

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DO 6,7-DEHIDROOILEANONA EM ASSOCIAÇÃO COM A PIRAZINAMIDA

Maria Gabriela Robles de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Eloísa Gibin Sampiron, Vanessa Pietrowski Baldin, Ana Paula Desiree de Oliveira, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli e Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: rblscodro@uem.br

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

Microbiologia – Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Tuberculose, 6,7-dehidrooileanona, *checkerboard*.

Resumo

A tuberculose, causada principalmente por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é uma patologia infecciosa e transmissível, que afeta principalmente os pulmões. Com o aparecimento de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos utilizados no tratamento, é de significativa importância a descoberta de novas substâncias com atividade antimicobacteriana. Diante disso, a presente pesquisa avaliou a atividade da substância isolada 6,7-dehidrooileanona, extraída do óleo essencial de *Tetradenia riparia*, associada à pirazinamida (PZA) contra isolados clínicos de *M. tuberculosis* através do método resazurin drugs combination microtiter assay (REDCA), em pH 6,0. Foram testados três isolados clínicos de *M. tuberculosis* multirresistentes (71A, 73A e 3614). Apesar de não ter sido encontrado sinergismo, em nenhuma combinação foi observado antagonismo. O melhor valor para o índice de fração inibitória fracionada (FICI) foi encontrado para o isolado clínico 73A, pois ambas as concentrações inibitórias mínimas diminuíram, com FICI de 0,56. Considerando que os valores de FICI obtidos para os três isolados clínicos demonstram efeito aditivo entre as duas substâncias, este estudo confirma a possibilidade de uso desta associação sem prejudicar a eficácia de ambos, além disso, amplia a possibilidade no desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos.

Introdução

A tuberculose é uma doença infecciosa e altamente contagiosa que afeta primordialmente os pulmões. Causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK), a tuberculose é transmitida predominantemente através das vias aéreas. No Brasil, em 2018, cerca de 72.788 novos casos de tuberculose foram registrados, tornando-a um importante problema de saúde pública no país (WHO, 2019).

Outro motivo de grande preocupação é o aparecimento de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos utilizados atualmente no tratamento, sendo mais comum a resistência à isoniazida e rifampicina, o que leva a uma procura cada vez maior por substâncias com propriedades anti-*M. tuberculosis* (PALUCCI et al., 2020). O

tratamento da tuberculose é poliquimioterápico, pois é feito a partir da administração de quatro fármacos combinados: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida (WHO, 2019). Com o aparecimento de bactérias resistentes a estes antibióticos tornou-se imprescindível buscar novas substâncias que possam apresentar sinergismo com estes medicamentos visando à melhoria no tratamento e a redução das taxas de desenvolvimento de resistência bacteriana.

Tetradenia riparia (Hochst.) Codd da Família Lamiaceae, conhecida popularmente como incenso ou falsa mirra, é um arbusto presente em toda a África tropical e seu óleo essencial possui diversas propriedades medicinais (GAZIM et al., 2010). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da associação entre o 6,7-dehidrooleanona (6,7-D) e a PZA frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis*, em pH 6.0. É importante que as substâncias de interesse sejam testadas em pH 6.0 a fim de mimetizar uma possível atividade intramacrofágica da substância, visto que no interior dos macrófagos e das lesões pulmonares há um ambiente ácido (CAMPANERUT et al., 2011).

Materiais e métodos

A combinação entre 6,7-D e a PZA foi avaliada frente a três isolados clínicos pelo método resazurin drugs combination microtiter assay (REDCA), como padronizado por Caleffi-Ferracioli et al. (2013). Para esse ensaio o meio de cultura 7H9 foi previamente acidificado (pH 6.0). Inicialmente, foram adicionados 100 µL de meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC em cada orifício de uma microplaca de 96 poços. Então, adicionou-se 100 µL da PZA no eixo y da microplaca, e realizada uma diluição seriada desse fármaco (3.200 – 12,5 µg/mL). Então, 100 µL de 6,7-D foram acrescentados a cada orifício do eixo x da microplaca, seguida de uma diluição seriada (125 – 0,98 µg/mL). Para o preparo das bactérias, foram utilizados crescimentos bacterianos de 15 a 21 dias dos isolados clínicos de interesse (71 A, 73 A e 3614). As bactérias foram padronizadas de acordo com a escala 1 de McFarland, feita uma diluição 1:20, e então 100 µL foram adicionados a cada poço da microplaca. A microplaca foi, em seguida, incubada em estufa a 35 °C por 7 dias. Para revelá-la foram adicionados 30 µL de uma solução de resazurina a 0,02%, as placas foram reincubadas por 24h a 35 °C.

Para determinar o FICI (índice de concentração inibitória fracionada) dos compostos calculou-se: $FICI = (CIM A + B / CIM A) + (CIM B + A / CIM B)$, sendo A o 6,7-dehidrooleanona e B a pirazinamida. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento bacteriano. Os efeitos das combinações dos agentes antimicrobianos foram classificados em: sinérgico ($FICI \leq 0,5$), aditivo ou indiferente ($FICI > 0,5$ e < 4) e antagonico ($FICI > 4$).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para o ensaio de REDCA estão descritos na tabela 1. Foi possível observar que para o isolado clínico 71A, a CIM da PZA foi > 3200 µg/mL, enquanto a CIM encontrada para 6,7-D foi de 62,5 µg/mL. Quando em associação, tais CIMs se mantiveram com valores iguais. Sendo assim, ao calcular o FICI, cujo

resultado foi 2, concluímos que embora não tenhamos observado efeito sinérgico entre as substâncias, também não foi observado antagônico do 6,7-D com a PZA.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e índice de fração inibitória (FICI) do 6,7-dehidrooileanona e da pirazinamida frente a isolados clínicos resistentes a fármacos antituberculose.

Isolados clínicos	Perfil de resistência	CIM (µg/mL)			FICI
		PZA	6,7-D	PZA/6,7-D	
71 A	INH ^R , RIF ^R , PZA ^R	>3.200	62,5	>3.200/62,5	2
73 A	INH ^R , RIF ^R , PZA ^R	>3.200	31,25	1.600/1,95	0,56
3614	INH ^R , RIF ^R , EMB ^R , ETH ^R , SM ^R	1.600	31,25	1.600/31,25	2

INH: isoniazida; EMB: etambutol; RIF: rifampicina; PZA: pirazinamida; ETH: Etionamida; SM: estreptomicina; 6,7-D: 6,7-dehidrooileanona; ^R: resistente.

Para o isolado clínico 73A, a CIM encontrada para a PZA foi de >3200 µg/mL, enquanto a CIM para o 6,7-D foi de 31,25 µg/mL. Quando associados, ambos os valores de CIM diminuiram. A CIM foi de 1.600 µg/mL para a PZA e 1,95 µg/mL para o 6,7-D. Calculando o valor de FICI (FICI 0,56) pudemos concluir que apesar de as substâncias serem aditivas quando em associação, o resultado ficou muito próximo do sinergismo.

Em relação ao isolado clínico 3614, o valor da CIM observada para o PZA foi de 1.600 µg/mL e 31,25 µg/mL para o 6,7-D. Quando combinados, tais CIMs mantiveram os mesmos valores. Desta forma, ao calcular o valor de FICI, observamos que apesar de não apresentarem sinergismo, as substâncias associadas também não apresentam efeito antagônico.

Sendo assim, foi possível constatar que o efeito da associação do 6,7-D com a PZA nos 3 isolados clínicos foi aditivo (FICI >0,5 e < 4), ou seja, a substância pura não interfere na ação do fármaco e vice-versa, e por isso, poderiam ser utilizados em associação em um esquema de tratamento sem prejudicar a eficácia de ambos.

Conclusões

Considerando que os valores de FICI obtidos para os três isolados clínicos multirresistentes demonstram efeito aditivo entre 6,7-dehidrooileanona e a pirazinamida, este estudo confirma a possibilidade de uso desta associação sem prejudicar a eficácia de ambos, além disso, amplia a possibilidade no desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer imensamente ao CNPq pela bolsa recebida durante o projeto e principalmente pela oportunidade. Agradeço também à Profa. Dra. Regiane Bertin de Lima Scodro pela confiança e por toda a orientação recebida e à Eloísa Gibin Sampiron, Vanessa Pietrowski Baldin e Andressa Takeshiro, que foram essenciais para a realização deste 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, 2013.

CAMPANERUT, P. A. Z. et al. Rapid detection of resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* using the resazurin microtitre assay. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 66, n. 5, p.1044-1046, 2011.

GAZIM, Z. C. et al. Seasonal variation, chemical composition and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5509-5524, 2010.

PALUCCI, I. et al. Inhibition of transglutaminase 2 as a potential host directed therapy against *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2020.

WHO. Global tuberculosis report 2019. Disponível em: www.who.int/tb/publications/global-report/en/. Acesso em: 18 ago. 2020.