

POLIMIXINA B EM ENTEROBACTERIACEAE RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS: AÇÃO COMBINADA COM 4-HIDROXI- TIOSEMICARBAZONA DERIVADA DO (-)-CANFENO OU NICOTINAMIDA

Amanda Dias Pedro (PIBIC-AF-IS/UEM), Pedro Henrique Rodrigues do Amaral, Renata Zacanini Milani, João Paulo Salvaterra Pasquini, Fábio Vandresen, Regiane Bertin de Lima Scodro, Vera Lucia Dias Siqueira (Orientadora), e-mail: amandadiaspedro200700@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Departamento de Química/Londrina, PR.

Microbiologia / Bacteriologia

Palavras-chave: Polimixina B, atividade antibacteriana, combinações terapêuticas

Resumo

A emergência de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) tem levado ao aumento do uso de polimixinas (Polimixina B – PMB e colistina) como uma das poucas opções terapêuticas. Entretanto, relatos de isolados de ERC resistentes às polimixinas estão aumentando e novas opções terapêuticas são almejadas. Nesse sentido, o objetivo deste projeto foi avaliar a atividade inibitória da PMB combinada com 4-hidroxi-tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (4-OH-TSZ) ou nicotinamida (NAM) sobre o crescimento de isolados de ERC sensíveis e resistentes à PMB. A atividade da PMB e da PMB combinada com 4-OH-TSZ ou NAM foi avaliada empregando metodologia para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O fator modulatório (FM) foi calculado a partir da fórmula $FM = CIM_{PMB} / CIM_{PMB + 4-OH-TSZ \text{ ou } NAM}$ e refletiu a capacidade do 4-OH-TSZ ou NAM modular a atividade da PMB quando $FM \geq 4$. Neste estudo observamos que o 4-OH-TSZ atuou modulando ($FM > 4$) a atividade da PMB, especialmente contra *Klebsiella pneumoniae*, resgatando a atividade deste antimicrobiano nos isolados resistentes. NAM não modulou ($FM < 4$) a atividade da PMB contra os isolados testados. Os resultados obtidos mostram que, embora NAM não tenha apresentado efeito modulatório, 4-OH-TSZ pode representar uma promissora opção como adjuvante da PMB para o tratamento de infecções causadas por ERC, inclusive podendo resgatar a atividade deste antimicrobiano em *K. pneumoniae*.

Introdução

Algumas espécies de *Enterobacteriaceae*, em particular *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* são capazes de causar diferentes tipos de infecção, atingindo tanto pacientes hospitalizados como ambulatoriais. A resistência aos carbapenêmicos nestas espécies bacterianas têm levado a utilização de outras opções terapêuticas, dentre elas as polimixinas (SHEU et al., 2019). Polimixina B (PMB) e colistina representam antimicrobianos catiônicos, da classe das polimixinas, usados clinicamente. Com o aumento do uso, diversos isolados resistentes às polimixinas já foram relatados (SHEU et al., 2019). Com o objetivo de barrar e combater o avanço

de infecções bacterianas, especialmente aquelas causadas por *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC), há uma busca crescente por novas substâncias de origem natural, semissintética ou sintética, (SHEU et al., 2019). Tiossemicarbazonas derivadas do (-)-canfeno têm sido investigada e resultados promissores foram observados (SOUZA et al., 2018). Nicotinamida (NAM) é um derivado amida do ácido nicotínico, que tem sido usado para uma variedade de aplicações terapêuticas, inclusive como antimicrobiano (MURRAY, 2003).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade da 4-hidroxi-tiossemicarbazona derivada do (-)-canfeno (4-OH-TSZ) e da NAM em modular a atividade da PMB em isolados clínicos de ERC sensíveis e resistentes à este antimicrobiano.

Materiais e métodos

Foram utilizadas ERC sensíveis e resistentes à PMB, provenientes de uma coleção depositada na bacterioteca do setor de Bacteriologia Médica, do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá, PR. O derivado 4-OH-TSZ foi sintetizado e fornecido pelo Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). NAM e PMB foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). A concentração inibitória mínima (CIM) da PMB e das combinações PMB + 4-OH-TSZ e PMB + NAM foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, usando Muller Hinton Broth com ajuste de cátions (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA), conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). *Escherichia coli* ATCC 25922 foi testada como controle. A interpretação do perfil de sensibilidade à PMB foi de acordo com os pontos de corte (sensível $\leq 2 \mu\text{g/mL}$; resistente $> 2 \mu\text{g/mL}$) estabelecidos pelo BrCAST (2020).

O fator modulatório (FM) foi calculado a partir da fórmula $FM = \text{CIM}_{\text{PMB}} / \text{CIM}_{\text{PMB} + 4\text{-OH-TSZ ou NAM}}$ e refletiu a atividade do 4-OH-TSZ ou NAM de modular a atividade da PMB quando $FM \geq 4$.

Resultados e Discussão

A substância química 4-OH-TSZ foi sintetizada e caracterizada previamente (SOUZA et al., 2018). Embora tenha demonstrado ação contra *Mycobacterium tuberculosis* (SOUZA et al., 2018) e contra cocos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp. (Dados em publicação), 4-OH-TSZ não tem ação direta contra bactérias Gram-negativas. Por outro lado, a PMB é um importante antimicrobiano que atua sobre a parede celular de bactérias Gram-negativas, especialmente sobre o lipopolissacarídeo (LPS), promovendo a morte bacteriana. Entretanto, bactérias com alteração no LPS se apresentam resistentes a PMB.

Neste estudo observamos que o 4-OH-TSZ atuou modulando ($FM > 4$) a atividade da PMB, contra todos os isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à PMB. Com exceção de dois isolados ($\text{CIM} = 1 \mu\text{g/ml}$), a modulação ocorreu em *K. pneumoniae* com CIM elevada para PMB (tabela 1). Em um isolado de *Proteus mirabilis* que é naturalmente resistente a PMB ($\text{MIC} > 1024 \mu\text{g/ml}$) o 4-OH-TSZ não modulou a atividade inibitória da PMB e não alterou a CIM.

NAM não modulou a atividade da PMB nos isolados sensíveis e resistentes testados, não diminuindo a CIM da PMB (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de sensibilidade e concentração inibitória mínima (CIM) de polimixina B (PMB) combinada ou não com 4-OH tiossemicarbazona derivada do (-)-canfeno (4-OH-TSZ) e nicotinamida (NAM) e fator modulatório (FM) de 4-OH-TSZ e NAM sobre a PMB em isolados de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC).

Isolado/Espécie de ERC	Perfil sensibilidade polimixina*	CIM polimixina (µg/mL)	CIM polimixina + 4-OH-TSZ (µg/mL) (FM)**	CIM polimixina + NAM (µg/mL) (FM)**
5850/K. p	R	128	1 (128)	128 (1)
8872/K. p	R	64	1 (64)	64 (1)
2428/K. p	S	1	0,008 (128)	1 (1)
1345/K. p	S	1	0,06 (16)	1 (1)
3437/K. p	R	32	1 (32)	32 (1)
0667/K. p	S	0,5	1 (0,5)	0,5 (1)
4760/K. p	S	0,5	0,5 (1)	0,5 (1)
7395/K. p	S	0,5	0,5 (1)	0,5 (1)
7379/K. p	S	0,5	0,5 (1)	0,5 (1)
2887/P. m	R	>1024	>1024 (1)	>1024 (1)
5121/K. p	S	0,5	0,5 (1)	NT
2409/K. p	S	1	0,5 (0,5)	NT
6250/K. p	S	1	0,5 (0,5)	NT
8154/K. p	R	16	1 (16)	NT
8295/K. p	R	16	1 (16)	NT
0663/K. p	S	0,5	0,5 (1)	NT

*Interpretação segundo BrCast/2020 ($S \leq 2$, > 2 R); ** Atividade Modulatória de 4-OH-TSZ ou NAM quando FM > 4
K. p: *Klebsiella pneumoniae*, Pm: *Proteus mirabilis*, S: Sensível, R: resistente, NT: Não testado.

Mais isolados bacterianos precisam ser testados, inclusive de outras espécies de *Enterobacteriaceae* sensíveis e resistentes a PMB, para uma melhor compreensão da atividade modulatória da substância química 4-OH-TSZ.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo indicam que, embora NAM não tenha apresentado efeito modulatório sobre a atividade da PMB, 4-OH-TSZ pode representar um promissor adjuvante deste antimicrobiano para o tratamento de infecções por ERC, inclusive podendo resgatar sua atividade em *K. pneumoniae*.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária, ao laboratório de Bacteriologia Médica da UEM por permitir a realização do estudo e à minha orientadora por me auxiliar e me incentivar.

Referências

BrCAST – **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility**. Tabelas pontos corte clínicos, versão 2020. Disponível em <http://brcast.org.br/>. Acesso 11/08/2020.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratories Standards Inst., 2020.

MURRAY, Michael F. Nicotinamide: an oral antimicrobial agent with activity against both *Mycobacterium tuberculosis* and human immunodeficiency virus. **Clinical infectious diseases**, v. 36, n. 4, p. 453-460, 2003.

SHEU CC, CHANG YT, LIN SY, CHEN YH, HSUEH PR. Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An Update on Therapeutic Options. **Frontier Microbiology**, v.10, p 80-93, 2019.

SOUZA MRP, COELHO NP, BALDIN VP, SCODRO RBL, CARDOSO RF, SILVA CC, VANDRESEN F. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Natural Product Research**, v. 33, n. 23, p. 3372-77, 2018.