AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACILHIDRAZONAS EM MATRIZ EXTRACELULAR EM BIOFILMES DE *Mycobacterium abscessus*

Beatriz Ramos Cordeiro (PIC/UEM), Letícia Julia Faria, Camile Yuraki Okochi, Lorrana Giovana de Souza Almeida, Jean Eduardo Meneguello, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora). E-mail: rblscodro@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde, Microbiologia

Palavras-chave: Concentração Inibitória Mínima; *Mycobacterium abscessus;* Biofilme

RESUMO

O complexo *Mycobacterium abscessus* (MABC) é uma micobactéria não tuberculosa de crescimento rápido e de relevância clínica, principalmente por causar infecções pulmonares, além de acometimentos cutâneos e de tecidos moles. Sua persistência está relacionada à formação de biofilmes, cuja matriz extracelular contribui para a adesão, proteção e tolerância aos agentes antimicrobianos. Nesse contexto, novas moléculas com potencial antimicrobiano, como a SH-18, podem representar alternativas terapêuticas para o controle dessas infecções. Foi utilizada a cepa *M. abscessus* ATCC 19977 para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e avaliação da atividade antibiofilme. A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo utilizando resazurina. Para avaliação do biofilme, os compostos foram testados nas concentrações de ¼ CIM, ½ CIM, CIM e 2× CIM, com análises nos dias 5, 7 e 10. A matriz extracelular foi quantificada por coloração com safranina e leitura a 492 nm. A atividade antibiofilme aumentou de 64,87% em ¼ MIC para 75,86% em ½ CIM, atingindo 80,68% na CIM, seguida de discreta redução para 78,86% em 2× CIM. Os resultados indicaram aumento da atividade até a CIM, seguido de estabilização do efeito em concentrações superiores. O quinto dia de incubação foi considerado o período mais adequado para avaliação da atividade antibiofilme, por representar maior maturação e produção de matriz extracelular. Esses achados sugerem que a SH-18 pode representar uma molécula promissora para o controle de biofilmes produzidos por *M. abscessus.*

INTRODUÇÃO

Dentro da classificação das micobactérias não tuberculosas (MNT), o *complexo Mycobacterium abscessus* (MABC) destaca-se como importante agente relacionado principalmente a infecções pulmonares (ABDELAAL *et al.*, 2023). Trata-se de uma micobactéria ambiental de crescimento rápido, cuja prevalência tem

aumentado mundialmente. A transmissão ocorre principalmente pela exposição a aerossóis e fontes de água contaminada, incluindo ambientes hospitalares e equipamentos médicos (ABDELAAL *et al., 2022*). Suas manifestações clínicas ocorrem principalmente no trato respiratório, mas também podem envolver pele e tecidos moles, especialmente após procedimentos cirúrgicos e transplantes (DOKIC *et al.*, 2021). Embora apresente maior frequência em indivíduos com condições pulmonares subjacentes, como fibrose cística, DPOC e bronquiectasias, também pode acometer indivíduos imunocompetentes (ABDELAAL *et al.*, 2022). No Brasil, foram relatados mais de 2.128 casos de infecções de pele e tecidos moles por MABC entre 2004 e 2017, evidenciando sua relevância clínica e epidemiológica (EVERALL *et al.*, 2017).

A patogenicidade e persistência do MABC estão relacionadas, entre outros fatores, à sua superfície rica em lipídios e à presença de glicopeptidolipídeos (GPLs), que contribuem para a adesão bacteriana e formação de biofilmes (PARMAR; TOCHEVA, 2023). Os biofilmes são comunidades bacterianas envoltas por uma matriz extracelular (MEC), constituída por lipídios, carboidratos, proteínas e DNA extracelular, que favorece a adesão, a persistência e a proteção contra agentes antimicrobianos (CHAKRABORTY; KUMAR, 2019). Dessa forma, a formação de biofilme representa um importante mecanismo de adaptação e tolerância do MABC, dificultando o controle das infecções e reforçando a necessidade de investigar novas alternativas terapêuticas.

Nesse contexto, estudos pré-clínicos têm identificado moléculas com potencial antimicrobiano contra micobactérias, apresentando atividade significativa e baixa citotoxicidade para células humanas. Entre essas alternativas, destaca-se SH-18, da classe das acilhidrazonas, que apresentou resultados promissores em ensaios *in silico* e *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*. Diante da relevância do MABC e da necessidade de novas estratégias terapêuticas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação dessas substâncias sobre *M. abscessus* ATCC 19977, tanto em sua forma planctônica quanto sobre a matriz extracelular de seu biofilme.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo, foi utilizada a cepa padrão *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, do Laboratório de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC/UEM). As culturas foram descongeladas e mantidas em caldo Müeller-Hinton (MHB) com cátions ajustados e incubadas por 3 dias a 35 °C. Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram preparadas suspensões bacterianas padronizadas em espectrofotômetro, equivalentes a 0,5 da escala de McFarland, e posteriormente diluídas 1:200 em MHB. Após a diluição seriada dos compostos, foram adicionados 100 µL do inóculo em cada poço e as placas foram incubadas por 3 dias a 30 °C. A CIM foi determinada por meio da resazurina 0,01%, considerando-se a menor concentração

capaz de impedir a mudança de coloração de azul para rosa, indicativa da atividade metabólica das micobactérias.

Para a formação do biofilme, o inóculo de *M. abscessus* ATCC 19977 foi padronizado em 0,5 da escala de McFarland e diluído 1:100 em MHB com cátions ajustados (MHBca), visando favorecer a permeabilidade da membrana bacteriana e a reprodutibilidade do experimento. Em placas de 24 poços, foram adicionados 1 mL do inóculo e 1 mL dos compostos testados, nas concentrações de ¼ CIM, ½ CIM, CIM e 2× CIM, em duplicata. Foram incluídos controles positivos, negativos e Tween 80 a 0,2%, utilizado como controle de inibição da adesão inicial do biofilme. As placas foram incubadas por 10 dias a 35 °C e 5% de CO□, com avaliações realizadas nos dias 5, 7 e 10. Para quantificação da matriz extracelular, após 5, 7 e 10 dias de formação do biofilme, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com 1 mL de PBS. O biofilme foi fixado com 300 µL de etanol por 10 minutos e corado com Safranina a 1% por 5 minutos. Após nova lavagem com PBS, foram adicionados 300 µL de ácido acético e o conteúdo foi transferido para microplacas de 96 poços. Posteriormente, foi realizada diluição seriada em PBS e a leitura foi efetuada em fluorímetro, em comprimento de onda de 492 nm, para avaliação da matriz extracelular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da inibição do biofilme de *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, demonstrada na figura 1, demonstrou que a concentração de ¼ CIM apresentou a menor porcentagem média de inibição (64,87%). Com o aumento da concentração para ½ CIM, observou-se aumento da inibição para 75,86%, atingindo o maior valor na concentração correspondente à CIM (80,68%). Em 2× CIM, foi observada uma discreta redução da inibição, para 78,86%, valor próximo ao obtido na CIM. O controle com Tween 80 apresentou 79,69% de inibição. Dessa forma, os resultados demonstraram aumento da atividade inibitória entre ¼ CIM e CIM, seguido de uma estabilização do efeito nas concentrações mais elevadas, não sendo observado incremento adicional da inibição em 2× CIM.

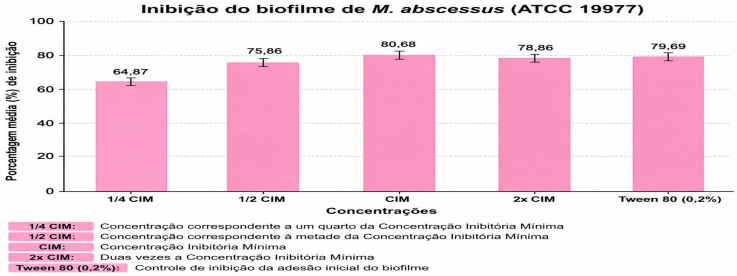


Figura 1: Representação da porcentagem média da inibição de biofilme em *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977.

CONCLUSÕES

A substância avaliada apresentou atividade antibiofilme contra *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, com maior inibição na concentração correspondente à CIM. Em concentrações superiores, observou-se estabilização do efeito, sem

incremento adicional da atividade. Esses resultados indicam o potencial da substância como uma molécula promissora para o controle de biofilmes de *M. abscessus*, sendo necessários estudos adicionais para confirmar sua eficácia e segurança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), ao Laboratório de Bacteriologia Médica (LEPAC/UEM) e, especialmente à orientadora Regiane Bertin de Lima Scodro e às alunas de mestrado Leticia Julia Faria e Camile Yukari Okochi.

REFERÊNCIAS

ABDELAAL, H. F. M. *et al*. *Mycobacterium abscessus*: It's Complex. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, 1454, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10071454.

CHAKRABORTY, P.; KUMAR, A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: Could we shorten the treatment of mycobacterial infections? **Microbial Cell**, v. 6, n. 2, p. 105–122, 2019. DOI: 10.15698/mic2019.02.667.

DOKIC, A. *et al*. *Mycobacterium abscessus* biofilms produce an extracellular matrix and have a distinct mycolic acid profile. **The Cell Surface**, v. 7, 100051, 2021. DOI: 10.1016/j.tcsw.2021.100051.

EVERALL, I. *et al*. Genomic epidemiology of a national outbreak of post-surgical *Mycobacterium abscessus* wound infections in Brazil. **Microbial Genomics**, v. 3, n. 5, e000111, 2017. DOI: 10.1099/mgen.0.000111.

PARMAR, S., & TOCHEVA, E. I. The cell envelope of *Mycobacterium abscessus* and its role in pathogenesis. **In *PLoS Pathogens***, v. 19, n. 5, 2023. Public Library of Science. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011318