

AÇÃO DE COMPOSTOS SINTÉTICOS COM PROVÁVEL ATIVIDADE DE INIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASE (IACHÉ) EM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

Luiza Fajardo Spricigo (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Dra. Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador), Dra. Regiane Bertin de Lima Scodro, Dra. Aryadne Larissa de Almeida, Dr. Diego A. dos Santos Yamazaki, Dra. Gisele de Freitas Gauze Bandoch. e-mail: rfcardoso@uem.br;

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

Área de Microbiologia e subárea de Microbiologia Médica.

Palavras-chave: Tuberculose, *resazurin microtiter plate assay* (REMA), IACHÉ.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de compostos sintéticos com possível ação de IACHÉ por meio da metodologia REMA na cepa *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos com diferentes perfis de resistência. As CIMs (concentração inibitória mínima) contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos, para as 14 substâncias testadas os resultados de CIM variaram de 31,25 a >250 µg/mL, e de 62,5 a >250 µg/mL, frente à cepa de referência e aos isolados clínicos, respectivamente. Foi concluído, portanto, que os compostos sintéticos avaliadas no presente estudo demonstraram baixa atividade contra *M. tuberculosis* e isolados clínicos, entretanto, novos testes devem ser realizados frente a outros microrganismos para confirmação de sua atividade.

Introdução

A tuberculose (TB), doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, está entre as 10 principais causas de morte no mundo, e a principal causa de morte ocasionada por um único agente infeccioso, superando até o HIV. Em 2018, tivemos 1,5 milhões de mortes por TB, e no mesmo ano, foi estimado que cerca de 10 milhões de pessoas contraíram a doença mundialmente (WHO, 2020), apenas o Brasil contribuiu para este número com cerca de 95 mil novos casos. Cerca de um quarto da população mundial está infectada com *M. tuberculosis*, portanto, estão em risco de desenvolver a doença (WHO, 2019).

A TB multirresistente (MDR-TB), cepa resistente a pelo menos rifampicina (R) e isoniazida (H), continua sendo um problema de saúde pública. Há também cepas extensivamente resistentes (TB-XDR), que são aquelas que

além da resistência à R e H, também apresentam à fluoroquinolonas e aos fármacos injetáveis de segunda linha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Neste sentido, a busca de novos fármacos ou mesmo a utilização de fármacos já liberados para uso e com atividade para tratamento de outras doenças, devem ser testados sua atividade anti *M. tuberculosis*. A busca de novos fármacos envolve diferentes abordagens e para isto uma imensa quantidade desses ainda precisam ser estudados. Kapp e colaboradores (2017) estudaram a atividade anti-TB de inibidores de acetilcolinesterase (IACHe) e tal investigação demonstrou que além da atividade de neuroproteção, a mesma apresenta atividade anti-TB.

Nesse contexto, uma vez que em estudos prévios foi determinado a ação de IACHe em *M. tuberculosis*, aumenta o interesse na busca de novos compostos inibidores sintéticos e testá-los contra *M. tuberculosis*, na tentativa de descobrir compostos que podem inibir o crescimento do bacilo.

Materiais e métodos

1. Obtenção dos compostos.

Compostos derivados de IACHe foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Departamento de Química da UEM, e estão descritos na Tabela 1.

2. Cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv, isolados clínicos e preparo do inóculo bacteriano.

Foram utilizadas para o presente estudo a cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 e isolados clínicos com diferentes perfis de resistência, incluindo isolados multidroga resistentes com mutações previamente determinadas, proveniente da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica da UEM. A cepa de referência, assim como os isolados clínicos, foi semeada em *Middlebrook* 7H9 suplementado com OADC (Ac. Oléico, Albumina, Dextrose e Catalase) e incubados por 15 dias a 35-37 °C.

3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Soluções dos derivados de IACHe foram diluídas serialmente à razão 1:2 para a obtenção de uma concentração final de 2000 a 1,95 µg/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) dos derivados para a cepa de referência *M. tuberculosis* e isolados clínicos foram determinados pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* - REMA em microplacas de 96 orifícios descrito por Palomino *et al.* (2002).

Nas microplacas para o método REMA, os compostos foram serialmente diluídos em *Middlebrook* 7H9 suplementado com OADC e em seguida foi adicionado o inóculo bacteriano previamente padronizado de acordo com a turvação correspondente à escala 1 de McFarland e diluído na razão 1:20

em *Middlebrook* 7H9 suplementado com OADC. As microplacas foram seladas e incubadas a 35-37 °C em atmosfera normal por 7 dias. Após esse período, 30 µL de solução de resazurina 0,01% (Acros, Morris Plains, NJ, USA) recém preparada, foi adicionada a cada orifício e as placas foram reincubadas a 35-37 °C por 24h para posterior leitura visual.

A mudança da cor azul para rosa pela redução da resazurina foi considerada como presença de crescimento bacteriano. 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).

Resultados e Discussão

Foi determinado a atividade anti-TB de 14 substâncias sintéticas frente a *M. tuberculosis* cepa de referência e 5 isolados clínicos com diferentes perfis de resistência. Os resultados são mostrados na Tabela 1. Os valores de CIM variaram de 31,25 µg/mL a >250 µg/mL para *M. tuberculosis* H₃₇Rv, 62,5 µg/mL a >250 µg/mL para os demais isolados clínicos. Foi detectada pouca variação nos valores de CIM das substâncias em cepa padrão e isolado clínico com resistência aos principais fármacos anti-TB. Em exceção, as substâncias C2NV e C2N4 apresentaram uma atividade ligeiramente melhor no bacilo sensível (CIM 31,25 µg/mL), enquanto que a substância TZLP mostrou-se mais eficiente em todos os isolados clínicos resistentes testados que na cepa sensível (CIM 62,5 µg/mL).

Tabela 1. Perfil de sensibilidade e concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias sintéticas em *Mycobacterium tuberculosis*.

Substâncias sintéticas	CIM (µg/mL)					
	H ₃₇ Rv*	309**	73A**	71A**	Brf07	3614**
IACHÉ	H ₃₇ Rv*	309**	73A**	71A**	Brf07	3614**
CVNV	250	125	250	125	>250	250
C2NV	31,2	125	>250	125	250	250
C4N4	>250	>250	>250	250	>250	>250
C2N4	31,2	125	250	62,5	250	125
CVN4	>250	>250	>250	250	>250	>250
C4NV	250	125	250	125	125	125
C2N3	250	250	>250	125	>250	250
C4N3	62,5	62,5	250	62,5	125	125
C2NM	250	250	250	125	250	250

CVN3	250	62,5	250	>250	>250	125
OXON	62,5	62,5	125	62,5	125	62,5
TZAB	250	250	>250	>250	>250	>250
TZLP	250	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
TZAE	250	125	125	125	250	250

CIM: concentração inibitória mínima; IACHÉ: inibidores de acetilcolinesterase; *: cepa padrão de *M. tuberculosis*; **: isolado clínico multidroga resistente (MDR).

Conclusões

Foi concluído que os compostos sintéticos avaliadas no presente estudo demonstraram baixa atividade contra *M. tuberculosis* e isolados clínicos, entretanto, novos testes devem ser realizados frente a outros microrganismos para confirmação de sua atividade.

Agradecimentos

Ao CNPq, à Universidade Estadual de Maringá, ao laboratório de Bacteriologia Médica, a Professora Dra. Rosilene Fressatti Cardoso, meu orientador, à Dra. Aryadne Larissa de Almeida, por todo apoio e disposição.

Referências

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 144, 2019.

KAPP, E. *et al.* **Versatility of 7-Substituted Coumarin Molecules as Antimycobacterial Agents, Neuronal Enzyme Inhibitors and Neuroprotective Agents**. *Molecules*, Suíça: v. 22, n.10, p.164, 2017.

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, 2002.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2019**. Out. 2019. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 03 ago. 2020.

WHO. **Key Facts**. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>>. Acesso em: 02 ago. 2020.