

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COMBINATÓRIA DE PIPERINA E AMICACINA EM ESPÉCIES DO COMPLEXO *Mycobacterium abscessus*

Renata Alexandre de Oliveira¹ (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Giulienne Karla Pereira da Silva¹, Carolina Trevisolli Palomo¹, João Vítor Perez de Souza¹; Letícia Sayuri Murase¹, Rosilene Fressatti Cardoso¹ (Orientador),
e-mail: rfcardoso@uem.br

¹Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e sub-área: Ciências da Saúde, Microbiologia.

Palavras-chave: Amicacina, *Mycobacterium abscessus*, piperina, sinergismo.

Resumo:

O tratamento padrão para infecções causadas pelo complexo *Mycobacterium abscessus* (MAB) é poliquimioterápico, baseado na associação de macrolídeos e aminoglicosídeos, como a amicacina (AMK). Infelizmente, o tratamento de doenças causadas por esses microrganismos possui baixa eficácia devido à alta resistência de MAB aos antimicrobianos. Para contornar esse problema, a busca por novas estratégias terapêuticas é uma necessidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de susceptibilidade e atividade combinatória de piperina (PIP), alcalóide isolado da pimenta-do-reino, e AMK em espécies do complexo MAB. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay*. PIP isolada apresentou baixa atividade contra o complexo MAB (CIM 32-128 µg/mL) e AMK apresentou de maior heterogeneidade no valor de CIM (0,125-8 µg/mL). A atividade combinatória entre AMK e PIP foi avaliada por meio do ensaio *resazurin drug combination microtiter assay*. PIP reduziu o valor da CIM de AMK (2 a 4 vezes) em isolados do complexo MAB. Estudos com um número maior de isolados são necessários para um melhor entendimento da interação entre PIP e AMK nesse complexo bacteriano.

Introdução

Micobactérias do complexo *Mycobacterium abscessus* (MAB) são importantes patógenos humanos, responsáveis por um amplo espectro de infecções pulmonares, de tecidos moles e infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos (GRIFFITH, 2007). Devido à alta resistência de MAB aos medicamentos disponíveis, o tratamento dessas infecções é lento, caro e, muitas vezes, ineficaz (LEE, 2017).

A resistência intrínseca de MAB é atribuída à alta permeabilidade da parede celular, à presença de sistemas de efluxo bem ativos e à ação de enzimas que neutralizam ou inativam fármacos. A alta taxa de mutações espontâneas em genes-alvo, o que pode ter relação com a resistência, também é uma característica que limita as opções terapêuticas disponíveis contra MAB (NESSAR et al., 2012).

A amicacina (AMK) é um dos fármacos utilizados no esquema terapêutico padrão. Este fármaco inibe a síntese protéica bacteriana ao se ligar

irreversivelmente à subunidade 30S do ribossomo (MURRAY, 2017). Vale ressaltar que os pacientes com micobacteriose devem tomar múltiplos antibióticos por um longo período de tempo, em especial claritromicina, imipenem, AMK, cefoxitina e sulfonamidas (MURRAY, 2017). Sendo assim, a administração de AMK de maneira isolada, seria incapaz de eliminar o bacilo. E em alguns casos, mesmo associada a outros fármacos é muito comum a infecção persistir devido a resistência de MAB a múltiplos fármacos (FLORES et al., 2018).

Considerando o aumento de infecções por MAB, nas últimas décadas e a baixa efetividade do tratamento com fármacos tradicionais, a busca por novas estratégias terapêuticas é de extrema importância. Piperina (PIP) é um alcalóide isolado de *Piper* sp. com importantes propriedades farmacológicas já relatadas, dentre elas antimicrobiana (MOON et al., 2016), anti-inflamatória (MURUNIKKARA, 2012), e imunomoduladora (SANTOS, 2018).

Apesar de resultados promissores terem sido encontrados em estudos prévios, a atividade de PIP no combate à MAB ainda não foi completamente elucidada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de susceptibilidade de PIP e AMK em MAB e avaliar a atividade combinatória dos respectivos fármacos neste grupo bacteriano.

Materiais e Métodos

Cinco isolados clínicos de MAB, pertencentes à micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica foram reativados em meio de cultura Lowenstein-Jensen e transferidos para crescimento em meio líquido Mueller Hinton Broth (MHB) a 30 °C por 3–5 dias.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de PIP, AMK, e ciprofloxacino (CIP) (controle interno de diluição) para cada isolado clínico de MAB foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* (Palomino et al., 2002). As concentrações utilizadas para cada fármaco variaram de 0,06-16 µg/mL para AMK e CIP e de 4-1024 µg/mL para e PIP. O inóculo micobacteriano foi padronizado utilizando escala de McFarland 0,5, diluído 1:200 e semeado (100 µL) nos orifícios das microplacas contendo as diluições dos fármacos e PIP. As microplacas foram incubadas a 30°C por 3 dias. Após incubação, 30 µL de resazurina 0,01% foram adicionados aos orifícios e as mesmas reincubadas por mais 24h. A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento micobacteriano, caracterizado pela mudança de cor da resazurina de azul para róseo. Controles de esterilidade e crescimento bacteriano foram incorporados aos experimentos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A interação entre PIP e AMK foi avaliada pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2013). As microplacas foram preparadas com AMK (0,06-16 µg/mL, no eixo X) e PIP (4-1024 µg/mL, no eixo Y) e os fármacos foram diluídos seriadamente. Após, 100 µL da suspensão bacteriana em concentração ajustada com escala McFarland 0,5 e diluída 1:200 foi adicionada em cada orifício da microplaca. As microplacas foram incubadas por 3 dias a 30°C. Após esse período, 30 uL de resazurina 0,01% foram adicionados aos orifícios das microplacas, contendo as combinações de fármacos, e incubadas novamente por 24 h. A mudança de cor de azul para rosa indicou redução da

resazurina e, portanto, do crescimento bacteriano. O efeito de PIP sobre a atividade de AMK em bactérias do Complexo MAB foi determinado pelo fator de modulação (FM), onde $FM = (CIM\ AMK)/(CIM\ [AMK+PIP])$. FM reflete a redução de valores da CIM de AMK na presença de PIP. Consideramos resultados significativos, quando $FM \geq 4$ (COELHO et al., 2015). Controles de esterilidade e crescimento bacteriano foram incorporados aos experimentos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

A CIM de PIP e AMK variaram de 32 a 128 µg/mL e 0,125 a 8 µg/mL, respectivamente. A CIM de CIP também foi determinada e os valores encontrados variaram de 0,25 a 8 µg/mL. PIP isoladamente não apresentou atividade antimicobacteriana significativa, porém resultados interessantes foram observados na combinação com AMK. Nos isolados testados, PIP reduziu a CIM de AMK de 2 a 4 vezes. Os resultados encontram-se na tabela 1.

PIP não foi capaz de reduzir a CIM de AMK em isolados com elevado grau de resistência à AMK, e apresentou efeitos mais proeminentes apenas nos isolados com maior suscetibilidade. O perfil de resistência dos isolados selecionados não é conhecido, e informações relacionadas à presença de mutações em genes-alvo, por exemplo, seria interessante para investigar a fundo o efeito de PIP e AMK em MAB. Além disso, poucos isolados clínicos foram testados até o momento, uma das perspectivas futuras é testar em um número maior de isolados clínicos de MAB.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima e atividade combinatória de amicacina com piperina em isolados do complexo *Mycobacterium abscessus*.

Espécie	Concentração inibitória mínima (µg/mL)			FM
	PIP	AMK	CIP	PIP+AMK
<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977	32	4	4	2
<i>Mycobacterium abscessus</i> LACEN	128	0,125	0,25	4
<i>Mycobacterium abscessus</i> HCRP/USP	32	8	8	NR
<i>Mycobacterium massiliense</i> LACEN	64	0,125	0,25	4
<i>Mycobacterium bolletii</i> LACEN	64	8	4	2

PIP: piperina; AMK: amicacina; CIP: ciprofloxacino (controle interno de diluição); FM: fator de modulação; NR: não realizado.

Conclusões

Os isolados de MAB apresentaram diferentes níveis de suscetibilidade à AMK, porém a CIM de PIP foi alta para a maioria dos isolados. Mesmo não tendo atividade sozinha, PIP reduziu a CIM de AMK de dois isolados. A redução da CIM de AMK indica um possível potencial de PIP como um adjuvante no tratamento de infecções causadas por MAB. Para obter um panorama mais representativo da combinação de AMK e PIP, um estudo com um maior número de isolados clínicos e com perfis de resistência diferente se faz necessário.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária (FA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

CALEFFI-FERRACIOLI, Katiany R. et al. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 660-663, 2013.

COELHO, Tatiane et al. Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 330, 2015.

FLORES, Vanessa da Costa et al. **Resistência de biofilmes formados por micobactérias de crescimento rápido frente a antimicrobianos**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

GRIFFITH, David E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.

GRIFFITH, David E. et al. *Mycobacterium abscessus* and antibiotic resistance: same as it ever was. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 10, p. 1687-1689, 2019.

LEE, Ming-Chun et al. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium abscessus* complex isolated from patients with skin and soft tissue infections at a tertiary teaching hospital in Taiwan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 10, p. 2782-2786, 2017.

PALOMINO, Juan-Carlos et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken; PFALLER, Michael. **Microbiologia médica** 8 ed, 2017.

MURUNIKKARA, Vachana et al. Anti-inflammatory effect of piperine in adjuvant-induced arthritic rats—a biochemical approach. **Inflammation**, v. 35, n. 4, p. 1348-1356, 2012.

NESSAR, Rachid et al. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 810-818, 2012.

SANTOS, Jephesson et al. Th1-biased immunomodulation and in vivo antitumor effect of a novel piperine analogue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2594, 2018.