



AVALIAÇÃO DO USO DE PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

Natalya Picheictt Carvalho Gomes¹, Luiz Ricardo Olchanheski. ²

¹Acadêmica do Curso de Nutrição, Campus Ponta Grossa-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/ICETI- UniCesumar. ra-22224633-2@alunos.unicesumar.edu.br

²Orientador e Docente do departamento de saúde da Universidade Cesumar - UNICESUMAR - Campus Ponta Grossa-PR. Doutor. luiz.rolchanheski@unicesumar.edu.br

RESUMO

A tuberculose é uma doença bacteriana infecciosa, causada pela *Mycobacterium tuberculosis* que atinge órgãos respiratórios e está envolvida com o estado imunológico de cada indivíduo. A doença é um grande desafio para a saúde pública devido a invasão do tratamento e a resistência bacteriana aos antibióticos, sendo esta enfermidade uma das principais causas de mortalidade no mundo. O tratamento dessa doença é longo e consiste em antibióticos agressivos ao corpo, sendo muitas vezes não aceito pelo paciente. Alternativas como os probióticos vêm sendo estudadas e desenvolvidas a fim de substituir a antibioticoterapia, uma vez que os probióticos apresentam capacidades imunológicas e relação com o eixo intestino-pulmão, podendo assim ser uma opção na terapia da tuberculose. Este projeto tem por objetivo avaliar opções ao tratamento contra a tuberculose por meio do uso de probióticos e verificar a capacidade desses na produção de antimicrobianos que inibam o crescimento da bactéria de forma direta e eficaz. Dessa forma seria possível optar por uma alternativa para o tratamento da doença ou diminuir o percurso do uso dos antimicrobianos, diminuindo os problemas que existem na terapia com antibióticos, aumentar a aceitabilidade dos enfermos, e diminuir os custos da terapia.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobianos; *Mycobacterium smegmatis*; *Mycobacterium tuberculosis*; resistência a antibióticos.

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é considerada uma das doenças infecciosas que mais causa mortes no mundo (Gelaw. Y, 2021). Em 2017, houve uma estimativa de 33,5 a 44 casos a cada cem mil habitantes no mundo, sendo que o Brasil, está entre os 30 países com maior carga de tuberculose (Rebeiro, P. F, 2020). Aproximadamente dez milhões de pessoas morrem de tuberculose no mundo a cada ano. A Assembleia Mundial da Saúde determinou como meta reduzir o número de infectados em 80% e o número de mortes em 90% até 2023 (Christof. C, 2020).

A tuberculose é uma doença bacteriana caracterizada como infecção crônica transmitida pelo ar e causada pela *Mycobacterium tuberculosis*. O tratamento prolongado do regime de antimicrobianos pode diminuir a resposta do paciente, e tal fator afeta o sucesso do tratamento e também pode levar a seleção de cepas de bactérias resistentes. Portanto, é de extrema importância desenvolver alternativas a antibioticoterapia no tratamento da tuberculose (Sanjwani, 2021). Os antibióticos capazes de eliminar a *M. tuberculosis* (isoniazida e rifampicina, comumente), causam diversas reações como náuseas, disenteria, êmese, perda de apetite, e a destruição da microbiota do intestino (Yue Li, 2022). Ademais, a extensa duração da terapia contra a bactéria está ligada ao expressivo abandono dos pacientes ao tratamento sendo o causador do aumento acelerado de cepas resistentes a antibióticos, e tal fator afeta a saúde pública (Quinnonez. C, 2022). Os fármacos contra a tuberculose também baixam o rendimento do fígado devido à alta carga de medicamento. A inclusão de probióticos no tratamento pode fornecer efeito de proteção contra essas drogas. Estudos também apontaram que o uso de *Lactobacillus casei* pode diminuir o efeito de náuseas nos pacientes (Lin S et al, 2020).



Os probióticos são classificados como organismos vivos, que beneficiam a saúde quando ingeridos em quantidades adequadas. Esses também apresentaram poder de reduzir inflamação na parede do intestino e regular a microbiota intestinal. O estudo dos probióticos é recente e logo está em constante aprimoramento. Os probióticos usados em alimentos, fornecidos como suplemento ou como componentes ativos de um fármaco, não devem apenas ser capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo, mas também devem ter a capacidade de proliferar e ser benéfico a microbiota intestinal. Os probióticos devem ser capazes de exercer seus benefícios no hospedeiro por meio do crescimento e da atividade no corpo humano. A capacidade de permanecer viável e eficaz no local alvo deve ser estudada e confirmada para cada cepa e produto ou alimento comercializado. Os estudos clínicos devem ser realizados com o produto comercializado e não com a cepa isolada. A literatura recente tem demonstrado que um dos mecanismos de ação dos probióticos envolve a estimulação do sistema imunológico, ou seja, podem atuar no tratamento de doenças infecciosas. (Guillot.C, 2018).

Há relatos de que a microbiota intestinal também é atingida durante o percurso da doença, em um processo conhecido como eixo intestino-pulmão, que mostra uma relação entre os dois órgãos, uma vez que os microrganismos do intestino têm efeito sobre a manutenção do trato respiratório e vice-versa. Ainda não se sabe exatamente se a alteração causada pela bactéria *M. tuberculosis* é devido a infecção ou uma predisposição que precipita patógenos em formação (Li W et al, 2019). Estudos indicam que a manutenção da microbiota intestinal pode reduzir os sintomas ou prevenir o estabelecimento de doenças pulmonares (Ma Y et al, 2020). O eixo intestino-pulmão fornece uma translocação da microbiota que permite uma proteção via exclusão competitiva, ou pode ainda liberar metabólitos imunomoduladores, que auxiliam na resposta imunológica frente a doenças infecciosas (Ma Y et al, 2020). Uma forma de restaurar a microbiota intestinal é por meio de probióticos (Wieërs. G, 2020).

Certos casos demonstram que a microbiota em seu estado saudável pode apresentar sinais positivos no tratamento da tuberculose, uma vez que a disbiose prejudica a função dos macrófagos do sistema imunológico, os quais atuam contra a *M. tuberculosis*, logo a implementação de probióticos no tratamento contra a doença pode melhorar os resultados do tratamento (Liu et al, 2021). Estudos já mostraram, que *Lactobacillus plantarum* e *L. brevis* apresentam dados positivos frente a *M. tuberculosis* em estudos *in vivo* utilizando ratos, sendo a resposta favorável relacionada com o mecanismo de interação entre moléculas sinalizadoras, chamado de *quorum sensing* (QS) (Kuczkowska, 2019).

O *quorum sensing*, permite que as bactérias individuais monitorem e entendam o tamanho da sua comunidade por meio da liberação de auto indutores, cuja concentração cresce devido ao aumento da densidade celular (Avaneesh V. Narla et al, 2020). Dessa forma, as bactérias podem controlar características fenotípicas e a liberação de sinalizadores químicos. O QS, permite que a colônia de bactérias possa agir em conjunto, alcançando maiores resultados e também contribui na formação do biofilme (Azimi. S, 2020).

Dessa forma, é necessário encontrar meios alternativos para o tratamento da tuberculose, uma vez que os impactos do tratamento com antibióticos trazem as consequências já citadas que diminuem a eficiência da terapia, logo o objetivo desse estudo é buscar alternativas por meio dos probióticos com a finalidade de melhorar a recuperação de pacientes afetados pela *M. tuberculosis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS



As linhagens bacterianas utilizadas foram padrão ATCC, disponibilizadas pelo laboratório de Ecologia Microbiana da UEPG. A cepa referente ao agente patógeno da tuberculose utilizado nesta pesquisa foi a *M. smegmatis*, visto apresentar um período mais curto de crescimento e menor grau de patogenicidade, podendo ser manipulado no laboratório de microbiologia da UniCesumar. Já as cepas de probióticos utilizadas foram: *Lactobacillus acidophilus*, *L. helveticus*, *Bifidobacterium bifido*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium longum*.

Inicialmente foi determinado qual o meio de cultura ideal para o crescimento dos probióticos. Para isto, foi verificado o crescimento de todas as cepas em Ágar BHI, Ágar Mueller-Hinton e Ágar Lúria Bertani, e a capacidade de crescimento foi determinada dentro de 72 horas, de forma qualitativa.

Após a determinação do melhor meio de cultura para crescimento, as cepas foram estocadas em glicerol 60% no laboratório de microbiologia da UniCesumar. As cepas foram crescidas em 10 mL de meio líquido, determinado no ensaio anterior, e deixadas crescer durante 72 horas à 37°C a 200 rpm. Após o período de incubação, as cepas foram centrifugadas a 8.000 rpm durante 5 minutos, e o *pellet* foi ressuspensido em 1 mL de glicerol 60%, sendo os estoques conservados em freezer -20°C.

Para a realização do teste de produção de metabólitos antimicrobianos produzidos pelos probióticos, a cepa de *M. smegmatis* e os probióticos foram crescidos em Ágar Mueller-Hinton durante 72 horas à 37°C. Posteriormente, a *M. smegmatis* será ressuspensida em solução salina estéril (NaCl 0,9%) até a turbidez equivalente ao tubo 0,5 da Estala de McFarland, e foi inoculado em Ágar Muller-Hinton com o auxílio de swab estéril. Os probióticos foram inoculados sobre a *M. smegmatis*, e as placas foram incubadas a 37°C durante 72h. A formação de halos de inibição (de qualquer diâmetro), foram verificadas, caracterizando a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estudos recentes vêm destacando o uso de probióticos para o tratamento de doenças infecciosas não relacionadas ao trato gastrointestinal, como depressão, diabetes tipo 2, doenças parasitárias, entre outras. O reestabelecimento da microbiota intestinal mediada pelo uso de probióticos auxilia na resposta ao sistema imunológico, ou pode ainda afetar diretamente o estabelecimento de patógenos microbianos, como na síntese de antimicrobianos e/ou antiparasitários produzidos pelos probióticos. Há ainda relatos de que o uso de probióticos potencializa a ação de antimicrobianos, podendo facilitar a ação do antibiótico ou diminuir o período de tratamento.

Primeiramente, foi realizado o estabelecimento dos perfis de crescimento microbiano em condições laboratoriais. As cepas bacterianas de probióticos e *M. smegmatis* foram recebidas na forma de doação pelo laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Pileggi e Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski. As cepas de probióticos não apresentaram capacidade de crescimento em ágar TSB, ágar Mueller-Hinton e ágar BHI. Desta forma, considerou-se o uso de um meio de cultura específico para isolamento de *Lactobacillus* sp., o meio MRS, sendo possível o estabelecimento de crescimento dos isolados de *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. em um período de 24 horas à 37°C. A cepa de *M. smegmatis* apresentou a capacidade de crescimento em ágar BHI em um período de 24 horas. Será necessário verificar se a cepa de *M. smegmatis* apresenta capacidade de crescimento em Ágar MRS, a partir deste resultado será possível determinar se os ensaios de antibiose poderão ser realizados neste meio de cultura, ou se será necessário a síntese de metabólitos microbianos.



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bases levantadas sobre o uso de probióticos podem ser aplicadas no tratamento da doença. Com o intuito de contribuir para os avanços do tratamento da tuberculose, a proposta deste trabalho é iniciar uma pesquisa que visa determinar se os probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *L. helveticus*, *Bifidobacterium bifido*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium longum* podem afetar o estabelecimento de *M. tuberculosis*, primeiramente de forma direta, pela síntese de metabólitos secundários antimicrobianos, e posteriormente verificada a influência indireta, pela produção de moléculas sinalizadoras (*quorum sensing*) ou potencializadores do sistema imunológico.

Após o estabelecimento do crescimento dos probióticos no laboratório, será realizado um teste de antibiose com os probióticos frente a *M. smegmatis*, a partir disto serão selecionados e verificadas se as cepas podem apresentar um potencial antimicrobiano ou não, e dessa forma compreender a ana

REFERÊNCIAS

AVANEESH, V. et al. Biophysical limit for quorum sensing in biofilms, received for review. **Biophysics and computational biology**, San Diego, p.1-6, abril, 2021. Acesso em 7 de março de 2023.

AZIMI, S. et al. *Detecção de quorum bacteriano durante a infecção. Revisão Anual de Microbiologia*, 74(1), 2020. Acesso em 7 de março de 2023.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE TUBERCULOSE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Número Especial, Março, 2023.

CHRISTOF, C. et al. Guidelines on Tuberculosis Infection Prevention and Control. **Gesundheitswesen**, Germany. Acesso em 17 de fevereiro de 2023.

GELAW, Y. Et al. Anemia as a risk factor for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **Environmental Health and Preventive Medicine**, p. 2-15, jan, 2021. Acesso em 17 de fevereiro de 2023.

GUILLOT, C. Probióticos, puesta al día: an update. **Rev Cubana Pediatr**, Los Andes, vol. 90, n.2, p.286-298, 2018. Acesso em 7 de março de 2023.

KUCZKOWSKA, K. Et al. Comparison of eight *Lactobacillus* species for delivery of surface-displayed mycobacterial antigen. **Vaccine**, v. 37, n. 43, p. 6371-6379. Aas, 2019. Acesso em 7 de março de 2023.

LI, W. et al. Characterization of Gut Microbiota in Children with Pulmonary Tuberculosis. **BMC Pediatrics**. 19(1):445, 2019 Acesso em 7 de março de 2023.

LIN, S. et al. Efficacy of Proprietary *Lactobacillus casei* for Anti-Tuberculosis Associated Gastrointestinal Adverse Reactions in Adult Patients: A Randomized, Open-Label, Dose-Response Trial. **Food & Function**, Shandong province, 11(1):370-7, 2020. Acesso em 7 de março de 2023.

LIU, Y. et al. Microbiota and Tuberculosis: A Potential Role of Probiotics, and Postbiotics. **Front Nutr**. Taiyuan, 7:8:626254, 2021. Acesso em 7 de março de 2023.



MA, Y. et al. The Gut-Lung Axis in Systemic Inflammation: Role of Mesenteric Lymph as Conduit. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. Tampa, 2020. Acesso em 7 de março de 2023.

QUINONEZ, C. et al. The Role of Fatty Acid Metabolism in Drug Tolerance of *Mycobacterium tuberculosis*. **MBio**, 13(1), 2022. Acesso em 7 de março de 2023.

RAHIM, M. et al. In vitro anti-tuberculosis effect of probiotic *Lacticaseibacillus rhamnosus* PMC203 isolated from vaginal microbiota. **Sci Rep** 12, 8290 (2022). Acesso em 7 de março de 2023.

REBEIRO, P. et al. Knowledge and stigma of latent tuberculosis infection in Brazil: Implications for tuberculosis prevention strategies. **BMC Public Health**, 20(1), 2020. Acesso em 17 de fevereiro de 2023.

SANJIWANI, M. et al. Probiotic-Based Therapy for Active Tuberculosis Infection: The Role of Gut-Lung Axis and Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor. **Jurnal Respirasi**, 7(2), 93, 2021. Acesso em 7 de março de 2023.

WIEERS, G. et al. How Probiotics Affect the Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Frontiers Media S.A. Bordeaux ,2020. Acesso em 7 de março de 2023.

YUE, L. et al. *Lactobacillus casei* Improve Anti-Tuberculosis Drugs-Inducesd Intestinal Adverse Reactions in Rat by Modulation Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids. **MDPI**. Nutrients, 14 (8), Qingdao, 2022. Acesso em 17 de fevereiro de 2023.