

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA POLIMIXINA B POR ADJUVANTES ANTIBIÓTICOS NA PRESENÇA DE ALBUMINA

Geovanna Castilho de Freitas (PIBIC/CNPq/FA/UEM),
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.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Londrina, PR.

Ciências Biológicas / Microbiologia Médica

Palavras-chave: Polimixina, resistência bacteriana, albumina.

RESUMO

Polimixina B (PMB) representa uma das poucas opções terapêuticas para infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes (BGN-MDR). PMB são polipeptídeos catiônicos com afinidade pela membrana externa, especialmente pelo lipopolissacarídeo (LPS) de Gram-negativos. Contudo, BGN-MDR resistente à PMB, tem incentivado a busca por alternativas terapêuticas. Adjuvantes antibióticos são substâncias químicas com pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana, mas que atuam aumentando a atividade de um agente antimicrobiano clássico. Assim, esse projeto teve como objetivo avaliar a influência de uma concentração, próxima a sérica, de albumina e soro de cavalo sobre a atividade *in vitro* da combinação de PMB e adjuvantes contra *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter* spp. resistentes a PMB. A atividade antimicrobiana da PMB e PMB+adjuvantes foi avaliada usando um método de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Tiossemicarbazida (TSC) e 4-hidroxi-tiossemicarbazona (4-OH-TSZ) derivados do (-)-canfeno e derivados 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH₋₁ e DNH₋₂₀) foram empregados como adjuvantes. 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 ≥4 e CIM ≤ 2 µg/ml indicou capacidade dos derivados testados em modular ou resgatar a atividade da PMB, respectivamente. Com os resultados foi possível observar que, embora a albumina e soro de cavalo prejudicaram a modulação e o resgate da atividade inibitória da PMB por TSC e 4-OH-TSZ, os derivados DNH, especialmente DNH-1, resgataram e modularam a atividade da PMB mesmo na presença de albumina ou soro de cavalo em isolados de BGN-MDR.

Introdução

Bactérias Gram negativas (BGN) como a *Klebsiella pneumoniae*, uma destacada espécie da ordem *Enterobacterales* e *Acinetobacter* spp. uma importante BGN não

fermentadoras de glicose, constituem importantes agentes de infecção, particularmente em ambiente hospitalar. O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, inclusive aos carbapenêmicos, considerados última opção terapêutica para tratamento de infecções causadas por BGN, tem desencadeado a busca por novas alternativas terapêuticas (Sheu *et al.*, 2019). A polimixina B (PMB) usada em monoterapia ou combinada com outros agentes antimicrobianos constitui uma das poucas opções terapêuticas contra BGN multirresistentes (BGN-MDR) (Sheu *et al.*, 2019). Nesse sentido, o uso de moléculas que atuam como adjuvantes, capazes de resgatar a atividade de antimicrobianos clássicos, como a PMB, pode representar uma alternativa promissora para o tratamento de infecções por BGN-MDR. Derivados do (-)-canfeno, como tiossemicarbazida (TSC) e 4-OH-tiossemicarbazona (4-OH-TSZ) e derivados 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH) foram testados por colaboradores do nosso grupo de pesquisa e mostraram importante capacidade de atuar como adjuvantes antibióticos, modulando e resgatando a atividade da PMB (Silva *et al.*, 2022; Pasquini *et al.*, 2021). Entretanto, proteínas presentes no soro, especialmente albumina, podem interferir nesse tipo de atividade e um ensaio *in vitro*, contendo os principais componentes do plasma sanguíneo, pode simular as condições encontradas *in vivo*. Assim, o presente estudo avaliou a atividade de derivados do (-)-canfeno (TSC, 4-OH-TSZ) e DNH (DNH1 e DNH20) em combinação com PMB, em meio de cultura contendo albumina e soro de cavalo, contra isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*.

Materiais e Métodos

Isolados bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*. PMB-resistentes, 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 nº AB486FE), foram testados. Os derivados do (-)-canfeno e de DNH foram sintetizados de acordo com Souza *et al.* (2018) e Pasquini *et al.* (2021), respectivamente. Os derivados foram diluídos em dimetilssulfóxido (DMSO, Synth, 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). Uma concentração de 4% de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA), ou 10 % de soro de cavalo (NovaBiotecnologia, Cotia, São Paulo) foi adicionada no meio CAMHB. 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 (BRCAS, 2023) 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.*,2022).

Resultados e Discussão

Diante aos resultados obtidos foi possível observar que na presença de albumina e soro de cavalo houve alteração da CIM da PMB sem adjuvantes (aumento ou diminuição) em todos os isolados testados (tabela 1 e 2). A presença da albumina e soro de cavalo prejudicou o resgate e modulação da atividade da PMB pelos adjuvantes derivados do (-)-canfeno (tabela 1). O prejuízo foi menor com os derivados DNH, especialmente com DNH-1 que resgatou a atividade da PMB em 66,7% e 100% dos isolados testados na ausência ou presença de 4% de albumina e soro de cavalo, respectivamente (Tabela 2). Estes resultados, embora não inviabilizem o uso dos derivados do (-)-canfeno ou de DNH como adjuvantes antibióticos, destacam que mais estudos necessitam ser realizados para melhor definir o mecanismo envolvido neste resgate da atividade inibitória da PMB em isolados de BGN.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Polimixina B (PMB) combinada ou não com derivados de (-)-canfeno (TSC e 4-OH-TSZ) na presença ou ausência

Isolado bacteriano	CIM ($\mu\text{g/ml}$)/FM								
	PMB	PMB + alb 4%	PMB +soro	PMB +TSC	PMB +TSC + alb 4%	PMB+TSC + soro	PMB+4-OH-TSZ	PMB+4-OH-TSZ + alb 4%	PMB+4-OH-TSZ + soro
<i>Kp jv</i>	128	8	8	1 (128)	128 (0,0625)	4(2)	0,2(512)	128 (0,06)	4(2)
<i>Kp ant</i>	16	64	8	0,5 (32)	128 (0,5)	0,5 (16)	0,2 (64)	64(1)	16(0,5)
<i>Kp jo</i>	32	8	8	0,25 (128)	32 (0,25)	0,25(32)	0,5 (64)	128(0,06)	0,5(16)
<i>Kp cla</i>	64	128	16	0,5 (128)	128 (1)	16(1)	0,1(512)	128(1)	8(2)
<i>Kp vig</i>	32	128	4	0,5 (64)	64 (2)	16(0,2)	0,1(256)	32(4)	4(1)
<i>Ac 628</i>	4	32	8	2 (2)	16 (2)	4(2)	8 (0,5)	32(1)	2(4)

de 4% de albumina bovina ou 10% de soro de cavalo e fator modulatório (FM) dos derivados sobre a atividade da PMB em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*.

Kp: *Klebsiella pneumoniae*, *Ac*: *Acinetobacter baumannii*

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Polimixina B (PMB) combinada ou não com derivados de 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH1 e DNH20) na presença ou ausência de 4% de albumina bovina ou 10% de soro de cavalo e fator modulatório (FM) dos derivados sobre a atividade da PMB em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*.

Isolado bacteriano	CIM ($\mu\text{g/ml}$)/FM								
	PMB	PMB + alb 4%	PMB + soro	PMB+ DNH 1	PMB+DNH -1 + alb 4%	PMB+DNH -1 + soro	PMB+ DNH 20	PMB+D NH-20 + alb 4%	PMB+DNH- 20 + soro
<i>Kp jv</i>	128	8	8	0,5 (256)	1(8)	0,1 (64)	0,5 (256)	16 (0,5)	8 (1)
<i>Kp ant</i>	16	64	8	8 (2)	8(8)	1 (8)	16 (1)	64 (1)	16 (0,5)
<i>Kp jo</i>	32	8	8	0,1 (256)	0,2 (32)	0,1 (64)	0,2 (128)	4 (2)	16 (0,5)
<i>Kp cla</i>	64	128	16	0,1(512)	1(128)	0,1 (128)	1 (64)	2 (64)	0,2 (64)
<i>Kp vig</i>	32	128	4	32 (1)	16(8)	2 (2)	16 (2)	32 (4)	8 (0,5)

Ac 628 | 4 32 8 0,5 (8) 0,2(128) 1 (8) 1 (4) 8 (4) 2 (4)
Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Ac: *Acinetobacter baumannii*

Conclusões

Os resultados deste estudo destacaram que a presença da albumina, bem como do soro de cavalo prejudicaram a modulação e o resgate da atividade inibitória da PMB pelos derivados TSC e 4-OH-TSZ. Entretanto, os derivados DNH, especialmente DNH-1 foram capazes de resgatar e modular a atividade da PMB *in vitro*, mesmo na presença de albumina ou soro de cavalo em BGN-MDR.

Agradecimentos

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

Referências

BrCAST – **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, documento: Tabela pontos de corte clínicos BrCAST, versão de 15 de março de 2023. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.

PASQUINI, J. P. S; QUEIROZ, P. A.; PEDRO, A. D. *et al.* . Atividade da polimixina B combinada com derivados 3,5-dinitrobenzoilhidrazônicos e com nacilhidrazonas derivados da isoniazida contra gram-negativos multirresistentes. In: **8th International Meeting of Biosciences and Physiopathology**, 2021, Maringá. 8th IMBP 2021. Maringá: UEM/PBF, 2021. v. 1. p. 83-89.

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.; QUEIROZ, PA.; AMARAL, PHR. *et al.*, Polymyxin B activity Rescue by (-)-camphene-based thiosemicarbazide against carbapenem-resistant *Enterobacterales*. **Microb. Drug Resist.**, v 28, n 10, p. 962-971, 2022.

SOUZA, M.R.P., N.P. COELHO, V.P. BALDIN, et al. Synthesis of novel (-)-camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Nat. Prod. Res.**, v.33, p.3372–3377, 2018.