

AValiação DA AÇÃO Combinada ENTRE Tiossemicarbazida Derivada DO (-)-CANFENO E Meropenem EM *ENTEROBACTERIACEAE* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS

Pedro Henrique Rodrigues do Amaral (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Bruna Renata Silva, Renata Zacanini Milani, Amanda Dias Pedro, Fábio Vandressen, Rosilene Fressatti Cardoso, Vera Lucia Dias Siqueira (Orientadora), e-mail: vldsiqueira@gmail.com

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

Área: Ciências Biológicas - 2.00.00.00-6

Subárea: Microbiologia Médica - 2.12.02.01-0

Palavras-chave: Derivados de canfeno; Meropenem; *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos

Resumo:

A emergência e disseminação de microrganismos com resistência a múltiplos fármacos, em particular *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC), como o meropenem (MERO), limita as opções para terapia antimicrobiana. Essa multirresistência tem levado a busca por novas opções de tratamento e estimulado pesquisas com novas substâncias químicas com atividade antibacteriana. Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) tem atividade, comprovada em estudos anteriores, contra alguns microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, micobactérias e fungos, porém não tem atividade direta contra ERC. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar a capacidade da TSC em modular a atividade do MERO contra isolados clínicos de ERC. A concentração inibitória mínima (CIM) do MERO com e sem diferentes concentrações de TSC foi determinada por microdiluição em caldo. O fator modulatório (FM) foi calculado ($FM = CIM_{MERO} / CIM_{MERO + TSC}$) e determinou a capacidade da TSC modular atividade do meropenem quando $FM \geq 4$. Os valores da CIM do MERO variaram de 8 a 512 $\mu\text{g/mL}$. Importantes reduções nessas CIM foram observadas na associação com a TSC, especialmente na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, em isolados de ERC produtores de carbapenemase do tipo *New Delhi* metalo-betalactamase (NDM). Nessa mesma concentração a TSC modulou a atividade do MERO ($FM \geq 4$) em 69,2% dos isolados produtores de NDM. Em isolados resistentes aos carbapenêmicos por mecanismos que não a produção de NDM, TSC não foi capaz de reduzir a CIM do MERO. Os resultados obtidos destacam que TSC pode representar um promissor modulador da atividade do MERO em ERC produtoras de NDM.

Introdução

Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos (ERC), última geração de antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, representam uma ameaça à saúde pública, devido aos altos índices de mortalidade. Espécies de ERC estão envolvidas em diversos tipos de infecções, especialmente as relacionadas à assistência à

saúde. Produção de beta-lactamases do tipo carbapenemases é o mecanismo mais frequentemente relacionado à resistência aos carbapenêmicos, inclusive ao meropenem (MERO), nessas espécies bacterianas. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), *New Delhi* metalo-betalactamase (NDM) e oxacilinas (OXA) são as principais carbapenemases produzidas por ERC (PERI et al., 2019).

Alternativas terapêuticas, como polimixinas, tigeciclina, bem como associações de antimicrobianos podem ser utilizadas para tratar infecções por ERC. Entretanto, isolados resistentes à polimixina e tigeciclina foram relatados em diversas regiões do mundo, restringindo ainda mais as opções de tratamento (SHEU et al., 2019). Nesse sentido, a otimização de moléculas com potencial antimicrobiano tem sido alvo de pesquisas farmacológicas e a síntese química contribui com diversos compostos com potencial antimicrobiano. A tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) foi definida, em estudos anteriores, como um promissor candidato a agente antimicrobiano (SOUZA et al., 2018). Embora TSC não tenha apresentado ação direta contra bactérias Gram-negativas, como ERC, atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (SOUZA et al., 2018) e Cocos Gram-positivos (Dados em publicação) já foram relatadas. Diante disso, este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade da TSC em modular a atividade do MERO contra isolados clínicos de ERC.

Materiais e métodos

TSC foi sintetizada como descrito por Souza et al. (2018) e diluída em dimetilssufóxido (DMSO, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA,) para obter solução estoque de concentração igual a 10.000 µg/ml. MERO foi adquirido comercialmente (AstraZeneca, Cotia, Brasil) e preparado em solução estoque na concentração de 10.240 µg/ml.

Foram testados isolados clínicos de ERC das espécies *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae* 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. Os isolados bacterianos estocados a -80°C em caldo triptona de soja (TSB - Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) adicionado de 15 % de glicerol (Synth, Diadema, SP, Brazil) foram reativados de acordo com a necessidade da realização de cada teste.

A concentração inibitória mínima (CIM) do MERO com e sem diferentes concentrações de TSC (50, 25 e 10 µg/ml) foi determinada empregando o método de microdiluição em caldo, usando Muller Hinton Broth com ajuste de cátions (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA), conforme recomendação e critérios de interpretação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC® 29213 foi utilizado como controle. A atividade da ação combinada foi determinada pelo fator de modulação (FM), calculado a partir da fórmula $FM = (CIM_{MERO}) / (CIM_{MERO+TSC})$. O efeito modulatório foi definido quando uma redução ≥ 4 na CIM da combinação (MERO+TSC) em relação ao MERO foi observada (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2019).

Resultados e Discussão

As CIMs do MERO variaram de 8 a 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e importantes reduções foram observadas na associação com a TSC, especialmente na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, apenas nos isolados de ERC produtores de NDM (Tabela 1). Foi possível observar que 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TSC modulou a ação do MERO ($\text{FM} \geq 4$) em 69,2% ($n=9$) dos isolados de ERC produtores de NDM. Nas concentrações de 25 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a TSC modulou a ação em 15,4 ($n=2$) e 7,8% ($n=1$) desses isolados, respectivamente (Tabela 1). Em quatro isolados de ERC produtores de NDM a TSC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não melhorou significativamente a ação do meropenem ($\text{FM} = 2$ e $\text{FM} = 1$), o que poderia ser explicado por um possível segundo mecanismo de resistência aos carbapenêmicos presente nesses isolados. A TSC não reduziu a CIM do MERO nos isolados de ERC produtores de KPC ou naqueles em que nenhuma carbapenemase foi detectada fenotipicamente (Tabela 1).

Tabela 1: Tipos de carbapenemases produzidas, concentração inibitória mínima (CIM) do meropenem (MERO) com e sem diferentes concentrações (50, 25 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) e fator de modulação (FM) das diferentes concentrações de TSC sobre o MERO em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC).

ERC	Tipo de carbapenemase	MERO	MERO+TSC ₅₀	MERO+TSC ₂₅	MERO+TSC ₁₀
		CIM em $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FM)			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	64	4 (16)	16 (4)	16 (4)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	NDM	128	32 (4)	64 (2)	64(2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	32	8 (4)	16 (2)	16 (2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	64	64 (1)	64 (1)	64 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	64	64 (1)	64 (1)	64 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	128	128 (1)	128 (1)	128 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	128	128 (1)	128 (1)	128 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	512	512 (1)	512 (1)	512 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	64	64 (1)	64 (1)	64 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	128	64 (2)	128 (1)	128 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	128	128 (1)	128 (1)	128 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ND	16	16 (1)	16 (1)	16 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ND	8	8 (1)	8 (1)	8 (1)
<i>Escherichia coli</i>	NDM	256	256 (1)	256 (1)	256 (1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	128	128 (1)	128 (1)	128 (1)
<i>Escherichia coli</i>	NDM	128	32 (4)	64 (2)	64 (2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	128	32 (4)	32 (4)	64 (2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	64	16 (4)	32 (2)	32 (2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	64	16 (4)	32 (2)	32 (2)
<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	32	32 (1)	32 (1)	32 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	128	32 (4)	64 (2)	128 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	64	16 (4)	32 (2)	32 (2)

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM: *New Delhi* metalobetalactamase; ND: Não determinada

Conclusões

Os resultados encontrados destacam que, em concentração dependente, a TSC

melhora a atividade do MERO em isolados clínicos de ERC.

Agradecimentos

Agradeço ao grupo do laboratório, a minha orientadora e ao CNPq que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto.

Referências

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

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; CARDOSO, R. F.; DE SOUZA, J. V.; MURASE, L. S.; CANEZIN, P. H.; SCODRO, R. B., et al. Modulatory effects of verapamil in rifampicin activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Future Microbiol.** v.14, p.185–94, 2019.

PERI AM, DOI Y, POTOSKI BA, HARRIS PNA, PATERSON DL, RIGHI E. Antimicrobial treatment challenges in the era of carbapenem resistance. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 94, n. 4, p. 413-425, 2019.

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

SOUZA, M. R. P.; Coelho, N. P.; Baldin, V. P.; Scodro, R. B. L.; Cardoso, R. F.; Silva, C. C., et al. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Nat Prod Res**, v. 24, p.1-6, 2018.