

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

# GENÉTICA

### AValiação DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE HIDRAZINAS ANÁLOGAS A ISONIAZIDA

1Mariana Marques da Costa Lima (IC-UNIRIO); 2Frederico S. Castelo Branco (Doutorado-Fiocruz); 2Alcione S. Carvalho; 2Nubia Boechat; 3Israel Felzenszwalb; 1,3Carlos Fernando Araujo Lima (Mestrado-FAPERJ, co-orientador); 1Claudia Alessandra Fortes Aiub (Orientador acadêmico)

1- Departamento de Genética e Biologia Molecular, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2- Departamento de Síntese Orgânica, FarManguinhos, Fundação Oswaldo Cruz.

3- Departamento de Biofísica e Biometria, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio Financeiro: UNIRIO, CNPQ, Fiocruz, FAPERJ, UERJ.

Palavra Chave: Isoniazida; tuberculose; mutagenicidade.

### INTRODUÇÃO

A tuberculose humana é uma infecção causada por algumas micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, incluindo o *M. bovis*, *M. africanum* e principalmente o *M. tuberculosis*. Descoberta por Robert Koch no final do século XIX, a tuberculose já era conhecida por incontáveis mortes em tempos medievais europeus como peste branca. No Brasil, acredita-se que esta doença tenha dizimado tribos indígenas, após ter sido introduzida pelo contato com os jesuítas europeus (Tabulsi e Alterthum, 2004). Atualmente, a tuberculose é um problema de saúde prioritário no Brasil, e juntamente com outros 21 países em desenvolvimento, alberga 80% dos casos mundiais da doença. Estima-se que, cerca de um terço da população mundial, esteja infectada com o *Mycobacterium tuberculosis*, estando sob risco de desenvolver a enfermidade. Em torno de oito milhões de casos novos e quase 3 milhões de mortes por tuberculose, ocorrem anualmente (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2013). O bacilo da tuberculose é transmitido por contato inter pessoal, sendo o ar o principal veículo e tendo como fonte um indivíduo multibacilar (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2009). A tosse persistente e produtiva, característica da doença, é produto da resposta inflamatória gerada pela fagocitose dos bacilos por macrófagos alveolares. Se não controlada a infecção, pode ocorrer necrose e lesão de brônquios, gerando cavidades no pulmão. A tuberculose extra- pulmonar, ocorre em 15% dos pacientes, devido a evolução do granuloma, pelo crescimento excessivo das bactérias e pode atingir pleura, linfonodos, fígado, baço, ossos, articulações, coração, peritônio, pele e cérebro (Tabulsi e Alterthum, 2004). Um rápido e preciso diagnóstico diminui significativamente os números de indivíduos multibacilares e de casos extra pulmonares. (Alcaide e Coll, 2011). O tratamento da TB é baseado em quimioterapia e visa eliminar o foco da infecção, interrompendo a cadeia de transmissão. A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os meios para evitar a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos. O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde, consistia na associação de rifampicina, isoniazida e pirazinamida e, se houvesse falência desses esquemas, utilizava-se a associação de estreptomicina, pirazinamida, etambutol e etionamida. O período longo de utilização e os efeitos colaterais gerados na utilização destes medicamentos levou a elevada taxa de abandono ao tratamento. Mesmo com o novo esquema constituído com doses únicas e assistidas por agente de saúde, os efeitos colaterais persistem (Wildner, L. et AL, 2011). Além do grande abandono de tratamento, o elevado número de pacientes HIV positivo, atribuem ao tratamento um desafio significativo, principalmente quando ocorre co-infecção com o vírus (Alcaide e Santín, 2007). Pacientes imunodeprimidos não são capazes de produzir uma resposta imune adequada, favorecendo a disseminação da bactéria. Ainda sim, existe um problema crítico no tratamento/ combate da doença: o aparecimento de cepas resistentes. Estima-se que, cerca de um terço da população mundial, esteja infectada com o bacilo, inclusive com formas multirresistentes (MDR) e extremamente resistentes (XDR) da doença (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2013). Para estas o diagnóstico diferencial se dá pelo Testes de Sensibilidade aos medicamentos anti-TB (TSA) e necessita de elevado investimento na montagem. Visando diminuir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia do fármaco, foram desenvolvidos análogos desta hidrazina derivada do ácido isonicotínico. Os análogos tem a mesma ação da isoniazida: necessitam serem ativados pela enzima catalase/peroxidase do *M. tuberculosis*, produzindo radicais reativos de oxigênio e radicais orgânicos que inibem a formação de ácido micólico da parede celular, causando erros na síntese do DNA e levando à morte do micro-organismo (Arbex et al., 2010). A avaliação segura de novos compostos químicos com a possibilidade de induzir mutações se tornaram um importante procedimento, principalmente quando envolvem substâncias que possam se tornar hábeis ao uso humano. Testes bacterianos de avaliação da mutagenicidade e da genotoxicidade têm desempenhado um importante papel nesta identificação, seja pela sua simplicidade, rapidez e baixo custo quanto pela reconhecida capacidade de detectar um amplo leque de componentes mutagênicos. Além disto, há uma grande associação entre um agente ser mutagênico e genotóxico para bactéria e carcinogênico para mamíferos, com uma correlação estimada em 83%. Por estes motivos, os testes bacterianos são reconhecidos na comunidade científica e institutos internacionais de regulamentação e aprovação de novos compostos, sendo utilizados largamente como uma avaliação inicial para determinar a mutagenicidade de agentes químicos (Mortelmans & Zeiger, 2000).

### OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o potencial mutagênico e citotóxico de um análogo de isoniazida: BTI026, visando relacionar sua atividade tuberculostática com sua possível toxicidade, na tentativa de desenvolver novos fármacos menos tóxicos e mais eficientes na terapêutica para tuberculose.

### METODOLOGIA

Para os experimentos, foi realizado o ensaio Salmonella/Microsoma (Ensaio de Ames), onde incubou-se, em tubos de ensaio, 100 µL das cepas TA97, TA98, TA100, TA 102 e TA1535 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium com 100µl com cinco diferentes concentrações da amostra teste (50; 100; 500;

### 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

1000; 5000  $\mu$ M), diluídas em dimetil sulfoxido (DMSO), e também 500  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,2M ou 500 $\mu$ L de fração metabólica (S9 mix, 4%). Após 20 minutos, foram adicionados a cada tubo, 2 mL de ágar de superfície enriquecido com solução de histidina/biotina 0,5mM, numa proporção de 10:1, pH 7,4, 45°C, e as misturas finais foram vertidas em placas de Petri de Ágar Vogel-Bonner. Estas foram incubadas a 37°C, durante 72 h, e as colônias His+ revertentes foram contadas. O índice de mutagenicidade foi calculado pelo valor médio obtido a partir de cada concentração, dividido pelo valor médio do controle negativo (DMSO, 5%). Para determinar o potencial citotóxico, 10 $\mu$ L da mistura pós incubação foi diluída em 0,9% de NaCl (w/v). Esta suspensão final, após diluição seriada, continha  $2 \times 10^3$  células/ml. Uma alíquota de 100 $\mu$ L desta suspensão foi plaqueada em ágar nutriente definido, resultando num número final estimado de  $2 \times 10^2$  bactérias/placa. As placas foram, então, incubadas a 37°C durante 24h e porcentagens de sobrevivência foram calculadas em comparação com o grupo controle negativo (Maron & Ames, 1983; OECD, 1997).

#### RESULTADOS

Dentre os ensaios realizados observou-se citotoxicidade apenas em ensaios sem metabolização e na maior concentração das amostras nas cepas TA97, TA98 e TA102. O resultado positivo na avaliação do potencial citotóxico se dá pelo valor percentual de sobrevivência menor do que 70% em relação às placas do controle (Mortelmans e Zeiger, 2000; Maron & Ames, 1983). Na última cepa mencionada (TA102), observou-se este potencial sendo expresso fortemente, o que pode mascarar o potencial mutagênico. Apesar disso, ainda sobre a TA102, com resultados negativos de citotoxicidade e mutagenicidade na presença de metabolização exógena, possivelmente os metabólitos gerados não possuem caráter oxidativos, característica rastreada por esta linhagem (Maron & Ames, 1983). Observou-se mutagenicidade com as linhagens TA98 e TA1535, ambas frente à maior concentração. A mutagenicidade é obtida por um índice, representando a relação entre o número de revertentes nas placas tratadas com o análogo em diferentes concentrações e nas placas do controle negativo (Mortelmans e Zeiger, 2000; Maron & Ames, 1983). O fenótipo his+ na linhagem TA98 na presença de metabolização exógena ocorreu por deleção de um ou dois pares de bases da sequência de DNA repetitivo ou, pela adição de um par de base (Maron & Ames, 1983). Apesar de ter gerado tal resultado não se pode afirmar que haja geração expressiva de metabólito mutagênico, mas pode-se investigar a presença de nitrocompostos, já que esta linhagem possui tal característica (Maron & Ames, 1983). Na cepa 1535 a reversão foi gerada na ausência de metabolização exógena por substituição de pares de base. Tal linhagem é comparativamente similar a TA100, que também é utilizada em estudos de rastreio de nitrocompostos. Apesar disso a linhagem TA100 diante das concentrações usadas foi a única linhagem que não apresentou citotoxicidade, tampouco mutagenicidade, na presença ou ausência da fração metabólica. Apesar disso, observamos uma brusca queda na porcentagem de sobrevivência entre as duas últimas concentrações teste, o que de certa maneira corrobora os achados com as linhagens TA98 e TA1535.

#### CONCLUSÃO

O BTI026 pode ser considerado uma promissora droga no tratamento antituberculose, apresentando efeito mutagênico e citotóxico apenas nas maiores concentrações testadas. Dessa forma, podemos concluir que doses menores a 5000 $\mu$ M são seguras nas condições testadas. A partir desse ensaio, outros complementares devem ser realizados, tanto in vitro como in vivo, afim de determinar a segurança desse novo análogo (OECD, 1997).

#### REFERÊNCIAS

- ALCAIDE, F. e COLL, P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance, *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(Supl 1):34-40, 2011.
- ALCAIDE, F. e SANTÍN, M. Tuberculosis multirresistente, *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26 Supl 13:54-60, 2007.
- ARBEX, M.A. et al. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. *J. Bras. Pneumol. Araraquara - SP*, v.36, n.5, p.626-640, 2010.
- Global Tuberculosis Report, 2013
- MARON, D. M. & AMES, B. N. *Mutat. Res.* 1983 v.113, p. 173-215.
- MORTELMANS K., ZEIGER E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Vol. 455, Issues 1–2, 20 November 2000, Pages 29–60, 2000.
- OECD. Guideline 471 for testing chemicals by Bacterial Reverse Mutation Test, 1997.
- TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. *Microbiologia Médica - 4ª Edição*. Atheneu, 2004.
- WILDER, L. ET AL. Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico, *Revista de Patologia Tropical* Vol. 40 (3): 207-229. jul.-set. 2011.