

Atividade de moxifloxacino combinado com inibidores de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*

Giulienne Karla Pereira da Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Carolina Trevisolli Palomo, João Vítor Perez de Souza; Letícia Sayuri Murase; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli; Regiane Bertin de Lima Scodro; Vera Lúcia Dias Siqueira; Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador), e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências biológicas III, Microbiologia.

Palavras-chave: Tuberculose, inibidores de bombas de efluxo, resistência.

Resumo

A tuberculose (TB) é causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, requer tratamento longo o que leva a importantes efeitos colaterais. Em casos de TB multirresistente, ou seja o bacilo apresenta resistência a isoniazida e rifampicina, o fármaco moxifloxacino (MXF) tem sido utilizado para o tratamento desses casos. Uma estratégia em estudo é a combinação de fármacos anti-TB com inibidores de bombas de efluxo (IBE). O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade e o efeito combinatório, *in vitro*, de IBEs com MXF em *M.tuberculosis*. Foi determinada a CIM dos compostos pelo método *resazurin microtiter assay plate* (REMA) e a combinação entre eles por *resazurin drugs combination microtiter assay* (REDCA) em *M.tuberculosis*. Embora o sinergismo não tenha sido observado, para alguns isolados clínicos, IBE foi capaz de modular o efeito de MXF contra *M.tuberculosis*. Aparentemente, os sistemas de efluxo não se mostram uma importante via de resistência para MXF e a continuidade deste estudo em *M.tuberculosis* resistentes fornecerá informações adicionais sobre mecanismos de resistência e possível aplicação deste esquema terapêutico nos pacientes com TB.

Introdução

A tuberculose (TB) tem se destacado mundialmente como uma grande preocupação em saúde pública, devido ao surgimento de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes, maiores taxas de mortalidade e poucas opções de fármacos para o tratamento (WHO, 2019). Causada principalmente por *M. tuberculosis*, requer um tratamento de longa duração com associação de fármacos, sendo isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA). Este esquema, além de longo, apresenta diversos efeitos colaterais no paciente, levando a frequentes abandonos da terapia (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2013). O moxifloxacino (MXF), derivado de metoxial C-8, tem sido considerado como uma das fluoroquinolonas mais promissoras para novos esquemas de tratamento da TB

em episódios de falha com os fármacos anti-TB. A sua capacidade de penetrar nos tecidos e acumular-se nos macrófagos, juntamente com sua longa meia-vida, alta concentração plasmática e atividade em concentrações baixas, torna-o uma adição de MXF promissora ao número restrito de fármacos ativos contra *M. tuberculosis* (TORTOLI; DIONISIO; FABBRI, 2017).

A resistência aos medicamentos anti-TB ocorre principalmente por mutações espontâneas no genoma do *M. tuberculosis* ou ainda por atividade de bombas de efluxo (BEs), que são proteínas transportadoras envolvidas na eliminação de substâncias tóxicas da célula, diminuindo a concentração intracelular de diversos fármacos e contribuindo para a seleção de isolados resistentes. A análise sequencial do genoma mostra que *M. tuberculosis* possui múltiplas BEs

Neste sentido, a administração de inibidores de bombas de efluxo (IBEs) em combinação com medicamentos anti-TB pode ser uma estratégia eficaz no tratamento desta doença. Entre os inibidores estudados, o carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP), verapamil (VP) e piperina (PIP) tem mostrado resultados promissores.

Tendo em vista a TB como problema de saúde pública mundial, a falta de opções terapêuticas para tratamento de formas multirresistentes da doença, a dificuldade e demora no desenvolvimento de novos fármacos, estudos sobre o sinergismo entre fármacos disponíveis, a fim de encurtar o tempo de tratamento e reduzir os efeitos colaterais se faz necessário. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade e a ação combinatória, *in vitro*, de IBEs com MXF em *M. tuberculosis*.

Materiais e métodos

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

Foram estudados *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) e isolados clínicos de *M. tuberculosis* previamente identificados como sensíveis e resistentes aos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da TB provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá. Os bacilos foram semeados em Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, USA) enriquecido com OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) e incubados por 15 dias a 35 °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 MXF e de IBEs (VP, CCCP e PIP), foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração inibitória mínima (CIM) de MXF e IBEs para os isolados de *M. tuberculosis* e a cepa de referência, foi determinada em triplicata pelo método *resazurin microtiter assay plate* (REMA) em microplacas de 96 orifícios (PALOMINO et al., 2002).

Avaliação da combinação de MXF com IBEs

O efeito combinatório entre compostos foi determinado em triplicata pelo método *resazurin drugs combination microtiter assay (REDCA)*, 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 modulador dos IBEs sobre o MXF, foi calculado o fator de modulação (FM) onde $FM = CIM_{\text{antimicrobiano}} / CIM_{\text{combinação}}$. FM reflete a redução de valores da CIM de um dado antibiótico na presença do IBE. Foram considerados resultados significativos, quando $FM \geq 4$ (redução de quatro vezes) (COELHO et al., 2015).

Resultados e Discussão

Tabela 1 Concentração inibitória mínima de moxifloxacino, carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona, verapamil e piperina isoladamente e em combinação contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Isolados	Perfil de susceptibilidade	CIM (mg/L)						FM			
		MXF	CCCP	VP	PIP	MXF+ CCCP	MXF+ VP	MXF+ PIP	MXF+ CCCP	MXF+ VP	MXF+ PIP
H ₃₇ Rv	S	0,06	1,56	250	62,5	0,06	0,06	0,03	1	1	2
47S	S	0,03	1,56	125	62,5	0,03	0,03	0,015	1	1	2
73A	INH ^R /RIF ^R	1	0,78	125	62,5	1	0,5	1	1	2	1
71A	INH ^R /RIF ^R /EMB ^R	0,03	1,56	125	62,5	0,03	0,015	0,03	1	2	1
3614	INH ^R /RIF ^R /EMB ^R	0,03	0,78	125	125	0,03	0,03	0,03	1	1	1

*S: sensível; R: resistente; MXF: moxifloxacino; CCCP: carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona; VP: verapamil; PIP: piperina; FM: fator modulador

Neste estudo foram avaliados 4 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, sendo 3 deles resistentes a, no mínimo, INH e RIF (multirresistentes - MDR) e cepa de referência H₃₇Rv. A CIM do antimicrobiano MXF variou, de acordo com os isolados, de 0,03 a 1 mg/L. Já as CIMs dos IBEs VP, CCCP e PIP foram de 125 a 250 mg/L, 0,78 a 1,56 mg/L e 62,5 a 125 mg/L, respectivamente (Tabela 1).

As combinações de MXF+IBEs não mostraram modulação significativa nos na ação de MXF contra os bacilos estudados. Porém houve redução da CIM para alguns isolados clínicos MDR, principalmente nas combinações de MXF+VP (FM = 2) (Tabela 1). As CIMs encontradas para MXF+IBE foram de 0,03 a 1 mg/L, de acordo com os isolados, e sugerem uma alternativa favorável para tratamentos da doença MDR-TB, sendo recomendado pela Organização Mundial da Saúde o uso da FQ nesses casos. A necessidade de novos fármacos para o tratamento de pacientes com TB resistente, torna o estudo com FQs e IBEs importante, devido sua capacidade de penetrar nos tecidos (TORTOLI; DIONISIO; FABBRI, 2017). Levando em consideração que utilizamos um número restrito de isolados, é necessário novos estudos que incluam uma quantidade maior de isolados clínicos.

Conclusões

As associações entre MXF e IBEs não apresentaram ação modulatória, porém as CIMs de MXF, principalmente quando associado ao VP tiveram redução em sua concentração, o que mostra uma associação possível tendo em vista a prevenção do surgimento de mutação, o que poderia conferir resistência definitiva ao MXF. Diante disso, a continuidade deste estudo em bacilos resistentes a FQs se faz necessário e poderá fornecer informações detalhadas sobre mecanismos de resistência e a possível aplicação deste esquema terapêutico nos pacientes com 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.

TORTOLI, E.; DIONISIO, D.; FABBRI, C. Evaluation of Moxifloxacin Activity In Vitro Against *Mycobacterium tuberculosis*, Including Resistant and Multidrug-Resistant Strains. v. 9478, n. August, 2017.

WHO. **WHO guidelines on tuberculosis infection prevention and control**. Geneva: [s.n.].