

ATIVIDADE DE DISSULFIRAM EM MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS DE CRESCIMENTO LENTO

Camile Yukari Okochi¹(PIBIC/CNPq/FA/UEM), Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli¹
Renata Alexandre de Oliveira¹, Giulienne Karla Pereira da Silva¹, Letícia Sayuri
Murase¹, Lygia Beatriz Dziendzik da Silva¹, Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador).
E-mail: rfcardoso@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde/Microbiologia

Palavras-chave: Micobactérias não tuberculosas; Concentração Inibitória Mínima; Dissulfiram.

RESUMO

Dentre as micobactérias não tuberculosas (MNT) de crescimento lento, podemos destacar o Complexo *Mycobacterium avium*, que são bactérias causadoras de micobacterioses principalmente em pacientes imunocomprometidos, porém, infecções têm ocorrido também, em indivíduos imunologicamente competentes. A manifestação clínica mais comum causada por esse microrganismo é a infecção pulmonar, mas também pode resultar em infecção em outros sítios anatômicos. O tratamento das infecções causadas por *M. avium* é realizado por combinações de antimicrobianos que nem sempre são eficientes devido à resistência bacteriana. Devido à falta de um tratamento bem definido, é necessária a busca por novas opções terapêuticas. O dissulfiram (DSF) é um medicamento utilizado no tratamento de pacientes dependentes de álcool. Apesar de o seu uso estar relacionado ao alcoolismo, estudos mostraram sua atividade antimicrobiana *in vitro* em *M. tuberculosis*. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de DSF contra MNT de crescimento lento por *resazurin broth microdilution assay* (REBMA). A CIM de DSF variou de 16-32 µg/mL, sugerindo futuras possibilidades de incorporação no tratamento dos pacientes.

INTRODUÇÃO

As infecções causadas por micobactérias não tuberculosas (MNT) estão cada vez mais sendo detectadas pelo mundo por diversos motivos, como a melhoria no diagnóstico, a conscientização dos indivíduos sobre as doenças causadas e ainda o crescimento da população de risco para infecções por esses microrganismos. MNT se caracterizam por estarem dispersas no meio ambiente, podendo ser encontradas na água, alimentos, no solo e são capazes de sobreviver

em ambientes hostis, com carência de nutrientes. Atualmente, existem mais de 200 espécies que pertencem a esse gênero, *Mycobacterium spp.* Dentro do Complexo *Mycobacterium avium*, que são bactérias consideradas como oportunistas, destacam-se clinicamente como patógenos humanos *M. avium* e *M. intracellulare* (Kwon; Koh; Daley, 2019). Devido à onipresença da bactéria no ambiente, acredita-se que a forma mais comum de transmissão ao ser humano ou animais seja por exposição a fontes ambientais. As manifestações clínicas mais comuns de doenças causadas por *M. avium* podem ocorrer em tecido pulmonar ou de forma disseminada. A infecção disseminada é mais comum em pacientes imunocomprometidos, principalmente em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Os sintomas clínicos em doença pulmonar causada por *M. avium* são semelhantes à tuberculose, que é causada por bacilos do Complexo *M. tuberculosis*, o que dificulta o diagnóstico correto em casos envolvendo MNT. Isto ocasiona demora em chegar ao diagnóstico correto de um quadro infeccioso por MNT e conseqüentemente início de tratamento errôneo, podendo promover resistência dos bacilos aos medicamentos (Kwon; Koh; Daley, 2019).

O dissulfiram (DSF) é um medicamento utilizado no tratamento de pacientes dependentes de álcool. Seu mecanismo de ação é baseado na inibição irreversível da enzima que degrada álcool presente no sangue, a aldeído desidrogenase. Apesar de seu uso estar relacionado ao alcoolismo, estudos mostraram sua atividade antimicrobiana em *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes. Em MNT, como *M. fortuitum* e *M. abscessus*, além de apresentar ação bactericida, DSF também apresentou sinergismo com fármacos usados no tratamento de micobacterioses (Winters *et al.*, 2022).

A falta de um tratamento eficiente e a escassez de opções de antibacterianos em casos de resistência das MNT aumenta a ressalva da necessidade de buscas por alternativas terapêuticas que venham a auxiliar nesse tratamento. Além disso, a falta de estudos da atividade de DSF contra MNT de crescimento lento demonstra a importância da avaliação da sua atividade contra essas bactérias, a fim de ser um candidato promissor no tratamento de micobacterioses. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de DSF em isolados clínicos de MNTs de crescimento lento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, as linhagens de MNT de crescimento lento pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (DAB/UEM) foram semeadas em Muller Hinton Broth (Difco Laboratories, Detroit, USA) cátion ajustado enriquecidos com 5% de OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) e incubados por 5 dias a 35 °C.

A CIM de DSF foi determinada de acordo com o *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2018) com modificações na leitura do teste pela adição de resazurina como revelador de crescimento bacteriano. As suspensões bacterianas de MNT foram padronizadas com escala McFarland nº 0,5 e diluídas em Mueller Hinton Broth cátion ajustado. Após, 100 µL desta suspensão bacteriana padronizada foram adicionados em cada orifício da microplaca contendo diluições seriadas de DSF. A microplaca foi incubada por 5 dias/35 °C. Após incubação, 30 µL de solução de resazurina 0,01% (Acros, Morris Plains, NJ, USA) foram adicionados a cada orifício e a placa foi reincubada por 24 horas/35 °C. A mudança da cor azul para rosa, pela redução da resazurina, foi considerada como presença de crescimento bacteriano. A CIM de DSF foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano. Controles de esterilidade e crescimento bacteriano foram incorporados aos experimentos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CIM de DSF contra MNT estudadas variou de 16 a 32 µg/mL para MAC e *M. kansasii* analisados. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima de Dissulfiram (DSF) contra o Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) e *Mycobacterium kansasii*

Linhagem de coleção	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)
	DSF
<i>M. avium</i> 1	32
<i>M. avium</i> 2	32
<i>M. intracellulare</i>	16
<i>M. kansasii</i> 1	32
<i>M. kansasii</i> 2	16
<i>M. kansasii</i> 3	16

Em estudo realizado por Das *et al.* (2019), que avaliou a atividade de DSF contra MNT de crescimento rápido, DSF apresentou valores de CIM semelhantes aos obtidos para MNT de crescimento lento utilizados neste estudo, em que a CIM de DSF contra *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. chelonae* ATCC 35752 e *M. abscessus*

ATCC 19977 foi de 32 µg/mL. Em estudo realizado por Winters *et al.* (2022), DSF também apresentou valores de CIM semelhantes para espécies de MAB e *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. avium*, dentre outras. Esses resultados apontam para a possibilidade de incorporação de DSF no tratamento de pacientes acometidos por infecções causadas por MNT, sendo necessária a realização de mais estudos acerca da atividade de DSF e da possibilidade de utilização em terapias multi medicamentosas, como é o caso em micobacterioses.

CONCLUSÕES

As linhagens de MAC e de *M. kansasii* apresentaram níveis próximos de suscetibilidade ao DSF. Para a obtenção de um panorama do perfil de suscetibilidade mais representativo, estudos com um maior número de isolados clínicos se fazem necessários.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

CASTILHO, Aline Lemes *et al.* Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. **Journal of microbiological methods**, v. 111, p. 119-121, 2015.

CLSI. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes. 3rd ed. CLSI supplement M24. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2018.

DAS, S. *et al.* Repurposing disulfiram to target infections caused by non-tuberculous mycobacteria. **J Antimicrob Chemother**, 74, n. 5, p. 1317-1322, May 1 2019.

KWON, Y.; KOH, W.; DALEY, C. L. Treatment of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. **Tuberculosis and respiratory diseases**, v. 82, n. 1, p. 15-26, 2019.

WINTERS, C. G. *et al.* Disulfiram Is Effective against Drug-Resistant *Mycobacterium abscessus* in a Zebrafish Embryo Infection Model. **Antimicrob Agents Chemother**, 66, n. 11, p. e0053922, Nov 15 2022.