

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINE DANIELE FURLAN PAGLIOTTO

Avaliação da interação *in vitro* da Amoxicilina/Clavulanato de Potássio com
Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Linezolida contra *Mycobacterium*
tuberculosis

Maringá

2013

ALINE DANIELE FURLAN PAGLIOTTO

Avaliação da interação *in vitro* da Amoxicilina/Clavulanato de Potássio com Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Linezolida contra *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof.^a Dr.^a Rosilene Fressatti Cardoso

Maringá

2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALINE DANIELE FURLAN PAGLIOTTO

Avaliação da interação *in vitro* da Amoxicilina/Clavulanato de Potássio com Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Linezolida contra *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Rosilene Fressatti Cardoso
Universidade Estadual de Maringá (UEM) (Presidente)

Prof. Dr. José Rodrigo Pandolfi
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Prof^ª. Dr. Fernando Rogério Pavan
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Fiorini
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof^ª. Dr^ª. Silvana Martins Caparroz Assef
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Aprovada em: 21 de março de 2013.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho aos meus pais, que me deram a base para minha formação pessoal e profissional. E ao meu marido, por estar sempre ao meu lado me dando força e sempre acreditando no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sabedoria e força para superar os obstáculos, e nunca me deixar desistir;

Aos meus pais Alice e Nilton, pelo apoio, compreensão, carinho e amor, por sempre acreditarem em mim e me dar forças para continuar em busca dos meus objetivos, e principalmente por estarem sempre presentes;

Ao meu marido Sidnei, pelo amor, carinho, paciência e compreender por muitas vezes a minha ausência em nossa casa;

Ao meu irmão Wilton, minha cunhada Gesseli e minha sobrinha Elisa, que mesmo estando longe, sempre torceram por mim;

À minha orientadora professora Dr.^a Rosilene Fressatti Cardoso, meus sinceros agradecimentos, pelos ensinamentos, dedicação, preocupação, carinho na realização deste trabalho, e pela oportunidade de desenvolvê-lo;

À professora Katiany, o meu muito obrigada, pelo carinho, pela amizade, força e ajuda sempre nos momentos precisos;

Às professoras do Laboratório de Bacteriologia Médica, Vera e Regiane, pelos ensinamentos, apoio e incentivo dispensados.

Às farmacêuticas bioquímicas Sônia e Rúbia, por todo apoio na realização deste trabalho.

Aos técnicos e laboratório, Soninha, Edilene e Marcos pelo companheirismo e paciência durante a realização dos experimentos.

Às alunas de pós-graduação, Paula, Luciana, Renata, Cláudia, Fernanda, Flaviane, Aline Lemes e Mariana, e iniciação científica Vanessa pela colaboração e amizade.

Aos meus colegas de trabalho, que sempre me deram apoio, incentivo e força para nunca desistir;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar)

Avaliação da interação *in vitro* da Amoxicilina/Clavulanato de Potássio com Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Linezolida contra *Mycobacterium tuberculosis*

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo *M. tuberculosis* a espécie mais importante clinicamente. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2011 aconteceram 8,7 milhões de novos casos em todo o mundo. A quimioterapia tradicional da TB tem limitações devido a cepas resistentes e aos efeitos secundários de alguns fármacos. Estes problemas têm sido exacerbados por surtos com TB multidrogas resistentes (MDR-TB) e a co-infecção AIDS/TB. Uma alternativa para o tratamento da TB é a associação de fármacos já utilizados para outras bactérias, obtendo efeito sinérgico e conseqüente diminuição de doses. O método *checkerboard* é usado para avaliar a combinação antimicrobiana e verificar se o efeito dos fármacos combinados é significativamente maior do que resultados dos fármacos empregados separadamente. A amoxicilina/clavulanato de potássio (AMO/CLAV) já vem sendo estudada em alguns trabalhos, que apresentam resultados promissores e sugerem novas pesquisas para melhor interpretação. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação sinérgica, *in vitro*, da AMO/CLAV em combinação com os fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e linezolida (LINE) contra a cepa de referência e 23 isolados de *M. tuberculosis*. Na combinação da AMO/CLAV com INH, houve sinergismo em oito isolados clínicos (33,33%). Entre a RIF e a AMO/CLAV houve sinergismo em dezenove isolados clínicos (79,16%). Na interação com o EMB, houve sinergismo na cepa de referência H₃₇Rv e com dezenove isolados clínicos (79,16%). Já em associação a LINE, houve sinergismo em apenas cinco isolados clínicos (20,83%). Nossos estudos mostram que AMO/CLAV é bastante promissor para estudos futuros como auxiliar no tratamento de cepas resistente de *M. tuberculosis*. Da mesma forma com os resultados obtidos da interação da AMO/CLAV com os fármacos anti-TB, seu uso em associação no tratamento também poderia contribuir para a redução da dosagem de INH, RIF e principalmente do EMB que apresentam importantes efeitos colaterais para o paciente.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, *Checkerboard*, Sinergismo, Amoxicilina/Clavulanato de Potássio

In vitro interaction of Amoxicillin / Clavulanate Potassium with Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol and Linezolid against *Mycobacterium tuberculosis*

ABSTRACT

The Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, and *M. tuberculosis* is, clinically, the most important specie. According to the World Health Organization (WHO), took place in 2011 8.7 million new cases worldwide. The traditional chemotherapy of TB has limitations due resistant strains and the side effects of some drugs. These problems have been exacerbated by outbreaks with multi-resistant strains (MDR-TB). An alternative for the treatment of TB is the association of new compounds with the drugs already used, obtaining synergic effect and consequent decrease of doses. The checkerboard method is used to evaluate the antimicrobial combination and check whether the effect of the drugs combined is significantly greater than the results of drugs used separately. The amoxicillin / clavulanate potassium (AMO / CLAV) has already been studied in some papers, and present an interesting result and suggests further research to better interpretation. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of AMO / CLAV in combination with the drug isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol (EMB) and linezolid (LINE) against *M. tuberculosis* and verify the synergistic action of these compounds. In the combination of AMO / CLAV with INH, there was synergism in eight clinical isolates (33.33%). Between RIF and AMO / CLAV there was synergism in nineteen clinical isolates (79.16%). In the interaction with the EMB, there was synergism in reference strain H₃₇Rv and clinical isolates with nineteen (79.16%). Already in association with LINE, there was synergism in just five clinical isolates (20.83%). Our studies show that AMO / CLAV is very promising for future studies in treatment of anti-TB drugs and aid in the treatment of MDR-TB. Similarly to the results of the interaction of AMO / CLAV with anti-TB drugs, their use in combination in treatment could contribute to reducing the dosage of INH, RIF and especially the EMB showing important side effects for the patient.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Checkerboard, Synergism, Amoxicillin / Clavulanate Potassium.

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas da ABNT (Capítulo I) e da
publicação científica (Capítulo II): *Plos One*
Disponível em:
<http://www.plosone.org/static/guidelines>

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I.....	11
1.1 Introdução.....	11
1.2 Justificativa.....	16
1.3 Objetivos.....	17
1.4 Referências	17
2 CAPÍTULO II.....	22
2.1 Avaliação da interação <i>in vitro</i> da Amoxicilina/Clavulanato de Potássio com Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Linezolida contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
3 CAPÍTULO III.....	37
3.1 Conclusões	37
3.2 Perspectivas Futuras.....	37

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é historicamente um importante problema de saúde pública no mundo, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Trata-se de uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* que assume evolução crônica (BIERRENBACH et al., 2007). Acomete principalmente pessoas na faixa etária correspondente a plena capacidade produtiva, afetando os setores de baixa renda da população, acarretando enorme prejuízo econômico ao país (MINION et al., 2013).

No ano de 2011, estima-se que ocorreram aproximadamente 9 milhões de novos casos de TB (125/100.000 habitantes), responsável por cerca de 1,4 milhões de óbitos. Desses óbitos, aproximadamente 430.000 foram de pessoas co-infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2012).

O Brasil ocupa o 17º lugar no ranking dos 22 países que concentram 80% dos casos de TB em todo o mundo, com o maior número de casos notificados, sendo 84.137 notificações e incidência de 42/100.000 habitantes (WHO, 2012). Atualmente, a TB é a segunda causa de óbitos por doenças infecciosas e a primeira entre pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (VEZIRIS et al., 2011).

As precárias condições de moradia ocasionadas pela falta de política social e habitacional no cenário urbano, atreladas a desemprego, migração para grandes centros, situação de pobreza financeira de parte da população, entre outros determinantes sociais, contribuem para o surgimento de áreas vulneráveis ao desenvolvimento da TB. A vulnerabilidade dos indivíduos à TB resulta na marginalização da população em relação aos locais de moradia, dificuldade de acesso aos serviços de saúde e falta de representação social (MACQ et al., 2007).

A TB é transmitida basicamente pelo ar e pode atingir todos os órgãos do corpo, porém como o bacilo se reproduz e se desenvolve rapidamente em áreas do corpo com alta concentração de oxigênio, o pulmão é o principal órgão atingido. O espirro ou tosse de uma pessoa doente e bacilífera joga no ar cerca de dois milhões de bacilos que permanecem em suspensão durante horas. Os sintomas da TB são geralmente tosse crônica, febre, suor noturno, dor no tórax, anorexia e adinamia (SOUZA, VASCONCELOS, 2005).

O diagnóstico da TB resume-se a relação entre diagnóstico clínico e laboratorial, embora a confirmação ainda depende da baciloscopia e cultura da amostra clínica, seguido de uma bateria de provas bioquímicas para a identificação da espécie micobacteriana. A microscopia direta, após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen, ainda é o método mais utilizado no diagnóstico bacteriológico da TB, por ser rápido e barato, embora tenha baixa sensibilidade e especificidade, necessitando da presença de pelo menos 5.000 bacilos/mL de escarro para que haja positividade na baciloscopia (BOLLELA et al., 1999). No Brasil, a cultura para *M. tuberculosis* e o teste de sensibilidade aos fármacos no início do tratamento estão indicados apenas nos casos considerados como de risco para resistência primária (recidiva de TB, história de internação hospitalar, ter sido preso, ser morador de rua e presença de comorbidades, como infecção pelo HIV) ou para resistência adquirida (principalmente história de problemas de adesão ao tratamento) (BASTOS et al., 2012; CONDE et al., 2009).

No Brasil, o esquema básico de tratamento para todos os casos de TB em adultos e adolescentes (mais de 10 anos de idade), exceto a forma meningoencefálica, consiste em dois meses de tratamento com isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB), em comprimidos com dose fixa combinada dos quatro fármacos (4 em 1), seguido por quatro meses com INH e RIF (ARBEX et al., 2010).

A INH é um dos mais importantes fármacos no tratamento da TB. INH é um pró-fármaco que necessita ser ativado pela enzima catalase/peroxidase (KatG) do *M. tuberculosis*, conseqüentemente produzindo radicais reativos de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrato) e radicais orgânicos que inibem a formação de ácido micólico da parede celular, causando dano ao DNA e subsequente morte do bacilo (ARBEX et al., 2010; ZHANG, 2005; SLAYDEN et al., 2000).

A RIF, um fármaco de grande importância no tratamento da TB, inibe a transcrição gênica da micobactéria por bloqueio da RNA polimerase DNA dependente, o que impede a síntese de RNA mensageiro (RNAm) e de proteínas pelo bacilo, produzindo morte celular (ARBEX et al., 2010; RAMASWAMY, MUSSER, 1998).

O EMB foi sintetizado em 1961 e é utilizado no tratamento da TB desde 1966. Apresenta ação na biossíntese de arabinogalactano, principal polissacarídeo da parede celular da micobactéria. Atua inibindo a enzima arabinosil transferase codificada pelo gene *embB*, que media a polimerização de arabinose para arabinogalactano (ARBEX et al., 2010).

Com base nos modelos *in vitro* e *in vivo*, atualmente compreendem-se bem as particularidades da multiplicação diferenciada do *M. tuberculosis*, conforme a oferta de oxigênio. Isto é, distintas velocidades de crescimento nos meios intra e extracelulares, nas lesões caseosas fechadas, e nas paredes das lesões cavitárias. Com isso se diferenciam populações de multiplicação geométrica (mais sensíveis à ação dos medicamentos) daquelas persistentes (multiplicação lenta ou intermitente), que exigem tempo prolongado de uso dos medicamentos para sua eliminação. Assim se fundamentam as bases terapêuticas da associação medicamentosa para neutralizar os bacilos naturalmente resistentes, e do tempo longo de tratamento para eliminação dos persistentes, como ocorre nas formas resistentes (COLE,1994).

No Brasil, apesar da disponibilização gratuita dos medicamentos, a taxa de cura ainda é baixa, 72%, enquanto a OMS preconiza 85% (WHO, 2011). As principais dificuldades no tratamento da TB estão na duração do tratamento, de seis a doze meses, no número de doses e nos efeitos colaterais como náuseas, vômitos, icterícia, perda de equilíbrio, asma, alterações visuais, diminuição de audição, neuropatia periférica e até cegueira (SOUZA,VASCONCELOS, 2005).

Os pacientes portadores de bacilos resistentes a INH e RIF constituem um grupo de doentes classificados como portadores de TB multidrogas resistente (MDR-TB). Para esses casos, foi proposto um esquema constituído por estreptomicina, EMB, terizidona, pirazinamida e uma quinolona (levofloxacina ou ofloxacina). Na impossibilidade de se utilizar estreptomicina, essa deve ser substituída por amicacina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; CONDE et al., 2009; ARBEX et al., 2010). Pacientes portadores de TB extensivamente resistente (XDR-TB) que são aquelas resistentes também a qualquer fluoroquinolona e aos fármacos injetáveis de segunda linha, devem ser encaminhados para centros de referência terciários e utilizarem esquemas individualizados com fármacos de reserva, que incluem capreomicina, moxifloxacina, ácido para-aminossalicílico e etionamida (ARBEX et al., 2010; CONDE et al., 2009).

A necessidade de novos fármacos tem causado renovado interesse, tanto em testar moléculas derivadas de antituberculosos e outros fármacos já conhecidos, quanto na busca de novas substâncias isoladas de extratos de vegetais ou de fermentação microbiana (TELLES et al., 2000).

Amoxicilina/Clavulanato de Potássio (sal do ácido clavulânico) (AMO/CLAV) é um antibiótico betalactâmico associado a um inibidor das betalactamases. Essa combinação permite o tratamento de infecções por bactérias que resistem à amoxicilina, por produzir beta-lactamases. A amoxicilina possui ação bactericida e seu efeito depende da sua capacidade para unir-se às proteínas ligadoras de penicilinas (PLPs), localizadas na parede celular bacterianas. Inibe a divisão celular e o crescimento e produz lise e alongação das bactérias sensíveis, particularmente as que sofrem rápida divisão, pois possuem maior grau de sensibilidade à ação das penicilinas. O clavulanato de potássio inibe de forma irreversível as beta-lactamases. Não possui atividade antibacteriana própria e utiliza-se uma relação clavulanato:amoxicilina de 1:4 (GILMAN et al., 2006).

A AMO/CLAV tem sido utilizada com sucesso no tratamento de pacientes com MDR-TB quando a combinação foi administrada com medicamentos de segunda linha (NADLER et al., 1991; SEGURA et al., 1998).

Chambers et al. (1998), evidenciaram que o uso de AMO/CLA reduziu a carga de *M. tuberculosis* no escarro dos pacientes com TB pulmonar, sugerindo que β -lactâmicos possuem atividade antimicobacteriana e propondo que estudos adicionais seriam necessários para avaliar o seu papel na terapia.

Abate et al. (1998), obtiveram bons resultados testando diferentes concentrações de AMO/CLA em cepas de *M. tuberculosis* tratadas com EMB. Os autores sugerem que a combinação de β -lactâmicos com ácido clavulânico, foi mais eficaz do que a amoxicilina sozinha.

Estudos *in vitro* demonstraram que β -lactâmicos tem atividade antimicobacteriana quando associados com o clavulanato, portanto, eles tem um efeito sinérgico quando combinado com EMB. Além disso, os dados clínicos indicaram que β -lactâmicos tem uma perspectiva promissora para o uso em tratamento de pacientes com MDR-TB (GETAHUN, 2000; VARSHOCHI et al., 2006).

Varshochi et al. (2006), relataram que AMO/CLA foi eficaz contra as cepas sensíveis e resistentes de *M. tuberculosis*, e ainda sugere que avaliação das atividades de β -lactâmicos em combinação com outros fármacos antituberculosos poderiam ser de grande ajuda.

Normalmente os β -lactâmicos são ineficazes contra o *M. tuberculosis*, sendo rapidamente hidrolisados pelo produto do gene *BlaC* codificado cromossomicamente. A classe carbapenem de β -lactâmicos é um substrato muito pobre para a enzima *BlaC*, porém quando associada com o clavulanato, é bem mais eficaz. De acordo com Hugonnet et al. (2009), AMO/CLAV é um dos melhores substratos para *BlaC*, e a inativação completa da enzima *BlaC* seria necessária para manter as concentrações inibitórias do antibiótico.

Em 2011, Veziris et al. testaram carbapenêmicos combinados com clavulanato, em ratos tuberculosos, e tiveram um resultado encorajador e justificando novos testes. Demonstraram *in vivo* que carbapenêmicos foram agentes promissores no tratamento da tuberculose, uma vez que estas drogas têm atividade bactericida contra as cepas XDR-TB, se associadas com o clavulanato.

Um membro da classe de antibióticos oxazolidinono, a linezolida (LINE), inibe a síntese de proteínas por ligação à porção de ARN ribossômico 23S (rRNA) da subunidade 50S do ribossoma bacteriano. A LINE é eficaz no tratamento de pacientes XDR-TB, por converter a cultura positiva para negativa, mas os pacientes devem ser cuidadosamente monitorados para eventos adversos (LEE et al., 2012).

Diaz et al. (2003) demonstraram que a existência de sinergismo entre RIF e LINE é muito importante, especialmente em casos de colônias que são resistentes a INH. Desta forma, os autores sugerem que a avaliação da atividade sinérgica dos compostos deve ser realizada com outras cepas e outras metodologias, tais como modelos animais, a fim de avaliar a sua verdadeira importância clínica.

O método *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) vem sendo usado para estudos de detecção de resistência em micobactérias e tem demonstrado uma boa correlação dos resultados quando comparado com o método das proporções (PALOMINO et al., 2002; MARTIN et al., 2003; FRANZBLAU et al., 2005). O REMA utiliza a resazurina como agente revelador da atividade biológica. A resazurina, de cor azul, é reduzida a resofurina, de cor rosa e fluorescente, e não precipita após ser reduzida; porém o mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não está bem esclarecido, o qual pode ocorrer por reações químicas em células viáveis. Além da facilidade de execução e custo menor quando da utilização da resazurina, este corante apresenta a vantagem de obter um resultado mais rápido quando comparado ao método das proporções (PALOMINO et al., 2002; ARANTES et al., 2005; MARTIN et al., 2003).

O método *checkerboard* é usado para avaliar a combinação de fármacos antimicrobianos e verificar se há sinergismo, ou seja, analisar se o efeito dos fármacos combinados é significativamente maior que o resultado dado pelos fármacos empregados separadamente (PILLAI et al., 2005). Estudos recentes usaram a técnica de *checkerboard* para avaliar combinações potencialmente sinérgicas contra *M. tuberculosis*, entre os antimicrobianos etambutol, estreptomicina, claritromicina, minociclina, ciprofloxacino, levofloxacino, sparfloxacino, gatifloxacino e sitafloxacino (BHUSAL et al., 2005).

Para avaliar o efeito sinérgico na técnica de *checkerboard* utiliza-se o Índice da Fração Inibitória (IFI) (ORMI, 2001), sendo, $IFI = (CIM A + B / CIM A) + (CIM B + A / CIM B)$, onde: CIM A + B representa a CIM (Concentração Inibitória Mínima) da droga A quando associada a droga B. CIM B + A representa a CIM da droga B quando associada a droga A. CIM A representa a CIM da droga A quando testada isoladamente, CIM B representa a CIM da droga B quando testada isoladamente.

A somatória dos IFIs foi utilizada para a classificação dos efeitos, de acordo com Odds (2003) onde: sinérgico ($\sum IFI \leq 0,5$), aditivo ou indiferente ($\sum IFI > 0,5 - 4$) e antagônico ($\sum IFI > 4$).

JUSTIFICATIVA

De acordo com o abordado acima, a resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos disponíveis é uma preocupação mundial, pois não há muita variedade de medicamentos disponíveis para o tratamento da TB. Isto mostra a necessidade de estudos em busca de fármacos eficazes para seu tratamento.

A descoberta de novos fármacos representa um desafio, devido a particularidades do *M. tuberculosis*, que apresenta população com crescimento lento e tem uma parede celular rica em lipídios, o que o torna, de certa forma, protegido contra ação de um significativo número de fármacos.

Espera-se que os novos agentes possam reduzir a duração total do tratamento, serem compatíveis com os fármacos já existentes, apresentar uma ação sinérgica e quando possível não interferir com outros medicamentos que o paciente utiliza.

Diante disso, em nosso estudo trabalhamos com fármacos já conhecidos no mercado e aprovados para uso em seres humanos, que tem seu mecanismo de ação confirmado e testado

em outras bactérias. Dessa forma, associar esses fármacos com drogas já usadas no tratamento da TB pode ser promissor.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicobacteriana *in vitro* da combinação de Amoxicilina/Clavulanato de Potássio com fármacos INH, RIF, EMB e LINE.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a CIM da AMO/CLAV, INH, RIF, EMB e LINE para a cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv e para isolados clínicos sensíveis e resistentes à INH e outros fármacos, utilizando o REMA;
- Determinar a ação sinérgica, *in vitro*, da associação da AMO/CLAV e INH para a cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos sensíveis e resistentes;
- Determinar a ação sinérgica, *in vitro*, da associação da AMO/CLAV e EMB para a cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos sensíveis e resistentes;
- Determinar a ação sinérgica, *in vitro*, da associação da AMO/CLAV e RIF para a cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos sensíveis e resistentes;
- Determinar a ação sinérgica, *in vitro*, da associação da AMO/CLAV e LINE para a cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos sensíveis e resistentes.

REFERÊNCIAS

ABATE, G.; MIORNER, H. Susceptibility of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* to amoxicillin in combination with clavulanic acid and ethambutol: **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.42, p.735-740, 1998.

ARANTES, V.P.; SATO, D.N.; VILEGA, S.W. et al. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicadas**, v.26, p.195-198, 2005.

ARBEX, M.A.; VARELLA, M.C.L.; SIQUEIRA, H.R.; MELLO, F.A.F. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs: **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.36, n.5, p.626-640, 2010.

BASTOS, G.M.; CEZAR, M.C.; QUEIROZ, F.C.Q.; CONDE, M.B. Prevalence of primary drug resistance in pulmonary tuberculosis patients with no known risk factors for such: **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.38, n.6, p.733-739, 2012.

BHUSAL, Y.; SHIOHIRA, C.M.; YAMANE, N. Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*: **Int J Antimicrob Agents**, v.26, p.292-297, 2005.

BIERRENBACH, A.L.; GOMES, A.B.F.; NORONHA, E.F.; SOUZA, M.F.M. Incidência de tuberculose e taxa de cura, Brasil, 2000 a 2004: **Revista Saúde Pública**, v.41, n.1, p.24-33, 2007.

BOLLELA, V.R.; SATO, D.N.; FONSECA, B.A.L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar: **Revista Saúde Pública**, v.33, n.3, p.281-286, 1999.

CHAMBERS, H.F.; KOCAZ, T.; SIPIT, T.; TURNER, J.; HOPEWELL, P. Activity of Amoxicillin/Clavulanate in Patients with Tuberculosis: **Clinical Infectious diseases**, v. 26, p.874-877, 1998.

COLE, S.T. *Mycobacterium tuberculosis*: drug resistance mechanisms: **Trends Microbiol.**, v.10, p.411-415, 1994.

CONDE, M.B.; MELO, F.A.; MARQUES, A.M.; CARDOSO, N.C.; PINHEIRO, V.G.; DALCIN, P.D.E. T, et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis: **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.10, p.1018-1048, 2009.

DIAZ, J.C.; RUIZ, M.; LÓPEZ, M.; ROYO, G. Synergic activity of fluoroquinolones and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis*: **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.354-356, 2003.

FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; MCLAUGHLIN, J.C. et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay: **J. Clin. Microbiol**, v.36, p.362-366, 1998.

GETAHUN, A. Anti-tuberculosis activity of β -lactam antibiotics: prospect for the treatment of MDR tuberculosis: **Ethiop J Health**, v.14, n.3, p.276-296, 2000.

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. As bases Farmacológicas da Terapêutica. 11^a. ed., McGraw Hill. New York, USA, 2006.

HUGONNET, J.E.; TREMBLAY, L. W.; BOSHOFF, H.; BARRY, C.E. Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*; **Science**, v.323, p.1215-1218, 2009.

LEE, M. et al. Linezolid for Treatment of Chronic Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: **The New England journal of medicine**, v.367, n.16, p.1508-1518, 2012.

MACQ, J.; TORFOSS, T.; GETAHUN, H. Patient empowerment in tuberculosis control: reflecting on past documented experiences: **Tropical Medicine and International Health**, v.12, n.7, p.873-885, 2007.

MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method: **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.11, p. 3616-3619, 2003.

MINION, J.; GALLANT, V.; WOLFE, J.; JAMIESON, F.; LONG, R. Multidrug and Extensively Drug-resistant Tuberculosis in Canada 1997–2008: Demographic and Disease Characteristics: **Plos One**, v.8, n.1, p.1-8, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose Situação da Tuberculose no Brasil, 2011.

NADLER, J. P.; BERGER, J. A.; NORD, J.; COFSKY, R.; SAXENA, M. Amoxicillin clavulanic acid for treating drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: **Chest**, v.99, p.1025-1026, 1991.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them: **J Antimicrob Chemother**, v.52, p.1, 2003.

ORME, I. Program TDS: Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, p.1943-1946, 2001.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.2720-2722, 2002.

PILLAI, S.K.; MOELLERING, R.C.; ELIOPOULOS, G.M. Antimicrobial Combinations in Antibiotics in Laboratory Medicine. In: Victor Lorian MD (ed) Fifth edition, Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia USA., p.365-440, 2005.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: **Tuber Lung Dis.**, v.79, n.1, p.3-29, 1998.

SEGURA, C.; SALVADO, M.; COLLADO, I.; CHAVES, J.; COIRA, A. Contribution of β -Lactamases to β -Lactam Susceptibilities of Susceptible and Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates: **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.6, p. 1524-1526, 1998.

SLAYDEN, R.A.; BARRY, C.E. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infect.**, v.2, n.6, p.659-669, 2000.

SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A. Drugs against tuberculosis: past, present and future: **Quim Nova**, v.28, p.678-682, 2005.

TELLES, M.A.S.; MOSCA A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 59, p.16-19, 2000.

VARSHOCHI, M.; RASTGAR, M.H.; RAFFI, A.; NAGILI, B. In-vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to amoxicillin-clavulanate: Iranian **Journal of Clinical Infectious Diseases**, v.1, n.3, p. 121-125, 2006.

VEZIRIS, N.; TRUFFOT, C.; MAINARDI, J.; JARLIER, V. Activity of Carbapenems Combined with Clavulanate against Murine Tuberculosis: **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.6, p.2597-2600, 2011.

WHO. Global tuberculosis control: WHO 2012 Report, Geneva, **World Health Organization**, 2012.

WHO. Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings. , **World Health Organization**, 2011.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets: **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.45, p.529-564, 2005.

CAPÍTULO II

Artigo: “Avaliação da interação *in vitro* da Amoxicilina/Clavulanato de Potássio com Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Linezolida contra *Mycobacterium tuberculosis*”

**Avaliação da interação *in vitro* da Amoxicilina/Clavulanato de Potássio
com Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Linezolida contra
*Mycobacterium tuberculosis***

Aline Daniele Furlan Pagliotto¹, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli², Mariana Aparecida
Lopes³, Rosilene Fressatti Cardoso²,

¹*Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, PR.* ²*Departamento de
Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, PR.*

³*Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual de Maringá, PR.*

Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo 5790, Bloco T-20 –
Sala 05, 78020-900, Maringá, Paraná, Brasil E-mail: rfcardoso@uem.br

Telefone 55 44 3011 4797; Fax 55 44 3011 4797

Resumo

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, que constitui um importante problema de saúde pública, que acomete milhares de pessoas anualmente no mundo. Este estudo teve como objetivo avaliar a interação *in vitro* da Amoxicilina/Clavulanato de Potássio (AMO/CLAV), com isoniazida, etambutol, rifampicina e linezolida. Para avaliar a interação foi utilizado o método *checkerboard* bidimensional e o Índice de Fração Inibitória ($\Sigma IFI \leq 0,5$ foi considerado sinérgico, $\Sigma IFI > 0,5 - 4$ aditivo ou indiferente e $\Sigma IFI > 4$ antagônico). Foram utilizados vinte e três isolados clínicos de *M. tuberculosis* e a cepa de referência H₃₇Rv. Na combinação da AMO/CLAV com isoniazida, houve sinergismo em oito isolados clínicos (33,33%); com a rifampicina, dezenove isolados clínicos (79,16%); com o etambutol, houve sinergismo com cepa de referência H₃₇Rv e dezenove isolados clínicos (79,16%) e com a linezolida, apenas em cinco isolados clínicos (20,83%). Não foram obtidos nenhum resultado antagônico. Os resultados mostram que a AMO/CLAV é bastante promissor para estudos futuros como auxiliar no tratamento de TB causada por cepas resistente de *M. tuberculosis*. Da mesma forma com os resultados obtidos da interação da AMO/CLAV com os fármacos anti-TB, seu uso em associação no tratamento poderia contribuir para a redução da dosagem de INH, RIF e principalmente do EMB que apresentam importantes efeitos colaterais para o paciente.

INTRODUÇÃO

Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que afeta principalmente os pulmões sendo causada por *Mycobacterium tuberculosis*. O bacilo é transmitido pela tosse, espirro ou mesmo pela fala, por aerossóis contaminados com o bacilo[1].

A TB continua sendo um grave problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, voltando a ocupar papel de destaque entre as principais doenças infectocontagiosas. Muitos foram os fatores que contribuíram para isso, podendo-se destacar a desigualdade social, os aglomerados populacionais, os movimentos migratórios, o envelhecimento da população, o aparecimento cada vez mais comum de cepas resistentes aos fármacos utilizados e o surgimento, na década de 80, da “Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA)” ou “Acquired Immuno Deficiency Syndrome (AIDS)” [2].

No ano de 2011, estima-se que ocorreram 9 milhões (variando de 8,3 a 9,0 milhões) de novos casos de TB (125/100.000 habitantes), que levou a um número aproximado de 1,4 milhões de óbitos/ano. Desses óbitos, aproximadamente 430.000 foram de pessoas co-infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) [1].

O diagnóstico da TB resume-se em uma relação entre diagnóstico clínico e laboratorial, embora a confirmação ainda dependa da baciloscopia e cultura da amostra clínica, seguido de uma bateria de provas bioquímicas para a identificação da espécie micobacteriana [3], [4], [5].

A Organização Mundial da Saúde recomenda que o tratamento da forma ativa da TB seja realizado em um esquema com administração diária de isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) durante dois meses, seguido de INH e RIF durante quatro meses. A falha no fornecimento adequado dos medicamentos ou adesão do paciente ao tratamento resulta na emergência de cepas de *M. tuberculosis* resistentes [1].

Nos casos de resistência é necessário tratamento com outros fármacos muitas vezes menos potentes, mais tóxicos, de maior custo e por tempo prolongado quando comparado à terapia padrão [6], [7], [8].

A necessidade de novos fármacos ativos contra o bacilo causador da TB é urgente e tem causado renovado interesse, tanto em testar moléculas derivadas de antituberculosos já conhecidos, quanto na busca de novas substâncias isoladas de extratos de vegetais ou de fermentação microbiana [9].

Amoxicilina/Clavulanato de Potássio (AMO/CLAV) é uma associação (1:4) de antibiótico betalactâmico e um inibidor das betalactamases que vem sendo usada no

tratamento de infecções por bactérias resistentes à AMO (amoxicilina), por produzir beta-lactamases. A AMO possui ação bactericida por ligar-se às proteínas ligadoras de penicilinas (PLPs), na parede celular bacteriana, inibindo a divisão celular e produzindo lise e alongação das bactérias sensíveis [10], [11], [12], [13], [14], [15].

Encontrar novos fármacos para o tratamento da TB representa um grande trabalho e desafio. Espera-se que os novos agentes possam reduzir a duração total do tratamento [16], ser compatíveis com os fármacos já existentes, apresentar uma ação sinérgica e se possível não interagir com outros medicamentos [17]. Para isso, o método *checkerboard* vem sendo usado para avaliar a combinação antimicrobiana e verificar se há sinergismo entre fármacos, ou seja, analisar se o efeito dos fármacos combinados é significativamente maior que o resultado dado pelos fármacos empregados separadamente [18].

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação, *in vitro*, da AMO/CLAV quando usada em combinação com INH, EMB, RIF e linezolida (LINE) contra *M. tuberculosis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras bacterianas

Neste estudo, foi utilizada uma cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 sensível, dez isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis a INH, RIF, PZA e EMB e treze resistentes a INH e outros fármacos antituberculosos, determinado pelo método das proporções em meio de Löwenstein-Jensen [19], selecionados da coleção de micobactérias do Laboratório de Bacteriologia Médica do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá (Tabela 1).

Agentes antimicobacterianos

Foram utilizadas soluções estoques de AMO/CLAV (EMS, BR), LINE (Pharmacia, BR), INH (SIGMA, St. Louis, USA), EMB (SIGMA, St. Louis, USA) e RIF (SIGMA, St. Louis, USA) que foram preparadas nas concentrações 50.000 mg/L, 2.000 mg/L, 1.000 mg/L, 512 mg/L e 1.000 mg/L, respectivamente, e estocadas a -20°C. As soluções foram diluídas em

água destilada (com exceção da RIF que foi primeiramente diluída em metanol, e depois em água destilada). No momento de uso, as soluções foram diluídas em Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, USA) suplementado com OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase)/(BBL/ Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA).

Preparo do inóculo

A cepa de referência e os isolados clínicos testados foram semeados em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, incubados por 15 - 21 dias a 37°C e o inóculo padronizado por comparação visual da turvação equivalente ao tubo 1 da escala de McFarland. Após isto, foi diluída na proporção de 1:20 em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, para obter uma concentração bacteriana de $1,5 \times 10^6$.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados clínicos de *M. tuberculosis*, para cada antimicrobiano, foi determinada pelo método de *Resazurin Microtiter Plate Assay* (REMA) [20] em triplicata. Inicialmente os antimicobacterianos foram diluídos em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, em microplacas de 96 orifícios (Kartell, Milão, Itália) e após foi adicionado 100 µl do inóculo bacteriano previamente padronizado. As microplacas foram seladas e incubadas a 37°C em atmosfera normal por 7 dias. Após esse período, 30µL de solução de resazurina 0,01% (Acros, Morris Plains, NJ, USA) recém preparada foi adicionado a cada orifício. As placas foram reincubadas a 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 da droga capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano. Para cada isolado estudado foram utilizados orifícios contendo inóculo micobacteriano e meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC como controle de crescimento e outros contendo apenas meio de cultivo Middlebrook 7H9 como controle de esterilidade do meio de cultivo. Isolados no qual o valor de CIM foi $\geq 0,5$, 0,5 e 4 mg/L foram considerados resistentes a INH, RIF e EMB, respectivamente [21], [22], [23].

Avaliação da atividade anti-*M. tuberculosis* de combinações de AMO/CLAV com fármacos antituberculosos e linezolida (LINE)

O teste empregado para avaliar a combinação de fármacos foi o método *checkerboard* bidimensional [18]. O teste foi realizado em placas de microdiluição com 96 orifícios (Kartell, Milão, Itália) onde foram testadas duplas combinações (AMO/CLAV e INH, AMO/CLAV e EMB, AMO/CLAV e RIF e AMO/CLAV e LINE). Após as diluições das combinações de fármacos, foi acrescentado 100 µL de inóculo bacteriano previamente padronizado a cada diluição das associações. Para cada isolado estudado foram utilizados orifícios contendo inóculo micobacteriano e meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC como controle de crescimento e outros contendo apenas meio de cultivo Middlebrook 7H9 como controle de esterilidade do meio de cultivo. As microplacas foram seladas e incubadas a 37°C em atmosfera normal por 7 dias. Após esse período, 30µL de solução de resazurina 0,01% (Acros, Morris Plains, NJ, USA) recém-preparada foram adicionados a cada orifício e as placas foram reincubadas a 37° C por 48h para posterior leitura visual. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano (mudança da cor azul para rosa).

Para avaliar o efeito sinérgico, usou-se o Índice da Fração Inibitória [24]. Sendo, $IFI = (CIM A + B / CIM A) + (CIM B + A / CIM B)$, onde: CIM A +B representa a CIM da droga A quando associada à droga B; CIM B + A representa a CIM da droga B quando associada a droga A; CIM A representa a CIM da droga A quando testada isoladamente e CIM B representa a CIM da droga B quando testada isoladamente.

A somatória dos IFIs foi utilizada para a classificação dos efeitos, onde: sinérgico ($\sum IFI \leq 0,5$), aditivo ou indiferente ($\sum IFI > 0,5 - 4$) e antagônico ($\sum IFI > 4$) [25].

RESULTADOS

As CIMs encontradas para INH, isoladamente, variaram de 0,03 mg/L a 0,250 mg/L para os isolados sensíveis e de 0,5 mg/L a 16 mg/L para os isolados resistentes. Para RIF variaram de 0,007 mg/L a 0,250 mg/L para os isolados sensíveis e de 2 mg/L a 32 mg/L para os resistentes. Para o EMB variaram de 0,5 mg/L a 2mg/L para os isolados sensíveis e de 4 mg/L a 16 mg/L para os resistentes. Para LINE variaram de 0,007 mg/L a 0,5 mg/L para todos os isolados. Para a AMO/CLAV as concentrações variaram de 2 mg/L a 16 mg/L (Tabela 1).

Quando a AMO/CLAV foi combinada com INH foi observado efeito sinérgico em oito isolados clínicos, sendo dois sensíveis e seis resistentes. A cepa de referência e os demais

isolados apresentaram resultados aditivos ou indiferentes. Os valores de Σ IFI para os isolados sinérgicos variaram de 0,187 a 0,312, e nos demais de 0,515 a 2 (Tabela 2).

Para a combinação de AMO/CLAV com EMB, foi observado resultado sinérgico na cepa de referência e em dezenove isolados clínicos, sendo que, cinco eram resistentes ao EMB. Já os outros isolados apresentaram resultados que os classificam como aditivos ou indiferentes. Os valores de Σ IFI para os isolados que apresentaram sinergismo variaram de 0,128 a 0,5 (Tabela 2).

Quando realizado a combinação da AMO/CLAV com RIF, houve sinergismo em dezenove isolados clínicos, sendo que desses três eram resistentes a RIF (um deles, MDR-TB). A cepa de referência e os demais isolados clínicos tiveram um resultado aditivo ou indiferente. Para os isolados com efeito sinérgico os valores de Σ IFI variaram de 0,092 a 0,5 (Tabela 2).

Na combinação da AMO/CLAV com LINE, houve sinergismo em cinco isolados clínicos, sendo quatro resistentes. Para a cepa de referência e os outros dezoito isolados, apresentaram efeitos classificados como aditivos ou indiferentes. Para os isolados com efeito sinérgico os valores de Σ IFI variaram de 0,181 a 0,278 (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A combinação de fármacos é a chave para alcançar altas taxas de cura no tratamento da TB [26], [27]. O fracasso do tratamento com regimes de fármacos de primeira linha requer a utilização de fármacos de segunda linha, no entanto, algumas cepas circulantes são resistentes a estes também [26]. Os fármacos β -lactâmicos, há muito usados no tratamento de algumas infecções, são ineficazes contra alguns micro-organismos, incluindo o *M. tuberculosis*, sendo rapidamente hidrolisados por β -lactamases que é codificada cromossomicamente, neste último, pelo gene *BlaC* [14]. A combinação de β -lactâmicos, como a AMO, com inibidores de β -lactamases, tais como o ácido clavulânico, tem demonstrado ser mais eficaz do que AMO sozinha [10], [11], [12], [13], [14]. Especificamente no caso das micobactérias, deve-se considerar um fator importante na resistência relativa aos β -lactâmicos, a parede celular rica em lipídios que dificulta a entrada deste fármaco no bacilo [11].

A combinação AMO/CLAV, que é um betalactâmico associado a um inibidor de betalactamases, vem sendo usada com sucesso no tratamento de infecções por bactérias resistentes à AMO por produzir beta-lactamases [8], [10], [11], [12], [13], [14], [29], [30].

Os valores de MIC para a cepa de referência, isolados sensíveis e resistentes de *M. tuberculosis* apresentaram uma variação de 2 a 16 mg/L para AMO/CLAV. Estes resultados estão de acordo com os observados por Abate e Miorner [11] e Segura et al. [28], também trabalhando com isolados clínicos, *in vitro*, que apresentaram MIC de 1-16 mg/L e ≤ 16 mg/L respectivamente. Mais recentemente, Hugonnet et al. [14], trabalhando com isolados de *M. tuberculosis* XDR-TB e a cepa de referência H₃₇Rv, observaram MIC >10 mg/L para AMO em presença de 2,5 mg/L de ácido clavulânico para a cepa de referência. Diferente dos nossos resultados, Varshochi et al. [13] obtiveram maiores valores de MIC, que variaram de 32-512 mg/L, em estudo com 90 isolados de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes.

Em nosso estudo utilizando a metodologia de *checkerboard* [18] *in vitro* para avaliar o sinergismo entre os fármacos testados, não observamos nenhuma interação antagonista entre AMO/CLAV e os três fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da TB (INH, RIF e EMB) bem como com a LINE.

A combinação de AMO/CLAV e INH mostraram interações positivas, resultando em oito isolados clínicos com sinergismo, sendo que seis destes eram resistentes. Podemos destacar ainda que, em alguns isolados testados, houve diminuição da CIM, porém não o suficiente para ser considerado sinergismo entre AMO/CLAV e INH. Até o momento, de que temos conhecimento, não existem estudos de interação de INH com fármacos clássicos tais como AMO. Porém, estudos de sinergismo com novos compostos que apresentaram certa atividade contra *M. tuberculosis* como dihidromicoplanecina (DHMP) [31] e derivados de isonicotinoilhidrazonas [32] foram realizados. Contudo foi observado sinergismo somente no primeiro estudo. Mais recente, estudos de sinergismo de INH com ácido oleanólico mostrou resultado favorável em isolados resistentes [26].

A combinação de AMO/CLAV com RIF apresentou resultado sinérgico para dezenove isolados clínicos, sendo nove sensíveis aos três fármacos, sete resistentes à INH, dois resistentes a RIF e um multirresistente (MDR-TB). Os outros isolados avaliados apresentaram resultados aditivos, com redução de CIM. Essa interação positiva com RIF é importante, visto que este fármaco tem um papel fundamental na redução do tempo do tratamento da TB. Considerando que a RIF possui efeitos colaterais [33], [34] na dosagem usada em alguns pacientes, poderia ser reduzida com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais, que muitas vezes induzem a interrupção do tratamento com RIF, o que pode levar ao aparecimento de cepas resistentes. Com isso devemos lembrar também a importância da redução da dosagem da RIF principalmente no tratamento de pacientes HIV/AIDS onde a interação com os

antirretrovirais leva a uma diminuição da concentração sérica de RIF e/ou antirretrovirais [34].

Para a combinação da AMO/CLAV com EMB, foi observado resultado sinérgico com a cepa de referência e em dezenove isolados clínicos. Destes com sinergismo, onze eram resistentes, sendo dois resistentes ao EMB e três MDR-TB. Esses resultados devem ficar em destaque, uma vez que o EMB tem ação em bacilos intracelulares e extracelulares, e foi introduzido na terapia anti-TB com o objetivo de combater a resistência medicamentosa [32], [33].

Abate e Miorner [11] testaram a combinação de AMO/CLAV com EMB pelo método BACTEC, e obtiveram resultado encorajador. Os autores acima testaram 30 isolados bacterianos, e destes, 29 tiveram a concentração de AMO/CLAV reduzida em até quatro vezes ou mais. Rey-Jurado et al. [35] utilizaram *checkerboard* tridimensional com EMB, levofloxacino e amicacina bem como, EMB, LINE e levofloxacino e não observaram sinergismo com a cepa de referência e em nenhum dos 20 isolados estudados.

O decréscimo no valor da MIC da AMO/CLAV através do efeito sinérgico com EMB pode ser de importância crucial para a maior atividade no local da infecção tuberculosa, onde é difícil de conseguir concentrações eficazes de fármaco [32]. Desta forma sabe-se que EMB é um importante fármaco na terapia da TB, principalmente no combate à resistência, porém este apresenta principalmente toxicidade ocular dose-dependente, podendo causar danos permanentes na visão [36], [37]. Com isso, uma diminuição na dose de EMB pode solucionar este problema, pela redução de efeitos colaterais, e até mesmo diminuir o tempo de tratamento, o que para o paciente com TB é de uma valiosa ajuda.

Da mesma forma, com estudos realizados com INH associada a compostos novos com atividade antimicobacteriana, o composto SQ109, um novo candidato a fármaco anti-TB, mostrou ação sinérgica com EMB e RIF [38] e análogos de capuramicina com EMB [39].

Na combinação de AMO/CLAV com LINE, houve sinergismo em cinco isolados clínicos, sendo quatro resistentes. A cepa de referência e dezoito isolados apresentaram efeitos classificados como aditivos ou indiferentes. Resultados semelhantes aos obtidos em nosso estudo foram observados por Diaz et al. [40] que obtiveram resultados sinérgicos em três de dez isolados testados com a associação LINE e INH; quando testaram RIF com LINE, obtiveram sinergismo em cinco entre os quinze isolados. Resultados não tão animadores foram obtidos por Coban et al. [41] que observaram sinergismo de LINE com INH em um isolado clínico MDR-TB, dos dez testados e em nenhum com RIF.

Embora com pequeno número de isolados estudados, o presente estudo mostra que a associação de AMO/CLAV aos fármacos anti-TB parece ser uma alternativa promissora para estudos futuros na utilização destes como auxiliar no tratamento de TB resistente, por ser uma droga de uso via oral. Neste sentido, o uso destas associações, incluindo a LINE em determinados casos poderia contribuir para a redução da dosagem de INH, RIF e principalmente do EMB, que apresentam importantes efeitos colaterais para o paciente em tratamento de TB.

REFERÊNCIAS

1. Who (2012). Global tuberculosis control: WHO 2012 Report, Geneva, World Health Organization.
2. Souza M, Vasconcelos T (2005) Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Quim. Nova* 28 (4): 678-682.
3. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL (1999) Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Rev Saúde Pública* 33(3): 281-286.
4. Bastos GM, Cezar MC; Mello FCQ, Conde MB (2012) Prevalence of primary drug resistance in pulmonary tuberculosis patients with no known risk factors for such. *J bras pneumol* 38(6): 733-739.
5. Conde MB, Melo FA, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VG, Dalcin PT, et al. (2009) III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *J Bras Pneumol* 35(10):1018-1048.
6. Nathanson E, Nunn P, Uplekar M, Floyd K, Jaramillo E, et al. (2010) MDR tuberculosis—critical steps for prevention and control. *N Engl J Med* 363: 1050–1058.
7. Minion J, Gallant V, Wolfe J, Jamieson F, Long R (2013) Multidrug and Extensively Drug-resistant Tuberculosis in Canada 1997–2008: Demographic and Disease Characteristics. *PLoS ONE* 8(1): e53466.
8. Jassal M, Bishai WR (2009) Extensively drug-resistance tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 9: 19-30.
9. Telles M, Mosca A (2000) Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Inst Adolfo Lutz* 59(1/2):16-19.

10. Chambers HF, Kocaz T, Sipit T, Turner J, Hopewell P (1998) Activity of Amoxicillin/Clavulanate in Patients with Tuberculosis. *Rev Infect Dis* 26:874-877.
11. Abate G, Miorner H (1998) Susceptibility of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* to amoxicillin in combination with clavulanic acid and ethambutol. *J Antimicrob Chemother* 42:735-740.
12. Getahun A (2000) Anti-tuberculosis activity of β -lactam antibiotics: prospect for the treatment of MDR tuberculosis. *Ethiop J Health* 14(3): 276-296.
13. Varshochi M, Rastgar MH, Raffi A, Nagili B (2006) In-vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to amoxicillin-clavulanate. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases* 1(3):121-125.
14. Hugonnet JE, Tremblay LW, Boshoff H, Barry CE (2009) Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 323:1215-1218.
15. Goodman & Gilman's (2006) *The pharmacological basis of therapeutics*. 11th. ed. New York: McGraw-Hill.
16. Orme I, Program TDS (2001) Search for new drugs for treatment of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1943-1946.
17. Zhang Y, Amzel LM (1996) Tuberculosis drug targets. *Curr drug targets* 3(2):131-134.
18. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM (2005) Antimicrobial Combinations in Antibiotics in Laboratory Medicine. In: Victor Lorian MD (ed) Fifth edition, Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia USA., 365-440.
19. Brasil (2008) Manual de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.
20. Palomino JC, Portaels F (1999) Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Di* 18: 380-383.
21. Palomino JC, Martin A, Camacho M et al. (2002) Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2720-2722.
22. Nateche F, Martin A, Baraka S et al. (2006) Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. *J Med Microbiol* 55: 857-860.

23. Cavalieri SJ, Biehle JR, Sanders WE (1995) Synergistic activities of clarithromycin and antituberculous drugs against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1542-1545.
24. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM (2005). *Antimicrobial Combinations in Antibiotics in Laboratory Medicine*. In: Victor Lorian MD (ed) Fifth edition, Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia USA. 365-440.
25. Odds FC (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 52: 1.
26. Ge F, Zeng F, Liu S et al.(2010) In vitro synergistic interactions of oleanolic acid in combination with isoniazid, rifampicin or ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* 59: 567-572.
27. Dye, C. (2009). Doomsday postponed? Preventing and reversing epidemics of drug-resistant tuberculosis. *Nat Rev Microbiol* 7: 81–87.
28. Segura C, Salvado M, Collado I, Chaves J, Coira A (1998) Contribution of b-Lactamases to b-Lactam Susceptibilities of Susceptible and Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 42(6): 1524-1526.
29. Hugonnet J-E, Blanchard JS. (2007) Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* b-lactamase by clavulanate. *Biochemistry* 46(43):11998-12004.
30. Mainardi JL, Hugonnet JE, Gutmann L, Arthur M (2011) Fighting resistant tuberculosis with old compounds: the carbapenem paradigm. *Clinical Microbiology and Infection* 17:1755-1756.
31. Haneishi T, Nakajima M, Shiraishi A et al.(1988) Antimycobacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of dihydromycoplanecin A. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 110-116.
32. De Logu A, Onnis V, Saddi B et al. (2002) Activity of a new class of isonicotinoylhydrazones used alone and in combination with isoniazid, rifampicin, ethambutol, para-aminosalicylic acid and clofazimine against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 49: 275-282.
33. Arbex MA, Varella MCL, Siqueira HR, Mello FAF (2010) Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 36(5): 626-640.
34. Brasil (2011) Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 284p.

35. Rey-Jurado E, Tudó G, de la Bellacasa JP, Espasa M, González-Martín J (2013) In vitro effect of three-drug combinations of antituberculous agents against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 41(3): 278-280.
36. Kho RC, Al-Obailan M, Arnold AC (2011) Bitemporal visual field defects in ethambutol-induced optic neuropathy *J Neuroophthalmol* 31: 121-126.
37. Kandel H, Adhikari P, Shrestha GS et al.(2012) Visual function in patients on ethambutol therapy for tuberculosis. *J Ocul Pharmacol Ther* 28: 174-178.
38. Chen P, Gearhart J, Protopopova M et al.(2006) Synergistic interactions of SQ109, a new ethylene diamine, with front-line antitubercular drugs in vitro. *J Antimicrob Chemother* 58: 332-337.
39. Reddy VM, Einck L, Nacy CA (2008) In vitro antimycobacterial activities of capuramycin analogues. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 719-721.
40. Diaz JC, Ruiz M, López M, Royo G (2003) Synergic activity of fluoroquinolones and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 21:354-356.
41. Coban AY, Bilgin K, Uzun M, Durupinar B (2009) Effect of linezolid in combination with isoniazid and rifampicin against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Mikrobiyol Bul* 43(2): 293-297.

Tabela 1. Perfil de sensibilidade e Concentração Inibitória Mínima (CIM) para amoxicilina/clavulanato, isoniazida, rifampicina, etambutol, e linezolida utilizando o método Resazurin Microtitre Plate Assay (REMA), da cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv e 23 isolados clínicos sensíveis e resistentes ao *M. tuberculosis*.

Isolados	Sensibilidade/ Resistência	CIM (µg/mL)				
		AMO/ CLAV	INH	RIF	EMB	LINE
H ₃₇ Rv	Sensível	4	0,030	0,125	2	0,250
14	Sensível	2	0,060	0,030	0,5	0,007
60	Sensível	2	0,250	0,125	2	0,250
20	Sensível	4	0,250	0,250	2	0,5
50	Sensível	8	0,030	0,125	1	0,250
TB24	Sensível	4	0,250	0,015	1	0,250
TB27	Sensível	4	0,030	0,015	0,5	0,5
65	Sensível	4	0,030	0,125	2	0,250
25	Sensível	4	0,250	0,012	1	0,007
24	Sensível	2	0,030	0,125	2	0,125
13638	Sensível	4	0,060	0,007	2	0,250
4250	INH	16	1	0,030	2	0,007
1193	INH/EMB	8	2	0,030	8	0,250
34	INH	8	1	0,030	2	0,007
3	INH	8	4	0,125	2	0,250
1	INH	8	2	0,125	2	0,250
51	INH, RIF	2	1	2	1	0,007
43	INH/EMB	8	16	0,125	16	0,007
52	INH	16	0,5	0,060	2	0,007
64-A	INH/RIF	4	1	16	1	0,250
71-A	INH/EMB/RIF	2	2	32	8	0,125
73-A	INH/RIF	8	4	8	2	0,5
18	INH/EMB/RIF	4	2	32	4	0,250
19	INH/EMB/RIF	8	4	16	4	0,250

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; EMB: etambutol; LINE: linezolida; AMO: amoxicilina/clavulanato; CIM: Concentração Inibitória Mínima

Tabela 2 . Índice de fração inibitória de amoxicilina/clavulanato combinado com isoniazida, rifampicina, etambutol e linezolida por checkerboard bidimensional contra isolados clínicos sensíveis e resistentes de *M. tuberculosis* e cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

Isolados	ΣIFI	Sinergismo	ΣIFI	Sinergismo	ΣIFI	Sinergismo	ΣIFI	Sinergismo
	INH/AMO		LINE/AMO		RIF/AMO		EMB/AMO	
H ₃₇ Rv	0,625	I	2	I	0,530	I	0,187	S
14	2	I	0,514	I	0,375	S	0,750	I
60	0,265	S	2	I	0,155	S	0,187	S
20	2	I	2	I	0,140	S	0,250	S
50	2	I	2	I	0,155	S	0,312	S
TB24	0,515	I	2	I	0,5	S	0,312	S
TB27	0,625	I	2	I	0,5	S	0,625	I
65	0,625	I	2	I	0,280	S	0,187	S
25	2	I	0,264	S	0,155	S	0,312	S
24	0,250	S	2	I	0,153	S	0,187	S
13638	0,562	I	2	I	0,750	I	0,128	S
4250	2	I	0,187	S	0,375	S	0,187	S
1193	2	I	2	I	0,380	S	0,312	S
34	2	I	0,503	I	0,375	S	0,372	S
3	0,321	S	2	I	0,280	S	0,250	S
1	0,187	S	2	I	0,155	S	0,5	S
51	0,5	S	0,278	S	0,188	S	0,375	S
43	0,253	S	0,264	S	0,092	S	0,140	S
52	0,312	S	0,181	S	0,312	S	0,141	S
64-A	0,75	I	2	I	0,281	S	0,750	I
71-A	2	I	2	I	0,140	S	0,250	S
73-A	0,187	S	2	I	2	I	0,625	I
18	2	I	2	I	2	I	0,312	S
19	2	I	2	I	2	I	0,312	S

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; EMB: etambutol; LINE: linezolida; AMO: amoxicilina/clavulanato IFI: Índice de Fração Inibitória; S: sinergismo; I: aditivo ou indiferente

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

A AMO/CLA é interessante para estudos futuros como fármaco auxiliar no tratamento da TB em situações como MDR-TB e outras em que ocorrem incompatibilidades dos fármacos usados. Destaca-se o sinergismo com a RIF e EMB, pois o seu uso em associação no tratamento poderia contribuir para a redução da dosagem destes fármacos, principalmente do EMB que apresentam importantes efeitos colaterais para o paciente.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O tratamento atual para TB é longo e com fármacos já utilizados a mais de 50 anos. O tratamento traz muitos efeitos colaterais para o paciente reduzindo a adesão. A não finalização do tratamento e utilização incorreta destes fármacos favorece o surgimento de cepas resistentes aos fármacos disponíveis contribuindo para o agravamento da situação da TB de forma mundial. No presente trabalho iniciou-se estudo com AMO/CLA, associação já conhecida no mercado e aprovada para uso em seres humanos, que tem seu mecanismo de ação confirmado e testado em outras bactérias.

Uma vez observada ação sinérgica de AMO/CLA com INH, RIF e EMB, utilizando a metodologia de *checkerboard*, a pesquisa de sinergismo entre outros fármacos, já utilizados na medicina deve ser continuada. Isto se faz necessário no sentido de determinar um tratamento não tão longo como o atual, e com menores efeitos colaterais aos pacientes.