

Avaliação da taxa de mutantes de *Mycobacterium abscessus* exposto a concentrações subinibitórias de piperina combinada a claritromicina ou amicacina

Beatriz Ignácio Pinel (PIBIC/CNPq/FA/UEM), João Vítor Perez de Souza, Leticia Sayuri Murase, Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador), e-mail: rfcardoso@uem.br.

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

Área: microbiologia (21200009) subárea: bacterologia (21201021)

Palavras-chave: *Mycobacterium abscessus*, resistência, piperina.

Resumo:

As micobactérias não tuberculosas (MNT) formam um grupo de bactérias no gênero *Mycobacterium* spp. e algumas incriminadas em causar uma gama de doenças humanas. As MNT foram consideradas importantes patógenos humanos nas últimas décadas. *Mycobacterium abscessus* é uma das espécies de MNT, de crescimento rápido, mais comumente envolvida em causar doenças pulmonares. As doenças causadas por MNT estão associadas à resistência natural das diferentes espécies aos fármacos, o que leva à resultados clínicos decepcionantes. Além do número de casos crescente, *M. abscessus* possui mecanismos de virulência importantes. O objetivo deste estudo foi padronizar uma técnica para avaliar o desenvolvimento de *M. abscessus* resistentes, bem como avaliar o efeito da piperina (PIP) na prevenção de desenvolvimento desses mutantes resistentes a claritromicina (CLA) e amicacina (AMK). Foram realizados experimentos para padronizar, desde as diluições dos fármacos em teste, preparo de meios sólidos contendo os fármacos, preparo das suspensões de *M. abscessus* e semeadura nos meios de cultivo, bem como o tempo de incubação para de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada fármaco isoladamente e em combinação com PIP. A concentração de fármaco que inibiu totalmente o crescimento de *M. abscessus* foi 390 µg/mL para AMK e 360 µg/mL para CLA. Porém, quando iniciamos os estudos com PIP estes precisaram ser interrompidos devido a pandemia por COVID-19. Acreditamos que a técnica padronizada para detecção de mutantes de *M. abscessus* resistentes a fármacos contribuirá para as pesquisas futuras no nosso laboratório e a mesma possa ser usada em estudos com outras espécies do gênero *Mycobacterium*.

Introdução

Micobactérias não tuberculosas (MNT) apresentarem patogenicidade variável e estão dispersas na natureza, principalmente no solo e na água. MNT de crescimento rápido, como é o caso de *M. abscessus*, desenvolvem colônias em até sete dias, enquanto que as de crescimento lento necessitam

de um tempo maior para apresentarem colônias visíveis (ATUNES et al., 2012). Dentre as MNT responsáveis em causar doenças, *M. abscessus* se destaca pelo número de casos crescente em todo o mundo. Este patógeno possui mecanismos de virulência importantes, como a formação de biofilme e estratégias para se evadir da resposta imune do hospedeiro (COWMAN et al., 2016). Doenças por *M. abscessus* também se destacam quanto dificuldade no tratamento, uma vez que essa espécie de micobactéria é resistente a diversos fármacos. O tratamento das micobacterioses, doenças causadas por MNT, é constituído de múltiplos fármacos que atuam simultaneamente, mas com mecanismos de ação diferentes para evitar o desenvolvimento de resistência a esses. Os fármacos mais utilizados no tratamento dessas doenças são amicacina (AMK), claritromicina (CLA) e quinolonas (ATUNES et al., 2012). Estudos apontam que combinações de antimicrobianos disponíveis, como possíveis inibidores de bombas de efluxo apresentam resultados positivos para superar a resistência das micobactérias. A piperina (PIP), um alcalóide isolado de *Piper nigrum* (pimenta do reino), demonstrou diversas atividades biológicas e destaca-se principalmente pelo aumento da biodisponibilidade de fármacos (DE OLIVEIRA; ALENCAR-FILHO; VASCONCELLOS, 2014) e também atuar de modo sinérgico, contra *Mycobacterium tuberculosis*, quando combinada à alguns fármacos (MENICHINI; LARI; RINDI, 2020). Considerando as propriedades já descritas da PIP, o objetivo deste estudo foi padronizar uma técnica para avaliar o desenvolvimento de *M. abscessus* resistentes, bem como avaliar o efeito da PIP na prevenção de desenvolvimento desses mutantes a CLA e AMK.

Materiais e métodos

Padronização dos procedimentos experimentais

Inicialmente foram realizados estudos para padronizar os procedimentos técnicos para determinar a ação de CLA e AMK, isoladamente e combinadas com PIP, na prevenção do surgimento de mutantes, de *M. abscessus* com resistência a variadas concentrações desses fármacos em meio de cultivo sólido. Para isso, foi avaliada a melhor forma para: i) diluir fármacos; ii) aliquotar meio de cultura e adição dos fármacos em concentrações pré estabelecidas aos meios de cultivo; iii) inóculo bacteriano; e iv) tempo de incubação dos meios de cultivo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Após a padronização, foi definida a seguinte metodologia.

Meio de cultura e preparo de placas contento meios com antimicrobianos

O meio de cultura Middlebrook 7H11 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) suplementado com 0,5% de glicerol foi utilizado para o preparo de 12 concentrações de CLA e AMK. Para isso, quantidades específicas de soluções estoque dos fármacos foram adicionadas a 10 mL de meio de cultura a uma temperatura de 56 °C e posteriormente envasados em placas

de petri septadas para obter concentrações finais dos fármacos de 0,0625 a 10 mM.

Determinação da concentração inibitória mínima em meio sólido

Culturas de *M. abscessus* em meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (Ac. Oléico, Albumina, Dextrose e Catalase), e adicionadas de fagulhas de vidro, foram submetidas à agitação em vortex por 2 minutos. Após homogeneização, as suspensões bacterianas foram padronizadas com turvação equivalente a escala de McFarland 0,5. Posteriormente, 100 uL da suspensão bacteriana foi semeada em Middlebrook 7H11 suplementado com OADC (Ac. Oléico, Albumina, Dextrose e Catalase) contendo os fármacos em diferentes concentrações. Após 7 dias de incubação a 37°C, foi realizada a contagem do número de colônias desenvolvidas nos meios contendo diferentes concentrações de AMK bem como de CLA isoladamente e combinadas com PIP. A CIM, para cada fármaco isoladamente e combinado com PIP, foi determinada nos meios com a menor concentração de fármacos em teste, onde não houve crescimento de *M. abscessus*.

Resultados e Discussão

O surgimento de isolados clínicos de *M. abscessus* resistentes aos fármacos disponíveis é uma ameaça ao controle e tratamento de doenças causadas por este microrganismo. O desenvolvimento de novos fármacos ou de novas estratégias terapêuticas que seja eficaz contra o bacilo e capaz diminuir o surgimento de resistência bacilar é uma necessidade atual. Inicialmente, realizamos a padronização da técnica para determinar a frequência de mutantes de *M. abscessus* resistentes a AMK e CLA. Após, foi conduzido estudo da determinação da frequência de desenvolvimento de mutantes resistentes a CLA e AMK isoladamente e combinadas com PIP em *M. abscessus*. Foram realizados experimentos para padronizar cada etapa do ensaio. Primeiramente, a realização da diluição dos fármacos foi testada em tubos cônicos, microtubos e em microplacas. Dentre esses, a diluição em microplacas se mostrou vantajosa, pois permitiu trabalhar com volumes reduzidos de fármacos e meio de cultura líquido, evitando desperdícios. Com relação a preparação dos meios de cultivos sólidos, contendo as diferentes concentrações dos fármacos, primeiramente foi alíquotado o meio de cultura Middlebrook 7H11, ainda em sua forma líquida, em tubos cônicos e estes permaneceram em banho maria (56 °C) até o momento de adição dos fármacos na concentração desejada. O meio de cultura foi homogeneizado por inversão delicada, envasado em placas de petri e deixado solidificar. Para a semeadura do inóculo bacteriano, foi utilizado alça bacteriológica (10µL) descartável. Esta escolha foi feita devido ao número de placas a serem semeadas e possibilidade de contaminação entre as amostras. As placas semeadas com *M. abscessus* foram incubadas (37°C) e observadas a cada dois dias. A contagem de colônias desenvolvidas nos meios contendo os fármacos, foi realizada após 7 dias de incubação. Adicionalmente, as placas foram observadas por mais 7 dias. A

concentração de fármaco que inibiu totalmente o crescimento de *M. abscessus* foi 390 µg/mL para AMK e 360 µg/mL para CLA. Com a obtenção das CIM para AMK e CLA, o próximo passo seria avaliar a atividade de PIP em prevenir o surgimento de *M. abscessus* resistentes a AMK e CLA. Porém, já nos primeiros ensaios, os experimentos tiveram de ser interrompidos devido à pandemia de COVID-19. Apesar de não ter sido possível concluir os estudos na sua totalidade, outros estudos reforçam as atividades promissoras de PIP (MENICHINI; LARI; RINDI, 2020; SHARMA et al., 2010).

Conclusões

Neste estudo, padronizamos uma técnica que nos dá informações quanto a capacidade de determinados compostos de prevenir o surgimento de *M. abscessus* mutantes resistentes *in vitro* a fármacos. Assim, acreditamos que próximos estudos em nosso laboratório serão beneficiados por esta técnica. Acreditamos que a técnica padronizada para detecção de mutantes de *M. abscessus* resistentes a fármacos contribuirá para as pesquisas futuras no nosso laboratório e a mesma possa ser usada em estudos com outras espécies do gênero *Mycobacterium*.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Fundação Araucária pela bolsa concedida, a Prof^a Dr^a Rosilene Fressatti Cardoso por me conceder a oportunidade de ter um projeto de pesquisa no laboratório de Bacteriologia Médica, agradeço ao doutorando João Vitor Perez Souza pela dedicação e disposição de tempo em me auxiliar no projeto de pesquisa e também a equipe deste laboratório.

Referências

ATUNES, A. et al. Micobacterioses Não-Tuberculosas - Das Manifestações Clínicas ao Tratamento. **Arquivos de Medicina**, v. 26, n. 1, p. 25–30, 2012.

COWMAN, S. et al. The antimicrobial susceptibility of non-tuberculous mycobacteria. **Journal of Infection**, v. 72, n. 3, p. 324–331, 1 mar. 2016.

DE OLIVEIRA, R. G.; ALENCAR-FILHO, E. B.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Influência da piperina na biodisponibilidade de fármacos: Uma abordagem molecular. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 69–73, 2014.

MENICHINI, M.; LARI, N.; RINDI, L. Effect of efflux pump inhibitors on the susceptibility of *Mycobacterium avium* complex to clarithromycin. **The Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 2, p. 128–132, 17 fev. 2020

SHARMA, S. et al. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1694–1701, 2010.