PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE AVALIAÇÃO METABÓLICA EM BIOFILMES DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

Giovana Santana da Silva[1] (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Camile Yukari Okochi[1], Leticia Julia Faria[1], Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli[1], Regiane Bertin de Lima Scodro[1], Jean Eduardo Meneguello[1], Rosilene Fressatti Cardoso[1] (Orientador). Email: rfcardoso@uem.br

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

Ciências da Saúde/Microbiologia

Palavras-chave: *Mycobacterium abscessus*; Biofilme; Resistência antimicrobiana

RESUMO

Doenças causadas por micobactérias não-tuberculosas (MNT) são mundialmente emergentes e relacionam-se a doenças imunossupressoras associadas e a outras infecções. Tais micobactérias são ubíquas, e capazes de formar biofilmes, estruturas de resistência que conferem proteção contra antimicrobianos. Entre as micobactérias de crescimento rápido, destaca-se a *Mycobacterium abscessus*, sua resistência à maioria das classes de antibióticos e tolerância induzida pela formação de biofilme, ainda carecem de técnicas padronizadas que dificultam a comparação entre estudos de biofilme. O objetivo principal deste estudo é padronizar técnicas de avaliação da formação e da atividade metabólica de biofilmes de micobactérias de crescimento rápido, empregando o timol (TIM) como composto-teste. Utilizou-se a cepa de referência *M. abscessus* ATCC 19977 em microplacas de 24 orifícios, o biofilme formado foi mensurado em três momentos diferentes, sendo 3, 5 e 7 dias de incubação, foi realizada a quantificação de biomassa com cristal violeta e atividade metabólica pela redução do MTT. O maior percentual de inibição de biomassa ocorreu no quinto dia, enquanto a atividade metabólica aumentou ao longo do tempo, de modo menos acentuado nas maiores concentrações. As técnicas mostraram-se complementares e o TIM interferiu na formação e no metabolismo do biofilme.

INTRODUÇÃO

As doenças causadas por micobactérias não-tuberculosas (MNT) são mundialmente emergentes, e estão relacionadas também com doenças imunossupressoras associadas. As MNT ainda se dividem em dois grupos, as de crescimento lento e de crescimento rápido. Neste trabalho vamos abordar a classe de micobactérias de crescimento rápido, dentre elas destaca-se a *Mycobacterium abscessus*, como um patógeno oportunista associado a infecções pulmonares graves, com resistência intrínseca a vários antimicrobianos convencionais (MELIEFSTE et al., 2024).

As MNT são microrganismos ubíquos amplamente encontrados em solos e água, os quais têm o potencial de formar biofilme: colônias de microrganismos agregados entre si a uma superfície, envoltos por uma matriz extracelular, que ao reter água e nutrientes, protegem as bactérias aderidas e atuam como barreira física. Além disso, *M. abscessus* cresce em dois morfotipos coloniais distintos: liso e rugoso. Assim, eles respondem de maneira diferente a antimicrobianos quando avaliados em modelos de biofilme colonial, o que evidencia a importância de considerar o morfotipo bacteriano na condução de estudos sobre biofilmes e na definição de condutas terapêuticas (AGUILERA-CORREA; BOUDEHEN; KREMER, 2023). Essa organização aumenta as chances de sobrevivência das MNT e reduz a eficácia de antimicrobianos e desinfetantes.

O timol (TIM), ou 2-isopropil-5-metilfenol é um composto aromático hidrofóbico de origem vegetal, ao qual são atribuídas propriedades antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (GHOLAMI-AHANGARAN et al., 2022). A avaliação de compostos contra biofilmes, contudo, esbarra na ausência de metodologias padronizadas, o que dificulta a comparação entre estudos (MELIEFSTE et al., 2024). Nesse sentido, objetivo deste estudo foi padronizar técnicas de avaliação na formação na atividade metabólica *in vitro* de biofilmes de micobactérias de crescimento rápido, empregando o TIM como composto-teste contra *M. abscessus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e cepa de referência

TIM foi adquirido pela Sigma-Aldrich, USA. A cepa de referência de *M. abscessus* ATCC 19977, foi cultivada em caldo Mueller Hinton com cátions ajustados (MHBCa; Difco; EUA). A concentração inibitória mínima (CIM) do TIM (Sigma-Aldrich, EUA) foi determinada por *resazurin broth microdilution assay*, segundo Castilho *et al.* (2015).

Formação de Biofilme

O inóculo, padronizado pela escala 0,5 de Farland, foi diluído em uma proporção de 1:100 em MHBCa. Em microplacas de 24 orifícios, foi colocado 1 mL da suspensão padronizada, e 1 mL do composto testado, em concentrações que variaram da CIM à 1/16x CIM. A placa foi incubada a 37 °C com 5% de CO_2 durante sete dias. O controle positivo recebeu suspensão bacteriana e MHBCa; o negativo, apenas MHBCa. Com 3, 5 e 7 dias de incubação, o sobrenadante foi removido e os orifícios foram lavados duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS), para retirada das células planctônicas.

Avaliação da formação e metabolismo do biofilme

Após as lavagens, os orifícios foram fixados com 200 µL de metanol e corados por 5 minutos com cristal violeta 0,1% (biomassa). Os orifícios foram lavados com 1 mL de PBS, a fim de retirar o excesso do cristal violeta, e foram adicionados 200 µL de ácido acético. A leitura foi feita a 620 nm em Varioskan LUX

(ThermoFisher, EUA). A redução do biofilme foi estimada pela equação: % de inibição = (1 – DO da amostra / DO do controle) × 100.

A atividade metabólica foi avaliada pela adição de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) 0,3 mg/mL, aos poços com as células planctônicas removidas. As amostras foram incubadas por 4 horas a 37 °C, com dissolução dos cristais de formazan por meio da adição de dimetilsulfóxido e leitura espectrofotométrica a 550 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CIM do TIM para *M. abscessus* ATCC 19977 foi de 32 µg/mL, a partir da qual foram definidas as concentrações sub-inibitórias. Na quantificação da biomassa por cristal violeta, o controle positivo apresentou comportamento crescente até o quinto dia, seguido de redução no sétimo dia, enquanto as concentrações testadas apresentaram, em sua maioria, valores de absorbância inferiores ao controle, com os percentuais de inibição mais pronunciados no quinto dia (Figura 1a).

No quinto dia há um pico de biomassa, na organização do biofilme no controle não exposto com posterior queda. A medida que a concentração de TIM aumenta, nota-se a divergência de um comportamento de inibição com posterior recrescimento para 16 µg/mL para um padrão de pico de crescimento e posterior declínio com 8 µg/mL.

No ensaio de MTT houve aumento progressivo da absorbância em todas as condições ao longo do período avaliado, com os maiores valores no controle positivo (Figura 1b). O TIM postergou o estabelecimento do biofilme, a progressão da atividade metabólica foi consistentemente menor nas maiores concentrações, indicando redução parcial do metabolismo das células aderidas, porém ainda com tendência crescente.

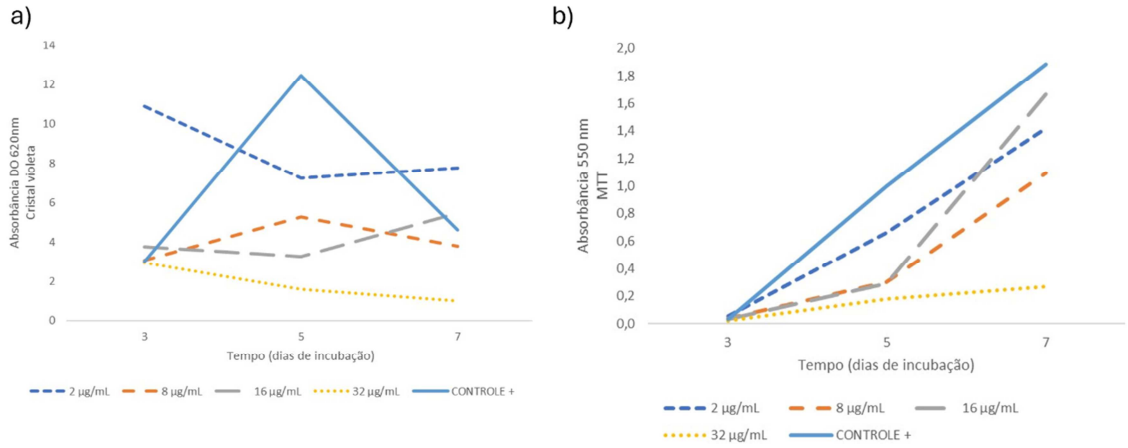


Figura 1 – Formação de biofilme de *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977 exposto ao timol a) Biomassa do biofilme determinada por ensaio de absorbância de cristal violeta. *b)* Atividade metabólica do biofilme por absorbância do ensaio com MTT.

CONCLUSÕES

As metodologias empregadas mostraram-se aplicáveis e complementares na avaliação de biofilmes de micobactérias de crescimento rápido, permitindo acompanhar biomassa e atividade metabólica ao longo da formação do biofilme. Nas condições testadas, o TIM exerceu atividade sobre o biofilme de *M. abscessus*, no qual o quinto dia representou o momento de maior inibição. O número reduzido de ensaios constitui limitação do estudo, sendo necessários novos experimentos, como a determinação da concentração inibitória mínima de erradicação do biofilme.

AGRADECIMENTOS

Presto meus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Araucária pelo apoio e concessão da bolsa de iniciação científica, como forma de financiamento à pesquisa, à Universidade Estadual de Maringá, e ao Laboratório de Bacteriologia Médica da UEM, pelo suporte à execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

AGUILERA-CORREA, J. J.; BOUDEHEN, Y.-M.; KREMER, L. Characterization of *Mycobacterium abscessus* colony-biofilms based on bi-dimensional images. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, v. 67, n. 9, e00402-23, 2023.

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.

FARHADI, K.; RAJABI, E.; VARPAEI, H. A.; IRANZADASL, M.; KHODAPARAST, S.; SALEHI, M. Thymol and carvacrol against *Klebsiella*: anti-bacterial, anti-biofilm, and synergistic activities—a systematic review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, 1487083, 2024.

GHOLAMI-AHANGARAN, M.; AHMADI-DASTGERDI, A.; AZIZI, S.; BASIRATPOUR, A.; ZOKAEI, M.; DERAKHSHAN, M. Thymol and carvacrol supplementation in poultry health and performance. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 1, p. 267-288, 2022. DOI: 10.1002/vms3.663.