SAIR MAXIMO CHAVEZ PACHECO

Estudo da resistência à isoniazida em *Mycobacterium tuberculosis*: uma caracterização estrutural e biofísica de mutações *missense* no gene *inhA* identificados a partir de isolados clínicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o Programa.

São Paulo
2017

RESUMO

PACHECO, S.M.C. **Estudo da resistência à isoniazida em *Mycobacterium tuberculosis*: uma caracterização estrutural e biofísica de mutações *missense* no gene *inhA* identificados a partir de isolados clínicos.** 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A tuberculose, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, ainda é uma emergência de saúde pública global. O surgimento das cepas multirresistentes (MDR) e das cepas extensivamente resistentes (XDR) agravam a situação, diminuindo o número de fármacos disponíveis para o tratamento. Embora a isoniazida seja uma das primeiras moléculas introduzidas no tratamento da tuberculose, diferentes mecanismos de resistência têm sido propostos e o tema ainda não foi totalmente esclarecido. Neste trabalho foi realizada a caracterização estrutural e biofísica de 7 mutantes da proteína InhA identificadas a partir de isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida. Os ensaios de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) mostram diminuições nos valores da constante de dissociação (K_d) dos mutantes para os NADH em aproximadamente cinco vezes quando comparado com a proteína selvagem. As estruturas cristalográficas dos mutantes de InhA mostram novas moléculas de água que parecem estar envolvidas nas variações entrópicas e entálpicas observadas em dados calorimétricos. Estes resultados corroboram e sugerem que a diminuição na afinidade pelo NADH e a desestabilização do tetrâmero de InhA podem ser fenômenos associados a resistência à isoniazida.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*. Isoniazida. Resistência antimicrobiana. InhA.

ABSTRACT

PACHECO, S.M.C. **Study of resistance to isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*: structural and biophysical characterization of missense mutations of the *inhA* gene identified in resistant clinical isolates.** 2017. 84 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Tuberculosis, caused by the infection of *Mycobacterium tuberculosis*, still remains as a global health emergency. The emergence of multidrug-resistant strains (MDR) and extensively drug-resistant strains (XDR) strains further aggravates the crisis, reducing the limited number of drugs available for the treatment of the disease. Even though isoniazid was one of the first drugs introduced in the antitubercular therapy, many resistance mechanisms were proposed and the subject is still not clear. In this work, a structural and biophysical characterization of seven mutant InhA proteins identified in clinical *M. tuberculosis* strains resistant to isoniazid were performed. Isothermal titration calorimetry (ITC) assays showed a decrease in the dissociation constant (K_d) values of the InhA mutants by up to almost five-fold when compared to the wild-type protein. Crystallographic structures of InhA mutants showed new water molecules that appear to be involved in the entropic and enthalpic variations described by the thermodynamic assays. These results corroborate and suggest that the decrease in affinity for NADH and the destabilization of the InhA tetramer may be the phenomena associated to isoniazid resistance.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. Isoniazid. Drug resistance. InhA.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose: Implicâncias e epidemiologia

O processo de globalização que temos experimentado nos últimos anos gerou mudanças demográficas, populacionais e ambientais que permitiram o desenvolvimento humano a uma velocidade sem precedentes. Mas estas mesmas condições favoreceram o surgimento e ressurgimento de doenças infecciosas, as quais já se tornaram desafios críticos para a saúde pública mundial. O conceito de doenças infecciosas emergentes e reemergentes incluem aquelas doenças resultantes de infecções de patógenos desconhecidos, patógenos conhecidos que estão se expandindo em novas áreas e patógenos conhecidos que estão reemergindo como resultado do desenvolvimento de resistência a antibióticos e a falha das medidas de saúde pública para enfrentá-los (MACKEY, et al., 2014).

A tuberculose (TB) tem existido por milênios e ainda hoje representa um grande problema de saúde pública global. Ela acomete aproximadamente 10 milhões de pessoas cada ano, sendo assim a nona principal causa de morte a nível mundial. *Mycobacterium tuberculosis*, o principal agente causador da tuberculose é o patógeno bacteriano mais mortal e a principal causa de morte produzida por um único agente infeccioso nos últimos 5 anos, ficando acima do HIV/AIDS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017b). A infecção causada por TB afeta principalmente os pulmões, mas também pode afetar outras áreas do corpo. TB é geralmente disseminada por via aérea quando um paciente infectado que desenvolveu a doença tosse e libera bactérias em gotículas de saliva ao exterior (WHO, 2015). Em geral, só uma pequena proporção (5-15%) das estimadas 1,7 bilhões de pessoas infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* irão desenvolver a doença durante o transcurso das suas vidas, isso devido a eficiente atuação do sistema imune. No entanto, devido ao comprometimento da imunidade, a probabilidade de desenvolver a TB é maior entre as pessoas infectadas com HIV, e também é alta entre pessoas afetadas por fatores de risco tais como a pobreza, falta de saneamento, desnutrição, diabetes, tabaquismo e consumo de álcool (WHO, 2017b).

Sem tratamento, a taxa de mortalidade da TB é preocupantemente alta. Estudos da história natural da doença em ausência de tratamento feitos antes do estabelecimento das terapias mostraram que 70% dos pacientes com diagnóstico positivo por baciloscopia morreram depois de 10 anos de terem sido diagnosticados, assim como, 20% de pacientes com baciloscopia negativa, mas que deram positivo para o diagnóstico por cultura (TIEMERSMA

et al., 2011). Apesar deste fato, a doença é curável quando é diagnosticada precocemente e quando realizado o tratamento adequado, de modo que a maior parte dos pacientes com TB podem ser curados. Milhões de pessoas são diagnosticadas e tratadas com sucesso anualmente, na qual tem sido salvas 53 milhões de pessoas nos últimos 16 anos. No entanto ainda há várias falências na detecção e no tratamento, principalmente nas áreas mais pobres do mundo, como países do continente africano e asiático (WHO, 2017b).

M. tuberculosis tem coevoluído conosco e tem-se adaptado não só aos nossos mecanismos de defesa, mas também aos agentes quimioterápicos usados para erradicá-lo. Atualmente, as opções para o tratamento da TB são muito restritas: embora tenham centenas de antimicrobianos disponíveis, só alguns deles são efetivos na terapia (NGUYEN; PIETERS, 2009). O tratamento recomendado mais atual para a TB sensível consiste num regime diário durante meio ano dos fármacos de primeira linha em combinação, sendo eles: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida (Figura 1). Esse tratamento tem uma taxa de sucesso para pelo menos 85% dos casos (WHO, 2010, 2017a, 2017b). A limitada quantidade de fármacos efetivos, os longos períodos de tratamento e a baixa aderência do paciente levaram à exposição da bactéria a concentrações subinibitórias, o que favoreceu a geração de cepas mutantes que adquiriram resistência (WOLFF; NGUYEN, 2012).

Figura 1- Fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose e as suas estruturas.

Como resultado, cepas multirresistentes (MDR-TB) e extensivamente resistentes (XDR-TB) aos medicamentos em uso emergiram e ainda estão emergindo. MDR-TB é definida como uma cepa resistente a isoniazida e rifampicina, e XDR-TB, apesar de ter as resistências características da MDR-TB, possui resistências adicionais para pelo menos um dos fármacos de segunda linha pertencentes a cada um dos dois principais grupos de medicamentos na terapia da MDR-TB: fluoroquinolonas e agentes injetáveis (amicacina, capreomicina, canamicina e estreptomicina). Os fármacos de segunda linha caracterizam-se por apresentar menor eficácia e maior toxicidade em comparação com os de primeira linha. Este grupo também compreende moléculas como etionamida, cicloserina, linezolida, ácido *p*-aminosalicílico, bedaquilina, entre outros. (Figura 2) (GOPAL; DICK, 2014; WHO, 2016, 2017b; WOLFF; NGUYEN, 2012).

Figura 2- Exemplos de fármacos de segunda linha no tratamento da tuberculose.

O tratamento clássico das cepas resistentes requer períodos de pelo menos 20 meses e o uso dos fármacos de segunda linha. Os últimos comunicativos da OMS mostraram que o sucesso do tratamento da MDR-TB a nível global tem uma taxa de 54%, o que reflete a baixa taxa de aderência terapêutica, a falta de avaliação dos resultados terapêuticos, a falta do seguimento terapêutico e, conseqüentemente, o fracasso do tratamento. Devido a isso, em maio de 2016, a OMS começou a recomendar um novo esquema de tratamento mais curto de 9-12 meses para pacientes com infecção pulmonar produzida por MDR-TB e cepas resistentes a rifampicina que não são resistentes aos fármacos de segunda linha. Até junho de 2017, pelo menos 35 países têm implementado esse novo regime para o tratamento da MDR-TB. Além disso, até a referida data, como parte dos esforços para reforçar o arsenal terapêutico contra a MDR-TB e a XDR-TB, 89 países introduziram a bedaquilina na terapia e 54 fizeram o mesmo

com a delamanida, os primeiros novos medicamentos introduzidos na terapia depois de um hiato de mais de 50 anos sem moléculas novas, os quais foram aprovados em 2012 e 2014, respectivamente (WHO, 2017b).

A pesar dos esforços e as medidas tomadas, as estatísticas da TB em 2016 ainda são alarmantes. No mundo estima-se que a TB cobrou a vida de 1,3 milhões de pacientes HIV-negativos, 374 000 pacientes com coinfeção com HIV e 240 000 pacientes infectados com MDR-TB e cepas resistentes a rifampicina. Com respeito a incidência, 10,4 milhões de pessoas contraíram a doença, dos quais 10% estavam infectados com HIV, e o número de novos casos de MDR-TB aumentou para 490 000. No mesmo ano, no Brasil, a TB foi responsável pela morte de 7,3 mil pacientes, dos quais 1,9 mil eram HIV-positivos. A taxa de incidência para esse mesmo ano foi de 87 mil novas infecções, das quais 11 mil foram coinfeções com HIV e 2,4 mil corresponderam a infecções por MDR-TB e cepas resistentes a rifampicina. As taxas de incidências globais são mostradas na Figura 3. (WHO, 2017b).

Figura 3- Mapa global da incidência de tuberculose no 2016.
Modificado de: WHO (2017b)

Neste contexto, a necessidade de novas alternativas e estratégias para combater a TB é urgente, assim como o entendimento do mecanismo de resistência aos fármacos já existentes. O conhecimento dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos permite, por exemplo, o planejamento de modificações na estrutura de moléculas que já são empregadas como fármacos na prática clínica e, desta forma, contornar esses próprios efeitos da resistência (WOLFF; NGUYEN, 2012).

1.2 Isoniazida

Na década de 1940, devido a maior parte dos antibióticos conhecidos serem ineficazes contra a TB, o tratamento se baseava num número limitado de moléculas, tais como a estreptomicina, o ácido *p*-aminosalicílico e as tiosemicarbazonas, as quais apresentavam problemas de toxicidade e o rápido surgimento de cepas resistentes (SCHATZ; WASKMAN, 1944). Em 1945, foi descoberto o efeito da vitamina B₃, a nicotinamida, em *Mycobacterium tuberculosis* (CHORINE, 1945). Baseando-se nesta informação, iniciou-se a busca de novos fármacos análogos à nicotinamida mais potentes, o que eventualmente levou a descoberta de um intermediário de síntese que mostrou uma atividade contra a TB sem precedentes em comparação a qualquer outro composto conhecido na época: a isoniazida (BERSTEIN et al., 1952).

A isoniazida (INH), ou hidrazida do ácido isonicotínico, é um dos fármacos mais efetivos, amplamente usados e econômicos na terapia contra a TB. Introduzida no arsenal terapêutico em 1952, atualmente é um dos fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose juntamente com a rifampicina, etambutol e a pirazinamida. INH possui uma estrutura simples constituída por um anel de piridina e um grupo hidrazida, sendo ambos essenciais para a sua atividade (Figura 4). Assim, análogos estruturais da INH como a hidrazida do ácido benzóico ou a hidrazida do ácido nicotínico são muito menos ativos, enquanto a isonicotinamida e o ácido isonicotínico são totalmente inativos (LABORDE et al., 2016). INH penetra em *Mycobacterium tuberculosis* por difusão facilitada através de porinas presentes na parede celular (BARDOU et al., 1998).

Figura 4- Estrutura química da isoniazida e de seus derivados.

Este fármaco é particularmente ativo nas micobactérias de crescimento lento (PANSY; STANDER; DONOVICK, 1952). As formas ativas de *M. tuberculosis* são muito sensíveis a INH (MIC entre 0,15 e 0,44 μM), enquanto *Mycobacterium smegmatis* é praticamente insensível (MIC de aproximadamente 230 μM). Esta diferença deve-se ao fato de que a enzima ativadora da INH em *M. smegmatis* não é idêntica à da *M. tuberculosis*, além de não possuir a mesma eficiência na atividade contra o alvo da isoniazida. Assim, a importância do passo de ativação na atividade de INH é evidente (ZHANG et al., 1992). INH mata exclusivamente bactérias em etapa de divisão e não foram observadas propriedades bactericidas em micobactérias em fase estacionária e em crescimento sobre condições anaeróbicas. (MITCHISON; SELKON, 1956). A INH é bacteriostática nas primeiras 24 horas e, depois deste período passa a ter ação bactericida (MIDDLEBROOK, 1952).

1.2.1 Mecanismo de ação

Diferentes estudos feitos por diferentes grupos de pesquisa ao redor do mundo demonstraram que, contrário à simplicidade da sua estrutura, a INH envolve diferentes mecanismos complexos que não podem ser totalmente explicados com a sua ação sobre um único alvo biológico (BERNARDES-GÉNISSON et al., 2013). Nos últimos 30 anos, foi possível um melhor entendimento do mecanismo de ação da INH graças aos avanços nas ferramentas genéticas em micobactérias, especialmente aquelas que possibilitaram o desenvolvimento de cepas de *M. smegmatis* capazes de receber plasmídeos por transformação, o que permitiu o estudo do envolvimento de mutações nos mecanismos de resistência (VILCHÈZE; JACOBS, 2007).

Atualmente, o mecanismo de ação descrito que tem maior aceitação é aquele proposto na década de 1990 que descreve a INH como um pró-fármaco que requer de uma reação de oxidação para ser ativado e assim poder exercer a sua atividade sobre a proteína InhA, seu alvo final. InhA é uma enoil-ACP redutase envolvida na biossíntese da parede celular em *Mycobacterium tuberculosis*, mais precisamente sobre a biossíntese de ácidos micólicos (LABORDE; DERAËVE; BERNARDES-GÉNISSON, 2017).

InhA é uma enzima essencial que forma parte do complexo FAS-II (*Fatty Acid Synthase II*, Ácido graxo sintase II), que tem como função a extensão sequencial dos ácidos graxos de cadeias de 15-18 carbonos sintetizados pelo complexo FAS-I para a produção de ácidos graxos de cadeias de 56 carbonos que vão ser usados como precursores na síntese de ácidos micólicos. Estas moléculas são longas cadeias de ácidos graxos α -alquila e β -hidroxila (com 70 a 90 carbonos de comprimento) que são característicos da parede celular de *M. tuberculosis* (MARRAKCHI; LANÉELLE; QUÉMARD, 2000). Dentro do complexo FAS-II, InhA tem como função a catálise da redução da ligação dupla *trans* conjugada ao grupo carbonila dos ácidos graxos que atuam como substratos usando o NADH como cofator, atuando como um doador de hidrogênio, tal como é mostrado na Figura 5 (DESSEN et al., 1995). A inibição da ação de InhA produz o bloqueio do alongamento das cadeias de ácido graxo e a consequente acumulação intracelular de ácidos graxos de cadeia longa levam finalmente a morte celular de *M. tuberculosis* (TAKAYAMA; WANG; DAVID, 1972).

Figura 5- Mecanismo da reação catalisada por InhA.
Adaptado de: Dessen (1995).

INH é ativada *in vivo* pela catalase-peroxidase KatG, produzindo um intermediário ativo, o radical isonicotinoil (Figura 6). Este radical se liga covalentemente ao cofator NADH, gerando o metabolito ativo, o aduto INH-NAD, com um único passo de redução que envolve a transferência de um único elétron (ROZWARSKI et al., 1998). INH-NAD é um inibidor de tipo *tight-binding* lento de InhA ($K_i = 0,75 \text{ nM}$) (RAWAT; WHITTY; TONGE, 2003). O esquema geral do mecanismo de ação de InhA é ilustrado na Figura 7. A estrutura do aduto INH-NAD em complexo com InhA foi confirmada como sendo a (4S)-cetocarboxamida-1,4-dihidropiridina por Rozwarski et al. (1998) por cristalografia de raios X. A oxidação *in vitro* usando um sistema biomimético com pirofosfato de manganês (III) como agente oxidante revelou a formação de diferentes formas de adutos INH-NAD (dihidropiridinas ou piridínio com estruturas abertas e cíclicas e com diferentes configurações) (NGUYEN et al., 2001). No entanto, unicamente a forma (4S)-cetocarbamida-1,4-dihidropiridina foi observada em complexo com InhA, além de demonstrar-se o inibidor mais eficiente do conjunto de adutos obtidos (CHOLLET et al., 2015; NGUYEN et al., 2002). Tem sido sugerido também que adutos INH-NAD(P) poderiam interagir com diferentes enzimas NAD(P) dependentes e estar envolvidas na inibição de uma ampla gama de processos celulares (ARGYROU; VETTING; BLANCHARD, 2007). Apesar destas hipóteses serem levantadas, ainda não se tem evidências pertinentes destes mecanismos *in vivo* (LABORDE; DERAEEVE; BERNARDES-GÉNISSON, 2017).

Figura 6- Ativação de INH por ação de KatG.
Adaptado de Laborde (2017)

Figura 7- Mecanismo de ação de INH.
Modificado de: Vilchèze (2007)

Entretanto, o mecanismo proposto acima é consistente com os relatos de mutações presentes em isolados clínicos resistentes a INH em *M. tuberculosis*, na qual 75-85% dos casos apresentam mutações nos genes *katG* ou *inhA* (HAZBÓN et al., 2006). Adicionalmente, transferindo mutações observadas em isolados clínicos no gene *inhA* (Ser94Ala) em micobactérias selvagens (*wild-type*), Vilchèze 2006 estabeleceu a InhA como alvo da isoniazida ao ter sucesso na conversão de cepas INH-sensíveis em cepas INH-resistentes (VILCHÈZE et al., 2006). Este resultado também sugere que a inibição de InhA por INH-NAD é o principal mecanismo de ação da INH. (LABORDE; DERA EVE; BERNARDES-GÉNISSON, 2017). No entanto, outros mecanismos também dependentes da etapa de ativação por oxidação foram propostos, como a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tóxicos que poderiam atuar como agentes oxidantes e causar perturbações no balance redox em *M. tuberculosis*, causando um deslocamento que favorece o acúmulo de radicais, produzindo danos celulares na bactéria (RICKMAN et al., 2012). A complexidade dos efeitos da INH, em conjunto com a resistência associada, reforça a ideia da existência de outros mecanismos de resistência complementares (BERNARDES-GÉNISSON et al., 2013).

1.2.2 Resistência à INH

A resistência à isoniazida foi relatada pela primeira vez em 1952, o mesmo ano em que foi introduzida na terapia (MIDDLEBROOK, 1952). A principal causa para a resistência à isoniazida em isolados clínicos de MDR-TB é uma mutação que codifica uma troca de aminoácidos na região codificante do gene *katG*, onde a proteína expressada tem uma serina substituída por uma treonina na posição 315 (Ser315Thr). Mesmo tendo se relatado mais de 16 mutações diferentes em isolados clínicos resistentes de *M. tuberculosis* neste gene, estas mutações mostram-se responsáveis pela resistência à INH em aproximadamente 42-80% dos isolados de cepas MDR-TB (HAZBÓN et al., 2006).

A mutação Ser315Thr em KatG, além de aumentar o MIC da INH em 200 vezes, aparece com maior frequência em cepas MDR-TB do que em cepas com monoresistência à INH. Nestas últimas, a mutação mais comum está localizada na região promotora do gene *inhA* (HAZBÓN et al., 2006). A mutação Ser315Thr diminui a eficiência da atividade catalase-peroxidase da enzima KatG e, consequentemente, da ativação da INH (WENGENACK et al., 1997). Acredita-se que a diminuição na ativação da INH pode ser explicada por modificações estruturais que estreitam o canal de acesso ao grupo heme na enzima ou por perturbações na transferência de elétrons devido a alterações no ciclo catalítico da KatG ou simplesmente por modificações no sítio de ligação da INH (DEEMAGARN et al., 2005; GHILADI et al., 2004). Também foi observado que mutações associadas a um alto nível de resistência à INH geralmente caracterizam-se por sofrer uma diminuição drástica na atividade catalase e na ativação de INH (BROSSIER et al., 2016).

Entretanto, a segunda mutação mais comum ocorre na região promotora do gene *inhA* (C-15T) que causa uma superexpressão, aumentando a quantidade de mRNA 20 vezes em comparação com cepas selvagens e aumentando assim a resistência à INH em pelo menos 8 vezes (VILCHÈZE et al., 2006). Outras mutações que aparecem com menor frequência são aquelas que afetam o sítio ativo de InhA, produzindo uma diminuição na afinidade pelo cofator NADH e também pelo aduto INH-NAD (DESSEN et al., 1995; DIAS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006). Como consequência desta diminuição da afinidade pelo NADH, a taxa de renovação da enzima é alterada, fazendo que tanto o NADH quanto INH-NAD fiquem ligados à enzima por um tempo menor e comprometendo a capacidade da enzima para manter-se ligada ao substrato, fato evidenciado pelo *turnover* mais rápido para finalmente deslocar o equilíbrio da transição constante entre InhA livre e InhA ligada ao NADH em direção à

formação da forma livre. Assim, a proporção de InhA livre em relação ao pool total de enzima da bactéria e a renovação tanto de NADH quanto de INH-NAD seria maior nos mutantes em comparação com a cepa selvagem, permitindo a compensação do efeito inibidor do aduto sacrificando parte da própria atividade enzimática.

Além disso, mutações no gene *mabA* causaram a supereexpressão de InhA por *upregulation*, gerando uma região promotora alternativa para *inhA* (ANDO et al., 2014). Embora estas mutações não têm implicações na ativação de INH, mutações *missense* de InhA produzem também coresistência à etionamida (ETH), um fármaco de segunda linha que também é um análogo estrutural da INH que, após ser bioativado pela enzima EthA, também vai atuar como inibidor de InhA (Figura 8) (BANERJEE et al., 1994). Conjuntamente, as mutações em *katG* e *inhA* são responsáveis por 75-85% do fenótipo de resistência à INH em isolados clínicos de *M. tuberculosis* (RAMASWAMY; MUSSER, 1998).

Figura 8- Estrutura de INH e ETH e seu mecanismo de ação sobre InhA. Adaptado de: Inturi (2016)

Outras mutações foram identificadas na região promotor dos genes *ahpC*, *ndh*, *mshA*, e *kasA*, os quais codificam uma alquilhidroxil reductase (AhpC); uma NADH dehidrogenase, Ndh, que regula os níveis intracelulares de NAD/NADH; a enzima MshA, envolvida na biossíntese de micotiol; e a β -cetoacil-ACP sintase do sistema FAS-II (KasA). A implicância direta das mutações nestes genes na resistência à INH ainda não está totalmente esclarecida e, em alguns casos, algumas cepas resistentes isoladas não possuem mutações em nenhum destes genes. Logo, tem sido proposto que outros mecanismos possam estar envolvidos na resistência a INH na qual possam ainda estar envolvidas mutações em outros genes não descritos (LABORDE; DERA EVE; BERNARDES-GÉNISSON, 2017).

Finalmente, outro fator na resistência a INH envolve um aumento da função de bombas de efluxo que pode expulsar o fármaco ao exterior de *Mycobacterium tuberculosis* (MACHADO et al., 2012).

1.3 InhA

1.3.1 Características cinéticas e estruturais

No estudo cinético de InhA realizado por Quémard et al. (1995) foi reportado que InhA existe como homodímero em solução e que, além de poder reduzir seus substratos naturais, cadeias de ácidos graxos ligadas à proteína carregadora de acilos (ACP), ela também pode reduzir ácidos graxos ligados a coenzima A. No referente à preferência de substratos em termos de comprimento de cadeia, apesar de InhA conseguir reduzir ácidos graxos com cadeias a partir de 8 átomos de carbono, a enzima tem uma marcada preferência por ácidos graxos de 16 átomos de carbono. Ácidos graxos de 12, 20 e 24 átomos de carbono de comprimento também são reconhecidos e reduzidos por InhA, sendo que foram determinadas preferências intermédias tomando como referente as atividades mostradas pelos substratos de 8 e 16 átomos de carbono.

Através de estudos de velocidade inicial variando a concentração de dodecenoil-CoA, Quémard et al. (1995) também determinaram que InhA liga-se sequencialmente aos seus dois substratos, NADH e o ácido graxo ligado a ACP, existindo uma preferência na ordem de adição, onde a ligação do NADH precederia a ligação do ácido graxo-ACP. Também foi reportado que tanto NADH quanto NAD^+ ligam-se a proteína e que NAD^+ pode agir como inibidor competitivo da ligação do NADH.

A primeira estrutura de InhA foi determinada por Dessen et al. (1995). Neste trabalho foi observado que, no cristal obtido, InhA adota uma forma tetraédrica, onde a cadeia primaria

da enzima se enovela para formar um único domínio *Rossmann fold* conformado por 7 fitas que formam uma folha β central (B1 até B7) e 8 hélices α (A1 até A8) (Figura 9). A estrutura da proteína é comparada com uma cadeira, onde o núcleo da estrutura, conformado pelas “patas” e o “assento”, é descrito como topologicamente similar ao enovelamento característico dos sítios de ligação de dinucleotídeos presentes em várias desidrogenases (DESSEN et al., 1995). O bolsão de ligação do NADH está localizado numa fenda superficial entre a parte posterior e o “assento” de InhA. Depois de adotar uma conformação alargada, NADH vai se posicionar dentro do bolsão, ao longo do topo do extremo C-terminal da folha β central (com exceção de B4 e B5, cujos extremos C-terminais se estendem para além do NADH). O anel de adenina é paralelo ao “assento” de InhA e a porção de nicotinamida do NADH está voltada a parte posterior da proteína, apontando para dentro da cavidade formada pelas fitas B4, B5 e B6 e as hélices α A5, A6 e A7.

Figura 9- Representação da estrutura monomérica de InhA selvagem em complexo com NADH.

1.3.2 Mutantes estudados neste trabalho

Com o objetivo de elucidar possíveis novos mecanismos de resistência à isoniazida e validar a informação disponível na literatura sobre o tema, foi feito um levantamento bibliográfico na busca de relatos de mutações na região codificante do gene *inhA*. Tomando como referência os relatos recopilados por Seifert et al. (2015) e Vilchère et al. (2014), foram escolhidas mutações listadas na Tabela 1, as quais não possuem algum tipo de caracterização experimental e estão localizadas ao longo da sequência do gene *inhA*.

Tabela 1- Mutantes de *inhA* selecionados para o estudo.

Códon	Substituição	Procedência do isolado	Genes testados	Outras mutações	Referências
16	Ile→Thr	Coreia do Sul	<i>katG</i> , <i>inhA</i>	<i>katG</i> : deleção dos códons 358-361 <i>inhA</i> : -15C→T	Yoon et al., 2012.
		EUA	<i>ethA</i> , <i>katG</i> , <i>inhA</i>	<i>inhA</i> : -15C→T	Morlock et al., 2003.
21	Ile→Thr	China	<i>furA</i> , <i>katG</i> , <i>mabA</i> , <i>inhA</i> , <i>Rv0340</i> , <i>iniB</i> , <i>iniA</i> , <i>iniC</i> , <i>efpA</i> , <i>oxyR-ahpC</i>	<i>katG</i> : Ser315→Thr <i>iniB</i> : inserção 198T	Zhang et al., 2005.
25	Ile→Thr	China	<i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>mabA</i> , <i>oxyR-ahpC</i>	<i>inhA</i> : -8T→C <i>ahpC</i> : -6Gly→Ala	Luo et al., 2010.
94	Ser→Arg	Peru	<i>katG</i> , <i>ahpC</i> , <i>inhA</i> , <i>oryR-ahpC</i>	Nenhuma	Costa et al., 2009.
95	Ile→Pro	Nepal	<i>inhA</i>	Não especificado	Ristow et al., 1995.
168	Leu→Trp	China	<i>inhA</i> , <i>katG</i>	Não especificado	Cheng et al., 2007.
		China	<i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>kasA</i> , <i>mabA</i> , <i>ndh</i> , <i>oryR-ahpC</i>	Não especificado	Leung et al., 2006.
194	Ile→Thr	Singapura	<i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>ahpC</i> , <i>kasA</i> , <i>ndh</i> , <i>folA</i>	Nenhuma	Ho et al., 2009.
241	Thr→Met	EUA	<i>katG</i> , <i>mabA</i> , <i>inhA</i> , <i>ndh</i>	<i>katG</i> : 493Asn→His	Guo et al., 2006.
258	Ile→Thr	China	<i>furA</i> , <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>mabA</i> , <i>Rv0340</i> , <i>iniB</i> , <i>iniA</i> , <i>iniC</i> , <i>efpA</i> , <i>oxyR-ahpC</i>	<i>katG</i> : Arg463→Lys <i>kasA</i> : Gly259→Ser <i>iniA</i> : Arg537→His	Zhang et al., 2005.
259	Tyr→His	Coreia do Sul	<i>katG</i> , <i>inhA</i>	<i>katG</i> : Gly285→Val	Yoon et al., 2012.

Os mutantes escolhidos estão localizados em diversas posições da cadeia primária de InhA, como pode ser observado na Figura 10. No sítio de ligação do NADH encontram-se Ile16, Ile21, Ser94, Ile95 e Ile194 (Figura 10A). Os resíduos Ile25 e Leu168 estão localizados próximos ao sítio de ligação do NADH, numa distância de aproximadamente 7 Å (Figura 10B). Thr241, Ile258 e Tyr259 já estão localizados em regiões mais distantes do NADH. Destaca-se o fato de Ile258 e Tyr259 estar localizados na região de interface com o monômero adjacente (Figura 10C).

Figura 10- Localização dos resíduos a serem trocados.

O NADH está representado em cor branca e os resíduos a serem trocados em diferentes cores. A. Localização dos resíduos próximos ao sítio de ligação do NADH. B. Localização da Leu168. C. Localização de Ile258 e Tyr259.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados deste trabalho confirmaram principalmente a influência das alterações na rede de águas nos mutantes da proteína InhA e das pequenas mudanças conformacionais das proteínas na perda de afinidade pelo NADH, introduzindo contribuições entrópicas negativas que podem ser responsáveis pelo fenótipo de resistência, mesmo tendo aumentos na entalpia de ligação. No entanto, ainda são necessários alguns experimentos para comprovar alguma das hipóteses sugeridas no trabalho.

A resistência no mutante InhA I258T possivelmente deve-se a alterações que desestabilizam a unidade tetramérica da proteína devido ao aumento da entropia na interface das subunidades do tetrâmero. Porém, para confirmação desta hipótese, é necessária a realização de estudos de estabilidade. Devido ao fato de InhA Y259H não incorporar INH-NAD durante a cristalização, não foi possível comprovar a hipótese da formação da interação iônica como explicação para o fenômeno de resistência para esta mutação. Desta maneira, seria necessário obter frações purificadas do aduto INH-NAD para a realização de ensaios de cocrystalização e ITC, os quais podem mostrar padrões na titulação diferentes daqueles obtidos com NADH. Da mesma forma, poderiam ser obtidas informações mais precisas para os outros mutantes estudados usando o aduto INH-NAD para os ensaios de ITC, embora o uso de NADH providencie um modelo bastante robusto e validado cientificamente. Experimentos na tentativa de produzir frações puras de INH-NAD foram realizadas, mas o rendimento da reação se mostrou baixo e otimizações ainda são necessárias.

O fenômeno observado na proteína InhA I95P é intrigante, especialmente tendo em consideração que *inhA* é um gene essencial para *M. tuberculosis*. A aparente perda de função do gene *inhA* para este mutante exige uma exploração estrutural no enovelamento da proteína para avaliar as mudanças conformacionais que estão envolvidas no detrimento da interação da proteína com o cofator. Pelo mesmo motivo, é necessária a otimização na purificação dos mutantes S94R, L168W e T241M para a exploração estrutural e biofísica destas proteínas.

Finalmente, apesar deste estudo indicar explicações para o fenômeno de resistência à isoniazida no nível molecular para alguns dos mutantes não anteriormente caracterizados, é sabido que a complexidade dos sistemas biológicos é muito extensa. Por isso, são necessários estudos cinéticos e análises *in vitro* com cepas de *Mycobacterium* para validar completamente

os efeitos destas mutações na eficiência enzimática da InhA e na fisiologia da bactéria, respectivamente.

REFERENCIAS*

- ANDO, H. et al. A silent mutation in *mabA* confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 538-547, 2014.
- ADAMS, P.V. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, p. 213-221, 2010.
- AGILENT TECHNOLOGIES. QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual. Disponível em: < <https://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200523.pdf>>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- ARGYROU, A.; VETTING, M.W.; BLANCHARD, J.S. New Insight into the Mechanism of Action of and Resistance to Isoniazid: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP Reductase with INH-NADP. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 31, p. 9582-9583, 2007.
- BAILEY, S. CCP4 suite – programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, v. 50, p. 760-763, 1994.
- BANERJEE, A. et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 263, p. 227-230, 1994.
- BARDOU, J. et al. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, v. 144, p. 2539-2544, 1998.
- BASSO, L. et al. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 3, p. 769-775, 1998.
- BERNARDES-GÉNISSON, V. et al. Isoniazid: an update on the multiple mechanisms for a singular action. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 35, p. 4370-4385, 2013.
- BERSTEIN, J. et al. Chemotherapy of Experimental Tuberculosis. V. Isonicotinic Acid Hydrazide (Nydrazid) and Related Compounds. **American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases**, v. 65, n. 4, p. 357-364, 1952.
- BROSSIER et al. Comparative study of enzymatic activities of new KatG mutants from low- and high-level isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 100, p. 15-24, 2016.
- CHAIRES, J.B. Calorimetry and Thermodynamics in Drug Design. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, p. 135-151, 2008.
- CHENG, X. et al. A new Multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 2, p. 301-305, 2007.
- CHOLLET, A. et al. Crystal structure of the enoyl-ACP reductase of *Mycobacterium tuberculosis* (InhA) in the apo-form and in complex with the active metabolite of isoniazid pre-

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

formed by a biomimetic approach. **Journal of Structural Biology**, v. 190, n. 3, p. 328-337, 2015.

CHORINE, V. Action of nicotinamide on bacilli of the species *Mycobacterium*. **Compte Rendu de l'Academie des Sciences**, v. 220, p. 150-151, 1945.

COSTA, E.R.D. et al. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and *in vitro* susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 39, 2009.

DEEMAGARN, T. et al. Structural Characterization of the Ser324Thr Variant of the Catalase-peroxidase (KatG) from *Burkholderia pseudomallei*. **Journal of Molecular Biology**, v. 345, n. 1, p. 21-28, 2005.

DESSEN, A. et al. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 267, p. 1638-1641, 1995.

DIAS, M.V.B. et al. Crystallographic studies on the binding of isonicotinyl-NAD adduct to wild-type and isoniazid resistant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Structural Biology**, v.159, n. 3, p. 369-380, 2007.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D**, v. 60, p. 2126-2132, 2004.

EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Crystallographica Section D**, v. 69, p. 1204–1214, 2013.

GHILADI, R.; CABELLI, D.; DE MONTELLANO, P.R. Superoxide Reactivity of KatG: Insights into Isoniazid Resistance Pathways in TB. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 15, p. 4772-4773, 2004.

GOPAL, P.; DICK, T. Reactive dirty fragments: implications for tuberculosis drug discovery. **Current Opinion in Microbiology**, v. 21, p. 7-12, 2014.

GUO, H. et al. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1527-1531, 2006.

HARTKOORN, R.C. et al. Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin - nature's isoniazid. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, n. 10, p. 1032-1042, 2012.

HAZBÓN, M.H. et al. Population Genetics Study of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2640-2649, 2006.

HO, Y.M. et al. Contribution of *dfrA* and *inhA* Mutations to the Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 4010-4012, 2009.

INTURI, B.; PUJAR, G.; PUROHIT, M. Recent Advances and Structural Features of Enoyl-ACP Reductase Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Arch Pharm Chemistry in Life Sciences**, v.349, n. 11, p. 817-826, 2016.

KABSCH, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, p. 133–144, 2010.

LABORDE, J.; DERAEEVE, C.; BERNARDES-GÉNISSON, V. Update of Antitubercular Prodrugs from a Molecular Perspective: Mechanisms of Action, Bioactivation Pathways, and Associated Resistance. **ChemMedChem**, v. 12, n. 20, p. 1657-1676, 2017.

LABORDE, J. et al. Synthesis, oxidation potential and anti-mycobacterial activity of isoniazid and analogues: insights into the molecular isoniazid activation mechanism. **Chemistry Select**, v. 2, p. 172-179, 2016.

LASKOWSKI, R.A.; SWINDELLS, M.B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.51, n. 10, p. 2778-2786, 2011.

LAWRENCE, A.-M.; BESIR, H. Staining of Proteins in Gels with Coomassie G-250 without Organic Solvent and Acetic Acid. **Journal of Visualized Experiments**, n. 30, p. 2–4, 2009.

LEAVITT, S.; FREIRE, E. Direct measurement of protein binding energetic by isothermal titration calorimetry. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 5, p. 560-566, 2001.

LEUNG, E.T.Y. et al. Molecular Characterization of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of a Novel Mutation in *inhA*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, 1075-1078, 2006.

LUO, T. et al., Selection of Mutations To Detect Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Shanghai, China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1075-1081, 2010.

MACHADO, D. et al. Contribution of Efflux to the Emergence of Isoniazid and Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, e34538, 2012.

MACKEY, T.K. et al. Emerging and Reemerging Neglected Tropical Diseases: a Review of Key Characteristics, Risk Factors, and the Policy and Innovation Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 949-979, 2014.

MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, G.; QUÉMARD, A. *InhA*, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. **Microbiology**, v. 146, p. 289-296, 2000.

MIDDLEBROOK, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. **American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases**, v. 65, n. 6, p. 765-767, 1952.

MILCHISON, D.A.; SELKON, J.B. The bactericidal activities of antituberculous drugs. **American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases**, v. 74, n. 2, p. 109-116, 1956.

MORLOCK, G.P. et al. *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3799-3805, 2003.

NASIRI, M. et al. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 681, 2017.

NGUYEN, M. et al. A fast and efficient metal-mediated oxidation of isoniazid and identification of isoniazid-NAD(H) adducts. **ChemBioChem**, v. 2, n. 12, p. 877-883, 2001.

NGUYEN, M. et al. Mn(III) pyrophosphate as an efficient tool for studying the mode of action of isoniazid on the InhA protein of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2137-2144, 2002.

NGUYEN, L; PIETERS, J. Mycobacterial Subversion of Chemotherapeutic Reagents and Host Defense Tactics: Challenges in Tuberculosis Drug Development. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 427-453, 2009.

OLIVEIRA, J.S. et al. Crystallographic and Pre-steady-state Kinetics Studies on Binding of NADH to Wild-type and Isoniazid-resistant Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 359, n. 9, p. 646-666, 2006.

PANSY, F., STANDER, H.; DONOVICK, R. In vitro studies on isonicotinic acid hydrazide. **American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases**, v. 65, n. 6, p. 761-764, 1952.

QUÉMARD, A. et al. Enzymic Characterization of the Target for Isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, v.34, n. 26, p. 8235-8241, 1995.

QUICKCHANGE PRIMER DESIGN PROGRAM. Agilent Technologies. Software. Disponível em: < <https://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>>. Acesso em: 16 fev. 2016.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tubercle and Lung Disease**, v. 79, n. 1, p. 3-29, 1998.

RAWAT, R.; WHITTY, A.; TONGE, P.J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. **PNAS**, v. 100, n. 24, p. 13881-13886, 2003.

RICKMAN, K.A. et al. Isoniazid: Radical-induced oxidation and reduction chemistry. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 10, p. 3096-3100, 2013.

RISTOW, M. et al. New isoniazid/ethionamide resistance gene mutation and screening for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. **The Lancet**, v. 346, n. 8973, p. 502-503, 1995.

ROZWARSKI, D.A. et al. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 279, p. 98-102, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000. 3 v.

SCHATZ, A; WAKSMAN, S.A. Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and Related Organisms. **Experimental Biology and Medicine**, v. 57, n. 2, p. 244-248, 1944.

SEIFERT, M. et al. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119628, 2015

TAKAYAMA, K.; WANG, L.; DAVID, H.L. Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 29-35, 1972.

TIEMERSMA, E.C. et al. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. **PLOS ONE**, v. 6, n. 4, p. e17601, 2011.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, p. 1022–1025, 1997.

VILCHÈZE, C. et al. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. **Nature Medicine**, v.12, n. 9, p. 1027-1029, 2006.

VILCHÈZE, C.; JACOBS, W.R. The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 35-50, 2007.

VILCHÈZE, C.; JACOBS, W.R. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations and Casualties. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, p. MGM2-0014, 2014.

WENGENACK, N.L. et al. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* KatG(S315T) Is a Competent Catalase-Peroxidase with Reduced Activity toward Isoniazid. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 3, p. 722–727, 1997.

WOLFF, K.A.; NGUYEN, L. Strategies for potentiation of ethionamide and folate antagonists against *Mycobacterium tuberculosis*. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 10, n. 9, p. 971-981, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017 update**. Geneva, 2017a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2014**. Geneva, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2017**. Geneva, 2017b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Treatment of tuberculosis: guidelines**. Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. October 2016 revision**. Geneva, 2016.

YOON, J. et al. Molecular characterization of drug-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with tuberculosis in Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 72, n. 1, p. 52-61, 2012.

ZHANG, M. et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5477-5482, 2005.

ZHANG, Y. et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v. 358, p. 591-593, 1992.