

## INTERFERÊNCIA DA ALBUMINA NA AÇÃO DE FÁRMACOS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

Amanda Larissa Dias Leme (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Addressa Lorena Ieque, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, Vanessa Guimarães Alves-Olher, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: rblscodro@uem.br

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

**Área e subárea:** Microbiologia - Microbiologia Aplicada

**Palavras-chave:** tuberculose, CIM, REMA

### Resumo:

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, na qual a infecção ocorre por meio da inalação de gotículas expelidas por pessoas infectadas, acometendo principalmente o pulmão. O tratamento da TB é considerado longo e complexo, visto que são necessários cerca de 6 meses e o uso de vários medicamentos em conjunto para se atingir a cura. Dentre os ensaios utilizados na pesquisa de um novo fármaco, o ensaio *in vitro* contendo os principais componentes do plasma sanguíneo procura simular as condições encontradas *in vivo*. Neste sentido, neste trabalho foram realizados testes para avaliar a atividade de *N*-salicilhidrazonas frente a *M. tuberculosis* em três condições: (a) 10% de soro fetal bovino (SFB), (b) 10% de soro de cavalo (SC), e (c) concentração de 4% de albumina de soro bovino (ASB). O método utilizado para a realização desses testes para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi o *resazurin microtiter assay plate* (REMA). A CIM das substâncias testadas frente a *M. tuberculosis* variou de 0,48 a >250 µg/mL. De modo geral, os valores de CIM com SFB, SC e ASB foram superiores aos valores obtidos nos experimentos de referência (meio de cultura com OADC). Sendo assim, algumas *N*-salicilhidrazonas demonstraram ser candidatas a futuros fármacos anti-TB, pois apresentaram atividade *in vitro* em diferentes suplementos que contêm albumina, principal proteína sanguínea. Estes estudos são importantes para se conhecer a interação entre proteínas e candidatos a fármacos anti-TB e melhorar o entendimento da metabolização destas substâncias.

### Introdução

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*. A infecção acontece quando o indivíduo inala gotículas que são expelidas pela tosse, espirro ou fala de pessoas enfermas. Quando a doença se instala no

pulmão, o indivíduo pode apresentar os sintomas mais clássicos, que são: tosse por mais de três semanas, febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento (BRASIL, 2011). O tratamento da tuberculose na forma pulmonar normalmente é realizado por um período de 6 meses, utilizando esquema poliquimioterápico, no qual quatro medicamentos são usados em conjunto: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida.

A busca por novas substâncias que apresentem atividade anti-TB tem aumentado ao longo dos anos, em razão dos altos índices de resistência dessa bactéria, dos fortes efeitos colaterais e do abandono do tratamento. Por conta disso, novas substâncias vêm sendo estudadas como possíveis candidatas a fármacos anti-TB. As hidrazonas são moléculas orgânicas classificadas como bases de Schiff que possuem um amplo espectro de atividade, onde diversos benefícios estão sendo relatados por vários grupos de pesquisa. Levando em consideração as excelentes propriedades biológicas das hidrazonas, pesquisadores estão procurando sintetizar novos derivados desta substância, por meio de modificações em sua estrutura química. Cardoso *et al.* (2014) desenvolveram e testaram contra *Mtb* uma série de *N*-acilhidrazonas que continham o núcleo tiofeno. Dentre as substâncias testadas, algumas demonstraram atividade contra o bacilo.

Dentre os ensaios utilizados na pesquisa de um novo fármaco, o ensaio *in vitro* contendo os principais componentes do plasma sanguíneo procura simular as condições encontradas *in vivo*. Por conta disso, neste trabalho foram realizados testes em três condições: 10% de soro fetal bovino (SFB), 10% de soro de cavalo (SC) e 4% de albumina de soro bovino (ASB) (PAVAN *et al.*, 2011). Visto isso, para melhorar o entendimento do papel da albumina na ação de fármacos, o presente estudo procurou avaliar a interferência da albumina na ação de um fármaco de referência (isoniazida) bem como de outras substâncias puras em *Mycobacterium tuberculosis*.

## Materiais e métodos

A atividade anti-TB foi determinada frente à cepa padrão de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) pelo método *resazurin microtiter assay plate* (REMA), conforme descrito por Palomino *et al.* (2002). Foi utilizada uma microplaca estéril de 96 poços, depositado 100 µL de meio 7H9 nos poços centrais e 200 µL de água destilada estéril nos poços mais externos da placa, com incubação a 35°C. As substâncias (ACH5, AC4, 10, 11, 15, 16, SHA e ACC) e o fármaco de referência (isoniazida) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados 100 µL no segundo poço de cada linha teste. Foi feita uma diluição seriada na placa de 96 poços, do segundo poço da placa até o décimo. A cepa de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv foi previamente cultivada a 35°C em Middlebrook 7H9-OADC e padronizada até atingir a turvação nº 1 de McFarland. As culturas foram diluídas 1:20 e 100 µL da diluição foram inoculados em cada um dos poços contendo as soluções das substâncias. As microplacas foram fechadas e incubadas a 35°C por 7 dias. Após este período, adicionou-se 30 µL de solução de resazurina (0,02%) em todos os poços. As placas foram novamente

incubadas por 24 horas a 35°C. A presença da cor azul nos poços, que é característica da resazurina, foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano, e o desenvolvimento de cor rósea como presença. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento bacteriano.

## Resultados e Discussão

Os resultados da avaliação de atividade anti-TB das oito *N*-salicilhidrazonas e da isoniazida, em 7H9 enriquecido com OADC, SFB, SC ou ASB estão dispostos na tabela 1. Comparando os resultados obtidos nos experimentos utilizando SFB, SC, ASB com os resultados obtidos em experimentos feitos somente com a suplementação padrão do meio 7H9 com OADC (suplemento a base de ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), observou-se que, no geral, os valores de CIM foram superiores aos valores obtidos nos experimentos de referência, com exceção das substâncias 15, 16 e SHA que mantiveram a mesma CIM ou com diferença de apenas uma diluição. Essa variação na CIM provavelmente se deve a composição dos soros e da ASB ser diferente da composição do OADC, visto que esses compostos contêm grandes quantidades de albumina. Sabe-se que a interação entre proteínas e fármacos tem importantes implicações nos processos de metabolização destas substâncias, podendo exercer efeitos importantes na distribuição, concentração livre e atividade destes fármacos.

**Tabela 1:** Resultados da avaliação de atividade anti-TB de oito *N*-salicilhidrazonas e da isoniazida, frente a *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv em meio de cultura (7H9) enriquecido com OADC ou soro fetal bovino (SFB) ou soro de cavalo (SC) ou albumina de soro bovino (ASB).

Substâncias	Meio com OADC*	Meio com SFB	Meio com SC	Meio com ASB
	(µg/mL)			
ACH5	62,5	>250	3,9	NR
AC4	31,2	>250	>250	62,5
10	7,8	31,2	31,2	>250
11	3,9	7,8	15,6	62,5
15	15,6	62,5	31,2	31,2
16	31,2	31,2	31,2	31,2
SHA	15,6	NR	31,2	NR
ACC	0,48	15,6	7,8	NR
Isoniazida	0,06	0,03	0,06	0,05

\*Método padrão; NR: Não realizado; OADC: ácido oleico, albumina, dextrose e catalase.

A CIM das substâncias ACH5, AC4, 10, 11 aumentaram na presença de soro ou de albumina pura como suplemento, algumas delas alcançando CIM >250 µg/mL. Apesar de, a ACC, ter aumentado sua CIM na presença de SFB e SC, a sua atividade frente ao bacilo causador da tuberculose ainda é considerada muito promissora. Vale destacar que a isoniazida foi utilizada como fármaco padrão controle para auxiliar na garantia da validade do experimento.

## Conclusões

Considerando os resultados obtidos, algumas *N*-salicilhidrazonas demonstraram ser candidatas a futuros fármacos anti-TB, pois apresentaram atividade *in vitro* contra *M. tuberculosis* em diferentes suplementos que contêm albumina, que é a principal proteína presente no sangue humano.

## Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida, a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regiane Bertin de Lima Scodro pela confiança, à doutoranda Andressa Lorena Ieque por todo o apoio necessário e à equipe do laboratório de Bacteriologia Médica pela orientação que foi fundamental na realização deste projeto.

## Referências

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011.

CARDOSO, L. N. *et al.* Anti-tuberculosis evaluation and conformational study of *N*-acylhydrazones containing the thiophene nucleus. **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v. 347, n. 6, p. 432-448, 2014.

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**, Bethesda, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PAVAN, F. R. *et al.* Ruthenium (II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 46, n. 10, p. 5099-5107, 2011.