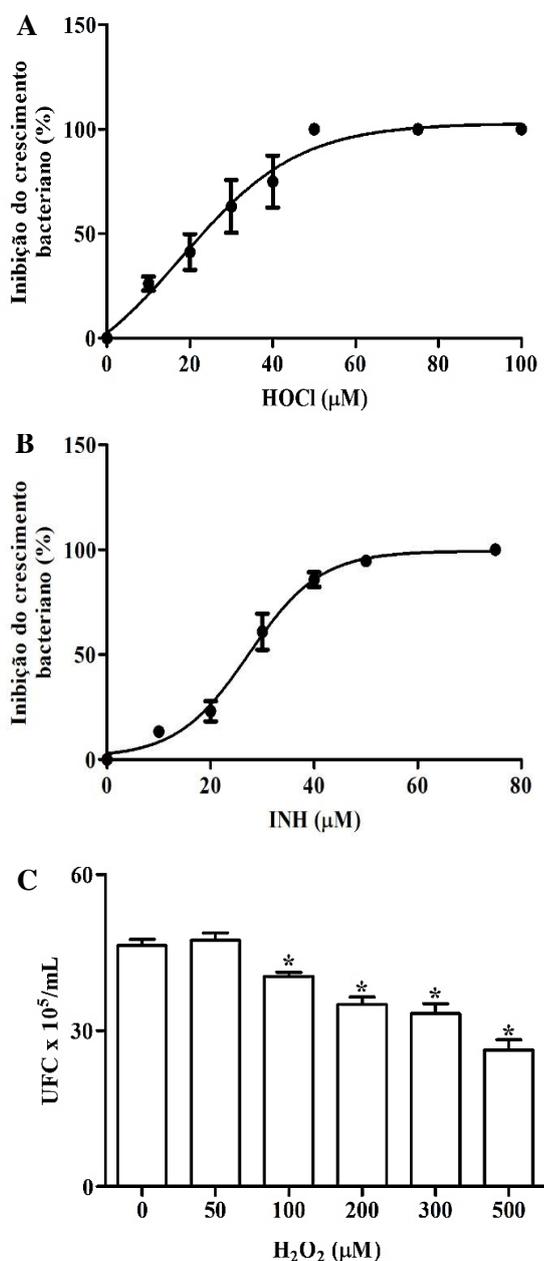


Fig. 1. Inibição de crescimento de *M. smegmatis* mc²155 por HOCl (A), INH (B) e H₂O₂ (C). As bactérias (1,8x10⁶ UFC/mL, 2,5x10⁵ UFC/mL para HOCl/H₂O₂ e INH, respectivamente)

foram incubadas com HOCl por 30 min, INH por 24 h e H₂O₂ por 1 h a 37 °C em PBS-g, para HOCl e H₂O₂, ou caldo M7H9, para INH. Posteriormente, o meio reacional foi diluído em PBS-g e a suspensão bacteriana estriada sobre placa contendo ágar M7H10 para a contagem das colônias remanescentes após 48 h a 37 °C. Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média do percentual de inibição em triplicata de três experimentos independentes para HOCl e INH e média ± erro padrão da média de UFC/mL de dois experimentos independentes para H₂O₂. Os dados foram ajustados na equação sigmoideal no software GraphPad Prism 5.0 para cálculo do IC₅₀. **p*<0,05 quando comparado com o controle negativo.

Em seguida, HOCl e INH foram pré-incubados *in vitro* e posteriormente avaliados quanto as atividades bactericidas residuais. Quando o HOCl foi pré-incubado com INH, o fármaco reverteu completamente a atividade bactericida do oxidante nas concentrações equivalentes ao IC₅₀ e MBC (*p*<0,0001) (Fig. 2A). Por outro lado, a oxidação do fármaco pelo HOCl reduziu a atividade bactericida do INH em cerca de 13% na concentração relativa ao IC₅₀ (*p*<0,01) (Fig. 2B).

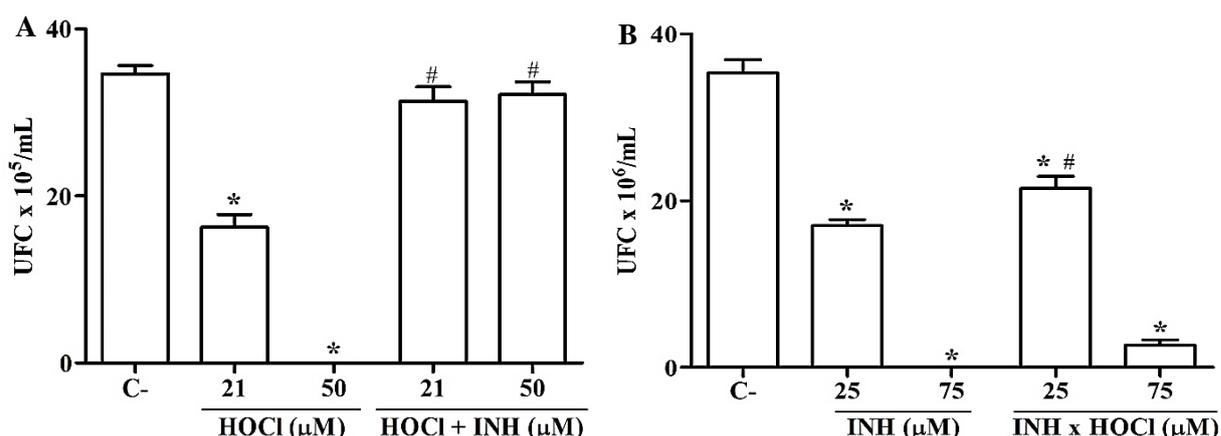


Fig. 2. Efeito da interação entre HOCl e INH sobre a atividade micobactericida do HOCl (A) e INH (B). INH (1 mM) foi pré-incubada por 10 min com HOCl (1 mM) à temperatura ambiente. As bactérias ($1,8 \times 10^6$ UFC/mL e $2,5 \times 10^5$ UFC/mL para HOCl e INH, respectivamente) foram incubadas com o meio reacional descrito acima por 30 min, para avaliar a atividade do HOCl, e por 24 h, para avaliar a atividade da INH, a 37 °C em PBS-g ou caldo M7H9. Posteriormente, o meio reacional foi diluído e a suspensão bacteriana estriada sobre placa contendo ágar M7H10 para a contagem das colônias remanescentes após 48 h a 37 °C. Os dados foram expressos em média ± erro padrão das triplicatas de três experimentos independentes para o gráfico A e um experimento independente para o gráfico B. **p*<0,05 quando comparado com o controle negativo; #*p*<0,05 quando comparado com o respectivo grupo sem co-incubação.

Os dados acima sugerem que HOCl reage com INH, embora a atividade da INH se altere sutilmente decorrente dessa reação. Por esse motivo, a cinética da reação entre INH e HOCl foi estimada pelo método competitivo com a taurina. A constante de velocidade observada foi linearmente dependente da concentração de INH (Fig. 3A) cujo valor, correspondente à

inclinação da reta multiplicado pela constante taurina-HOCl, foi de $3,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. A constante de velocidade do HOCl com a glutatona (Fig. 3B) foi de $2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

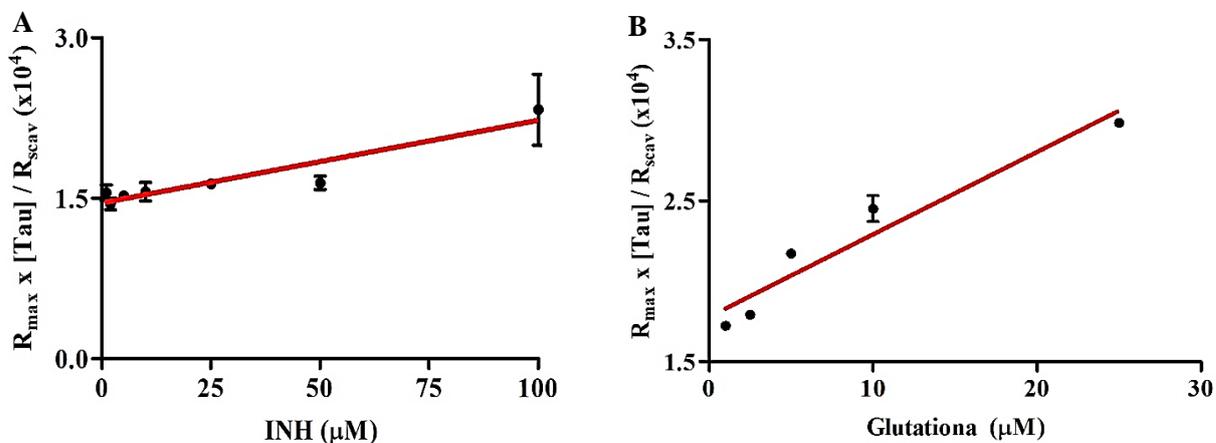


Fig. 3. Cinética competitiva da reação entre HOCl e INH (A) ou glutatona (B). HOCl (50 μM) foi incubado com taurina (Tau, 15 mM), na presença ou ausência de INH (1-100 μM) ou glutatona (1-25 μM). O meio reacional foi então diluído em uma solução de TNB ($\text{OD}_{412\text{nm}} = 0,5$) e absorvância foi medida a 412 nm em espectrofotômetro. A concentração final de HOCl após a reação foi calculada, e o ajuste linear da curva obtida permitiu o cálculo da constante de velocidade multiplicando o valor da inclinação pela constante de reação da taurina com HOCl. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média das triplicatas de um experimento independente. R_{\max} = rendimento na ausência da INH; R_{scaV} = rendimento na presença da INH ou glutatona.

Em seguida, foi investigado o efeito da INH sobre a atividade bactericida da MPO purificada. Após 20 min de incubação, todas as bactérias morreram no sistema contendo MPO e H_2O_2 (50 μM). Quando INH nas concentrações de 2,5, 5,0, 7,5 e 10 μM foram adicionadas ao sistema, a sobrevivência da bactéria foi significativamente restaurada para aproximadamente 12 % ($p < 0,01$), 43% ($p < 0,0001$), 53% ($p < 0,0001$) e 70% ($p < 0,0001$), respectivamente.

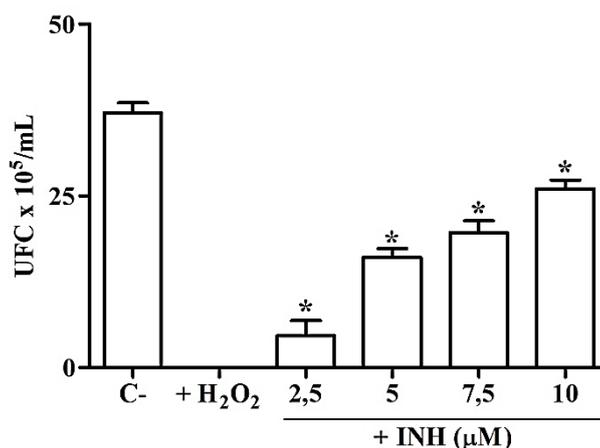


Fig. 4. Efeito da INH sobre a atividade bactericida da MPO. As bactérias (1×10^6 UFC/mL) foram incubadas num sistema contendo MPO (20 nM) e diferentes concentrações de INH (2,5 a 10 μ M) a 37 °C por 20 min, sendo a reação iniciada pela adição de H₂O₂ (50 μ M). O meio reacional foi então diluído em PBS-g e a suspensão bacteriana estriada sobre placas contendo ágar M7H10 para a contagem de colônias remanescentes após 48 h a 37 °C. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão das duplicatas de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo +H₂O₂. +H₂O₂: sistema contendo apenas MPO, H₂O₂ e bactérias.

O efeito da INH sobre a atividade micobactericida de neutrófilos isolados do sangue humano periférico foi também investigado (Fig. 4). Após 1 h, cerca de 45% das bactérias opsonizadas morreram na presença de neutrófilos humanos. Quando INH (25 e 75 μ M) foi adicionado ao sistema, a sobrevivência bacteriana aumentou em aproximadamente 33%, para ambas as concentrações, em comparação com o grupo que continha apenas neutrófilos e bactérias ($p < 0,0001$). ABAH e APO também aumentaram o número de colônias de bactérias em aproximadamente 17% ($p < 0,0001$) e 27% ($p < 0,0001$), respectivamente. Também, observou-se que a INH restaurou a sobrevivência da bactéria em aproximadamente 6% a mais do que nos neutrófilos pré-incubados com APO ($p < 0,01$). Esses resultados sugerem que, além de reduzir a morte por mecanismos da NADPH oxidase e MPO, INH deve possuir efeitos sobre vias não oxidativas de neutrófilos.

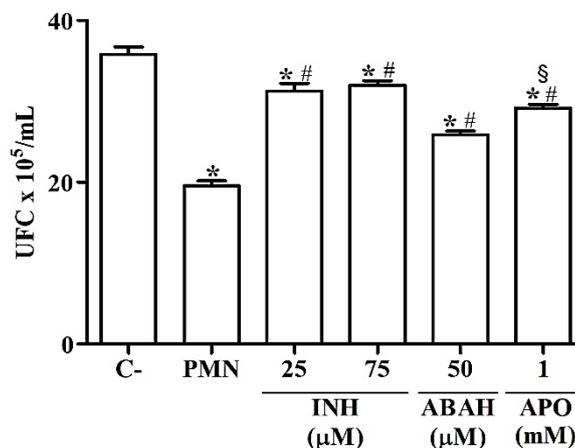


Fig. 5. Efeito da INH sobre a atividade bactericida de neutrófilos isolados do sangue humano. Os neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram desafiados com as bactérias opsonizadas (1×10^6 UFC/mL) em PBS-g na ausência ou presença de INH (25 e 75 μ M), ABAH (50 μ M) ou APO (1 mM). Após 1 h, Triton X-100 (0,5%) foi adicionado, a mistura reacional homogeneizada e mantida em gelo por 10 min para lise total dos neutrófilos. O homogenato total foi diluído em PBS-g e a suspensão bacteriana estriada sobre placas contendo ágar M7H10 para a contagem das colônias remanescentes após 48 h a 37 °C. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão das triplicatas de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo; # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que contém apenas neutrófilos e *M. smegmatis*; § $p < 0,05$ quando comparados os grupos APO e INH. PMN (polimorfonucleares): grupo contendo apenas neutrófilos e bactérias.

Posteriormente, o efeito da INH sobre vias *upstream* do *burst* oxidativo de neutrófilos também foi determinado. A formação de O_2^{\bullet} por neutrófilos ativados na presença de INH (5-50 μ M) foi analisada espectrofotometricamente pela determinação da redução do citocromo C. INH, nas concentrações utilizadas, não inibiu significativamente a formação O_2^{\bullet} por neutrófilos humanos (Fig. 5), sugerindo que os efeitos da INH no aumento da sobrevivência de *M. smegmatis* sejam principalmente em decorrência da inibição da MPO. A inibição da redução do citocromo C na presença de SOD confirma a formação de O_2^{\bullet} no sistema.

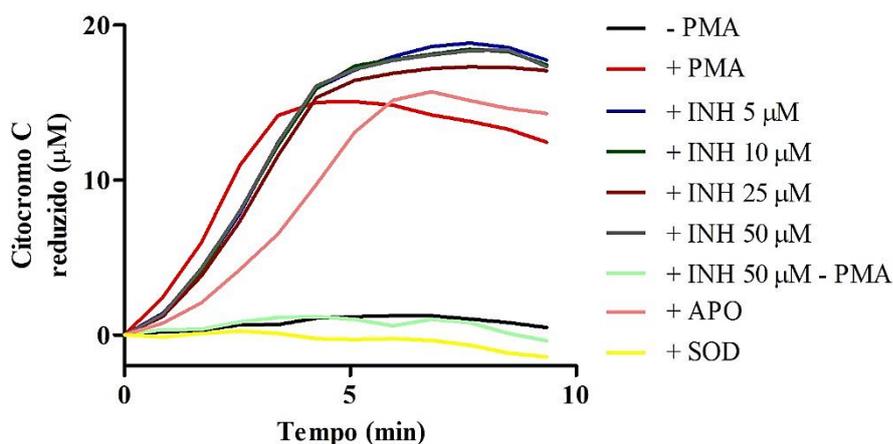


Fig. 6. Efeito da INH sobre a formação de $O_2^{\bullet-}$ por neutrófilos isolados do sangue humano. Neutrófilos ($3,3 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com INH (5, 10, 25 e 50 μM), taurina (15 mM) em PBS-g a 37 °C. APO (1 mM) ou SOD (100 $\mu\text{g/mL}$) foram utilizados em algumas incubações. Posteriormente, citocromo C (40 μM) foi adicionado ao meio, e as células foram ativadas com PMA (100 ng/mL). A redução de citocromo C foi acompanhada a 550 nm durante 10 min. O resultado foi expresso como concentração de citocromo C reduzido referente à média da duplicata experimental.

3.2.4 Discussão

Os neutrófilos desempenham um papel central no controle da infecção causada por micobactérias, principalmente em processos agudos [9]. Dentre os sistemas microbicidas em neutrófilos, aqueles associados à MPO se destacam. Essa enzima é capaz de amplificar o potencial oxidativo do H_2O_2 ao formar ácidos de halogênio e radicais livres [10,11,37]. Em certas situações, a resposta imune do indivíduo não é suficiente para limitar a disseminação das micobactérias, o que torna necessária a implementação do tratamento farmacológico, sendo INH o fármaco de primeira linha no tratamento e quimioprofilaxia da infecção por essas bactérias [12,13,14]. Todavia, os efeitos da INH sobre a atividade bactericida de neutrófilos eram ainda desconhecidos. Neste estudo, demonstramos pela primeira vez que INH aumentou a sobrevivência da *M. smegmatis* mc²155 ao inibir a produção de HOCl por neutrófilos humanos. Nós decidimos usar a *M. smegmatis* nos experimentos por se tratar de uma espécie de micobactéria não patogênica, de rápido crescimento e que compartilha várias características genéticas em comum com *M. tuberculosis* [24].

O MBC da INH contra *M. smegmatis* mc²155 foi de acordo com descrito na literatura anteriormente, ao considerar que utilizamos 5×10^5 UFC/mL enquanto Silva e colaboradores [38] empregaram cerca de 10^6 UFC/mL (75 e 117 μM , respectivamente) nos experimentos. Em contrapartida, o valor do MBC da INH contra *M. tuberculosis* é 166 vezes menor [39] que o

determinado por nós para *M. smegmatis*. Essa diferença se deve possivelmente pela maior expressão de bombas de efluxo em micobactérias atípicas [38,40].

Nós também demonstramos que INH reage com HOCl com altas taxas de velocidade ($k = 3,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), inibindo completamente a atividade bactericida do oxidante. A constante de velocidade de segunda ordem foi determinada por método competitivo, e quando utilizamos glutatona como padrão, confirmamos a robustez do ensaio, pois constante aqui determinada ($k = 2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) foi similar àquela previamente descrita ($k = 1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [41]. Em geral, INH não apenas interfere na atividade da MPO [20], como também consome rapidamente o HOCl formado, o que deve contribuir com a sobrevivência bacteriana. Por outro lado, a atividade micobactericida do INH se reduz significativamente apenas quando incubado com as bactérias na menor concentração relativa ao IC₅₀. É possível que a oxidação por HOCl na estrutura da INH não ocorra nos grupos farmacofóricos da molécula [42].

INH pode agir como substrato e inibidor da MPO, ao passo que diminui a atividade clorinante da enzima *in vitro* e em células [20]. Contudo, este estudo demonstrou pela primeira vez que a interação entre INH e MPO prejudica a atividade bactericida tanto da enzima purificada quanto de neutrófilos, considerando que a atividade micobactericida deste último se deve quase que exclusivamente aos mecanismos oxidativos. Além disso, o fato da INH reagir mais rapidamente com a MPO ($k = 1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) do que com o seu alvo primário, a catalase-peroxidase bacteriana ($k = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), explicaria o rápido consumo pela hemeperoxidase de neutrófilos e, conseqüentemente, o comprometimento na síntese do HOCl [20].

Na oxidação da INH pela catalase-peroxidase, o radical de INH forma um aduto com NAD⁺, que interfere na atividade da enzima *trans*-2-enoil-ACP redutase, responsável pela síntese de ácidos micólicos [17,18]. Khan e colaboradores [19] também demonstraram que o produto de oxidação da INH pela MPO também é capaz de formar adutos com NAD⁺. Devido à similaridade estrutural entre NAD⁺ e NADP⁺, sugerimos que o radical de INH poderia também formar adutos com NADP⁺ e, eventualmente, reduzir a reciclagem de NADPH e a atividade da NADPH oxidase de neutrófilos. Nos estudos preliminares não observamos alterações da produção de O₂^{•-} de células ativadas na presença de INH utilizando o método de redução por citocromo C. Entretanto, reconhecemos as limitações do método desde que a redução do citocromo C pode ocorrer por outros redutores que não O₂^{•-} e, mais importante, o citocromo C pode ser reoxidado na presença de oxidantes e radicais gerados no ambiente inflamatório, subestimando o efeito estudado [43].

Conjuntamente, esses dados demonstraram que a reação entre MPO e INH prejudica a defesa imune aguda na infecção por micobactéria. A compreensão dos mecanismos

responsáveis pelas interações entre o organismo e fármacos, bem como a consequência disso, são fundamentais no ajuste de terapias atualmente utilizadas em infecções micobacterianas, bem como auxiliar no desenvolvimento de fármacos específicos e mais potentes para tuberculose.

3.2.5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao professor Dr. André Kipnis do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás pela concessão da cepa bacteriana utilizada neste estudo, à Me. Tássia Liz Lessa pelo auxílio nos experimentos de cinética e ao Me. Leonardo Silva Rocha pelo auxílio nos experimentos com células.

3,2,6 Fontes de financiamento

Este estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) (RED038/2014, BOL0133/2018), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (462401/2014-6), pela Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) (2013/07937-8) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) (Código de financiamento – 001).

REFERÊNCIAS

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017. Global Tuberculosis Report, 262 p.
- [2] CHURCHYARD, G.; KIM, P.; SHAH, NS.; RUSTOMJEE, R.; GANDHI, N.; MATHEMA, B.; DOWDY, D.; KASMAR, A. & CARDENAS, V. 2017. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, p. 629-635.
- [3] HOUBEN, RMH. & DODD, PJ. 2016. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *Plos Medicine*, v. 13, n. 10, p. 1-13.
- [4] KAUFMANN, SHE. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews*, v. 1, p. 20-30.
- [5] GUIRADO, E & SCHLESINGER, LS. 2013. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma – the critical battlefield in host immunity and disease. *Frontiers in Immunology*, v. 4, n. 98, p. 1-7.
- [6] DOMINGO-GONZALEZ, R.; PRINCE, O.; COOPER, A.; KHADER, S. 2016. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 5, p. 1-58.
- [7] SHALER, CR.; HORVATH, C.; LAI, R. & XING, Z. 2012. Understanding Delayed T-Cell Priming, Lung Recruitment, and Airway Luminal T-Cell Responses in Host Defense against Pulmonary Tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, p. 1-13.
- [8] PHILIPS, JA. & ERNST, JD. 2012. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annual Review of Pathology*, v. 7, p. 353-384.
- [9] EUM, SY.; KONG, JH.; HONG, MS.; LEE, YJ.; KIM, JH.; HWANG, SH.; CHO, SN.; VIA, LE. & BARRY, CE. 2010. Neutrophils Are the Predominant Infected Phagocytic Cells in the Airways of Patients With Active Pulmonary TB. *Chest Journal*, v. 137, p. 122-128.

- [10] HAMPTON, MB.; KETTLE, AJ & WINTERBOURN, CC. 1998. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood Journal*, v. 92, n. 9, p. 3007-3017.
- [11] WINTERBOURN, CC.; KETTLE, AJ.; HAMPTON, MB. 2016. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annual Review Biochemistry*, v. 14, n. 21, p. 15.1-15.28.
- [12] MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. 2019. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil, 366 p.
- [13] GOUREVITCH, MC.; HARTEL, D.; SELWYN, PA.; SCHOENBAUM, EE. & KLEIN, RS. 1999. Effectiveness of isoniazida chemoprophylaxis for HIV-infected drug users at risk for active tuberculosis. *AIDS*, v. 13, p. 2069-2074.
- [14] BUDHA, NR.; LEE, RE. & MEIBOHM, B. 2008. Biopharmaceutics, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antituberculosis Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 8, p. 809-825.
- [15] SLAYDEN, RA.; LEE, RE; & BARRY, CE. 2000. Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, v. 38, n. 3, p. 514-525.
- [16] TIMMINS, GS.; MASTER, S.; RUSNAK, S. & DERETIC, V. 2004. Nitric Oxide Generated from Isoniazid Activation by KatG: Source of Nitric Oxide and Activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 8, p. 3006-3009.
- [17] JOHNSON, K. & SHULTZ, PG. 1994. Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid by the Catalase Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. v. 116, p. 7425-7426.
- [18] ROZWARSKI, DA.; GRANT, GA.; BARTON, DHR.; JACOBS, WR. & SACCHETTINI, JC. 1998. Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, v. 279, p. 98-102.

- [19] KHAN, SR.; MORGAN, AGM.; MICHAIL, K.; SRIVASTAVA, N.; WHITALL, RM.; ALJUHAN, N. & SIRAKI, AG. 2016. Metabolism of isoniazid by neutrophil myeloperoxidase leads to isoniazid-NAD⁺ adduct formation: A comparison of the reactivity of isoniazid with its known human metabolites. *Biochemical Pharmacology*, v. 106, p. 46-55.
- [20] FORBES, LV.; FURTMULLER, PG.; KHALILOVA, I.; TURNER, F.; OBINGER, C. & KETTLE, AJ. 2012. Isoniazid as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: Identification of amine adducts and the influence of superoxide dismutase on their formation. *Biochemical Pharmacology*, v. 84, p. 949-960.
- [21] MENG, X.; MAGGS, JL.; USUI, T.; WHITAKER, P.; FRENCH, NS.; NAISBITT, DJ. & PARK, BK. 2015. Auto-oxidation of Isoniazid Leads to Isonicotinic-Lysine Adducts on Human Serum Albumin. *Chemical Research in Toxicology*, v. 28, p. 51-58.
- [22] HOFSTRA, AH.; LI-MULLER, SMA. & UETRECHT, JP. 1992. Metabolism Of Isoniazid By Activated Leukocytes: Possible Role in Drug-Induced Lupus. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 20, n. 2, p. 205-210.
- [23] MORRIS, JC. 1966. The acid ionization constant of HClO from 5 to 35°. *Journal of Physical Chemistry*, v. 70, p. 3798-805.
- [24] AKINOLA, RO.; MAZANDU, GK. & MULDER, NJ. 2013. A Systems Level Comparison of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium smegmatis* Based on Functional Interaction Network Analysis. *Journal of Bacteriology and Parasitology*, v. 4, n. 4, p. 1-11.
- [25] MCBEE, ME.; CHIONH, YH.; SHARAF, ML.; HO, P.; CAL, MWL.; DEDON, PC. 2017. Production of Superoxide in Bacteria Is Stress- and Cell State-Dependent: A Gating-Optimized Flow Cytometry Method that Minimizes ROS Measurement Artifacts with Fluorescent Dyes. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1-17.
- [26] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI, 88 p.

- [27] FOLKES, LK.; CANDEIAS, LP.; WARDMAN, P. 1995. Kinetics and Mechanisms of Hypochlorous Acid Reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 323, p. 120-126.
- [28] STORKEY, C.; PATTISON, DI.; WHITE, JM.; SCHIESSER, CH.; DAVIES, MJ. 2012. Preventing Protein Oxidation with Sugars: Scavenging of Hypohalous Acids by 5-Selenopyranose and 4-Selenofuranose Derivatives. *Chemical Research in Toxicology*, v. 25, p. 2589-2599.
- [29] ENGLISH, D. & ANDERSEN, BR. 1974. Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of ficoll-hypaque. *Journal of Immunological Methods*, v. 5, p. 249-252.
- [30] STROBER, W. 2001. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, v. 21, p. A.3B.1-A.3B.2.
- [31] KETTLE, AJ.; GEDYE, CA.; WINTERBOURN, CC. 1997. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. *Biochemical Journal*, v. 321, p. 503-508.
- [32] QUEIROZ, RF.; JORDÃO, AK.; CUNHA, AC.; FERREIRA, VF.; BRIGAGÃO, MRPL.; MALVEZZI, A.; DO AMARAL, AT.; AUGUSTO, O. 2012. Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 53, p. 1942-1953.
- [33] XIMENES, VF.; KANEGAE, MPP.; RISSATO, SR., GALHIANE, MS. 2007. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 457, n. 1, p. 134-141.
- [34] TREVELIN, SC.; SANTOS, CX.; FERREIRA, RG.; LIMA, L.; SILVA, RL.; SCAVONE, C.; CURI, R.; ALVES-FILHO, JC.; CUNHA, TM.; ROXO-JÚNIOR, P.; CERVI, MC.; LAURINDO, FRM.; HOTHERSALL, JS.; COBB, AM.; ZHANG, M.; IVETIC, A.; SHAH, AM.; LOPES, L.R.; CUNHA, RQ. 2016. Apocynin and Nox2 regulate NF- κ B by modifying thioredoxin-1 redoxstate. *Scientific Reports*, v. 6, n. 34581, p. 1-12.

- [35] CORLEIS, B.; KORBEL, D.; WILSON, R.; BYLUND, J.; CHEE, R. & SCHAIBLE, UE. 2012. Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. *Cellular Microbiology*, v. 14, n. 7, p. 1109-1121.
- [36] PICK, E. & MIZEL, D. 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methods*, v. 46, p. 211-226.
- [37] KLEBANOFF, SJ. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, n. 5, p. 598-625.
- [38] SILVA, JL.; MESQUITA, ARC.; XIMENES, EA. 2009. In vitro synergic effect of β -lapachone and isoniazid on the growth of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 4, p. 580-582.
- [39] ANDREU, N.; FLETCHER, T.; KRISHNAN, N.; WILES, S.; ROBERTSON, BD. 2012. Rapid measurement of antituberculosis drug activity *in vitro* and in macrophages using bioluminescence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 404-414.
- [40] GUPTA, AK.; CHAUHAN, DS.; SRIVASTAVA, K.; DAS, R.; BATRA, S.; MITTAL, M.; GOSWAMI, P.; SINGHAL, M.; SHARMA, VD.; VENKATESAN, K.; HASNAIN, SE.; KATOCH, VM. 2006. Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria. *The Journal of Communicable Diseases*, v. 38, n. 3, p. 246-254.
- [41] STORKEY, C.; DAVIES, MJ.; PATTISON, DI. 2014. Reevaluation of the rate constants for the reaction of hypochlorous acid (HOCl) with cysteine, methionine, and peptide derivatives using a new competition kinetic approach. *Free Radicals Biology and Medicine*, v. 73, n. 1, p. 60-66.
- [42] WERMUTH, CG.; GANELLIN, CR.; LINDBERG, P.; MITSCHER, LA. 1998. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, n. 5, p. 1129-1143.

[43] TARPEY, MM. & FRIDOVICH, I. 2001. Methods of Detection of Vascular Reactive Species Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite. *Circulation Research*, v. 89, n. 3, p. 224-236.