

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE RESGATE DA ATIVIDADE DA POLIMIXINA B POR DERIVADOS DO (-)-CANFENO E ACILHIDRAZONAS CONTRA ENTEROBACTERIALES MULTIRRESISTENTES EM MEIO ÁCIDO

Geovanna Castilho de Freitas (PIBIC/CNPq/FA/UEM), João Paulo Salvaterra Pasquini, Pedro Henrique Rodrigues do Amaral; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Fabio Vandresen, Regiane Bertin de Lima Scodro, Vera Lucia Dias Siqueira (Orientadora), e-mail: vldsiqueira@uem.br.

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

Ciências Biológicas / Microbiologia Médica

Palavras-chave: Polimixina, resistência bacteriana, pH ácido

Resumo:

Derivados de (-) canfeno, tiossemicarbazida (TSC) e 4-OH-tiossemicarbazona (4-OH-TSZ) e derivados de 3,5 dinitrobenzoihidrazonicos (DNH-1 e DNH-20) foram capazes de resgatar a atividade do antimicrobiano polimixina B (PMB) contra Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos (ERC) em condições de pH próximos à neutralidade. Considerando que Enterobacterales são importantes agentes de infecções de trato urinário (ITU), essa combinação poderia representar uma alternativa terapêutica para ITU causadas por ERC e resistentes à PMB. Assim, esse estudo avaliou a capacidade de TSC, 4-OH-TSZ e derivados de DNH-1 e DNH-20 em resgatar e modular a atividade da PMB em isolados de ERC em pH ácido. A metodologia utilizada foi a microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O efeito da ação combinada foi avaliado pela diminuição da CIM e fator de modulação [(FM=(CIM da PMB)/(CIM da PMB+derivados))]. Resultado de $FM \geq 4$ e $CIM \leq 2 \mu\text{g/ml}$ indicou capacidade da substância química testada modular ou resgatar a atividade da PMB, respectivamente. Os resultados mostraram que TSC, 4-OH-TSZ, DNH-1 e DNH-20 foram capazes de modular e resgatar a atividade da PMB em 100% dos isolados testados em pH neutro. Em pH ácido o resgate da atividade da PMB não foi observado em alguns isolados, especialmente quando o antimicrobiano foi combinado com derivados de TSC e 4-OH-TSZ. Entretanto, os derivados estudados modularam a atividade da PMB na grande maioria dos isolados. Dessa forma, foi possível concluir que os derivados testados combinados à PMB podem representar uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções urinárias por ERC.

Introdução

A resistência bacteriana constitui uma ameaça à saúde humana e um sério problema para os sistemas de saúde, em consequência à uma crescente incidência de infecções causadas por microrganismos multirresistentes. Bactérias pertencentes à ordem *Enterobacterales* são bacilos Gram-negativos que podem adquirir

mecanismos de resistência à diversos antimicrobianos, inclusive aos carbapenêmicos, considerados última opção terapêutica para tratamento de infecções causadas por isolados bacterianos desta ordem. *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) constitui um dos grupos bacterianos para os quais a busca por novas alternativas terapêuticas é considerada prioridade crítica (SHEU *et al.*, 2019). Polimixina B (PMB) tem representado uma opção para o tratamento de infecções por ERC (SHEU *et al.*, 2019). A membrana externa de bactérias Gram-negativas é o principal alvo das polimixinas (PMB e colistina), uma classe de lipopeptídeos catiônicos que interagem com o lipídio A e grupos fosfato dos lipopolissacarídeos (LPS) presentes nesta membrana. O crescente uso de PMB trouxe como consequência o surgimento de *Enterobacterales* resistentes a este antimicrobiano. A adição de grupos catiônicos como fosfoetanolamina (PEtn) e/ou 4-amino-Larabinose (L-Ara4N), que diminuem a negatividade do LPS e consequentemente a afinidade pela PMB, constitui o principal mecanismo para esta resistência (PASQUINI *et al.*, 2021). Derivados de (-)-canfeno (tiossemicarbazida e 4-OH-tiossemicarbazona) e de 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos se mostraram eficazes para resgatar a atividade da PMB em alguns isolados ERC, em condições de pH próximo ao neutro (SILVA *et al.*, 2019; PEDRO *et al.*, 2020; PASQUINI *et al.*, 2021). Entretanto, como esse resgate pode estar relacionado à alteração de carga elétrica, um teste em pH ácido é importante para prever essa atividade em nível de trato urinário. Assim, o presente estudo buscou avaliar a atividade da tiossemicarbazida (TSC) e 4-OH-tiossemicarbazona (4-OH-TSZ) derivadas do (-)-canfeno, bem como derivados 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH) em combinação com PMB contra isolados de ERC crescendo em pH ácido.

Materiais e Métodos

Foram testados isolados de ERC provenientes da bacterioteca do setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) e registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número AB486FE. Os derivados do (-)-canfeno e de DNH foram sintetizados de acordo com Silva *et al.* (2019) e Pasquini *et al.* (2021), respectivamente. Os derivados foram diluídos em dimetilssufóxido (DMSO, Sinth, SP, Brasil) para obter solução estoque de concentração igual a 10.000 µg/mL. O antimicrobiano PMB foi adquirido comercialmente (Inlab, Diadema, Brasil). As concentrações inibitórias mínimas (CIM) da PMB e da PMB+derivados foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, usando Muller Hinton Broth com ajuste de cátions Mg²⁺ e Ca²⁺ (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA). O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0 com a adição de HCl 0,1N. A atividade da combinação de PMB+derivados foi avaliada pela redução na CIM e pelo fator de modulação (FM), calculado a partir da fórmula: $FM = (CIM \text{ da PMB}) / (CIM \text{ da combinação da PMB+derivado})$. Foi considerado como resgate da atividade de PMB quando a CIM da PMB+derivados foi < 2 µg/mL (BRCast, 2022) e o efeito modulatório foi definido quando uma redução > 4 vezes na CIM da combinação PMB+derivado em relação a PMB foi observada (SILVA *et al.*, 2019).

Resultados e Discussão

Os derivados do (-)-canfeno e de DNH utilizados apresentaram resultados promissores quando testados em isolados clínicos em pH neutro, seja aumentando a eficiência da PMB ou resgatando sua ação (SILVA *et al.*, 2019; PEDRO *et al.*, 2020; PASQUINI *et al.*, 2021). No decorrer desse estudo foram testados oito isolados clínicos de ERC, pertencentes às espécies *Klebsiella pneumoniae* (n = 6) e *Enterobacter cloacae* (n = 2) em meio de cultura com pH neutro e ácido (Tabela 1). Segundo os pontos de corte definidos pelo BRCAS (2022), a resistência à PMB (CIM \geq 4 μ g/ml) foi comprovada em todos os isolados testados em pH neutro ou ácido (Tabela 1). Em pH ácido, os derivados de TSC e 4-OH-TSZ resgataram a atividade da PMB com (FM \geq 4 μ g/ml) em sete isolados (87%). Os derivados de DNH-1 e DNH-20, se mostraram eficazes em relação ao resgate e modulação, sendo observado que apenas em um (12%) o derivado DNH-20 não foi capaz de resgatar ou modular a ação da PMB (FM < 2). Mais estudos precisam ser realizados para um melhor entendimento de como os derivados TSC, 4-OH-TSZ, DNH-1 e DNH-20 atuam diminuindo a CIM da PMB nos isolados testados e em outras espécies de bactérias Gram-negativas.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) da polimixina B (PMB) combinada ou não com tiossemicarbazida e 4-OH-tiossemicarbazona derivados do (-)-canfeno (TSC e 4-OH-TSZ) e com derivados 3,5 dinitrobenzoihidrazônicos (DNH 1 e DNH 20) e fator modulatório (FM) dos derivados sobre a atividade da PMB em isolados clínicos de *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) em pH neutro e ácido.

ERC	CIM μ g/ml / (FM)									
	PMB		PMB + TSC		PMB+4-OH-TSZ		PMB+DNH 1		PMB+DNH 20	
	pH neutro	pH ácido	pH neutro	pH ácido	pH neutro	pH ácido	pH neutro	pH ácido	pH neutro	pH ácido
<i>Kp</i> (13)	64	128	1 (64)	8 (16)	1 (64)	16 (8)	1 (64)	0,5 (256)	1(64)	1 (128)
<i>Kp</i> (47)	16	64	0,25 (64)	1 (64)	0,5 (32)	8 (8)	0,5 (32)	0,25 (256)	0,5 (32)	0,5 (128)
<i>Kp</i> (97)	32	128	0,5 (64)	2 (64)	1 (32)	1 (128)	<0,5 (64)	0,25 (512)	<0,5 (64)	0,5 (256)
<i>Ec</i> (176)	64	128	0,5 (128)	0,5 (256)	<0,25 (256)	2 (64)	0,5 (128)	0,5 (256)	0,25 (256)	0,5 (256)
<i>Kp</i> (181)	32	128	1 (32)	4 (32)	0,5 (64)	16 (8)	1 (32)	2 (64)	0,5 (64)	2 (64)
<i>Ec</i> (184)	32	64	1 (32)	0,125 (512)	0,5 (64)	0,25 (256)	0,5 (64)	0,125 (512)	0,5 (64)	0,125 (512)
<i>Kp</i> (259)	16	64	0,5 (32)	32 (2)	1 (16)	1 (64)	<0,5 (32)	0,25 (256)	1 (16)	32 (2)
<i>Kp</i>	32	128	0,5	0,5	1 (32)	1	0,5	0,5 (256)	1 (32)	0,5

(260)	(64)	(256)	(128)	(64)	(256)
-------	------	-------	-------	------	-------

Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Ec: *Enterobacter cloacae*

Conclusões

Os resultados deste estudo destacaram que derivados TSC, 4-OH-TSZ, DNH-1 e DNH 20 podem representar promissores candidatos à adjuvantes da PMB, como alternativa para o tratamento de infecções de trato urinário por ERC.

Agradecimentos

Agradeço ao laboratório de Bacteriologia Médica da UEM, a minha orientadora e ao CNPq que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto.

Referências

BrCAST – **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, documento: Tabela pontos de corte clínicos BrCAST, versão de 14 de abril de 2022. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acesso em: 30 de agosto de 2022.

PASQUINI JPS, et al. Atividade da polimixina B combinada com derivados 3,5-dinitrobenzoilhidrazônicos e com N-acilhidrazonas derivadas da isoniazida contra Gram-negativos multirresistentes. **8º International Meeting of Biosciences and Physiopathology**, 2021.

PEDRO AD, AMARAL PHR, MILANI RZ, PASQUINI JPS, VANDRESEN F, SCODRO RBL, SIQUEIRA VLD. Polimixina B em *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos: ação combinada com 4-hidroxi-tiossemicarbazona derivada do (-)-canfeno ou nicotinamida. **29º EAIC – Encontro Anual de Iniciação Científica e 9º EAIC JR**, outubro de 2020. UEM, Maringá.

SHEU C.C, 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, 2019.

SILVA BR, FREITAS BC, QUEIROZ PA, AMARAL PHR, VANDRESEN F, FERRACIOLI KRC, SCODRO RBL, CARDOSO RF, SIQUEIRA VLD. Resgate da ação da polimixina B pela tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno contra enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. **VI International Meeting of Biosciences and Physiopathology**, setembro de 2019.