

ASSOCIAÇÃO *IN VITRO* ENTRE CARBONILCIANETO *m*-CLOROFENIL-HIDRAZONA E FÁRMACOS DE PRIMEIRA ESCOLHA NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

Carolina Trevisolli Palomo (PIBIC/FA/UEM), João Vítor Perez de Souza¹; Letícia Sayuri Murase¹; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli¹; Regiane Bertin de Lima Scodro¹; Vera Lúcia Dias Siqueira¹; Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador), e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Maringá, PR

Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada, Microbiologia Médica

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, bombas de efluxo, Carbonilcianeto *m*-Clorofenil-Hidrazona

Resumo:

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, com altas taxas de mortalidade mundialmente, sendo uma preocupação devido à multirresistência aos fármacos utilizados no tratamento. A análise sequencial do genoma do *M. tuberculosis* mostrou que ele possui diversas bombas de efluxo, as quais possuem grande papel na resistência das micobactérias aos fármacos anti-TB. Tendo em vista o problema de saúde pública e a necessidade de novas estratégias de tratamento com menos efeitos colaterais e que sejam mais eficazes contra cepas resistentes, este trabalho teve por objetivo ampliar o conhecimento da ação sinérgica *in vitro* dos fármacos clássicos como isoniazida (INH) e rifampicina (RIF) com o inibidor de bomba de efluxo (IBE) carbonilcianeto *m*-clorofenil-hidrazona (CCCP). Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima dos fármacos pelo método *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) e a interação entre eles foi avaliada pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (REDCA) na cepa de referência H₃₇R_V e em isolados clínicos resistentes. Os resultados evidenciaram sinergismo entre RIF+CCCP em isolados multirresistentes indicando uma modulação da atividade da RIF pelo CCCP nos bacilos estudados. Novos estudos estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório a fim de esclarecer este efeito bem como a importância das bombas de efluxo como mecanismo de resistência aos fármacos anti-TB.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa e possui uma alta mortalidade mundial. É causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* e seu desenvolvimento e evolução é influenciado por fatores como aglomerados humanos, desnutrição e baixa resistência imunológica. O

tratamento da TB é realizado com associação de quatro fármacos nos dois primeiros meses, sendo isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida, seguido de quatro meses restantes por isoniazida e rifampicina. Estes possuem importantes efeitos colaterais, por isso, em alguns casos são abandonados antes do término da terapia. Essas falhas no tratamento podem levar à resistência aos fármacos rotineiramente selecionados e os mecanismos celulares envolvidos nesse processo são, principalmente, mutações no genoma de *M. tuberculosis* e atividade do sistema de bombas de efluxo, as quais são capazes de diminuir a concentração intracelular de diversos fármacos, reduzindo a sua eficácia clínica e contribuindo para a seleção de isolados resistentes (COELHO et al., 2015). Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito combinatório de rifampicina ou isoniazida com carbonilcianeto-*m*-clorofenil hidrazona (CCCP), um importante inibidor de bombas de efluxo, em *M. tuberculosis*.

Materiais e métodos

Cepa de referência, isolados clínicos de M. tuberculosis e preparo do inóculo bacteriano.

Foram utilizados *M. tuberculosis* H₃₇R_v ATCC 27294 e isolados clínicos de *M. tuberculosis* previamente identificados como sensíveis e resistentes à INH e RIF pelo método das proporções provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá. Foram cultivados em Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, USA) enriquecido com OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) e incubados por 15 dias a 37°C. As suspensões bacterianas foram padronizadas com escala de McFarland nº 1 e diluída 1:20 em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Soluções de INH, RIF e CCCP foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada fármaco para os isolados de *M. tuberculosis* e a cepa de referência, foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Assay Plate* - REMA em microplacas de 96 orifícios descrito anteriormente (PALOMINO et al., 2002).

Avaliação da interação entre CCCP com RIF e INH

A interação entre o inibidor e RIF ou INH foi avaliada em triplicata 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 do CCCP foi calculado o fator de modulação (FM) onde $FM = CIM_{\text{antimicrobiano}} / CIM_{\text{combinação}}$ que reflete a redução de valores de

CIM, de um dado antibiótico, na presença do inibidor de bomba de efluxo. 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

Neste estudo foram testados 14 isolados clínicos, além da cepa de referência H₃₇R_V. Destes, 6 isolados eram resistentes a, no mínimo, INH e RIF, sendo assim multirresistentes (MDR). As CIMs de RIF e INH variaram de 0,0039 a 50 mg/L e 0,03 a 12,5 mg/L, respectivamente. Diferente dos antimicrobianos, o inibidor mostrou uma variação menor de CIM, ficando entre 0,78 e 3,125 mg/L para todos os bacilos estudados, independente do perfil de resistência de cada um (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade, CIM de rifampicina e isoniazida, com e sem carbonilcianeto *m*-clorofenil-hidrazona, e calculo do fator modulador em *M. tuberculosis*

Isolados	Perfil de susceptibilidade	CIM (mg/L)					FM	
		CCCP	RIF	RIF + CCCP	INH	INH + CCCP	RIF + CCCP	INH + CCCP
H ₃₇ R _V	S	3,125	0,0039	0,0039	0,06	0,03	1	2
9S	S	1,56	0,0009	0,0009	0,06	0,03	1	2
46S	S	1,56	0,0039	0,0039	0,03	0,03	1	1
47S	S	3,125	0,0039	0,0039	0,06	0,06	1	1
25252	S	1,56	0,0039	0,0039	0,125	0,06	1	2
34R	INH ^R	3,125	0,0039	0,0039	6,125	3,125	1	2
91R	INH ^R	1,56	0,0039	0,0019	12,5	12,5	2	1
4250	INH ^R	1,56	0,0625	0,0625	6,25	6,25	1	1
64A	INH ^R /RIF ^R	1,56	25	6,25	12,5	6,25	4	2
73A	INH ^R /RIF ^R	3,125	3,125	1,56	6,25	3,125	2	2
109	INH ^R /RIF ^R	1,56	25	12,5	1,56	1,56	2	1
18	INH ^R /RIF ^R /EMB ^R	0,78	50	25	3,125	3,125	2	1
19	INH ^R /RIF ^R /EMB ^R	1,56	25	3,125	3,125	1,56	8	2
71A	INH ^R /RIF ^R /EMB ^R	3,125	50	6,25	12,5	6,25	8	2
3614	INH ^R /RIF ^R /EMB ^R	3,125	12,5	6,25	6,25	6,25	2	1

*S: sensível; R: resistente; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; EMB: etambutol; CCCP: carbonilcianeto *m*-clorofenil hidrazona; FM: Fator modulador. **Resultados em negrito indicam resultado significativo.

Para o Fator de Modulação, o qual indica redução de valores da CIM de um dado antibiótico na presença do inibidor de efluxo, foram encontrados valores significativos ($FM \geq 4$) somente para isolados MDR, sendo o isolado

64A FM=4, isolado 19 FM=8 e isolado 71A FM=8, nas combinações com RIF. Não houve resultados significativos para combinações com INH. Diante disso, podemos observar que todos os isolados que mostraram sinergismo com RIF+CCCP são classificados como MDR, demonstrando assim, um alto nível de resistência dessas micobactérias. Atualmente, administração de inibidores de transportadores de fármacos em combinação com medicamentos anti-TB disponíveis podem ser uma estratégia para melhorar a eficácia do tratamento enquanto esperamos desenvolvimento de novos medicamentos (TE BRAKE et al., 2018).

Conclusões

Os resultados evidenciaram sinergismo entre RIF+CCCP em isolados multirresistentes indicando uma modulação da atividade da RIF pelo CCCP em *M. tuberculosis* nestes isolados clínicos estudados. Novos estudos estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório a fim de esclarecer este efeito bem como a importância das bombas de efluxo como mecanismo de resistência aos fármacos anti-TB.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a PPG/UEM e a Fundação Araucária (FA) pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

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, nov. 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.

PALOMINO, J.-C. 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, ago. 2002.

TE BRAKE, L. H. M. et al. The Role of Efflux Pumps in Tuberculosis Treatment and Their Promise as a Target in Drug Development: Unraveling the Black Box. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 58, n. 1, p. annurev-pharmtox-010617-052438, 2018.