

## COMBINAÇÃO ENTRE DERIVADOS DA ISONIAZIDA E UM INIBIDOR DE BOMBAS DE EFLUXO EM *Mycobacterium tuberculosis* MULTIDROGA RESISTENTE

Débora Cássia Montaholi (PIC/BIOMED/Uem), Laíse Adriane Hegeto, Vera Lúcia D. Siqueira, Fábio Vandresen, Regiane B. Scodro, Rosilene F. Cardoso, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli (Orientador),  
e-mail: deh.cassia@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR.

### Ciências da Biológicas – Microbiologia

**Palavras-chave:** *M. tuberculosis*, sinergismo, isoniazida.

#### Resumo:

O objetivo do estudo foi avaliar a combinação de derivados da isoniazida (isoniazida S-limoneno (INH-S) e R-limoneno (INH-R)) com o composto piperina (PIP), uma substância inibidora de bombas de efluxo de fármacos em dois isolados clínicos de *M. tuberculosis* multidroga-resistente (3614 e 71A). A concentração inibitória mínima dos derivados da isoniazida e da piperina foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* (REMA) e o efeito combinatório entre os fármacos foi avaliado pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (REDCA). Foi considerado sinergismo quando o Índice da Fração Inibitória (IFI)  $\leq 0,5$  e Fator de Modulação (FM)  $\geq 4$ . Foi observado para a combinação PIP + INH-R, IFI = 0,27 (isolado 71A) e 0,185 (isolado 3614), para PIP + INH-S, IFI = 0,26 (isolado 71A) e 0,158 (isolado 3614). O FM confirmou o sinergismo (MF $\geq$ 4) indicado pelo IFI. Estes resultados satisfatórios podem agora nortear novas pesquisas na busca por novos tratamentos da tuberculose.

#### Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*. Segundo o Relatório Anual da Tuberculose publicado em 2017 pela Organização Mundial da Saúde, 84% dos casos confirmados de TB estão distribuídos entre 22 países, ranking no qual o Brasil ocupa o 20º lugar (WHO, 2016). Ainda por este relatório, a complexidade do esquema terapêutico desta moléstia é um dos fatores que acarreta o abandono do tratamento pelos pacientes, favorecendo um quadro oportunista ao surgimento e multiplicação cada vez mais frequentes de isolados resistentes aos fármacos utilizados. Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a combinação de derivados da isoniazida com o composto piperina (PIP), uma substância inibidora de bombas de efluxo (BEs) de fármacos em dois isolados clínicos de *M. tuberculosis* multidroga-resistente.

## **Materiais e métodos**

### **Amostras Bacterianas**

Foram selecionados e estudados dois isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* multi-droga resistente, 71A e 3614, e como controle a cepa *M. tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv) sensível a todos os fármacos proveniente da micobacterioteca do laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

### **Inibidores de Bombas de Efluxo e Antimicrobianos**

Os derivados da isoniazida, isoniazida S-limoneno (INH-S) e R-limoneno (INH-R), foram produzidos e gentilmente cedidos pelo Laboratório de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) coordenado pelo professor Fábio Vandresen. A piperina foi adquirida da Sigma e preparada conforme orientação do fabricante.

### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A concentração inibitória mínima (CIM) dos derivados de isoniazida para os isolados de *M. tuberculosis* e a cepa de referência, foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* - REMA em microplacas de 96 orifícios descrito por Palomino *et al.* (2002). A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir a mudança de cor da resazurina de azul para róseo (inibição do crescimento bacteriano).

### **Avaliação da Combinação entre derivados da isoniazida e inibidores da bomba de efluxo por REDCA**

A combinação entre os inibidores de bombas de efluxo e os derivados de isoniazida foi realizada em duplicata pelo método REDCA (*Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay*), um *chequerboard* modificado desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, que emprega resazurina como indicador de viabilidade celular (CALEFFI-FERRACIOLI *et al.*, 2013).

Para interpretar o efeito sinérgico entre os fármacos estudados foi utilizado o Índice da Fração Inibitória (IFI): sendo,  $IFI = (CIM A + B / CIM A) + (CIM B + A / CIM B)$ , onde: CIM A + B representa a CIM do fármaco A quando associada ao fármaco B; CIM B + A representa a CIM do fármaco B quando associada ao fármaco A; CIM A representa a CIM do fármaco A quando testado isoladamente; e CIM B representa a CIM do fármaco B quando testado isoladamente. O efeito das combinações dos agentes antimicrobianos foi classificado em: sinérgico ( $IFI \leq 0,5$ ); aditivo ou indiferente ou sem interação ( $IFI > 0,5 - 4$ ); e antagônico ( $IFI > 4$ ) (ODDS, 2003). O fator de modulação FM reflete a redução de valores de CIM de um dado antibiótico na presença do inibidor de efluxo e foi considerado significativo quando  $FM \geq 4$  (redução de quatro vezes) (COELHO *et al.*, 2015).

## **Resultados e Discussão**

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os compostos estudados em *M. tuberculosis* resistente e cepa padrão.

Cepa/ Isolados	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	PIP	INH-R	INH-S	PIP+ INH-R	PIP+INH-S
H <sub>37</sub> Rv	125	3,9	7,8	-	-
71A	625	625	625	19,5	9,75
3614	312	625	625	39	19,5

Tabela 2. Índice de Fração Inibitória (IFI) e o Fator de Modulação (FM) para as combinações estudadas entre derivados da isoniazida e piperina em *M. tuberculosis*

Cepa/ Isolados	IFI		FM	
	PIP+INH-R	PIP+INH-S	PIP+INH-R	PIP+INH-S
H <sub>37</sub> Rv				
71A	0,27	0,26	32	64
3614	0,185	0,158	16	32

Neste trabalho, o IFI foi o primeiro parâmetro utilizado para interpretar o sinergismo entre os compostos derivados da isoniazida e a piperina. Os procedentes estruturais da isoniazida apresentaram sinergismo com a piperina. O segundo parâmetro utilizado foi o FM que indica quantas vezes a CIM de um composto foi reduzida quando em associação com uma substância inibidora de bombas de efluxo, desse modo, constata-se que para ambos compostos estudados as reduções foram significativas.

Diante dos resultados expostos existem algumas especulações para essa combinação positiva: primeiramente a incorporação dos radicais S e R-limoneno à molécula original de isoniazida pode ter aumentado o tamanho da molécula permitindo assim que a mesma começasse a utilizar as bombas de efluxo para sair da célula bacteriana – visto que a isoniazida original por ser uma molécula pequena entra e sai da micobactéria por difusão passiva-assim, como as BEs estavam bloqueadas pela ação da piperina, a concentração da droga no interior da célula bacteriana aumentou e conseqüentemente a CIM diminuiu. Uma segunda hipótese é de que próprio radical limoneno unido aos derivados da isoniazida tenha contribuído com a diminuição da CIM dos fármacos, visto que o mesmo juntamente com outros terpenos possui propriedades antimicrobianas (DEANS; RITCHIE, 1987).

## Conclusões

O surgimento de isolados de *M. tuberculosis* resistentes circulantes na população reforça a necessidade de novas opções terapêuticas para o tratamento da TB. Como a formulação de um fármaco novo é dispendioso, demorado e burocrático, estudar derivados estruturais dos fármacos atualmente disponíveis, bem como estudar a combinação dos mesmos com inibidores de bomba de efluxo pode ser uma opção promissora. A

combinação de piperina com derivados da isoniazida se mostrou promissor indicando a necessidade da continuidade dos estudos com outros isolados clínicos a fim de se compreender melhor o sinergismo. Estes resultados satisfatórios podem agora nortear novas pesquisas na busca por novos tratamentos da tuberculose.

### Referências

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. et al. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method.

**Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 660–663, 2013.

COELHO, T. et al. Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–12, 2015.

DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 165–180, nov. 1987.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 12 jun. 2003.

PALOMINO, J. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.