

ESTUDO DA COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE COM PIPERINA EM *Mycobacterium tuberculosis*

Débora Cássia Montaholi (PIBIC/CNPq/UEM), Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, Laíse Adriane Hegeto, Aryadne Larissa de Almeida, Vera Lúcia Dias Siqueira, Regiane Bertin de Lima Scodro, Rosilene Fressati Cardoso (Orientadora), e-mail: deh.cassia@hotmail.com.

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

Ciências da Saúde – doenças infecciosas e parasitárias

Palavras-chave: Tuberculose, resistência, piperina.

Resumo:

O objetivo do estudo foi avaliar a ação combinada dos fármacos de primeira linha usados no tratamento da tuberculose (TB) tais como: isoniazida, etambutol, estreptomicina e rifampicina com piperina, uma substância promissora como inibidora de bombas de efluxo de fármaco na cepa de referência H₃₇Rv e em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* multidroga resistente. A concentração inibitória mínima dos fármacos e da piperina foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* e o efeito combinatório entre os fármacos foi avaliado pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay*. Fator de Modulação (FM) ≥ 4 foi considerado como modulação positiva do inibidor em relação aos fármacos antituberculosos. Foi observado FM > 4 para todos os bacilos de *M. tuberculosis* quando exposto a combinação PIP + RIF e PIP + SM. Estes resultados satisfatórios podem agora nortear outras pesquisas na busca por novos tratamentos da TB.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, dados publicados em 2016 no Relatório Anual da Tuberculose revelam que em 2015 foram estimados 10,4 milhões de novos casos de TB no mundo e 1,4 milhões de mortes decorrentes da doença. A prevalência da doença é fundamentada na dificuldade dos pacientes em seguir o longo tratamento poliquimioterápico, mas principalmente pela resistência adquirida pelos bacilos (WHO, 2017).

Depois de confirmado o diagnóstico da TB, a terapia poliquimioterápica inicia-se por dois meses (fase de ataque) com a combinação de isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (ETB) e pirazinamida (PZA) seguido por mais quatro meses com RIF e INH. Caso essa terapia não se mostre eficaz, inicia-se então o uso dos fármacos de segunda linha, com injetáveis como a estreptomicina, canamicina, etionamida, amicacina, terizidona e as quinolonas (ofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina). Com o aparecimento

de *M. tuberculosis* multidroga resistente (MDR) e extensivamente resistentes (XDR) caracterizadas pela perda da sensibilidade à RIF e INH no primeiro caso e no segundo perda também de sensibilidade aos fármacos de segunda linha, alguns pacientes não são curados pelo esquema terapêutico básico. As micobactérias possuem diferentes mecanismos que promovem a resistência aos fármacos, tais como: permeabilidade seletiva de membrana, bombas de efluxo, produção de enzimas capazes de modificar e inativar medicamentos ou mutação em genes alvo de fármaco.

As bombas de efluxo (BEs) induzem à resistência ao bombearem para fora das micobactérias os fármacos que nelas adentram, assim, tendo em vista esse processo, o uso de inibidores de bombas de efluxo (IBEs) já comprovados na literatura tais como verapamil, reserpina, haloperidol, entre outros, mostra-se uma opção promissora para uso na prática clínica.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito combinatório de fármacos de primeira linha usados no tratamento de TB com o inibidor de BE denominado piperina em *M. tuberculosis* multidroga-resistente e a cepa de referência H₃₇Rv.

Materiais e métodos

Cepa de referência e isolados clínicos de M. tuberculosis

Foram utilizadas para o presente estudo a cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294, e cinco isolados clínicos de *M. tuberculosis* MDR com diferentes perfis de resistência provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Soluções de RIF, INH, ETB, estreptomomicina (SM) e PIP foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração inibitória mínima (CIM) da piperina e dos fármacos antituberculose para os bacilos, foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* (REMA) em microplacas de 96 orifícios descrito por Palomino et al. (2002) que usa resazurina como indicador de crescimento bacteriano.

Avaliação da Combinação entre fármacos antituberculose e o inibidor de bomba de efluxo piperina.

A combinação entre PIP e fármacos antituberculose foi realizada de acordo com o perfil de resistência de cada isolado 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 os resultados foi calculado o fator de modulação (FM) que reflete a redução de valores de CIM, de um dado antibiótico, na presença do inibidor de BE. Foi considerado como ação significativa do inibidor em modular uma melhora na atividade do fármaco antituberculose quando $FM \geq 4$ (redução de

quatro vezes no valor da CIM do fármaco antituberculose) (COELHO et al., 2015).

Resultados e Discussão

Os valores de CIM estão apresentados na tabela 1 e estão de acordo com o perfil de susceptibilidade de cada bacilo aos fármacos estudados.

Tabela 1. Tabela da Concentração inibitória mínima (CIM) para os fármacos de acordo com a micobactéria estudada.

ISOLADOS	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE	CIM				
		PIP	RIF	SM	INH	ETB
H ₃₇ Rv	S	125	0,004	0,25	0,06	2
47S	INH ^R /RIF ^R	62,5	0,004	0,25	-	-
45	INH ^R /RIF ^R	31,2	31,2	0,25	4	-
109	INH ^R /RIF ^R	31,2	50	0,25	0,36	-
71A	INH ^R /RIF ^R /ETB ^R	125	50	1	12,5	8
3614	INH ^R /RIF ^R /ETB ^R	62,5	25	0,5	6,25	16

PIP = piperina; RIF = rifampicina; SM = estreptomicina; INH = isoniazida; ETB = etambutol.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados da combinação dos compostos estudados. Foi observado sinergismo entre a RIF ou SM com PIP (FM >4).

Tabela 2. Tabela demonstrativa dos resultados do Fator de modulação (FM) referente aos isolados clínicos estudados.

ISOLADOS	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE	FM			
		RIF/PIP	SM/PIP	INH/PIP	ETB/PIP
H ₃₇ Rv	S	4	4	-	-
47S	S	2	4	-	-
45	INH ^R /RIF ^R	1	2	1	-
109	INH ^R /RIF ^R	4	4	2	-
71A	INH ^R /RIF ^R /ETB ^R	8	4	1	1
3614	INH ^R /RIF ^R /ETB ^R	8	4	1	1

PIP = piperina; RIF = rifampicina; SM = estreptomicina; INH = isoniazida; ETB = etambutol.

A combinação entre a PIP e a RIF foi previamente estudada por Sharma et al. (2014), no qual a PIP foi responsável por diminuir de 4 até 8 vezes a CIM da RIF para os isolados utilizados. A concentração bactericida mínima também foi testada, obtendo-se valores de 1 mg/L para a RIF sozinha e 0,25 mg/L e 0,5 mg/L para a RIF combinada com 25 mg/L de PIP. No citado trabalho também foi analisado o efeito pós-antibiótico da RIF sozinha e em combinação com PIP, e em todos os tempos e concentrações testadas, a RIF exibiu efeito prolongado quando aliada a PIP.

Em relação à SM, o mecanismo de resistência dos bacilos a esse aminoglicosídeo ainda não é comprovadamente por bombas de efluxo, sabe-se que ocorre principalmente por modificação estrutural do alvo da droga. No

entanto, o fato de RIF e SM possuírem mecanismo de ação semelhante, ou seja, inibição da síntese proteica, poderia ser a razão da ocorrência do sinergismo em ambos os fármacos quando aliados a PIP. A combinação aditiva dos efeitos farmacológicos entre SM e PIP reforça a possibilidade do uso desta combinação em paciente infectados por bacilos multi-resistentes (Hegeto et al., 2018).

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 a combinação dos medicamentos que já são utilizados com inibidores de BE pode ser uma opção promissora. A combinação de PIP com os mesmos se mostrou promissora 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 TB.

Agradecimentos

A todos do Laboratório de Bacteriologia Clínica da UEM e ao CPNq pelo financiamento do projeto, cuja bolsa foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

WHO. Global tuberculosis report 2017 Geneva: World Health Organization; 2017.

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.

HEGETO, L. A. et al. *In vitro* combinatory activity of piperine and anti-tuberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v.111, p.35–40, 2018.

SHARMA, S. et al. Protective efficacy of piperine against *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 94, p.389–396, 2014.