REPOSICIONAMENTO DE UM ANTIDEPRESSIVO A PARTIR DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM AMOSTRAS CLÍNICAS RESISTENTES

Catrine de Souza Machado [1]

Tacieli Fagundes da Rosa [2]

Marissa Bolson Serafin [3]

Angelita Bottega [4]

Vitória Segabinazzi Foletto [5]

Luiz Fernando de Souza Machado [6]

Rosmari Horner [7]

Resumo:

A resistência bacteriana aumentou violentamente nos últimos anos, tornando-se um grande desafio para a saúde, tornando assim as bactérias as principais responsáveis pelas infecções e pela resistência a múltiplas drogas (MDR) e consequentemente aumentando as chances de uma infecção ser intratável por qualquer antibiótico atualmente conhecido. O reposicionamento de drogas é um termo que consiste em descobrir novos usos fora do escopo da indicação médica original para medicamentos existentes, com isso, este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antibacteriana in vitro da amitriptilina frente a cepas bacterianas ATCC e isolados clínicos resistentes a Carbapenemase oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria/RS. A avaliação da atividade antibacteriana in vitro foi realizada com isolados clínicos de Klebsiella pneumoniae produtora de Carbapenemase oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e cepas bacterianas padrão de referência da coleção American Type Culture Collection (ATCC). As cepas bacterianas são Gram positivas de Staphylococcus aureus ATCC 29213, Bacillus cereus ATCC 14579 e Enterococcus faecalis ATCC 29212 e cepas Gram negativos de Escherichia coli ATCC 25922, Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 e Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), registrado sob o número CAAE 38850614.4.0000.5346. Realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de microdiluição em caldo e posteriormente a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton, ficando incubados a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Nosso estudo mostrou atividade antimicrobiana da Amitritptilina frente a cepas ATCC de Gram positivas e Gram negativas, como por exemplo, Staphylococcus aureus ATCC 29213 (CIM=128 µg mL-1), Bacillus cereus ATCC 14579 (CIM=128 µg mL-1), Escherichia coli ATCC 25922 (CIM=128 µg mL-1) e Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 (CIM=128 µg mL-1). Em relação aos isolados clínicos do microrganismo Klebsiella Pneumoniae resistente a Carbapenemase, mostrou atividade frente aos isolados 2, 4 e 5 (CIM=256µg mL-1). No isolado 4, a amitriptilina mostrou-se também capaz de causar a morte do microrganismo na concentração de 256µg mL-1 (CBM). Podemos concluir que o reposicionamento de fármacos ‘não antibióticos’ é uma alternativa auspiciosa para o tratamento de infecções bacterianas, porém é de extrema importância estudos in vivo e de mecanismos de ação mais detalhados para o uso seguro dos mesmos.

Palavras-chave: Reposicionamento drogas, Antimicrobiano, Amitriptilina

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

REPOSICIONAMENTO DE UM ANTIDEPRESSIVO A PARTIR DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM AMOSTRAS CLÍNICAS RESISTENTES

[1] Aluno de pós-graduação. catrinesmachado@gmail.com. Autor principal

[2] Aluna de pós graduação PPGCF. tacielifagundesdarosa@gmail.com. Co-autor

[3] Aluna de pós graduação PPGCF. marissabolson@gmail.com. Co-autor

[4] Aluna de pós graduação PPGCF. angelitabotega@yahoo.com.br. Co-autor

[5] Aluna de Graduação em Farmácia. vitoria_sfoletto@yahoo.com.br. Co-autor

[6] Aluno de Graduação em Farmácia. lfsouzamachado@yahoo.com.br. Co-autor

[7] Docente. rosmari.ufsm@gmail.com. Orientador

REPOSICIONAMENTO DE UM ANTIDEPRESSIVO A PARTIR DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM AMOSTRAS CLÍNICAS RESISTENTES ORIUNDAS DE UM HOSPITAL REFERÊNCIA

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aumentou violentamente nos últimos anos, tornando-se um grande desafio para a saúde, com isso, as bactérias tornaram-se as principais responsáveis pelas infecções e pela resistência a múltiplas drogas (MDR), (U. THEURETZBACHER, 2013) aumentando as chances de uma infecção ser intratável por qualquer antibiótico atualmente conhecido. (K. ZAWACK et al., 2018)

A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico que aumenta a concentração sináptica de serotonina e/ou norepinefrina no sistema nervoso central (SNC) pela inibição de sua recaptação pela membrana neuronal pré-sináptica. Apresenta metabolismo hepático, sendo a nortriptilina seu metabólito ativo, tem meia vida de eliminação em média de quinze horas e atinge pico plasmático em quatro horas. Sua excreção é via urinária, em torno de 18% como droga inalterada e pequenas quantidades pelas fezes (LACY C.F. et al. 2009).

Nos últimos anos, a amitriptilina tem sido utilizada como terapia profilática para enxaqueca, pois além de reduzir a frequência, a duração e a intensidade das crises de dor de cabeça, também melhora a resposta ao tratamento agudo, em combinação com exercício aeróbico a eficácia é maior (SANTIAGO M.D.S. et al. 2014). Estudo mostra os efeitos da amitriptilina na modulação da dor aguda e indicam que, no modelo de lesão neural periférica, a noradrenalina auxilia na transdução do sinal lesivo, na nocicepção induzida pelo processo inflamatório e na modulação da via descendente inibitória da dor (PELÓGIA N.C.C. et al. 2011). Seu emprego também é recomendado na terapia preventiva pré-operatória em pacientes com amputação de membros, cujo propósito é o abrandamento da intensidade, diminuindo assim o sofrimento dos pacientes (SILVA F.C. et al. 2008).

A resistência bacteriana geralmente está associada ao uso inadequado dos antibióticos e apresenta consequências clinicas e econômicas preocupantes para o mundo, com isso, pesquisadores estão apostando no “drug repositioning”, uma alternativa para a identificação mais rápida de drogas eficazes para tratar doenças infecciosas. (SERAFIN, MB, HÖRNER, R., 2018) O reposicionamento de drogas consiste em descobrir novos usos fora do escopo da indicação médica original para medicamentos existentes, (ASHBURN TT, THOR KB, 2004) com isso, este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antibacteriana in vitro da amitriptilina frente a cepas bacterianas ATCC e isolados clínicos resistentes a Carbapenemase oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria/RS.

2 METODOLOGIA

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada com isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e cepas bacterianas padrão de referência da coleção *American Type Culture Collection (ATCC)*. Estas cepas encontram-se acondicionadas em caldo TSB (Tryptic Soy Broth) contendo 15% de glicerol a - 20 ºC, no Laboratório de Bacteriologia (Labac) da Universidade Federal de Santa Maria. Foram testadas cepas Gram positivas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e cepas Gram negativos de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), registrado sob o número CAAE 38850614.4.0000.5346.

Realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de microdiluição em caldo, baseado no documento M100-S26 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2012).

A Amitriptilina foi dissolvida com etanol atingindo a concentração de 512 μg mL^{-1} para obtenção das soluções estoque. O inóculo bacteriano foi realizado com solução salina estéril, alcançando turbidez padrão da escala 0,5 de McFarland. Em microplacas de 96 orifícios, contendo caldo Müller-Hinton, o medicamento Amitriptilina (0,25 a 256 μg mL^{-1}) e inóculo bacteriano (1 x 10^{-5} UFC/poço), foram incubados a 35 ± 2 °C por 24 horas. Após incubação, foi determinada a concentração inibitória mínima por meio de leitura visual.

Após a leitura da CIM, foram retirados, aproximadamente, 10μL do conteúdo dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível e também do último poço onde houve crescimento bacteriano visível para ser usado como controle positivo para a realização da determinação da concentração bactericida mínima (CBM), sendo este método descrito no documento M26-A do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) em 1999 (NCCLS, 1999), com algumas alterações. O volume retirado da CIM foi semeado em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton, ficando incubados a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Depois da incubação, foi determinada a CBM como a menor concentração requerida para matar o microrganismo.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Nosso estudo mostrou atividade antimicrobiana da Amitritptilina frente a cepas ATCC de Gram positivas e Gram negativas, como por exemplo, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (CIM=128 μg mL^{-1}), *Bacillus cereus* ATCC 14579 (CIM=128 μg mL^{-1}), *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIM=128 μg mL^{-1}) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (CIM=128 μg mL^{-1}) (Tabela 1). Em relação aos isolados clínicos do microrganismo *Klebsiella Pneumoniae* resistente a Carbapenemase, mostrou atividade frente aos isolados 2, 4 e 5 (CIM=256μg mL^{-1}) como mostra a tabela 2. No isolado 4, a amitriptilina mostrou-se também capaz de causar a morte do microrganismo na concentração de 256μg mL^{-1}.

Muthukumar e colaboradores mostraram em seu estudo que a amitriptilina apresentou efeito antibacteriano, sendo capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas como o *Staphylococcus aureus* e Gram negativas como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Porém sua mais pronunciada atividade foi frente às Gram positivas, possivelmente por ter melhor acessibilidade das paredes celulares destas bactérias (MUTHUKUMAR.V et al, 2014). Em outro estudo, Mandal e colaboradores também investigaram a atividade antimicrobiana da amitriptilina tanto in vitro quanto in vivo e constataram que ela apresentou sensibilidade frente à *Staphylococcus spp., Bacillus spp., Escherichia coli*, *Klebisiella pneumoniae* e *Pseudomonas* spp., porém foi resistente a *Enterococcus faecalis*. (MANDAL, A. et al, 2010)

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Cloridrato de Amitriptilina em ATCC.

ATCC	CIM	CBM
	Cl Ami. (μg mL^{-1})	Cl Ami. (μg mL^{-1})
***Staphylococcus aureus* ATCC 29213**	128	256
***Bacillus cereus* ATCC 14579**	128	-
Enterococcus	>512	-

***faecalis* ATCC 29212**		
***Escherichia coli* ATCC 25922**	128	512
***Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603**	128	512
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**	=512	-

Fonte: do autor, 2018.

A resistência bacteriana é, sem dúvida, vista como um grande desafio médico na maioria dos sistemas de saúde, em decorrência do surgimento de microrganismos completamente resistentes a qualquer medicamento disponível no mercado. Com isso, os microrganismos produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) são constituídos por um grupo de patógenos Gram-negativos altamente resistentes a drogas, que causam infecções associadas à morbidade e mortalidade significativas, cuja incidência está aumentando rapidamente em diversas situações clínicas. (ARNOLD et al., 2011) Algumas bactérias Gram-negativas, especialmente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* desenvolveram resistência à maioria ou a todos os antibióticos disponíveis.

Tabela 2 – Dados clínicos, CIM e CBM do Cloridrato de Amitriptilina em isolados clínicos.

Isolado Clínico	Sexo	Idade	Unidade de internação	Material Clínico	CIM Cl. Ami. ($\mu g\ mL^{-1}$)	CBM Cl. Ami ($\mu g\ mL^{-1}$)
1	M	59anos	UTI	Swab retal	512	512
2	M	57anos	PA ad	Swab retal	256	512
3	M	56anos	UTI	Swab retal	512	>512
4	M	65anos	Nefro	Swab retal	256	256
5	M	66anos	Amb	Swab retal	256	512
6	M	59anos	UTI	Swab retal	512	512

Fonte: do autor, 2018.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta e a produção de novos agentes antimicrobianos tornaram-se fundamentais, dado que a resistência bacteriana constitui um dos maiores e mais graves problemas de saúde pública. (LOUREIRO, R. J. et al. 2016) A pesquisa de novos agentes é fundamental, visto que, nossa pesquisa demonstrou atividade antibacteriana do antidepressivo tricíclico cloridrato de amitriptilina frente a cepas ATCC e pouca atividade frente a isolados de drogas multirresistentes, são necessários mais estudos para avaliar o mecanismo antimicrobiano deste no tratamento de infecções. Podemos concluir que o reposicionamento de fármacos 'não antibióticos' é uma alternativa auspiciosa para o tratamento de infecções bacterianas, porém é de extrema importância estudos in vivo e de mecanismos de ação mais detalhados para o uso seguro dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD ET AL. Emergence of Klebsiella pneumoniae Carbapenemase (KPC) Producing Bacteria. South Med J. 2011 January ; v. 104, n.1, p. 40–45.

ASHBURN TT, THOR KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. Nat Rev Drug Discov., v.3,p.673–83, 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07–A9. Wayne, USA: CLSI; 2012.

K. ZAWACK ET AL., 2018. Inferring the interaction structure of resistance to antimicrobials. Preventive Veterinary Medicine, v.152, p. 81–88, 2018.

LACY C.F. et al... Medicamentos Lexi-Comp Manola: uma fonte abrangente para médicos e profissionais da saúde. Barueri, SP: Manole: USA: Lexi- Comp INC, 2009.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. Revista Portuguesa de Saúde Pública, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MANDAL, A. et al. An investigation on in vitro and in vivo antimicrobial properties of the antidepressant: amitriptyline hydrochloride. Brazilian Journal of Microbiology v.41, p. 635-642, 2010.

MUTHUKUMAR. V, JANAKIRAMAN. K. Evoluation Of Antibacterial Activy Of Amitriptyline Hydrochloride. International journal of chem tech research CODEN (USA), v.6, oct-nov 2014.

NCCLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of antimicrobial agents;Aproved Guideline, NCCLS document M26-A.National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.

PELÓGIA N.C.C. et al. Efeitos da amitriptilina sobre a modulação da dor aguda, em ratos submetidos à ligadura do nervo ciático. Rev Dor. São Paulo, v.12, p. 245-249, jul-set 2011.

SANTIAGO M.D.S. et al. Amitriptyline and aerobic exercise or amitriptyline alone in the treatment of chronic migraine: a randomized comparative study. Arq Neuropsiquiatria, v. 72, p. 851-855, 2014.

SERAFIN, MB, HÖRNER, R., Drug repositioning, a new alternative in infectious Diseases. braz j infect dis.; v. 22, n. 3, p. 252–256, 2018.

SILVA F.C. et al. Prevenção da dor fantasma com uso de cloridrato de amitriptilina. Revista Brasileira de Cancerologia, v.54, p. 345-349, 2008.

U. THEURETZBACHER / Global antibacterial resistance: The never-ending story. Journal of Global Antimicrobial Resistance, v.1, p. 63–69, 2013