

POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA POLIMIXINA B POR DERIVADOS 3,5 DINITROBENZOILHIDRAZÔNICOS E ISONIAZIDA CONTRA BACILOS GRAM-NEGATIVOS MULTIRRESISTENTES.

Thalita Camilo da Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Pedro Henrique Rodrigues do Amaral, João Paulo Salvaterra Pasquini, Fábio Vandresen; Regiane Bertin de Lima Scodro (coorientadora); Vera Lucia Dias Siqueira (Orientadora), e-mail: ra112875@uem.br.

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

Área: Ciências Biológicas - 2.00.00.00-6
Subárea: Microbiologia Médica - 2.12.02.01-0

Palavras-chave: Polimixina B, bactérias gram-negativas, adjuvantes.

Resumo:

O crescente número de infecções por bactérias multirresistentes (MDR), somado à escassez de novos antimicrobianos eficazes, aumentou a procura por alternativas terapêuticas. Nesse sentido, polimixina B (PMB) retornou como uma opção terapêutica e o aumento de seu uso levou à um acréscimo nas taxas de resistências a esse antimicrobiano. Moléculas doadoras de hidrogênio, como os derivados 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH) e isoniazida (INH) surgiram como alternativa para modular e resgatar a atividade da PMB. Assim, este trabalho teve o objetivo de avaliar a potencialização da atividade da PMB por derivados DNH e pela INH em bactérias multirresistentes. A concentração inibitória (CIM) e bactericida mínima (CBM) da PMB com ou sem associação aos derivados DNH e INH foram determinadas por microdiluição em caldo e repique em ágar com contagem de colônias, respectivamente. O efeito modulatório e o resgate da atividade da PMB foram definidos quando uma redução ≥ 4 na CIM e $CIM \leq 2 \mu\text{g/ml}$ da combinação PMB+DNH e PMB+INH em relação à PMB foram detectadas, respectivamente. Os derivados DNH mostraram melhor ação que a INH na modulação e resgate da atividade da PMB e podem representar promissores candidatos à adjuvantes terapêuticos contra bactérias multirresistentes.

Introdução

Uma elevação no número de casos de infecções por bactérias com elevadas taxas de resistência antimicrobiana, particularmente bacilos Gram-negativos multirresistentes (BGN-MDR), associado às limitadas opções de tratamento disponíveis, impulsiona a busca por alternativas terapêuticas. Polimixina B (PMB), um antigo antimicrobiano catiônico que atua diretamente sobre a parede bacteriana, retornou como uma das poucas alternativas contra BGN-MDR

(PATERSON, BONOMO, 2019). Em virtude da larga utilização de PMB, ocorreu um aumento da incidência de infecções por BGN-MDR resistentes a esse antimicrobiano. Pesquisas prévias definiram derivados 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH) e isoniazida (INH) como moléculas doadoras de hidrogênio (VALVERDE, 2020). Ni *et al* (2016) reportaram que moléculas capazes de restaurar a carga negativa das membranas bacterianas contribuíram com a melhoria da atividade inibitória de polimixinas. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade da PMB em combinação com derivados DNH e INH contra BGN-MDR resistentes à PMB.

Materiais e Métodos

Os isolados clínicos testados foram das espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* e *Acinetobacter baumannii*, todos provenientes da bacterioteca do setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas – LEPAC da Universidade Estadual de Maringá. Os antimicrobianos PMB e INH foram adquiridos comercialmente (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e preparados em solução estoque na concentração de 10.240 µg/ml e 4.000 µg/ml, respectivamente. Derivados DNH (3,5-dinitrobenzohidrazida ou DNH1, 2-hidroxibenzaldeído ou DNH11, tiofeno-2-carboxaldeído ou DNH13 e metil-3,5-dinitrobenzoato ou DNH20) foram sintetizados (VALVERDE, 2020) e fornecidos pelo Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Londrina. Os derivados DNH foram testados em concentrações de 50, 25 e 10 µg/ml, enquanto a INH foi testada na concentração de 50 µg/ml. A concentração inibitória mínima (CIM) da PMB com e sem os derivados DNH ou INH para os isolados clínicos de BGN-MDR foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, segundo recomendação do comitê brasileiro para teste de sensibilidade aos antimicrobianos (BrCAST, 2021). O efeito da ação combinada foi avaliado pelo fator de modulação (FM) de acordo com Caleffi-ferracioli *et al.*, 2019 e o resgate da atividade da PMB foi definida quando a CIM da combinação PMB+DNH ou PMB+INH foi ≤ 2 µg/ml (BrCAST, 2021). A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada a partir do teste de microdiluição em caldo, com repique em placas de TSA (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) sem antimicrobianos ou derivados. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e houve a contagem das unidades formadoras de colônias. A placa com a concentração que matou 99,9% das bactérias foi determinada como a CBM.

Resultados e Discussão

De acordo com os pontos de corte do BrCAST (BrCAST,2021), a determinação da CIM confirmou a resistência a PMB (CIM > 2 µg/ml) dos isolados clínicos testados (Tabela 1). Os derivados DNH foram eficazes em modular (FM ≥ 4) e resgatar (CIM ≤ 2 µg/ml) a atividade da PMB, especialmente na concentração de 50 µg/ml (Tabela 1). A redução da CIM da PMB foi menor quando os derivados DNH foram testados em concentrações de 25 e 10 µg/ml (dados não mostrados). Além disso, os ensaios utilizados para avaliar a atividade bactericida demonstraram que a associação entre PMB e os derivados DNH também foram capazes de

reduzir a CBM desse antimicrobiano para a maioria dos isolados testados (tabela 1).

O mecanismo de resistência de bactérias Gram-negativas à PMB mais comumente reportado está relacionado à interação das cargas elétricas entre a molécula de PMB e os grupos fosfato do lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular. As bactérias resistentes adicionam moléculas catiônicas ao LPS em substituição aos grupos fosfato, o que diminui a carga negativa da parede bacteriana e conseqüentemente a afinidade pela PMB (PATERSON, BONOMO, 2019). Ni *et al.* (2016), mostraram que moléculas capazes de restaurar a carga negativa da parede celular, a partir da ruptura da força motriz do próton, foram capazes de resgatar a atividade da colistina, um antimicrobiano lipopolipeptídico, muito semelhante a PMB. Nesse sentido, acreditamos que os derivados DNH01, DNH11 e DNH20 foram capazes de melhorar a interação entre PMB e a parede bacteriana, o que resultou na diminuição da CIM e CBM. Mais estudos precisam ser realizados para definir se houve uma interação direta sobre a parede bacteriana ou sobre a molécula de PMB.

Tabela 1. Concentração Inibitória (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) da Polimixina B (PMB) combinada ou não com derivados 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH 01,

Isolado	CIM (CBM) µg/ml/FM
---------	--------------------

11, 13 e 20) na concentração de 50 µg/ml e fator modulatório (FM) dos derivados DNH sobre a atividade da PMB em isolados clínicos de bactérias Gram-negativas multirresistentes (BGN-MDR).

clínico (BGN-MDR)	PMB	PMB+DNH01	PMB+DNH11	PMB+DNH13	PMB+DNH20
Kp 13	64	1 (>8)/64	32(-)/2	64 (-)/1	1 (>8)/64
Kp 47	16	0,5 (0,5)/32	1 (2)/16	8 (-)/2	0,5 (0,5)/32
Kp 97	32	≤0,5 (0,5)/64	2 (-)/16	32 (-)/1	≤0,5 (0,5)/64
Pm 116	≥512	≥512 (-)/1	≥512 (-)/1	≥512 (-)/1	≥512 (-)/1
Ps154	≥512	≥512 (-)/1	≥512 (-)/1	≥512 (-)/1	≥512 (-)/1
Ec 161	128	0,25 (-)/512	0,5 (-)/256	128 (-)/1	0,25 (-)/512
Ec 176	64	0,5 (1)/128	1 (-)/64	64 (-)/1	0,25 (0,25)/256
Kp 181	32	1 (1)/32	NT	32 (-)/1	0,5 (0,5)/64
Ec184	32	0,5 (0,5)/64	2 (-)/16	32 (-)/1	0,125 (-)/256
Ab AC252	128	0,5 (0,5)/256	0,5(-)/256	128 (-)/1	0,5 (0,5)/256
Ab ACCI	128	128 (-)/1	64 (/)2	128 (-)/1	128 (-)/1
Kp 259	16	0,5 (2)/32	NT	NT	4 (-)/4
Kp 260	32	≤0,5 (0,5)/64	NT	NT	0,5 (-)/64
Kp 261	32	≤0,5 (0,5)/64	NT	NT	0,5 (-)/64
Kp 262	64	8 (-)/8	NT	NT	1 (-)/64

Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Pm: *Proteus mirabilis*, Ps: *Providencia stuartii*, Ec Complexo *Enterobacter cloacae*, Ab: *Acinetobacter baumannii*.

Como em concentração de 50 µg/ml a INH não foi eficaz na diminuição da CIM da PMB, concentrações menores não foram testadas. Os resultados mostraram que a INH, um fármaco utilizado no primeiro esquema terapêutico para a tuberculose, não modulou ou resgatou a ação da PMB em nenhum isolado testado (dados não mostrados), provavelmente por não atuar sobre as cargas elétricas da parede celular ou da própria molécula de PMB.

Conclusões

Os resultados encontrados destacam que, ao contrário do fármaco INH, os derivados DNH (DNH 01, 11 e 20) foram capazes de modular e resgatar a atividade da PMB, podendo constituir importantes candidatos à adjuvantes na terapia contra BGN-MDR.

Agradecimentos

Agradeço ao grupo do laboratório pela paciência em me ensinar, a minha orientadora e ao CNPq que possibilitaram o desenvolvimento desse projeto.

Referências

BrCAST – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, disponível em: <http://brcast.org.br/documentos>. Acesso em 29.08.2021.

CALEFFI-FERRACIOLI, K.R. et al. Modulatory effects of verapamil in rifampicin activity *against Mycobacterium tuberculosis*. **Future microbiology**, London, v. 14, n. 3, p. 185-194, 2019.

PATERSON, David L.; BONOMO, Robert A. Multidrug-resistant gram-negative pathogens: The urgent need for 'old polymyxins. **Advances in experimental medicine and biology**. New York, v. 1145 p. 9-13, 2019.

NI W, LI Y, GUAN J, ZHAO J, CUI J, WANG R, *et al*. Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 60, n. 5, p. 3215-3218, 2016

VALVERDE, T.L. **Derivados 3,5-dinitrobenzoilhidrazônicos como modelo para o desenvolvimento de fármacos antituberculose**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 59 f. 2020.