



Sequenciamento completo do genoma do *Mycobacterium Tuberculosis* na identificação de mutações gênicas associadas a resistência antimicrobiana

Complete genome sequencing of *Mycobacterium Tuberculosis* in the identification of gene mutations associated with antimicrobial resistance

DOI: 10.56238/isevjhv2n2-007

Recebimento dos originais: 06/03/2023

Aceitação para publicação: 28/03/2023

Iago Prina Rocha

Mestrando em Ciências da Saúde

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Endereço: Campus Carreiros. Av. Itália, km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil.

E-mail: iagoprina@hotmail.com

Caroline Valois Cunha

Enfermeira Especialista

Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)

Endereço: Av. José Moreira Sobrinho, s/n - Jequiezinho, Jequié - BA

Ana Paula Furtado Carneiro da Fontoura

Doutoranda em Ciências da Saúde

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Endereço: Campus Carreiros. Av. Itália, km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil.

Rafaela Sinnott Dias

Mestranda em Ciências da Saúde

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Endereço: Campus Carreiros. Av. Itália, km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil.

Ivana da Cruz Goulart

Doutoranda em Ciências da Saúde

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Endereço: Campus Carreiros. Av. Itália, km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil.

Laura Fontoura Perim

Mestranda em Enfermagem

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Endereço: Campus Carreiros. Av. Itália, km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil.

Ana Claudia Klein de Almeida de Chaves

Enfermeira Especialista

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Endereço: Campus Carreiros. Av. Itália, km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil.

RESUMO

O desenvolvimento e aplicação de novas ferramentas moleculares mostrou a real complexidade envolvida na infecção por *Mycobacterium Tuberculosis*. O sequenciamento do genoma completo do Bacillus de Koch pode revelar informações sobre a verdadeira extensão das mutações pontuais

que conferem resistência ao tratamento a estas bactérias. Técnicas completas de sequenciamento genômico e sua disponibilidade em bancos de dados públicos, têm sido responsáveis pelo crescimento exponencial de ferramentas computacionais para extrair informações sobre características importantes codificadas nos genomas das espécies do complexo *Mycobacterium*. Este é um estudo de revisão da literatura, a partir de plataformas de pesquisa científica, com o objetivo de discutir como as ferramentas computacionais utilizadas para análise do sequenciamento genômico completo do *M. tuberculosis* podem identificar a relação genética entre mutações de cepas e resistência antimicrobiana. O sequenciamento genômico completo é considerado um marcador de vigilância de transmissão e resistência a drogas, assim como um forte preditor do surgimento de possíveis mecanismos de resistência a drogas de primeira e segunda linha utilizadas no tratamento da tuberculose pulmonar.

Palavras-chave: Genoma, Antibióticos, Tuberculose.

1 INTRODUÇÃO

Com o advento de novos processos de desenvolvimento científico e tecnológico após o fim da Segunda Guerra Mundial no ano de 1945, técnicas mais complexas e precisas começaram a ser utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, pesquisadores da área da saúde, pesquisadores acadêmicos e outros setores públicos e privados para o refinamento e descoberta de novas substâncias e moléculas com atividade biológica (CHAKRAVORTY, 2017).

A conclusão do Projeto Genoma Humano, a partir de 1970, trouxe novas informações sobre caminhos moleculares e respostas celulares a várias doenças, esta evolução do conhecimento da biologia molecular e celular, revolucionou quando os receptores celulares se tornaram agregados a estratégias baseadas em alvos moleculares para a descoberta de novas substâncias terapêuticas (CHAKRAVORTY, 2017; DA COSTA, 2017).

Os recursos computacionais utilizados para a identificação de novas substâncias também se tornaram parte do processo de desenvolvimento de medicamentos nas indústrias farmacêuticas, as metodologias virtuais *em sílico*, aumentaram a produtividade tática da pesquisa e diminuíram o tempo e o custo durante as fases de desenvolvimento. Com a melhoria do conhecimento prévio dos mecanismos histológicos, fisiológicos e patológicos responsáveis por algumas doenças, novos compostos terapêuticos promissores puderam ser identificados para tratamento e, a partir daí, desenvolver-se mais adequados *nas estratégias do sílico* com os dados disponíveis sobre a estrutura do alvo molecular selecionado e dos ligandos conhecidos (DOMÍNGUEZ, 2018; LIMA, 2017; MEEHAN, 2019).

Desde a disponibilidade do sequenciamento do genoma *Bacillus* de Koch em 1998, o conhecimento e a compreensão desta bactéria aumentaram significativamente, mas a expectativa de que a era pós-genômica levaria a novas e eficazes intervenções terapêuticas ainda permanece

utópica. A extrema complexidade do envelope celular micobacteriano, que confere baixa permeabilidade, é um dos fatores que poderia explicar tal falha. Drogas atuais ou candidatos ao tratamento da Tuberculose (TB) foram identificados usando a abordagem droga-para-alvo em micobactérias. Esta abordagem baseia-se na triagem de pequenas moléculas em bactérias cultivadas (triagem de células inteiras) ou células infectadas (triagem de alto conteúdo) (DOMÍNGUEZ, 2018; PEDELACQ, 2020; TUNSTALL, 2020).

A pesquisa em genômica bacteriana conquistou espaço nas ciências devido ao objetivo de melhorar o tratamento atual. O desenvolvimento de novos medicamentos para TB segue alguns objetivos gerais, que seriam: a redução da duração do tratamento e possivelmente a diminuição da frequência de dosagem; melhoria do efeito bactericida em populações replicantes e não replicantes; efeito terapêutico contra cepas resistentes a medicamentos; redução das interações medicamentosas com outros medicamentos e efeitos adversos; melhor biodisponibilidade oral e padrão farmacocinético eficiente com maior penetração tecidual e, finalmente, o baixo custo garantindo a acessibilidade universal (IKETLENG, 2018).

O desenvolvimento e aplicação de novas ferramentas moleculares mostrou a real complexidade envolvida na infecção por *Mycobacterium Tuberculosis*. Sequenciando o genoma completo do Bacillus de Koch pode revelar informações sobre a verdadeira extensão das mutações pontuais que conferem resistência ao tratamento a estas bactérias. A análise das informações genômicas começou a ser usada como um marcador epidemiológico e clínico no estudo da tuberculose (DA COSTA, 2017; MUNIR, 2020; PÉREZ-LAGO, 2014; AMBROSETTI, 2020).

2 METODOLOGIA

Este é um estudo de revisão de literatura, baseado em plataformas de pesquisa científica. Para a pesquisa bibliográfica, os bancos de dados bibliográficos científicos eletrônicos foram consultados nos meses de julho de 2020 a novembro de 2021: Portal PUBMED, BVS e Google Academic.

2.1 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

A primeira etapa do estudo consistiu em definir o tema e a questão da pesquisa, a saber Como as ferramentas computacionais utilizadas para analisar todo o sequenciamento genético do M. tuberculosis podem identificar a relação genética entre mutações de cepas e resistência antimicrobiana? Na segunda etapa, foram selecionadas as seguintes palavras-chave: "análise"; "ferramentas"; "genoma inteiro"; "*Mycobacterium Tuberculosis*"; "resistência". O operador

Boolean AND foi usado para cruzar as palavras-chave na plataforma PUBMED, Google Scholar e a Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), como mostrado na tabela 1 abaixo.

Para pesquisar os artigos, foram seguidos os seguintes critérios de inclusão: artigos publicados entre 2014 e 2021, completos, disponíveis em mídia eletrônica, em português, inglês e/ou espanhol, e que cobriam diretamente o assunto. Estudos que não estavam relacionados ao tema e monografias, dissertações, teses e legislação foram excluídos.

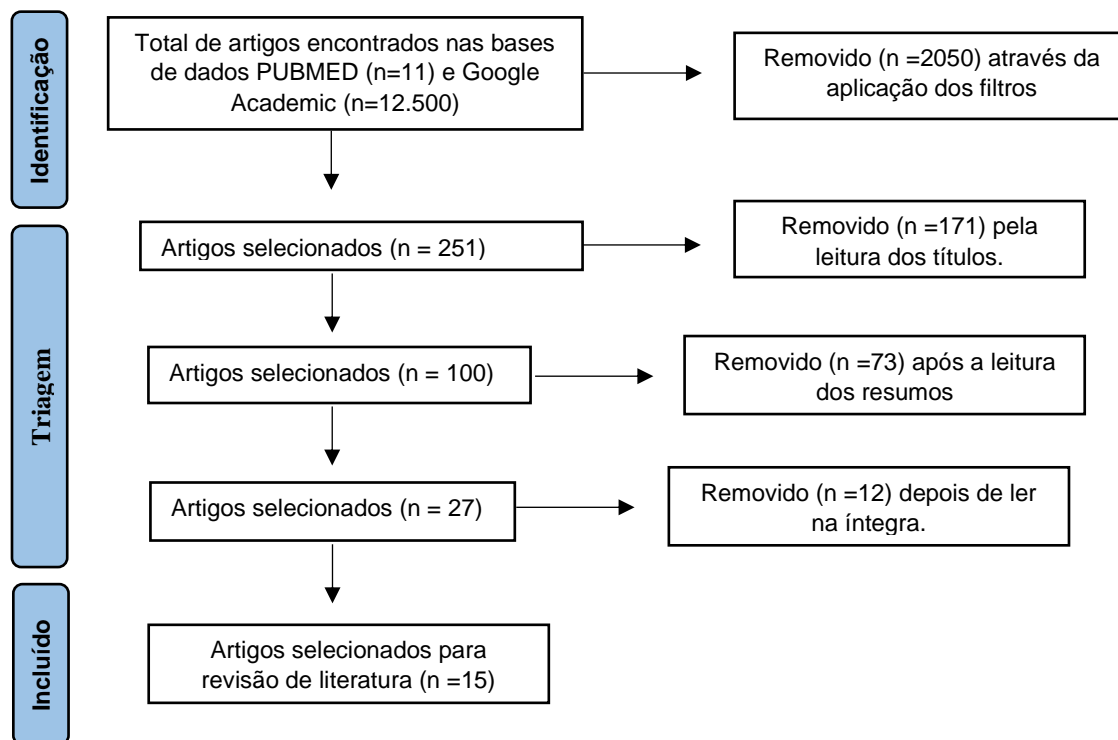
Tabela 1 - Referência cruzada de palavras-chave de acordo com o banco de dados e período de busca

Banco de dados/chaves de pesquisa	Qualquer período	2017 - 2021
PubMed/ (((Resistência a drogas) AND (Bacterial)) AND (Anti-Bacterial Agents)) AND (Genetic Phenomena)	34064	8785
Google Scholar / (((Resistência a drogas) AND (Bacterial)) AND (Anti-Bacterial Agents)) AND (Genetic Phenomena)	13200	5440
VHL / (((Resistência a drogas) AND (Bacterial)) AND (Anti-Bacterial Agents)) AND (Genetic Phenomena)	124	32

Fonte: Elaboração própria (2022)

No PUBMED foram encontrados 34.064 artigos, no Google Academic foram encontrados 13.200, no BVS foram encontrados 124 estudos, os filtros de tempo foram aplicados excluindo os artigos publicados no período anterior a 2017, tipos de pesquisa e artigos publicados na íntegra, após a leitura do título foram selecionados 87 artigos. Após a identificação dos títulos, os resumos foram lidos e a leitura diagonal foi realizada, o que seria uma análise superficial da introdução e dos resultados da pesquisa, resultando em 27 artigos ao final da leitura. Finalmente, 15 dos artigos selecionados foram lidos na íntegra, de acordo com o fluxograma, adaptado do formato PRISMA para a preparação de revisões sistemáticas, mostrado na figura 01:

Figura 1 - Fluxograma de identificação, seleção, exclusão e inclusão de artigos, para o desenvolvimento da Pesquisa.



Fonte: Elaboração própria (2022).

No final, a amostra do estudo consistiu de 15 artigos para análise e discussão, apenas os artigos que trouxeram o Sequenciamento Genômico Completo dentro das metodologias ou objetivos foram listados para a preparação das tabelas de apresentação de resultados. Após a leitura completa dos estudos, 8 artigos foram selecionados para compor a ferramenta de análise dos resultados, os 7 artigos restantes lidos na íntegra ajudaram na discussão e preparação do estudo.

Um total de 08 (oito) artigos foram utilizados para apresentar os dados, como mostrado no gráfico 01, onde foram identificados por título, ano de publicação e autores.

Tabela 2- Artigos incluídos nos resultados de acordo com a identificação do artigo, título, nomes dos autores, ano de publicação no período de 2015 a 2020.

NOME DO AUTOR	TÍTULO	EXERCÍCIO
Chakravorty, S., Simmons, A. M., Rowneki, M., Parmar, H., Cao, Y., Ryan, J., J., ... & Alland, D.	O novo Xpert MTB/RIF Ultra: melhorando a detecção de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> e a resistência à rifampicina em um ensaio adequado para testes no ponto de tratamento	2017
Meehan, C. J., Goig, G. A., Kohl, T. A., Verboven, L., Dippenaar, A., Ezewudo, M., ... & Van Rie, A	Seqüenciamento genômico completo do <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> : padrões atuais e questões em aberto	2019
Munir, A., Vedithi, S. C., Chaplin, A. K., & Blundell, T. L.	Genômica, biologia computacional e descoberta de drogas para infecções micobacterianas: combatendo o surgimento de resistência	2020

Tunstall, T., Portelli, S., Phelan, J., Clark, T. G., Ascher, D. B., & Furnham, N	Combinando estrutura e genômica para entender a resistência antimicrobiana	2020
Iketleng, T., Lessells, R., Dlamini, M. T., Mogashoa, T., Mupfumi, L., Moyo, S., ... & de Oliveira, T.	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i> seqüenciamento de toda a próxima geração do genoma: oportunidades e desafios	2018
Waman, V. P., Vedithi, S. C., Thomas, S. E., Bannerman, B. P., Munir, A., Skwark, M. J., ... & Blundell, T. L.	Genômica micobacteriana e bioinformática estrutural: oportunidades e desafios na descoberta de drogas	2019
do Carmo Guimarães, J. D. L., von Groll, A., Unis, G., Dalla-Costa, E. R., Rossetti, M. L. R., Vianna, J. S., ... & Silva, P. E. A	Seqüenciamento de todo o genoma como uma ferramenta para estudar a microevolução dos isolados de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> em série resistentes a drogas	2021
Gomez-Gonzalez, P. J., Andreu, N., Phelan, J. E., de Sessions, P. F., Glynn, J. R., Crampin, A. C., ... & Clark, T. G.	Uma análise integrada de todo o genoma da <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> revela insights sobre a relação entre seu genoma, transcriptoma e metiloma	2019

Fonte: Elaboração própria (2022).

Na quarta etapa, as informações a serem extraídas dos artigos selecionados foram listadas. Para reunir e sintetizar as informações-chave do estudo, foi preparado um instrumento que continha as seguintes variáveis: título, país e ano de publicação, nome dos autores, objetivo, metodologia e principais resultados.

Na quinta etapa da pesquisa, os resultados foram alcançados após a extração e interpretação das informações obtidas na etapa anterior do estudo. Finalmente, na sexta etapa, foi apresentada a síntese dos conhecimentos extraídos sobre o que foi publicado na Análise Completa da Seqüenciação do Genoma.

Os dados coletados foram analisados sistematicamente através da análise final dos artigos, que foram organizados em duas tabelas, com o objetivo de captar um determinado tema. Como se trata de uma revisão de literatura utilizando artigos de domínio público, o presente estudo não requer a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 1952 o papel do ácido desoxirribonucleico (DNA) como molécula que codifica a informação genética foi validado, era o DNA e não a proteína que era captada e transmitida por células bacterianas infectadas por um bacteriófago. Após o advento da bioinformática e o reconhecimento da linguagem do DNA como código genético, houve avanços no campo da biologia molecular, especialmente com o advento dos projetos de genoma, que geraram volumes

intensos de informações obtidas a partir do sequenciamento de fragmentos de DNA (CHAKRAVORTY, 2017; MUNIR, 2020).

As técnicas de sequenciamento genômico completo e sua disponibilidade em bancos de dados públicos foram responsáveis pelo crescimento exponencial de ferramentas computacionais para extrair informações sobre características importantes codificadas nos genomas das espécies do complexo *Mycobacterium*. As análises genômicas do *M. tuberculosis* podem caracterizar a virulência e a patogenicidade de diferentes cepas, contribuindo para o estabelecimento de dados epidemiológicos precisos sobre processos patogênicos (IKETLENG, 2018; WAMAN, 2019; GÓMEZ-TANGARIFE, 2018).

As 08 produções selecionadas trouxeram Sequenciamento Genômico Completo dentro das metodologias ou objetivos, estão representadas na tabela 03 e representam a amostra sintetizada de acordo com a identificação do artigo, título, nomes dos autores, objetivo, método e ano de publicação.

Tabela 3 - Resumo dos artigos incluídos na revisão de acordo com a identificação do objetivo, método utilizado na pesquisa.

NOME DO AUTOR	OBJETIVO	MÉTODO
Chakravorty, S., Simmons, A. M., Rowneki, M., Parmar, H., Cao, Y., Ryan, J., & Alland, D.	Demonstrar as características de projeto e as características operacionais de um teste Xpert Ultra aprimorado	Também foram testadas amostras clínicas congeladas, coletadas prospectivamente de pacientes com suspeita de tuberculose, com e sem tuberculose confirmada por cultura.
Meehan, C. J., Goig, G. A., Kohl, T. A., Verboven, L., Dippenaar, A., Ezewudo, M., M., ... & Van Rie, A	Descrevemos o panorama atual dos oleodutos e aplicações da WGS e estabelecemos as melhores práticas para a <i>M. tuberculosis</i> WGS.	Eles fizeram o sequenciamento genético direto de alguns espécimes clínicos de pacientes com tuberculose. Eles analisaram as variantes genômicas da tuberculose, incluindo os espécimes clínicos, e para prever os perfis de suscetibilidade às drogas.
Munir, A., Vedithi, S. C., Chaplin, A. K., & Blundell, T. L.	Descrever abordagens orientadas por estrutura para compreender os impactos das mutações que dão origem à resistência antimicobacteriana e o uso dessas informações no projeto de novos medicamentos.	Eles avaliaram as ferramentas levantadas por pesquisadores em um documento anterior, que forneceu uma atualização sobre os recentes desenvolvimentos no pipeline de desenvolvimento de medicamentos para TB (incluindo novos antimicrobianos e drogas de alvo alvo de hospedeiros) à medida que eles são aplicados a novos regimes para encurtar e melhorar os resultados do tratamento da TB.
Tunstall, T., Portelli, S., Phelan, J., Clark, T. G., Ascher, D. B., & Furnham, N	Apresentar várias das principais ferramentas e métodos computacionais atualmente disponíveis para medir as consequências mutacionais, com foco naquelas ferramentas que foram usadas para analisar a	Eles apresentaram algumas ferramentas baseadas em seqüência e estrutura que prevêm o efeito de mutações patogênicas. No caminho metodológico, eles utilizaram a tabela com uma lista atualizada das ferramentas atualmente disponíveis. O tipo de método para cada ferramenta é especificado usando o seguinte código; S : baseado em seqüência, St : baseado em estrutura, SA :

	variação dentro de um genoma patogênico.	alinhamento de seqüência , SS : seqüência e estrutura, (St) : estrutura, se disponível
Iketleng, T., Lessells, R., Dlamini, M. T., Mogashoa, T., Mupfumi, L., Moyo, S., ... & de Oliveira, T.	Discutir as tremendas oportunidades que a próxima geração da WGS apresenta em termos de compreensão da epidemiologia molecular da tuberculose e dos mecanismos de resistência às drogas.	Eles apresentaram os desafios atuais para implementar a WGS em ambientes de baixa e média renda. Utilizaram métodos moleculares como o Xpert MTB/RIF
Waman, V. P., Vedithi, S. C., Thomas, S. E., Bannerman, B. P., Munir, A., Skwark, M. J., ... & Blundell, T. L.	Descrever o impacto da rápida expansão do seqüenciamento do genoma e anotações do genoma/estrada que melhoraram muito o progresso da descoberta de drogas orientadas por estrutura.	Utilizaram a anotação rápida de dados genômicos, levando ao desenvolvimento de recursos gerais e especializados, fornecendo informações importantes e pertinentes sobre seqüência, estrutura, função, caminho metabólico, taxonomia e mutações de resistência a drogas.
do Carmo Guimarães, J. D. L., von Groll, A., Unis, G., Dalla-Costa, E. R., Rossetti, M. L. R., Vianna, J. S., ... & Silva, P. E. A	Descrever a microevolução da resistência às drogas em isolados em série de seis pacientes previamente tratados.	A pesquisa teve 6 participantes, eles realizaram amostras dos seis pacientes, cultura e extração de DNA, depois realizaram testes de sensibilidade a drogas, como ensaios de catalase, a resistência a drogas foi inicialmente investigada usando métodos fenotípicos, seguidos por abordagens genotípicas e Genotipagem das cepas.
Gomez-Gonzalez, P. J., Andreu, N., Phelan, J. E., de Sessions, P. F., Glynn, J. R., Crampin, A. C., ... & Clark, T. G.	Integrar a caracterização genômica, transcriptômica e de metilação baseada em seqüência em um conjunto de amostras comum	<i>O Mtb</i> foi isolado de 22 amostras de saliva de 22 pacientes diferentes com tuberculose coletadas entre 2003 e 2009 em Karonga, um distrito no norte do Malawi. A maioria dos indivíduos era HIV positivo (16/22). O DNA genômico foi extraído e sequenciado usando as tecnologias PacBio single molecule real-time sequencing (SMRT) e Illumina. Os <i>isolados Mtb</i> foram cultivados por cultura líquida (na ausência de drogas antimicrobianas) a partir de estoques congelados de Lowenstein-Jensen ou culturas líquidas derivadas de amostras já isoladas da expectoração de pacientes. As amostras foram sequenciadas no Genome Institute of Singapore.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Os diferentes métodos de análise das amostras utilizadas nos estudos encontrados demonstraram como o sequenciamento genômico completo do *Mycobacterium Tuberculosis* evoluiu rapidamente de uma ferramenta de pesquisa para uma ferramenta de aplicação clínica aplicável tanto para o diagnóstico e tratamento da tuberculose quanto para a vigilância da saúde pública.

O gráfico 02 mostra os principais resultados e a discussão dos estudos sobre o Sequenciamento Completo do Genoma *Mycobacterium Tuberculosis* e a identificação dos Mecanismos de Resistência Antimicrobiana.

Tabela 04- Resumo dos resultados apresentados nos periódicos publicados de 2015 a 2020.

AUTOR	RESULTADOS E DISCUSSÃO
Chakravorty, S., Simmons, A. M., Rowneki, M., Parmar, H., Cao, Y., Ryan, J., J., ... & Alland, D.	Os limites de detecção ultra e Xpert (LOD), faixas dinâmicas e detecção de mutação RIF-R rpoB foram testados em amostras de DNA ou expectoração de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> com números conhecidos de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ou <i>Mycobacterium bovis</i> BCG CFU. Todas as <i>M. tuberculosis</i> rpoB associadas às mutações RIF-R testadas foram identificadas pelo Ultra. Os testes em amostras clínicas de saliva, Ultra versus Xpert, resultaram em uma sensibilidade geral de 87,5% (intervalo de confiança de 95% [CI], 82,1/91,7) versus 81,0% (95% CI, 74,9/86,2) e uma sensibilidade em amostras de esfregaço de saliva negativa de 78,9% (95% CI, 70,0/86,1) versus 66,1% (95% CI, 56,4/74,9). Ambos os testes tiveram uma especificidade de 98,7% (95% CI, 93,0/100), e ambos tiveram precisões comparáveis para a detecção de RIF-R nestas amostras.
Meehan, C. J., Goig, G. A., Kohl, T. A., Verboven, L., Dippenaar, A., Ezewudo, M., M., ... & Van Rie, A	O sequenciamento do genoma inteiro (WGS) de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> evoluiu rapidamente de uma ferramenta de pesquisa para uma aplicação clínica para o diagnóstico e tratamento da tuberculose e na vigilância da saúde pública. Este desenvolvimento tem sido facilitado por declínios dramáticos nos custos, avanços na tecnologia e esforços concertados para traduzir dados de sequenciamento em informações acionáveis. Há um risco, entretanto, de que na ausência de consenso e normas internacionais, o uso generalizado da tecnologia WGS possa resultar em dados e processos que carecem de harmonização, comparabilidade e validação.
Munir, A., Vedithi, S. C., Chaplin, A. K., & Blundell, T. L.	Eles discutiram a aplicação de ferramentas computacionais e abordagens experimentais no contexto da descoberta de drogas micobacterianas e resistência a drogas antimicrobianas com ênfase na tuberculose e na hanseníase. Eles mostraram que os dados gerados pelo sequenciamento de genomas inteiros de isolados clínicos podem ser rastreados para a presença de mutações resistentes a drogas. Uma análise preliminar <i>em silico</i> das mutações pode então ser usada para priorizar o trabalho experimental para identificar a natureza dessas mutações.
Tunstall, T., Portelli, S., Phelan, J., Clark, T. G., Ascher, D. B., & Furnham, N	As ferramentas computacionais podem avaliar de forma rápida e barata o efeito das mutações sobre a função e evolução das proteínas. As percepções subsequentes podem então informar estudos experimentais e direcionar métodos computacionais existentes ou novos. A combinação de resultados genômicos com os efeitos biofísicos das mutações pode ajudar a revelar a base molecular e as consequências do desenvolvimento da resistência.
Iketleng, T., Lessells, R., Dlamini, M. T., Mogashoa, T., Mupfumi, L., Moyo, S., ... & de Oliveira, T.	O sequenciamento direto de amostras de expectoração sem a necessidade de cultura forneceria uma imagem mais precisa da estrutura da população de infecções mistas. A representação relativa de diferentes linhagens em infecções mistas pode ser capturada sem o crescimento excessivo de algumas linhagens sobre outras devido a condições favoráveis de cultura. Isto informaria melhor as intervenções de tratamento e prevenção.
Waman, V. P., Vedithi, S. C., Thomas, S. E., Bannerman, B. P., Munir, A., Skwark, M. J., ... & Blundell, T. L.	As primeiras abordagens para a descoberta de novos antibióticos baseavam-se quase que inteiramente na triagem fenotípica de células inteiras de produtos naturais, extratos microbianos e caldos de fermentação. As características estruturais também podem ser usadas para refinar ainda mais a seleção e validação do alvo, incluindo a falta de homologia estrutural com o hospedeiro humano para evitar toxicidade e ligabilidade baseadas em mecanismos que levem à modulação da atividade alvo.
do Carmo Guimarães, J. D. L., von Groll, A., Unis, G., Dalla-Costa, E. R., Rossetti, M. L. R., Vianna, J. S., ... & Silva, P. E. A	Os pesquisadores apontaram que o uso de sequenciamento genômico completo permitiu a identificação de mutações nos genes <i>katG</i> , <i>rpsL</i> e <i>rpoB</i> associados à resistência a drogas, incluindo a detecção de mutações raras <i>inkatG</i> e populações de cepas mistas. Também foram realizados estudos de simulação de ajuste molecular do impacto das mutações observadas na ligação de isoniazida. Sequenciamento de genoma inteiro detectou 266 polimorfismos de nucleotídeos

	únicos entre dois isolados obtidos de um paciente, sugerindo um caso de reinfeção exógena.
Gomez-Gonzalez, P. J., Andreu, N., Phelan, J. E., de Sessions, P. F., Glynn, J. R., Crampin, A. C., ... & Clark, T. G.	A pesquisa mostrou que para cada isolado, os dados da seqüência bruta foram alinhados ao genoma de referência H37Rv, levando a uma cobertura média de >100 vezes. Em todas as amostras, 9.384 SNPs únicos foram caracterizados, com ~40% deles identificados em isolados únicos. Apenas 1.446 dos 9.384 SNPs estavam localizados em regiões intergênicas.

Fonte: Elaboração própria (2022).

O estudo de Chakravorty (2017), trouxe a primeira demonstração das características de projeto e das características operacionais de um ensaio chamado Xpert Ultra aprimorado. Ele evidenciou nas descobertas uma excelente sensibilidade no teste de amostras de escarro com esfregaços de escarro positivo, entretanto, ele demonstrou que Xpert é ligeiramente menos sensível quando realizado em amostras de escarro com esfregaços de escarro negativo. Ultra deve melhorar significativamente a detecção da tuberculose, especialmente em pacientes com doença paucibacilar, e pode proporcionar uma detecção RIF-R mais confiável. A sensibilidade do ensaio também foi limitada nos resultados utilizando espécimes extrapulmonares, que são conhecidos por terem considerado níveis menores de bacilos em comparação com os espécimes pulmonares.

No artigo da Iketleng (2018), os autores apontaram que o futuro da WGS do *M. tuberculosis* reside na capacidade de aplicar o método diretamente ao escarro, já que este é o material clínico mais comumente disponível em laboratórios que realizam seqüenciamento de cepas. Waman (2019) trouxe que abordagens computacionais para prever os efeitos das mutações na estrutura e função da proteína podem ser úteis na compreensão do mecanismo de resistência às drogas.

Para Gomes (2019), o estudo dos perfis transcriptômicos específicos da linhagem e os mecanismos que regulam a expressão gênica nas cepas de *M. tuberculosis* podem fornecer informações sobre os mecanismos subjacentes a essas diferenças biológicas. Tais mecanismos serão úteis para identificar alvos potenciais para o desenvolvimento de novos medicamentos usados no tratamento da Tuberculose ou vacinas anti-tuberculose.

Os resultados mostraram que os dados gerados pelo seqüenciamento do genoma inteiro de espécies isoladas de casos clínicos podem servir como um rastreador para possíveis mutações resistentes a drogas. Esta combinação de resultados de leitura do genoma com os efeitos biofísicos das mutações existentes em cepas pode ajudar a investigar a base molecular e as conseqüências do desenvolvimento de resistência a uma única droga ou mesmo resistência a múltiplas drogas.

Todos os estudos concluíram que as tecnologias aplicadas ao seqüenciamento genômico podem detectar mutações pontuais raras relacionadas à resistência a drogas usadas no tratamento, bem como identificar subpopulações de cepas resistentes e analisar várias causas relacionadas à

reinfeção exógena e resistência múltipla, contribuindo para o controle do tratamento da TB, orientando a implementação precoce de intervenções clínicas e terapêuticas adequadas e eficazes em várias situações.

Os métodos de genotipagem podem contribuir para a diferenciação e compreensão das cadeias de transmissão do complexo *M. tuberculosis*, bem como ajudar na abordagem de questões clínicas como a virulência e fatores patogênicos. Entretanto, os métodos clássicos de sequenciamento genômico são limitados apenas a um conjunto de regiões polimórficas contidas em fragmentos de genoma (CHAKRAVORTY, 2017).

3.1 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO COMPLETO DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E A IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.

No ano de 1998 foi publicada e revisada em 2002 e 2010 a seqüência do genoma da linhagem do laboratório Mtb H37Rv. As abordagens de seqüenciamento de genoma inteiro (WGS) usam plataformas de seqüenciamento de DNA para reconstruir a seqüência completa de DNA do genoma de um organismo. As abordagens baseadas no WGS estão mudando rapidamente os métodos laboratoriais de pesquisa para aplicações em cuidados clínicos e saúde pública. A Organização Mundial da Saúde tem usado o WGS para a vigilância da resistência a drogas (DO CARMO GUIMARÃES, 2021; GOMEZ-GONZALEZ, 2019).

O fluxo de trabalho padrão para análise WGS de cepas de *Mycobacterium Tuberculosis* (Mtb) envolve cultura de amostras de saliva Lowenstein ou extração de DNA líquido de células, preparação de bibliotecas e seqüenciamento usando tecnologias de leitura curta. Dados genômicos para um conjunto de isolados também podem ser usados para investigações de vigilância e transmissão (TUNSTALL, 2020; AMBROSETTI, 2020; DO CARMO GUIMARÃES, 2021).

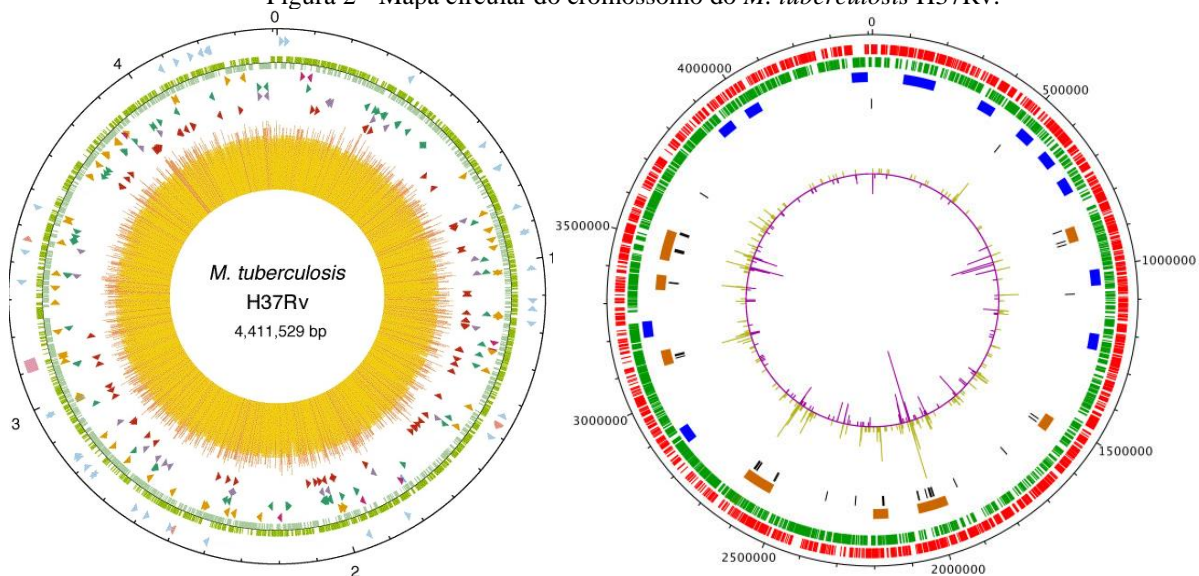
A amostra clínica (geralmente expectoração) é cultivada pela primeira vez por até 6 semanas, seguida de extração de DNA genômico e seqüenciamento. Os resultados do sequenciamento resultantes podem ser depositados on-line em repositórios públicos e também realizados através de *oleodutos*. A segmentação dos elementos desses *pipelines* ocorre inicialmente com leituras de um gene de referência (geralmente a cepa *M. tuberculosis* H37Rv) e depois com as variantes genômicas. Listas das leituras de seqüenciamento genômico podem então ser usadas para uma variedade de análises, tais como tipagem de cepa, agrupamento de transmissão e perfil de resistência a drogas (TUNSTALL, 2020).

A cepa *M. tuberculosis* H37Rv foi recentemente sequenciada por vários centros de pesquisa. Anotações continuamente atualizadas e informações genômicas sobre H37Rv podem ser

encontradas nos servidores da TubercuList e Mycobrowser e no banco de dados da TB. A primeira estrutura proteica de uma *M. tuberculosis* depositada no Banco de Dados de Proteínas (PDB) foi a de superóxido dependente do ferro dismutase. Seguiu-se a estrutura da proteína transportadora de enoyl-acyl (ACP) reductase InhA, para a qual 80 estruturas estão agora disponíveis. Na época da primeira publicação da seqüência genômica da cepa H37Rv, havia apenas oito estruturas de proteína Mtb no PDB (TUNSTALL, 2020).

No ano de 2018, um total de 2124 Mtb de estruturas foram depositadas no PDB, representando 585 estruturas únicas, as estruturas restantes correspondem em sua maioria em diferentes complexos das estruturas únicas com pequenas moléculas. Os programas usados pela biologia estrutural e genômica são projetados para estabelecer uma *continuidade* entre seqüências, estruturas e funções individuais, levando assim a um melhor entendimento do Mtb promovendo um projeto racional baseado em estruturas de novas drogas para TB. Várias iniciativas de bioinformática estrutural também foram desenvolvidas para aumentar a cobertura estrutural do proteoma Mtb (DOMÍNGUEZ, 2018).

Figura 2 - Mapa circular do cromossomo do *M. tuberculosis* H37Rv.



Fonte: Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Decifrando a biologia de *Mycobacterium Tuberculosis* a partir da seqüência completa do genoma. A natureza. 1998; 393 (6685): 537-44.

O genoma da cepa *M. tuberculosis* H37Rv tem 4.411.529 pares de bases em sua composição. Seu conteúdo é relativamente constante em 65,6% de guanina e citosina em toda a cadeia de DNA. O complexo de bactérias pertencentes ao grupo das micobactérias apresenta de certa forma, uma probabilidade quando analisado por seqüenciamento de genes por 16S rRNA, as diferenças são perceptíveis ao comparar as características morfológicas e a patogenicidade no

hospedeiro (TUNSTALL, 2020; IKETLENG, 2018; WAMAN, 2019; DO CARMO GUIMARÃES, 2021).

M. tuberculosis é caracterizada como uma bactéria patogênica humana apresentada na forma de bacilos, com morfologia apresentada da seguinte forma: diâmetro entre 0,3 e 0,5 μm , e uma parede celular muito impermeável. Ao contrário de outras espécies de bactérias, as micobactérias não podem ser classificadas como organismos Gram positivos ou negativos, devido às características de sua parede celular, o método de coloração Gram é ineficaz, levando estas bactérias a serem classificadas como bactérias resistentes ao álcool ácido pela técnica de Ziehl-Neelsen (GÓMEZ-TANGARIFE, 2018).

A complexa parede celular das micobactérias apresenta características similares aos dois grupos de bactérias classificadas como Gram positivas e negativas, enquanto apresenta uma estrutura rica em lipídios, não consegue reter a coloração de Gram. Características similares às dos indivíduos Gram-negativos são a presença de poros na camada lipídica externa e um espaço periplasmático entre a membrana interna e a camada peptídeoglicana (GÓMEZ-TANGARIFE, 2018).

M. tuberculosis é um organismo aeróbico que desempenha eficientemente suas funções biológicas em tecidos ricos em oxigênio, o que explica sua afinidade com o tecido pulmonar; entretanto, eles podem sobreviver em tecidos com quantidades reduzidas de oxigênio. Entretanto, os padrões de resistência relacionados ao genoma bacteriano não são afetados pelas concentrações dos antibióticos correspondentes, no sangue ou tecido, disponibilidade de oxigênio, ou mesmo aqueles que possuem mecanismos de resistência específicos ao agente estudado para o qual não houve uma resposta clínica adequada quando usado como tratamento (WAMAN, 2019).

Gómez-Tangarife (2018) aponta que com o avanço das tecnologias responsáveis pelo seqüenciamento de todo o genoma foi possível identificar mutações que possivelmente influenciariam a ocorrência de resistência e aumentariam as possibilidades de selecionar um alvo específico, como um gene ou proteína, que apresenta alguma propriedade ou característica essencial para o crescimento e/ou sobrevivência da bactéria sob as condições do processo infeccioso, tornando possível identificar o alvo para inibir a atividade e/ou resposta bacteriana.

A identificação de mutações em genes através da genotipagem do genoma inteiro pode qualificar e mostrar genes constitutivos e de resistência a drogas. Ao identificar fortes preditores de mecanismos de resistência através do seqüenciamento do genoma, a droga pode ser seletiva, ao ponto de um composto reconhecer proteínas bacterianas eficazes para uma resposta farmacológica eficaz (GÓMEZ-TANGARIFE, 2018).

Entretanto, a disponibilidade de seqüências de genoma de diferentes linhagens tornou possível comparar todo o genoma, variações no número de cópias de genes, variações na seqüência de DNA, inserções ou deleções de múltiplos nucleotídeos e mutações pontuais conhecidas como polimorfismo de um único nucleotídeo podem ocorrer (CHAKRAVORTY, 2017).

Tunstall (2020) diz que o processo de análise de seqüenciamento de genoma ocorre alinhando a seqüência de DNA com um genoma de referência, geralmente a cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Os métodos de análise baseados na seqüência dependem apenas do gene analisado ou da seqüência proteica da cepa, eles são frequentemente usados quando não há estrutura proteica conhecida ou quando a modelagem não é possível.

As previsões feitas por ferramentas de análise de seqüência são geralmente baseadas em alinhamentos das estruturas secundárias previstas. Os métodos de alinhamento de seqüências refletem a visão de dois modelos o alinhamento/similaridade global que considera similaridade ao longo de todo o comprimento das seqüências e o alinhamento de similaridade local que constitui uma fração do comprimento das seqüências. Os métodos de alinhamento local buscam semelhanças locais em regiões curtas da seqüência completa levando a resultados mais significativos biologicamente e especificados, diferentes daqueles obtidos pelo alinhamento ao longo de todo o comprimento da seqüência (CHAKRAVORTY, 2017).

Chakravorty (2017), traz que um dos maiores desafios da bioinformática aplicada à genômica é a análise completa dos genomas, ou seja, é necessário melhorar a identificação dos genes previstos computacionalmente e associá-los a uma função e fornecer subsídios para o desenho de experimentos que possam testar essas previsões e compará-las com outras já existentes. Há vários programas que realizam o processo de montagem do genoma: Phred/Phrap/Consed, CAP/PCAP, Celera Assembler, *Genome Analyzer* (Illumina) e o *GS De Novo Assembler* (Roche). Cada programa usa algoritmos diferentes para obter a seqüência de DNA contígua.

Tunstall (2020) afirma ainda que os métodos baseados em estrutura podem fornecer uma apresentação tridimensional das moléculas envolvidas no processo de mutações, o que pode não ser evidente apenas pela análise da seqüência. Os métodos baseados em estrutura incluem a análise das conseqüências estruturais e funcionais das mutações da proteína, incluindo aquelas sobre o enrolamento, estabilidade, dinâmica e mudanças nas interações com ligandos.

Após o sequenciamento completo do genoma, é necessário identificar todos os genes que codificam proteínas (proteoma) e a função das proteínas codificadas, procurando semelhanças em bancos de dados. A seleção do software bioinformático para a análise dos dados de

seqüenciamento genético será determinada pelo objetivo do estudo. O estudo de Gomes (2019), utilizou o Geneious 9.1.8 (Biomatters), um software desktop que analisa os dados de seqüenciamento. Geneious, segundo os autores, fornece uma interface intuitiva e fácil de usar que transforma dados de seqüência bruta em visualizações significativas, e pode ser usado para mapear leituras de seqüência FASTQ para um genoma de referência disponível em bancos de dados de Bioinformática. FASTQ é o formato de texto usado para armazenar uma seqüência de DNA e seus índices de qualidade correspondentes.

O sequenciamento do genoma inteiro é considerado um marcador de vigilância de transmissão e resistência a drogas, bem como um forte preditor do surgimento de possíveis mecanismos de resistência para drogas de primeira e segunda linha utilizadas no tratamento da Tuberculose Pulmonar (TB) (WAMAN, 2019; GOMEZ-GONZALEZ, 2019).

Vários estudos em escala global têm mostrado alvos em genes envolvidos na resistência fenotípica do *Bacillus* de Koch, identificando também mutações que conferem virulência e patogênese diferentes. Os pesquisadores apontam o sequenciamento de genomas inteiros como o método padrão para detectar cadeias de transmissão em tempo real. Este seqüenciamento pode facilitar a identificação de cepas resistentes, trazendo novos conhecimentos moleculares de resistência, permitindo eficácia para programas de controle de TB (WAMAN, 2019; GOMEZ-GONZALEZ, 2019).

Com as análises genômicas do *M. tuberculosis*, foi possível identificar genes e regiões genômicas que estão envolvidas no desenvolvimento de diferentes tipos de resistência. Por exemplo, a resistência à Isoniazida pode estar relacionada ao *katG* (catalase-peroxidase), *inhA* (enoyl acyl reductase), *ahpC* (alkyl hydroxyperoxide reductase) e, mais recentemente, aos genes *kasA* (ketoacyl acyl synthetase) e *ndh* (NADH desidrogenase) (WAMAN, 2019; GOMEZ-GONZALEZ, 2019).

4 CONCLUSÃO

O estudo de pares de genomas ou múltiplos genomas contribui para uma variedade de estudos, que engloba a elucidação de questões básicas envolvidas na biologia evolutiva dos microorganismos e pode ser usado para estudar questões clínicas muito específicas, tais como a identificação de polimorfismos genéticos de bactérias causadoras de doenças.

O uso de ferramentas de análise bioinformática é um dos fatores relevantes ao discutir o seqüenciamento genômico completo do *M. tuberculosis*, uma vez que, além de contribuir para o uso clínico ideal, pode resolver problemas dentro da análise de mutações e expressão gênica. A



compreensão do surgimento da resistência destas bactérias às drogas que tratam o *M. tuberculosis* tem sido facilitada pela disponibilidade do sequenciamento genômico completo nos últimos anos.

O processo de análise que começa com o alinhamento dos dados da seqüência de DNA a uma referência de genoma, geralmente a cepa *M. tuberculosis* H37Rv, pode aumentar a confiabilidade da identificação de novos genótipos, contribuindo para a previsão da resistência da cepa. Os dados gerados pelo sequenciamento de genoma inteiro de isolados clínicos podem ser usados como ferramentas para rastrear a presença de mutações resistentes a vários tipos de drogas. Há várias contribuições de descobertas genômicas e abordagem fenotípica quando se trata da identificação de novos alvos para possíveis candidatos a medicamentos e vacinas anti-TB.

O entendimento sobre o surgimento de resistência adquirida às drogas que tratam o *M. tuberculosis* tem sido facilitado pela disponibilidade de sequenciamento genômico completo nos últimos anos. Os dados gerados por todo o sequenciamento genômico de isolados clínicos podem ser usados como ferramentas para triagem da presença de mutações resistentes a vários tipos de drogas associadas ou isoladas.

REFERÊNCIAS

CHAKRAVORTY, Soumitesh et al. O novo Xpert MTB/RIF Ultra: melhorando a detecção de *Mycobacterium Tuberculosis* e a resistência à rifampicina em um ensaio adequado para testes no ponto de tratamento. **MBio**, v. 8, n. 4, p. e00812-17, 2017.

DA COSTA, Anderson Luiz Pena; JUNIOR, Antonio Carlos Souza Silva. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DOMÍNGUEZ, José; LATORRE, Irene; SANTIN, Miguel. Diagnóstico e abordagem terapêutica da infecção por tuberculose latente. **Enfermedades infecciosas e microbiologia clinica (ed. inglês)**, v. 36, n. 5, p. 302-311, 2018.

LIMA, Camila Correa; BENJAMIM, Sandra Cristina Calixto; SANTOS, Rosana Francisco Siqueira dos. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte, Enferm**, p. 105-113, 2017.

MEEHAN, Conor J. et al. Sequenciamento de todo o genoma de *Mycobacterium Tuberculosis*: padrões atuais e questões em aberto. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 533-545, 2019.

MUNIR, Asma et al. Genomics, Computational Biology and Drug Discovery for Mycobacterial Infections: Combate à Emergência da Resistência. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 965, 2020.

PEDELACQ, Jean-Denis et al. A Comprehensive Review on *Mycobacterium Tuberculosis* Targets and Drug Development from a Structural Perspective. **A Biologia Estrutural na Descoberta de Drogas: Métodos, Técnicas e Práticas**, p. 545-566, 2020.

TUNSTALL, Tanushree et al. Combinando estrutura e genômica para entender a resistência antimicrobiana. **Jornal de Biotecnologia Computacional e Estrutural**, 2020.

IKETLENG, Thato et al. *Mycobacterium Tuberculosis* Sequenciamento genético completo da próxima geração: oportunidades e desafios. **Pesquisa e tratamento da tuberculose**, v. 2018, 2018.

PÉREZ-LAGO, Laura et al. Análise de sequenciamento de todo o genoma da microevolução intrapaciente em *Mycobacterium Tuberculosis*: impacto potencial na inferência da transmissão da tuberculose. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 1, p. 98-108, 2014.

AMBROSETTI, Francesco et al. Modelagem de complexos anti-corpo-antígeno através de ancoragem orientada pela informação. **Estrutura**, v. 28, n. 1, p. 119-129. e2, 2020.

WAMAN, Vaishali P. et al. Mycobacterial genomics and structural bioinformatics: opportunities and challenges in drug discovery. **Micróbios emergentes e infecções**, v. 8, n. 1, p. 109-118, 2019.

GÓMEZ-TANGARIFE, Verónica J. et al. Resistencia a Medicamentos en *Mycobacterium Tuberculosis*: contribución de mecanismos constitutivos y adquiridos. **Revista de Salud Pública**, v. 20, p. 491-497, 2018.



DO CARMO GUIMARÃES, Jaciara de Lourdes et al. Sequenciamento de todo o genoma como uma ferramenta para estudar a microevolução de isolados de *Mycobacterium Tuberculosis* em série resistentes a drogas. **Tuberculose**, v. 131, p. 102137, 2021.

GOMEZ-GONZALEZ, Paula J. et al. Uma análise integrada de todo o genoma do *Mycobacterium Tuberculosis* revela insights sobre a relação entre seu genoma, transcriptoma e metiloma. **Relatórios científicos**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.