**EXPRESSÃO DO GENE *tap* DE *Mycobacterium fortuitum* E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS**

**SCAINI, João Luís Rheingantz**

**FAGUNDES, Michel Quevedo**

**VON GROLL, Andrea**

**SILVA, Pedro Eduardo Almeida**

**jlrscaini@yahoo.com.br**

**Evento: Mostra de Produção Universitária - FURG**

**Área do conhecimento: Ciências Biológicas – Microbiologia Médica**

**Palavras-chave: Bomba de efluxo, Micobactéria, Resistência**

1 INTRODUÇÃO

Em 2011, 6,2 milhões de casos de tuberculose (TB) foram notificados e relatados para a Organização Mundial da Saúde por centros nacionais de controle de TB. Foram estimados aproximadamente 310.000 casos de TB resistente á múltiplas drogas (MDR). A emergência de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* MDR é um obstáculo ao controle da TB (WHO, 2012). A resistência a múltiplos fármacos é um fenótipo que pode ser causado pelo efluxo, a extrusão de compostos por proteínas transportadoras, chamadas de bombas de efluxo, localizadas nas membranas plasmáticas de todos os tipos de células (WALMSLEY et al., 2003). A bomba de efluxo Tap de *M. fortuitum* confere resistência de baixo nível a tetraciclina e a aminoglicosídeos e apresenta similaridade de aminoácidos de 83% com a bomba de efluxo de Rv1258c de *M. tuberculosis* que tem sido relacionado com resistência a drogas em isolados clínicos (AÍNSA et al., 1998; RAMÓN-GARCIA et al., 2012). Neste trabalho foi avaliada a relação do gene *tap* de *M. fortuitum* clonado num plasmídeo multicopia e transformado em uma cepa de *M. smegmatis* com o perfil de resistência à tetraciclina e aminoglicosídeos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Um fragmento contendo o gene *tap* de *M. fortuitum* (2.3 kb) foi amplificado através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com os primers *tap 4* e *tap 6*. Posteriormente, este fragmento foi digerido com PstI e clonado no vetor pSUM36, um vetor que apresenta resistência a canamicina como indicador (Aínsa et al., 1996). Essa construção foi transformada por eletroporação em *M. smegmatis* mc²155, resultando na cepa PAZ 9. O vetor pSUM36 isolado também foi transformado por eletroporação em *M. smegmatis* mc²155, resultando na cepa PAZ 100, utilizada como controle por conter somente o plasmídeo pSUM 36 sem o gene *tap*.

Para determinar a influência do gene *tap* na resistência foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) das cepas frente a tetraciclina e aminoglicosideos (amicacina, higromicina B e estreptomicina) realizando o Resazurin Multititer Assay (REMA) (Martín e Palomino, 2012).

**3 RESULTADOS e DISCUSSÃO**

Tabela 1 – Concentração mínima inibitória das cepas testadas

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Antibióticos | mc²155 | PAZ100 | PAZ9 |
| Tetraciclina | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Estreptomicina | 0,062 | 0,25 | 0,062 |
| Amicacina | 0,125 | 4 | 8 |
| Higromicina | 16 | 16 | 16 |

 As concentrações estão apresentadas em mg/ml.

 Considerando a característica da bomba Tap de apresentar resistência à tetraciclina e aminoglicosídeos, era esperada uma CMI maior da PAZ9 que das outras duas cepas frente a estes antibióticos, o que só ocorreu com a amicacina. Levando em conta que as bombas de efluxo são proteínas transportadoras com muitas afinidades, e que sua função fisiológica ainda não é totalmente conhecida, diversos fatores envolvendo as condições de cultivo e os fatores do meio podem ter influenciado no resultado.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

 Estudos futuros devem ser feitos analisando a influência de alterações do meio sobre a atividade da bomba Tap de forma que se obtenha uma maior compreensão sobre a fisiologia desta bomba de efluxo.

5 REFERÊNCIAS

Aínsa, J.A.; Martín, C.; Cabeza, M.; De la Cruz, F.; Mendiola, M.V. Construction of a family of *Mycobacterium*/*Escherichia coli* shuttle vectors derived from pAL5000 and pACYC184: their use for cloning an antibiotic-resistance gene from Mycobacterium fortuitum. **Gene**, v.176, p.23 - 26. 1996

Aínsa, J.A.; Blokpoel, M.C.J.; Otal, I.; Young, D.B.; De Smet, K.A.L.; Martín, C. Molecular Cloning and Characterization of Tap, a Putative Multidrug Efflux Pump Present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.5836–5843. 1998

Martin, A.; Palomino, J.C. Drug susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis - Procedure Manual, v.6, 17p. 2012

Ramón-García, S.; Mick, V.; Dainese, E.; Martín, C.; Thompson, C.J.; De Rossi, E.; Manganelli, R.; Aínsa J.A. Functional and Genetic Characterization of the Tap Efflux Pump *in Mycobacterium bovis* BCG. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.2074–2083. 2012

Walmsley, M.I.B.; McKeegan, K.S.; Walmsley, A.R. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. **Biochemical Journal**, v.376, p.313-338. 2003

WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Report, 89p. 2012