

MORFOLOGIA E INTEGRIDADE DE PAREDE CELULAR DE *Enterobacteriales* EXPOSTAS À COMBINAÇÃO DE POLIMIXINA B COM DERIVADOS 3,5 DINITROBENZOIL-HIDRAZÔNICOS.

Danielle Silva Feliciano (PIBIC/CNPq/FA/UEM), João Paulo Salvaterra Pasquini, Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça, Fabio Vandresen, Regiane Bertin de Lima Scodro, Katiany Rizziere Caleffi Ferracioli, Vera Lucia Dias Siqueira (Orientador), e-mail: ra117483@uem.br

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

Ciências Biológicas / Microbiologia Médica

Palavras-chave: Antimicrobianos, resgate, parede bacteriana

Resumo:

A resistência de *Enterobacteriales* aos carbapenêmicos tem levado à utilização de outras opções terapêuticas, como a polimixina B (PMB). O aumento do uso de PMB em ambientes clínicos veio acompanhado do aumento das taxas de resistência a este antimicrobiano. *Enterobacteriales* tornam-se resistentes à PMB principalmente por alteração da carga elétrica do lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede bacteriana. Alguns derivados 3,5 dinitrobenzoil-hidrazônicos (DNH) se mostraram capazes de resgatar a atividade da PMB em *Enterobacteriales*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a integridade da parede celular e a morfologia de isolados de *Enterobacteriales* após exposição a concentrações inibitórias e subinibitórias de PMB associada ou não à derivados DNH (DNH-1 e DNH-20). Dois isolados de *Enterobacteriales* (*Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*) foram expostos a PMB associada ou não aos derivados e avaliados por citometria de fluxo (CF) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A avaliação da integridade de membrana por CF e da morfologia bacteriana por MEV mostrou que os isolados expostos a CIM da PMB apresentaram danos importantes na integridade da parede e alterações na morfologia. Entretanto, quando associada aos derivados, uma concentração até 128 vezes menor da PMB foi capaz de causar danos semelhantes na parede e morfologia dos isolados bacterianos testados. Desta forma, foi possível concluir que os derivados DNH-1 e DNH-20 possivelmente não apresentam uma atividade direta sobre as *Enterobacteriales*, mas sim, atuam resgatando a atividade bactericida da PMB, interagindo com a carga elétrica da parede bacteriana ou com a própria molécula de PMB.

Introdução

Enterobacteriales são bactérias Gram-negativas e frequentes causadoras de infecções hospitalares. O surgimento de cepas produtoras de

β -lactamases de espectro estendido (ESBL) reduziu a utilização das cefalosporinas no tratamento, tendo como consequência, o aumento do uso de carbapenêmicos como opção terapêutica. Entretanto, devido ao fato do seu consumo ter aumentado significativamente, isso resultou em um número crescente de *Enterobacterales* resistentes a esse grupo de antimicrobianos (PATERSON, BONOMO, 2019).

Em estudo prévio (PASQUINI et al., 2021) foi constatado que derivados (DNH-1 e DNH-20) atuaram resgatando a atividade da polimixina B (PMB), fazendo com que isolados clínicos de bactérias Gram-negativas com concentrações inibitórias mínimas (CIM) para PMB superiores aos pontos de corte para resistência ($CIM \geq 4 \mu\text{g/ml}$) voltassem a ser PMB sensíveis ($CIM \leq 2 \mu\text{g/ml}$) (BRCAS, 2022). A PMB é uma molécula catiônica que atua sobre a parede celular bacteriana, mais especificamente interagindo com o lipopolissacarídeo (LPS) da parede externa de Gram-negativos, desestabilizando e rompendo a parede, levando à lise celular e morte bacteriana. Isolados de Gram-negativos, especialmente *Enterobacterales*, têm se tornado resistentes, por adicionarem ao LPS bacteriano, moléculas carregadas positivamente e diminuindo assim a interação com a PMB. Os derivados DNH diminuíram a CIM da PMB provavelmente por melhorar a atividade deste antimicrobiano sobre a membrana (PATERSON, BONOMO, 2019). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a morfologia e integridade da parede celular de isolados de *Enterobacterales* após exposição a concentrações inibitórias e subinibitórias de PMB associada à derivados 3,5 dinitrobenzoil-hidrazônicos (DNH).

Materiais e métodos

A integridade da membrana celular bacteriana foi avaliada em isolados bacterianos (*Klebsiella pneumoniae* Kp261 e *Enterobacter cloacae* Ec176) para os quais os derivados associados foram capazes de resgatar a atividade da PMB. Os isolados foram avaliados por citometria de fluxo com iodeto de propídio de acordo com Pasquini et al. (2021).

O isolado de *Enterobacterales* (Kp261) foi fixado em glutaraldeído após exposição às combinações PMB+DNH-1 e PMB+DNH-20 e foi avaliado por MEV, segundo Pasquini et al. (2021).

Resultados e Discussão

Derivados DNH demonstraram importante ação contra micobactérias, especialmente *Mycobacterium tuberculosis*, além de apresentarem baixa citotoxicidade (VALVERDE et al., 2022). Embora esses derivados não tenham apresentado atividade inibitória direta sobre o crescimento de bactérias Gram-negativas, foram capazes de melhorar e até mesmo resgatar a atividade da PMB sobre isolados clínicos de *Enterobacterales* (PASQUINI et al., 2021).

A CIM da PMB para os isolados Ec176 e Kp261 foi de 64 e 32 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Quando combinada a DNH-1 e DNH-20 a CIM da PMB

caiu para 0,5 e 0,5 µg/ml, respectivamente no isolado Kp261 e para 0,5 e 0,25 µg/ml, respectivamente no isolado Ec176 (PASQUINI et al., 2021).

Os danos à integridade da membrana bacteriana dos isolados testados foram observados pelo aumento da fluorescência do iodeto de propídio, avaliado por citometria de fluxo (Figura 1). Foi possível observar que após exposição à CIM de PMB houve aumento na fluorescência em resposta às alterações na integridade da parede dos dois isolados testados (Figura 1aD e 1bD). Entretanto, quando associada aos derivados DNH-1 ou DNH-20, uma concentração até 128 vezes menor de PMB foi capaz de causar um aumento semelhante na fluorescência, correspondente ao aumento do dano na parede das duas espécies bacterianas testadas. Isolados não expostos ou expostos a concentrações subinibitórias de PMB apresentaram um nível de fluorescência mínima, consequente à impermeabilidade, da parede bacteriana íntegra, ao iodeto de propídio (MA et al., 2020).

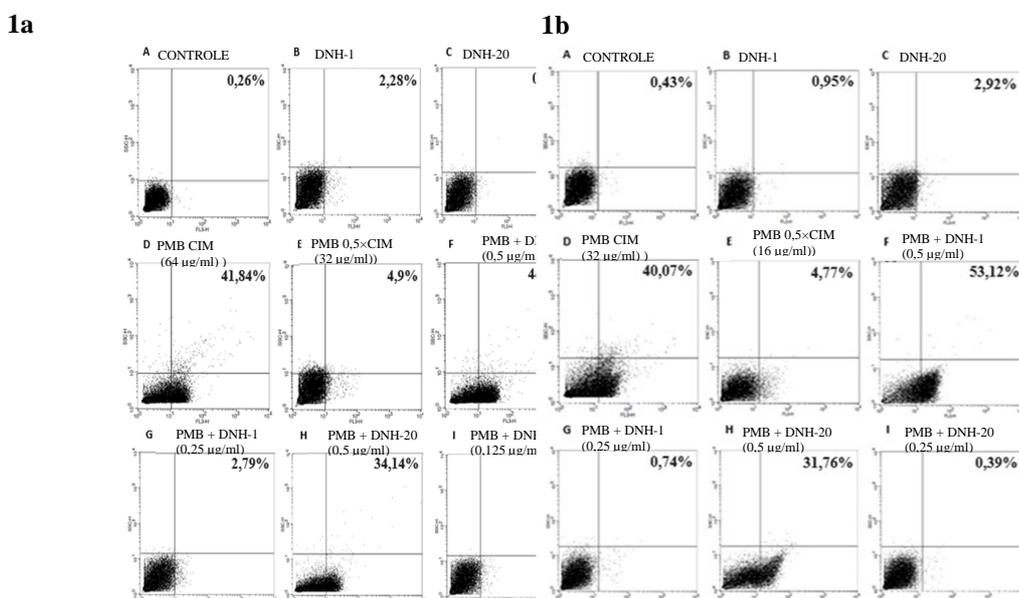


Figura 1. Avaliação da integridade da membrana celular através da citometria de fluxo. Figura 1a Fluorescência do iodeto de propídio para o isolado clínico *Enterobacter cloacae* (176) exposta ou não às combinações PMB+DNH01 e PMB+DNH20. Figura 1b Fluorescência do iodeto de propídio para o isolado clínico *Klebsiella pneumoniae* (261) exposta ou não às combinações PMB+DNH01 e PMB+DNH01.

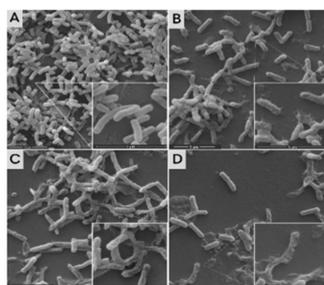


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura do isolado *Klebsiella pneumoniae* (Kp261) resistente aos carbapenêmicos e a polimixina B (PMB). Isolado Kp261 não exposto à PMB

ou DNH (A). Isolado Kp261 após 6 horas de exposição à PMB (64 µg/ml) (B); PMB (0,5 µg/ml) + DNH-1 (C); PMB (0,5 µg/ml)+DNH-20 (D).

A avaliação da morfologia por MEV do isolado Kp261 foi realizada após 6 h de exposição à CIM da PMB, PMB+DNH-1 e PMB+DNH-20. Foi possível observar alterações similares na parede celular dos bacilos submetidos aos 3 tratamentos, quando comparados ao controle não tratado.

Conclusões

Os resultados deste estudo corroboram a hipótese de que os derivados DNH-1 e DNH-20 não apresentam uma atividade direta sobre a parede celular das *Enterobacteriales*, mas sim, atuam resgatando a atividade bactericida da PMB, seja interagindo com as cargas da parede celular ou da própria molécula de PMB.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, ao Laboratório de Bacteriologia Médica, a Universidade Estadual de Maringá e a Fundação Araucária.

Referências

BrCAST – **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, disponível em: <http://brcast.org.br/documentos>. Consultado em 04.08.2021.

MA, B. et al. Contemporaneous Measurement of Outer and Inner Membrane Permeability in Gram-negative Bacteria. **Bio Protoc.** V. 10, n.5, p. e3548, 2020.

PASQUINI, JPS et al. Atividade da polimixina B combinada com derivados 3,5-dinitrobenzoilhidrazônicos e com *N*-acilhidrazonas derivadas da isoniazida contra bactérias Gram-negativas multirresistentes. Anais do Simpósio do Programa de Biociências e Fisiopatologia – UEM / Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia. Maringá : UEM/PBF, 2021.

PATERSON DL, BONOMO RA. Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens: The Urgent Need for 'Old' Polymyxins. **Adv Exp Med Biol.** 2019;1145:9-13.

VALVERDE, TL et al. 3,5-dinitrobenzoylhydrazine derivatives as a scaffold for antituberculosis drug development. **Future Microbiol.** 2022; 10.2217/fmb-2021-0119.