

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO COMBINADA ENTRE POLIMIXINA E INIBIDOR DE BOMBA DE EFLUXO OU TIOSSEMICARBAZIDA DERIVADA DO (-)-CANFENO CONTRA ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS

Amanda Dias Pedro (UEM - PIBIC-AF-IS), Bruna Renata Silva, Pedro Henrique Rodrigues do Amaral, Fábio Vandresen, Regiane Bertin de Lima Scodro, Rosilene Fressatti Cardoso, Vera Lucia Dias Siqueira (Orientador), e-mail: vldsiqueira@gmail.com

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

Microbiologia / Bacteriologia

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana, polimixina, ação combinada.

Resumo

Opções terapêuticas para infecções causadas por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERCs) são bem restritas. A polimixina representa uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções por ERCs. Desse modo, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar *in vitro* a ação combinada entre polimixina e o inibidor de bomba de efluxo carbonilcianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) ou tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) contra ERCs. A avaliação da polimixina associada ou não a concentrações fixas de TSC (25 µg/ml) ou CCCP (12,5 µg/ml) foi realizada empregando microdiluição em caldo, em ERCs sensíveis e resistentes à polimixina para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Um total de sete isolados de ERCs polimixina resistentes (CIM ≥ 16 µg/mL) apresentou diminuição da CIM, para concentrações iguais ou abaixo das empregadas para definir sensibilidade, quando a TSC foi associada à polimixina. Seis isolados ERCs resistentes a polimixina (CIM > 16 µg/mL) também apresentaram redução da CIM quando a polimixina foi associada ao CCCP. Em isolados polimixina sensíveis (CIM ≤ 0,5 µg/mL) a associação com TSC ou CCCP não diminuiu a CIM. Embora o CCCP não possa ser clinicamente aplicado, devido a sua intrínseca citotoxicidade, os resultados deste estudo sugerem que a TSC pode atuar de maneira semelhante ao inibidor de bomba de efluxo CCCP na diminuição da CIM da polimixina. Desta forma, considerando sua baixa citotoxicidade, a TSC pode representar um adjuvante no tratamento de infecções causadas por ERCs resistentes a polimixina.

Introdução

Algumas espécies de *Enterobacteriaceae*, em especial *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* são capazes de causar diversos tipos de infecção, que atingem tanto pacientes hospitalizados como ambulatoriais. Essas infecções geram altos custos de tratamento e prolongamento nos períodos de internação, devido especialmente à restrição nas opções terapêuticas consequentes da grande

resistência aos antimicrobianos que estas espécies bacterianas podem apresentar (SHEU e al., 2019). Desse modo, a utilização das polimixinas, que apresentam efeitos nefrotóxicos e neuróticos vem se tornando importante para o tratamento de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) (SHEU e al., 2019). Contudo, resistência a polimixina já foi encontrada em vários isolados clínicos (NORDMAN, JAYOL, POIREL, 2016).

No intuito de melhorar as opções terapêuticas para infecções por ERC e diminuir o potencial tóxico de alguns antimicrobianos, diversos estudos estão sendo realizados para avaliar novas substâncias químicas e combinações antimicrobianas (NI et al., 2016; SHEU et al., 2019). Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a ação combinada de polimixina e o inibidor de bomba de efluxo carbonilcianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) ou tiossemicarbazida (TSC) derivada do (-)-canfeno contra ERCs

Materiais e métodos

Foram empregadas espécies de ERC sensíveis e resistentes à polimixina, provenientes da bacterioteca do setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC).

A TSC foi sintetizada e gentilmente fornecida pelo Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) *campus* Londrina, sob responsabilidade do professor Dr. Fábio Vandresen. O CCCP e o sulfato de polimixina B foram adquiridos comercialmente (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA e Inlab, São Paulo, SP, Brasil, respectivamente).

A avaliação do efeito combinado da polimixina foi realizada empregando a técnica de microdiluição em caldo Muller Hinton cátions ajustados (CAMHB Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) com e sem concentrações fixas de TSC (25 µg/ml) ou CCCP (12,5 µg/ml).

Resultados e Discussão

Ni et al. (2016) observaram a diminuição da CIM de polimixina quando associada ao CCCP contra algumas bactérias Gram negativas, em especial em não fermentadoras de glicose, como *Acinetobacter* spp. e *Stenotropomonas maltophilia*. Esses autores sugeriram que o CCCP, conhecido como um inibidor de bombas de efluxo, neste caso poderia atuar como um restaurador da carga negativa das membranas das bactérias resistentes à polimixina, através do rompimento da força motriz do próton. Assim, o desenvolvimento de novas moléculas, com ação semelhante ao CCCP, mas com menor potencial citotóxico poderiam ser utilizadas para o tratamento de infecções por bactérias Gram negativas multirresistentes.

Em nosso trabalho observamos que TSC e CCCP diminuíram a CIM da polimixina em todos os isolados polimixina-resistentes. Desta forma, considerando os pontos de corte que define a sensibilidade para polimixina (≤ 2 µg/ml = Sensível e > 2 µg/ml = Resistente), tanto CCCP como TSC foram capazes de, em isolados de ERC resistentes à polimixina, resgatar a atividade deste antimicrobiano. Entretanto,

o mesmo perfil de redução na CIM de polimixina não foi observado nos isolados polimixina-sensíveis (Tabela1).

Considerando que a substância química TSC apresenta uma citotoxicidade baixa para células epiteliais da linhagem VERO (SOUZA et al., 2018), esta poderia ser utilizada como adjuvante no tratamento de infecções por ERC resistentes à polimixina.

Tabela 1. Perfil de sensibilidade e concentração inibitória mínima (CIM) da polimixina isoladamente e em associação com tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) e o inibidor de bomba de efluxo carbonilcianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) em isolados clínicos de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERCs).

ERCs	Perfil de resistência a polimixina	CIM polimixina (ug/ml)	CIM polimixina associada a TSC (ug/ml)	CIM polimixina associada ao CCCP (ug/ml)
IC 1	R	32	1	0,5
IC 2	S	0,25	0,25	NT
IC 3	R	256	1	0,5
IC 4	R	256	1	0,5
IC 5	R	64	0,5	0,25
IC 6	S	0,25	0,12	NT
IC 7	S	0,5	0,5	NT
IC 8	S	0,25	0,25	NT
IC 9	S	0,25	0,25	NT
IC 10	R	64	0,5	NT
IC 11	S	0,25	0,25	NT
IC 12	R	32	2	0,5
IC 13	R	16	1	0,5
IC 14	S	0,25	NT	0,25
IC 15	S	0,5	NT	0,5

R: resistente; S: sensível; NT: não testado; IC: Isolado clínico

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a TSC pode atuar de maneira semelhante ao CCCP, diminuindo a CIM da polimixina em ERCs polimixina-resistentes. Desta forma, TSC em combinação com polimixina poderia ser empregada para o tratamento de infecções causadas por estas bactérias.

Agradecimentos

À Fundação Araucária.

Referências

NI, W. et al. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 3215-3218, 2016.

SHEU, C. et al. Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An Update on Therapeutic Options. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 2019.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 1038, 2016.

SOUZA, M R.P. et al. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Natural product research**, v. 24, p. 1-6, 2018.