

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
FISIOPATOLOGIA

BRUNA RENATA SILVA

Atividade da polimixina B associada à tiossemicarbazida derivada do (-)-
canfeno ou ao carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona contra *Enterobacteriaceae*
resistentes aos carbapenêmicos

Maringá

2019

BRUNA RENATA SILVA

Atividade da polimixina B associada à tiossemicarbazida derivada do (-)-
canfeno ou ao carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona contra *Enterobacteriaceae*
resistentes aos carbapenêmicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de
Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Biociências e Fisiopatologia
Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia
Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Dias Siqueira

Maringá

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S618a

Silva, Bruna Renata

Atividade da polimixina B associada à tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno ou ao carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona contra Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos / Bruna Renata Silva. -- Maringá, PR, 2020.

52 f.: il. color., figs., tabs., maps.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Dias Siqueira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF), 2020.

1. Enterobacteriaceae. 2. Tiossemicarbazida. 3. Resistência microbiana a medicamentos. 4. Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona. 5. Polimixina B. I. Siqueira, Vera Lucia Dias, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF). III. Título.

CDD 23.ed. 615

Rosana de Souza Costa de Oliveira - 9/1366

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRUNA RENATA SILVA

Atividade da polimixina B associada a tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno ou carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona contra *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

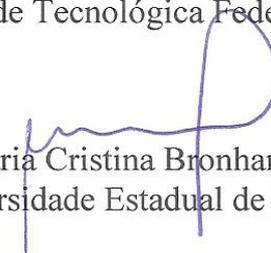
COMISSÃO JULGADORA



Dr.^a Vera Lucia Dias Siqueira
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)



Dr. Fábio Vandresen
Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Dr.^a Maria Cristina Bronharo Tognim
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 19 de dezembro de 2019

Local de Defesa: sala 112-B – Bloco T-20, *campus* da Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram
ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora que confiou em mim e teve paciência.

Agradeço à minha mãe e meu irmão que foram compreensíveis com a minha ausência e que não me deixaram de lado nunca.

Agradeço a todos os professores que tive o prazer de conhecer ao longo da graduação em biomedicina e ao longo desses dois anos de mestrado, pois sem eles eu não estaria aqui.

Agradeço ao meu amigo Marcelo por estar comigo e com o Mork na vida.

Agradeço à minha namorada que esteve presente nos momentos mais difíceis e que sempre me incentivou a continuar.

Agradeço aos meus amigos Bruno, Pedro, Caroline, Laís e Ana Vitória que fizeram meus anos serem incríveis.

Agradeço aos meus amigos do laboratório de Bacteriologia Médica, em especial a Beatriz, Paula e Pedro, que sempre me auxiliaram e estiveram comigo nesses dois anos.

Agradeço aos meus amigos do dia a dia que estiveram presentes de maneira indireta, mas que também são importantes.

Agradeço a todos envolvidos direta e indiretamente na realização desse trabalho.

Lembre-se:

A pressão faz parte do sucesso.

Atividade da polimixina B associada à tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno ou ao carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona contra *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos

RESUMO

A emergência de isolados clínicos de espécies bacterianas pertencentes à família *Enterobacteriaceae* apresentando resistência aos antimicrobianos de última geração, como os carbapenêmicos, tem sido cada vez mais frequente. A polimixina B (PB) representa um dos poucos recursos disponíveis para o tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC). No entanto, com o aumento do uso de PB na prática clínica, a emergência de bactérias Gram-negativas PB-resistentes vem sendo reportada em diversas regiões do mundo. A fim de contribuir para a redução da toxicidade da terapia antimicrobiana e resistência bacteriana, associações medicamentosas têm sido utilizadas como alternativas terapêuticas para pacientes com infecções por ERC PB-resistentes. Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) possui atividade antimicrobiana relatada em fungos e micobactérias. Carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) é um conhecido inibidor de bomba de efluxo, descrito na literatura como um modulador da atividade da colistina (polimixina E), diminuindo a concentração inibitória mínima (CIM) deste antimicrobiano em diversas bactérias Gram-negativas. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a ação combinada da TSC ou CCCP com PB sobre isolados de ERC PB-sensíveis e -resistentes. A CIM da PB, TSC e CCCP foram determinadas por microdiluição em caldo. O efeito da TSC ou CCCP na atividade de PB em ERC foi determinado pelo fator de modulação (FM), curva de tempo de morte e ensaio de acúmulo de brometo de etídio. Os resultados desse trabalho foram apresentados em forma de manuscrito no capítulo II. A TSC e o CCCP mostraram efeito modulador na atividade da PB em todos os isolados PB-resistentes (variação do FM de 4 a > 64). Assim, diferentes concentrações de TSC ou CCCP resgataram a atividade da PB em ERCs inicialmente PB-resistentes, com reversão das CIMs para pontos de corte de sensibilidade. No entanto, o mesmo padrão de redução na CIM da PB não foi observado em ERCs PB-sensíveis. O ensaio de curva de tempo de morte mostrou que uma concentração 64 vezes menor que a CIM da PB associada a TSC reduziu em $> 2 \log_{10}$ o número de viáveis de um isolado clínico PB-resistente, entretanto essa redução não se manteve ao longo de 24 h. Diferente do CCCP, o resgate da atividade da PB pela TSC pode não ser em consequência da inibição de bombas de efluxo. Em conclusão, nossos resultados

destacam que a TSC resgatou a sensibilidade de isolados clínicos de ERC para PB. Embora mais estudos devam ser realizados para entender o papel da TSC na modulação da atividade da PB, esta combinação pode representar uma opção no tratamento de infecções por ERC PB-resistentes.

Palavras-chave: *Enterobacteriaceae*. Resistência microbiana a medicamentos. Polimixina B. Tiosemicarbazida. Carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona.

Polymyxin B activity in combination with thiosemicarbazide (-)-camphene derivative or Carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*

ABSTRACT

The emergence of clinical isolates of bacterial species belonging to the *Enterobacteriaceae* family showing resistance to the latest generation antimicrobials, such as carbapenems, has been increasingly frequent. Polymyxin B (PB) is one of the few resources available for the treatment of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) infections. However, with the increasing use of PB in clinical practice, the emergence of PB-resistant Gram-negative bacteria has been reported in several regions of the world. In order to contribute to the reduction of antimicrobial therapy toxicity and bacterial resistance, drug combinations have been used as therapeutic alternatives for patients with PB-resistant CRE infections. (-)-camphene-based thiosemicarbazide (TSC) has reported antimicrobial activity in fungi and mycobacteria. Carbonyl cyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) is a known efflux pump inhibitor, reported as a modulator of colistin (polymyxin E) activity, decreasing the minimum inhibitory concentration (MIC) of this antimicrobial in several Gram-negative. In this sense, this study aimed to evaluate the combined action of TSC or CCCP with PB on PB-sensitive and resistant CRE isolates. The MIC of PB, TSC and CCCP were determined by broth microdilution. The effect of TSC or CCCP on PB activity in CRE was determined by modulation factor (MF), death time curve and ethidium bromide accumulation assay. The results of this work were presented in manuscript form in chapter II. TSC and CCCP showed modulating effect on PB activity in all PB-resistant isolates (FM range 4 to > 64). Thus, different concentrations of TSC or CCCP rescued PB activity in initially PB-resistant CREs, with reversal of MICs to sensitivity cutoffs. However, the same reduction pattern in PB MIC was not observed in PB-susceptible CREs. The time-kill curve assay showed that a concentration 64 times lower than the TSC-associated PB MIC reduced by > 2 log₁₀ the number of viable PB-resistant clinical isolates, however this reduction was not maintained over 24 h. Unlike CCCP, TSC rescue of PB activity may not be due to inhibition of efflux pumps. In conclusion, our results highlight that TSC rescued the sensitivity of clinical isolates from CRE to PB. Although further studies should be conducted to understand the role of TSC in modulating PB activity, this combination may represent an option in the treatment of PB-resistant CRE infections.

Keywords: *Enterobacteriaceae*. Drug resistance. Polymyxin B. Thiosemicarbazide. Carbonyl cyanide-*m*-chlorophenylhydrazone.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1. Molécula de Polimixina B..... 19
- Figura 2. Vias de regulação de modificações do LPS em *K. pneumoniae*..... 20
- Figura 3. Distribuição global do gene *mcr-1* até 2016..... 21
- Figura 4. Rota sintética para obtenção da tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (3). 23

Capítulo II

- Figura 1. Curva de tempo de morte de isolado clínico (CIM de 64 µg/mL para polimixina B (PB), com as concentrações de polimixina B e Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) ou carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) associadas..... 43
- Figura 2. Acúmulo de brometo de etídio (EtBr) do isolado clínico de *K. pneumoniae* ERC PB-resistente, realizado com a presença e ausência de inibidor de bomba de efluxo (IBE)..... 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|----------------------------------------------------------|
| BE | Bomba de efluxo |
| CCCP | Carbonilcianeto- <i>m</i> -clorofenilhidrazona |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| Dab | Ácido α , γ -diaminobutírico |
| DNP | 2,4-dinitrofenol |
| ERC | <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes aos carbapenêmicos |
| ESBL | Extended-spectrum β -lactamases |
| EtBr | Brometo de etídio |
| FM | Fator modulatório |
| IBE | Inibidores de bombas de efluxo |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase |
| L-Ara4N | L-aminoarabinose |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| NDM | <i>New Delhi</i> metalo- β -lactamase |
| PABN | Fenilalanil-arginil- β -naftilamida |
| PB | Polimixina B |
| pEtN | Fosfoetanolamina |
| PLP | Proteínas ligadoras de penicilina |
| RND | Resistance-nodulation-division |
| Sap | Sensitivity to antimicrobial peptides |
| SMR | Small multidrug resistance |
| TSC | Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno |
| UFC/mL | Unidades formadoras de colônias por mililitro |

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas Vancouver (Capítulo I e III) e da publicação científica (Capítulo II): *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, disponível em: <<https://aac.asm.org/>>

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO I..... | 15 |
| 1.1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1.2 Enterobacteriaceae..... | 16 |
| 1.1.3 Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos | 17 |
| 1.1.4 Polimixinas | 18 |
| 1.1.5 Mecanismos de Resistência às Polimixinas | 19 |
| 1.1.6 Inibidores de Bombas de Efluxo | 22 |
| 1.1.7 Busca por Novos Agentes Antibacterianos | 22 |
| 1.1.8 Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno | 22 |
| 1.1.9 Combinações antimicrobianas | 24 |
| 1. 2 JUSTIFICATIVA | 25 |
| 1. 3 OBJETIVOS..... | 26 |
| 1.3.1 Objetivo Geral | 26 |
| 1.3.2 Objetivos específicos..... | 26 |
| CAPÍTULO II..... | 32 |
| 2.1 Manuscrito: Resgate da ação da polimixina B pela tiossemicarbazida derivada do (-)- canfeno e CCCP contra Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos | 32 |
| CAPÍTULO III | 51 |
| 3.1 CONCLUSÕES | 51 |
| 3.2 PERSPECTIVAS | 52 |

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é uma crescente ameaça à saúde humana, de tal forma que, segundo estimativa, em 2050 a resistência antimicrobiana poderá ser responsável por dez milhões de mortes se medidas urgentes não forem tomadas (1). Diversos estudos têm reportado que a resistência bacteriana é uma realidade não apenas no ambiente hospitalar, mas também influencia o resultado do tratamento de pacientes da comunidade com infecções por bactérias multirresistentes (2–4). Para amenizar este problema estratégias consideradas cruciais, como a diminuição do uso inadequado de antimicrobianos e o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, capazes de contornar o fenômeno da resistência, necessitam ser urgentemente tomadas (5).

1.1.2 *Enterobacteriaceae*

Em 2016, a Organização Mundial da Saúde definiu uma lista de bactérias resistentes que deveriam ter prioridade na pesquisa e desenvolvimento de fármacos, na qual *Enterobacteriaceae* resistentes às cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos figuram como prioridade crítica (5).

Bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, também conhecidas como enterobactérias, são bacilos Gram-negativos comumente envolvidos em infecções. Embora pertençam a microbiota intestinal de humanos e animais, espécies pertencentes a esta família são capazes de causar desde infecções simples, como uma cistite não complicada, até graves infecções de corrente sanguínea que podem levar o indivíduo à morte em poucas horas (6). *Enterobacteriaceae*, especialmente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, representam a principal causa de infecções adquiridas tanto na comunidade como em hospitais (7).

A facilidade de disseminação entre os seres humanos, especialmente pelo contato com as mãos, além da grande capacidade de adquirir diversos mecanismos de resistência, fazem das *Enterobacteriaceae* uma das mais importantes fontes de preocupação para a terapia clínica (8).

1.1.3 Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos representam a última geração de antimicrobianos β -lactâmicos, e apresentam o melhor espectro de ação da classe, atuando em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. De modo geral, a atividade bactericida dos β -lactâmicos é atribuída à presença do anel β -lactâmico em seu núcleo estrutural, sendo a cadeia lateral responsável pelo seu espectro de ação. Devido a estrutura diferenciada da cadeia lateral do anel β -lactâmico, os carbapenêmicos são menos suscetíveis a hidrólise pelas enzimas β -lactamases (9).

Os β -lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos atuam se ligando às proteínas ligadoras de penicilina (PLP), levando a interrupção do crescimento e estruturação das paredes celulares bacterianas (9). Imipenem, meropenem e ertapenem são os principais carbapenêmicos utilizados na clínica médica para o tratamento de infecções graves (10). *Enterobacteriaceae* podem ser resistentes aos carbapenêmicos por dois mecanismos principais: i- aquisição de genes que codificam carbapenemases, enzimas capazes de degradar praticamente todos os β -lactâmicos; ii- diminuição na permeabilidade da membrana externa ao antimicrobiano associada a superexpressão de enzimas β -lactamases com baixa afinidade aos carbapenêmicos, como AmpC e ESBL (*extended-spectrum β -lactamases*) (8).

Enterobacteriaceae, especialmente *K. pneumoniae* e *E. coli*, são frequentemente relatadas como portadoras de genes que codificam duas das principais subclasses de carbapenemases, a *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) e a *New Delhi* metalo- β -lactamase (NDM) (7). Oxacilinase-48 (OXA-48), uma outra carbapenemase já relatada nestas espécies, é a terceira mais detectada no mundo (7).

A prevalência de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) são geralmente dependentes da localização geográfica, porém *K. pneumoniae* tem sido a espécie de ERC mais isolada no mundo (11). Os países com as taxas mais elevadas de ERC são principalmente Grécia, Itália, Brasil e China, e também outros países como EUA e Colômbia. As taxas de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos na Grécia chegaram a 64 % e na Itália a 29 % no ano de 2017 (12). No Brasil, um estudo conduzido em São Paulo no período de 2011 a 2015 observou um aumento de 6,8 % em 2011 para 35,5 % em 2015 na taxa de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (13).

A taxa de mortalidade por infecções causadas por ERC é de 50 % (14) e o tratamento de infecções graves por estes multirresistentes geralmente estão baseados em esquemas terapêuticos caracterizados por toxicidade aumentada ou farmacocinética de baixo desempenho (15).

O aumento da resistência em diversos microrganismos tem gerado programas governamentais de incentivos econômicos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos e para acelerar os processos de avaliação e liberação de novas moléculas para o uso clínico. Desses incentivos surgiram diversas novas combinações de β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases, bem como novas moléculas, muitas delas em fase de avaliação clínica (16).

Ceftazidima-avibactam, imipenem-relebactam e meropenem-vaborbactam são alguns exemplos de novas combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases capazes de inibir diversos tipos de enzimas, inclusive carbapenemases. Porém nenhuma destas combinações tem efetividade contra bactérias produtoras de carbapenemases do tipo metalo- β -lactamase, como a NDM produzida por algumas ERCs. O aztreonam, um β -lactâmico não hidrolisado pelas metalo- β -lactamases, têm sido testado associado ao avibactam para aumentar o espectro de ação contra ERCs (17,18). O cefiderocol é uma nova cefalosporina com potente ação contra microrganismos patogênicos Gram-negativos como *Enterobacteriaceae* e não fermentadores, incluindo produtores de carbapenemases do tipo KPC e NDM (19). Esta nova cefalosporina foi recentemente aprovada pelo comitê americano *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de pacientes maiores de 18 anos com infecção urinária complicada causada por BGN não sensíveis à outras opções terapêuticas. A eficácia e segurança terapêutica do cefiderocol ainda não foram estabelecidas para o tratamento de infecções em outros sítios anatômicos (20).

Outros agentes antimicrobianos não β -lactâmicos estão sendo estudados para o tratamento de ERC. Um agente promissor é a Eravaciclina, um derivado sintético da tetraciclina. Este antimicrobiano mostrou ser 2 a 4 vezes mais potente que a tigeciclina contra ERCs, entretanto também não demonstrou boa atividade contra BGN produtores de metalo- β -lactamases (21). Essas novas opções terapêuticas, embora com efeito promissor contra ERCs apresentam como principal fator limitante para sua aplicação clínica o alto custo de produção.

1.1.4 Polimixinas

As polimixinas foram descobertas em 1947, representadas por um grupo de cinco antibióticos polipeptídicos (polimixina A-E). A colistina (polimixina E) e a PB são as únicas utilizadas na prática clínica e são ativas contra a maior parte das bactérias Gram-negativas, como as *Enterobacteriaceae*, incluindo *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp (22).

Polimixinas são polipeptídios catiônicos, constituídos por um heptapeptídeo cíclico que possui uma cadeia lateral de tripeptídeo acilada na porção N-terminal por uma cauda de ácido graxo (Figura 1), sendo sua toxicidade explicada em partes devido a suas propriedades hidrofóbicas fornecidas pelo ácido graxo N-terminal (23).

Diversos mecanismos de ação das polimixinas têm sido descritos, mas o exato mecanismo pelo qual esses antimicrobianos atuam como bactericidas ainda não está totalmente esclarecido (24). A ação mais conhecida está relacionada a sua interação com o lipídio A do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana das bactérias Gram-negativas, tal interação ocorre entre o ácido α,γ -diaminobutírico (Dab) da polimixina, carregado positivamente, com os grupos fosfatos do lipídio A carregados negativamente, há também o deslocamento de cátions divalentes, como o Mg^{2+} e Ca^{2+} do fosfolipídio da membrana (25). Com isso há o vazamento do conteúdo citoplasmático, pois a desestabilização do fosfolipídio leva ao aumento da permeabilidade da membrana. Ou seja, por ser um agente catiônico, possui afinidade pela membrana externa, em especial pelo LPS de bactérias Gram-negativas. Essa atração pelo LPS facilita a passagem da molécula pela parede bacteriana e sua ação contra a bicamada fosfolipídica da membrana interna, levando à lise celular (26).

Embora haja grandes evidências da membrana como o único alvo das polimixinas, existem relatos de mecanismos alternativos de ação como a ligação com ribossomos, interferência na respiração celular por inibição das enzimas NADH oxidase e citocromo redutase e inibição da divisão celular (24).

A PB foi usada durante décadas para o tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas, porém, na década de 1980 seu uso foi reconsiderado devido a sua alta toxicidade e ao desenvolvimento de novos antimicrobianos menos tóxicos e efetivos. Contudo, com o surgimento de bactérias Gram-negativas multirresistentes, inclusive ERCs, as polimixinas voltaram como uma opção terapêutica (23,27). Entretanto, ERCs resistentes às polimixinas têm sido frequentemente relatadas como agentes de infecções

uma regulação positiva de genes e operons responsáveis pela síntese e adição de grupos catiônicos no lipídeo A (23).

O sistema de dois componentes PhoPQ é um regulador bem conhecido de remodelamento de envelopes, principalmente para o lipídeo A no LPS, e contribui para a resistência bacteriana à resposta imune inata (33). Sendo que alterações nesse sistema também levam a adição de grupos catiônicos no LPS como a pEtN e/ou grupo *L-Ara4N*. A adição desses grupos catiônicos diminui a negatividade do LPS, diminuindo a afinidade da molécula polimixina pela membrana externa da bactéria (23,34).

Um outro mecanismo de resistência às polimixinas comumente observado em *K. pneumoniae* é a inativação, por mutação, do gene *mgrB* relacionado com a codificação de uma proteína que regula negativamente o sistema de dois componentes *phoP/phoQ*, tal mutação também pode levar a uma regulação positiva do operon responsável pela adição de *L-Ara4N* (32).

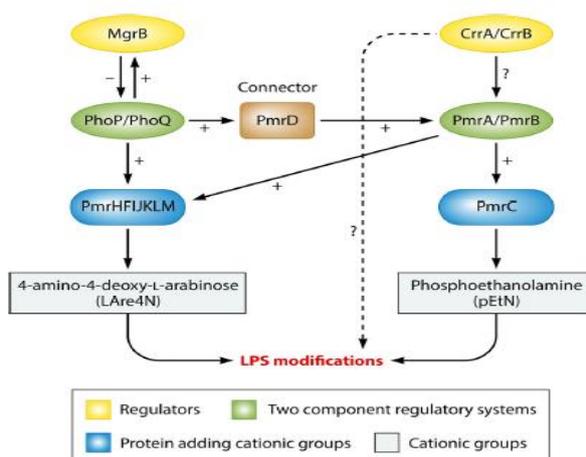


Figura 2. Vias de regulação de modificações do LPS em *K. pneumoniae* (23).

Em 2015, Liu et. al. relataram a identificação de um novo mecanismo de resistência às polimixinas mediado por um gene plasmidial, *mcr-1* (35). Este gene codifica uma família de enzimas fosfoetanolamina transferases que expressas resultam na adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A (36). Até 2016, o gene *mcr-1* já havia sido detectado em 16 países (Figura 3) (37) e diversos outros genes homólogos *mcr* (*mcr-2-8*) já foram identificados (38).

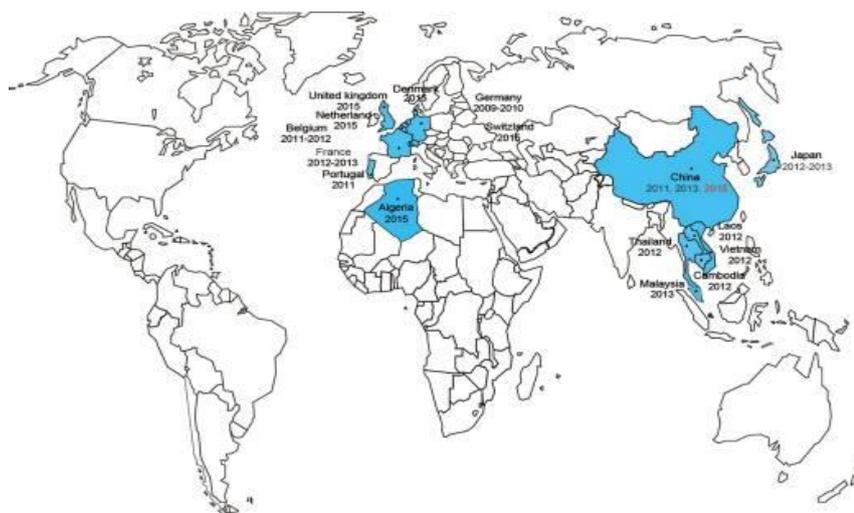


Figura 3. Distribuição global do gene *mcr-1* até 2016 (37).

Além da alteração do LPS, diferentes bombas de efluxo (BE) têm sido relacionadas à resistência às polimixinas. Bombas de efluxo são proteínas de transporte localizadas na parede celular bacteriana, responsáveis pela extrusão de diferentes substratos, inclusive antimicrobianos, do interior da célula e assim, podem contribuir para a resistência bacteriana (39).

Bombas de efluxo em bactérias Gram-negativas são complexas devido a estrutura em bicamada da parede celular que gera a necessidade de BE do tipo tripartidas, como da superfamília RND (*resistance-nodulation-division*). BEs do tipo RND, especialmente AcrAB têm sido amplamente reportadas como responsável por multirresistência em isolados da família *Enterobacteriaceae* (40).

Proteínas transportadoras Sap (*sensitivity to antimicrobial peptides*), relatadas em *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* e *K. pneumoniae*, é uma BE composta por 5 proteínas codificadas pelo operon *sapABCDF*. Este operon parece estar relacionado à resistência intrínseca à PB em *Proteus mirabilis* (30). Em *K. pneumoniae*, a KpnEF, uma BE da família SMR (*small multidrug resistance*), medeia a resistência a diversos antimicrobianos, inclusive colistina (41). As BEs AcrAB–TolC foram relacionadas ao aumento da resistência à polimixina em isolados de *E. coli* e a expressão dessas BE é dependente do sistema *phoP/phoQ* (42).

A formação de cápsula também é relatada como um mecanismo de resistência a polimixina, demonstrando que cepas resistentes podem apresentar cápsulas com muitas camadas organizadas, podendo ainda essa organização ser devida a inativação do gene *mgrB* (43).

1.1.6 Inibidores de Bombas de Efluxo

Considerando a importância das BE na mediação da resistência bacteriana, inibir esses sistemas de transporte pode potencializar a atividade dos antimicrobianos (44).

Inúmeros inibidores de bombas de efluxo (IBE) tem sido testados em bactérias Gram-negativas, como o carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP), 2,4-dinitrofenol (DNP), fenilalanil-arginil- β -naftilamida (PABN), reserpina, omeprazol e verapamil (39).

O CCCP é um importante IBE em bactérias e em alguns estudos já foi demonstrado sua capacidade em reduzir a concentração inibitória mínima (CIM) da colistina (39,45,46). Wentão et al. (2016) observaram reduções significativas nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da colistina quando associada ao inibidor de BE CCCP em bacilos Gram-negativos (46). Embora os mecanismos envolvidos nessa diminuição da CIM não sejam totalmente conhecidos, esses autores sugerem que o CCCP, neste caso, não atue como IBE, mas sim restaurando a carga negativa das bactérias pelo rompimento da força motriz do próton (46).

1.1.7 Busca por Novos Agentes Antibacterianos

Embora as estratégias terapêuticas busquem por alternativas e melhorias, o desenvolvimento de novos antimicrobianos menos tóxicos não acompanha o ritmo acelerado do avanço da resistência bacteriana, o que contribui para altas taxas de morbidade e mortalidade. Moléculas com propriedades farmacológicas satisfatórias são utilizados frequentemente como produtos de partida para síntese de derivados ativos biologicamente (47). O desenvolvimento de fármacos com atividade contra bactérias resistentes, com estruturas e mecanismos de ação diferentes não são vistos há muito tempo, o que dificulta o tratamento e intensifica a necessidade da busca por novas opções de antibacterianos (48).

1.1.8 Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno

Tiossemicarbazidas representam uma classe de compostos importantes, devido a sua capacidade de sofrer várias modificações estruturais possibilitando a síntese de compostos com propriedades diversas. Tiossemicarbazidas são compostas basicamente

por carbono, nitrogênio e enxofre e a sua obtenção ocorre principalmente através de reações entre isotiocianatos e hidrazinas (49). Devido as características já descritas e a necessidade do desenvolvimento de antimicrobianos, as tiossemicarbazidas têm sido alvo de diferentes estudos e já demonstraram atividade contra algumas espécies de bactérias, fungos e protozoários. Além disso, derivados de tiossemicarbazidas têm demonstrado baixa citotoxicidade para células de mamíferos (47,50,51).

O (-)-canfeno, um monoterpene bicíclico (Figura 4), encontrado em altas concentrações, principalmente no óleo essencial das folhas e flores de *Thymus vulgaris*, possui propriedades expectorantes, espasmolíticas e antimicrobianas o que estimula sua utilização como fármaco e como protótipo para a obtenção de novas moléculas bioativas (52).

Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) foi sintetizada (Figura 5) e caracterizada previamente (47), apresentando comprovada atividade antifúngica (47,53,54). Yamaguchi et al. observaram que a incorporação do (-)-canfeno à tiossemicarbazida melhorou o efeito antifúngico da molécula em *Trichophyton mentagrophytes*. Esses autores acreditam que a TSC atue na parede celular do fungo (47).

Recentemente, esta molécula também foi testada por colaboradores do nosso grupo de pesquisa e mostrou importante ação inibitória sobre *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp.*, inclusive em isolados multirresistentes (dados não publicados) e em *Mycobacterium tuberculosis*, além de apresentar baixa toxicidade em células epiteliais da linhagem VERO (55).

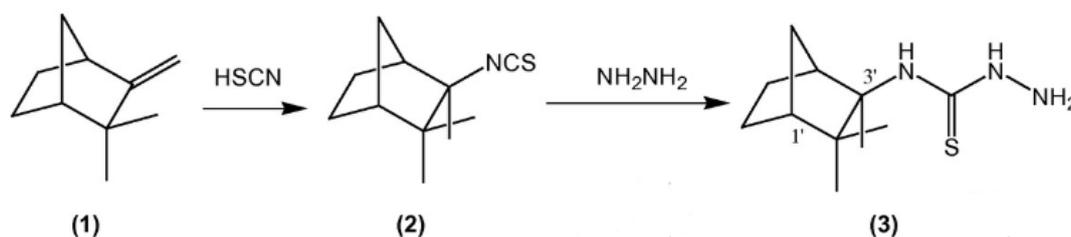


Figura 4. Rota sintética para obtenção da tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (3) (55).

1.1.9 Combinações antimicrobianas

Na prática clínica, associações de medicamentos têm sido empregadas como alternativas de tratamento em pacientes com infecções por ERC. Neste sentido, interações sinérgicas entre antimicrobianos têm sido investigadas para a melhoria dos resultados terapêuticos e diminuição do potencial tóxico dos antimicrobianos empregados (27,56).

Novas substâncias químicas também estão sendo testadas em combinação com fármacos já conhecidos na tentativa de resgatar a atividade antibacteriana prejudicada pela resistência (46,57).

Uma variedade de metodologias com diferentes princípios tem sido empregada para avaliação *in vitro* de combinações antimicrobianas. A microdiluição em caldo é uma metodologia amplamente utilizada para avaliação CIM, que determina a menor concentração da nova substância, associada ou não a um antimicrobiano já conhecido, que é capaz de inibir o crescimento bacteriano (58). O *chequerboard* representa o ensaio clássico de avaliação de combinações de duas ou mais substâncias com efeito antimicrobiano. Esta técnica permite avaliar se a combinação será sinérgica, antagônica ou aditiva/indiferente, usando para interpretação o índice de concentração inibitória fracionada (46).

A metodologia conhecida como curva de tempo de morte também pode ser utilizada para avaliar a atividade bactericida da combinação de antimicrobianos sobre um determinado período de tempo. Por esta metodologia a interpretação é feita comparando os resultados obtidos entre a combinação e o antimicrobiano mais ativo. Neste caso, sinergismo é definido como uma diminuição $\geq 2\text{-log}_{10}$ no número de UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro) após 24 h de exposição à combinação antimicrobiana, comparada com o antimicrobiano mais ativo usado sozinho e com o inóculo inicial (59,60).

Um outro método para avaliação de combinações antimicrobianas é o fator de modulação, o qual possibilita avaliar a capacidade de uma substância em modular a atividade de outro. Para esse método utilizamos o valor encontrado na CIM de uma substância sozinha e o valor da CIM encontrado quando associada a outra substância. Uma redução de 4 vezes ou mais da CIM da combinação em relação a substância sozinha define o efeito modulador de uma sobre a outra (61).

1. 2 JUSTIFICATIVA

Com o desenvolvimento da resistência bacteriana e conseqüentemente a diminuição das opções de tratamento, torna-se necessário a busca por novas substâncias que possam atuar sinergicamente com os antimicrobianos já conhecidos. TSC tem atividade comprovada contra importantes agentes de micose superficial e profunda, bem como atividade antituberculosa. Além disso, estudos preliminares demonstraram que a TSC tem ação contra os principais cocos Gram positivos causadores de infecção em humanos.

O CCCP já foi reportado como capaz de diminuir a CIM da colistina. Até o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo com PB em associação a TSC e CCCP em bactérias Gram-negativas, especialmente em ERC.

1. 3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação combinada da PB com TSC ou CCCP sobre isolados de ERC sensíveis e resistentes a PB.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da PB para as ERC selecionadas;
- Determinar o fator de modulação (FM) da associação de PB com TSC para as ERCs selecionadas;
- Determinar o fator de modulação (FM) da associação de PB com o CCCP para as ERCs selecionadas;
- Avaliar a ação combinada de PB com TSC ou CCCP sobre a cinética de morte bacteriana;
- Avaliar *In silico* a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME);

- Avaliar a ação da TSC como inibidor de bomba de efluxo pelo ensaio de acúmulo de brometo de etídio.

REFERÊNCIAS

1. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, in "Review on Antimicrobial Resistance,," 2016;(May). Available from: <https://amr-review.org>
2. van Hecke O, Wang K, Lee JJ, Roberts NW, Butler CC. Implications of Antibiotic Resistance for Patients' Recovery From Common Infections in the Community: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2017 Aug;65(3):371–82.
3. Khatri A, Naeger Murphy N, Wiest P, Osborn M, Garber K, Hecker M, et al. Community-Acquired Pyelonephritis in Pregnancy Caused by KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Aug;59(8):4375–8.
4. Dias VC, da Silva VL, Barros R, Bastos AN, de Andrade Bastos LQ, de Andrade Bastos VQ, et al. Phenotypic and genotypic evaluation of beta-lactamases (ESBL and KPC) among enterobacteria isolated from community-acquired monomicrobial urinary tract infections. *J Chemother*. 2014 Dec;26(6):328–32.
5. Antibacterial agents in clinical development: an analysis, of the antibacterial clinical development pipeline including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017 (WHO/EMP/IAU/2017.12). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258965/1/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf?ua=14>.
6. Sheu C-C, Chang Y-T, Lin S-Y, Chen Y-H, Hsueh P-R. Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An Update on Therapeutic Options. *Front Microbiol*. 2019;10:80.
7. Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the community: a scoping review. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Aug;50(2):127–34.
8. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med*. 2012 May;18(5):263–72.
9. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem*. 2017 May;131:185–95.
10. Anvisa. Gram-negativos - resistência aos antimicrobianos [Internet]. [cited 2018 May 24]. p. 1–2. Available from: http://www.anvisa.gov.br/servicosau/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/ops_web/modulo3/gramn_carba3.htm
11. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Lab Med*. 2017 Jun;37(2):303–15.
12. Centre for Disease Prevention and Control E. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC; 2018; 2017.
13. Bartolleti F, Seco BMS, Capuzzo Dos Santos C, Felipe CB, Lemo MEB, Alves T da S, et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, Sao Paulo, Brazil. Vol. 22, Emerging infectious diseases. United States; 2016. p. 1849–51.

14. Parker VA, Logan CK CB. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Control and Prevention Toolkit. Rockville, MD Agency Healthc Res Qual [Internet]. 2014;14-0028. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/index.html>.
15. Peri AM, Doi Y, Potoski BA, Harris PNA, Paterson DL, Righi E. Antimicrobial treatment challenges in the era of carbapenem resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019 Aug;94(4):413–25.
16. Bush K, Page MGP. What we may expect from novel antibacterial agents in the pipeline with respect to resistance and pharmacodynamic principles. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2017 Apr;44(2):113–32.
17. Wright H, Bonomo RA, Paterson DL. New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn? *Clin Microbiol Infect*. 2017 Oct;23(10):704–12.
18. Plazak ME, Tamma PD, Heil EL. The antibiotic arms race: current and emerging therapy for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) - producing bacteria. *Expert Opin Pharmacother*. 2018 Dec;19(18):2019–31.
19. Portsmouth S, van Veenhuyzen D, Echols R, Machida M, Ferreira JCA, Ariyasu M, et al. Cefiderocol versus imipenem-cilastatin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by Gram-negative uropathogens: a phase 2, randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*. 2018 Dec;18(12):1319–28.
20. Lesney M. FDA approves cefiderocol for multidrug-resistant, complicated urinary tract infections [Internet]. [cited 2019 Dec 16]. Available from: <https://www.the-hospitalist.org/hospitalist/article/212421/antimicrobial-resistant-infections/fda-approves-cefiderocol-multidrug>.
21. Lee YR, Burton CE. Eravacycline, a newly approved fluorocycline. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Oct;38(10):1787–94.
22. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005 May;40(9):1333–41.
23. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Apr;30(2):557–96.
24. Trimble MJ, Mlynarcik P, Kolar M, Hancock REW. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Oct;6(10).
25. Dixon RA, Chopra I. Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986 May;29(5):781–8.
26. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015. Available from: <https://doi.org/10.1155/2015/679109>
27. Lee GC, Burgess DS. Polymyxins and Doripenem Combination Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res*. 2013 Apr;5(2):97–100.

28. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. [Internet]. Vol. 47, Brazilian Journal of Microbiology. scielo; 2016. p. 31–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>.
29. Avedissian SN, Liu J, Rhodes NJ, Lee A, Pais GM, Hauser AR, et al. A Review of the Clinical Pharmacokinetics of Polymyxin B. *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2019 Mar;8(1).
30. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas M-V, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Aug;58(8):4762–6.
31. Yan A, Guan Z, Raetz CRH. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2007 Dec;282(49):36077–89.
32. Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Nov;57(11):5521–6.
33. Groisman EA. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol*. 2001 Mar;183(6):1835–42.
34. Kim SY, Choi HJ, Ko KS. Differential expression of two-component systems, pmrAB and phoPQ, with different growth phases of *Klebsiella pneumoniae* in the presence or absence of colistin. *Curr Microbiol*. 2014 Jul;69(1):37–41.
35. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb;16(2):161–8.
36. Gao R, Hu Y, Li Z, Sun J, Wang Q, Lin J, et al. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathog*. 2016 Nov;12(11):e1005957.
37. Ye H, Li Y, Li Z, Gao R, Zhang H, Wen R, et al. Diversified mcr-1-Harboring Plasmid Reservoirs Confer Resistance to Colistin in Human Gut Microbiota. Bush Baoli Yang, Ruifu Jiang, Shibo KZ, editor. *MBio* [Internet]. 2016 May 4;7(2):e00177-16. Available from: <http://mbio.asm.org/content/7/2/e00177-16.abstract>
38. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect*. 2018 Jul;7(1):122.
39. Baron SA, Rolain J-M. Efflux pump inhibitor CCCP to rescue colistin susceptibility in mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant strains and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Jul;73(7):1862–71.
40. Maurya N, Jangra M, Tambat R, Nandanwar H. Alliance of Efflux Pumps with beta-Lactamases in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Microb Drug Resist*. 2019 Oct;25(8):1155–63.
41. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014;5:643.

42. Baron S, Hadjadj L, Rolain J, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023>
43. Formosa C, Herold M, Vidailac C, Duval RE, Dague E. Unravelling of a mechanism of resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* using atomic force microscopy. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Aug;70(8):2261–70.
44. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res.* 2019 Feb;149(2):129–45.
45. Park YK, Ko KS. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistin. *J Microbiol.* 2015 Jan;53(1):53–9.
46. Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R, et al. Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 May;60(5):3215–8.
47. Yamaguchi MU, Da Silva APB, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Da Silva CC, Nakamura CV. Effects of a thiosemicarbazide camphene derivative on *Trichophyton mentagrophytes*. *Molecules.* 2009;14(5):1796–807.
48. Theuretzbacher U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need. *Curr Opin Microbiol.* 2017 Oct;39:106–12.
49. Sousa-pereira D, Goulart CM, Reis CM. Síntese e Avaliação da Atividade Anticorrosiva de Tiossemicarbazida e Tiossemicarbazona 4- N - (p -metóxilfenil) Substituídas. *Rev virtual Quim.* 2013;5(4):770–85.
50. Pitucha M, Woś M, Miazga-Karska M, Klimek K, Mirosław B, Pachuta-Stec A, et al. Synthesis, antibacterial and antiproliferative potential of some new 1-pyridinecarbonyl-4-substituted thiosemicarbazide derivatives. *Med Chem Res.* 2016;25(8):1666–77.
51. Pintilie O, Profire L, Sunel V, Popa M, Pui A. Synthesis and antimicrobial activity of some new 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole compounds having a D,L-methionine moiety. *Molecules.* 2007 Jan;12(1):103–13.
52. Baser KHC BG. *Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications.* 2010.
53. do Carmo Silva L, Tamayo Ossa DP, Castro SV da C, Bringel Pires L, Alves de Oliveira CM, Conceicao da Silva C, et al. Transcriptome Profile of the Response of *Paracoccidioides* spp. to a Camphene Thiosemicarbazide Derivative. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130703.
54. Borba JVV, Tauhata SBF, Oliveira CMA de, Ferreira Marques M, Bailao AM, Soares CM de A, et al. Chemoproteomic identification of molecular targets of antifungal prototypes, thiosemicarbazide and a camphene derivative of thiosemicarbazide, in *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One.* 2018;13(8):e0201948.
55. Souza MRP, Coelho NP, Baldin VP, Scodro RBL, Cardoso RF, da Silva CC, et al. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. *Nat Prod Res.* 2018 May;1–6.
56. Le J, McKee B, Srisupha-Olarn W, Burgess DS. In vitro activity of carbapenems

- alone and in combination with amikacin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res*. 2011 May;3(3):106–10.
57. Schneider EK, Azad MAK, Han M-L, Tony Zhou Q, Wang J, Huang JX, et al. An “Unlikely” Pair: The Antimicrobial Synergy of Polymyxin B in Combination with the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Drugs KALYDECO and ORKAMBI. *ACS Infect Dis*. 2016 Jul;2(7):478–88.
 58. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; 11th Edition. CLSI standard M07. Wayne, PA: USA, 2018.
 59. Siqueira VLD, Cardoso RF, Caleffi-Ferracioli KR, Scodro RB de L, Fernandez MA, Fiorini A, et al. Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jul;58(7):3957–67.
 60. Foweraker JE, Laughton CR, Brown DF, Bilton D. Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from patients with acute infective exacerbations in cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Nov;53(11):4809–15.
 61. Caleffi-Ferracioli KR, Cardoso RF, de Souza JV, Murase LS, Canezin PH, Scodro RB, et al. Modulatory effects of verapamil in rifampicin activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol*. 2019 Feb;14:185–94.

CAPÍTULO II

2.1 Manuscrito: Resgate da atividade da polimixina B pela tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno e CCCP contra *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos

Resgate da atividade da polimixina B pela tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno e CCCP contra *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos

Bruna Renata Silva¹, Eloisa Gibin Sampiron⁴, Paula Assis Queiroz¹, Pedro Henrique do Amaral², Alison Fernando Stocco³, Fábio Vandresen³, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli¹, Regiane Bertin de Lima Scodro⁴, Rosilene Fressatti Cardoso¹, Vera Lucia Dias Siqueira^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brasil

²Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, UEM, Maringá, Paraná, Brasil

³Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná-Brasil

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, UEM, Maringá Paraná, Brasil

*Autor correspondente:

Vera Lucia Dias Siqueira

Laboratório de Bacteriologia Médica

Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Tel. and Fax number: + 55 44 3011-5375.

e-mail: vldsiqueira@gmail.com

RESUMO

Objetivo: Avaliar a atividade da tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) ou do inibidor de bomba de efluxo carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) em associação com polimixina B (PB) em *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC).

Material e Métodos: Foram utilizados isolados clínicos de ERCs sensíveis e resistentes à PB. Concentração inibitória mínima (CIM) de PB associada ou não à TSC ou CCCP foram determinadas por microdiluição em caldo. O efeito da associação do CCCP ou de TSC na atividade inibitória da PB foi avaliado pelo fator de modulação (FM), curva de tempo de morte e ensaio de acúmulo de brometo de etídio.

Resultados: As CIMs de PB variaram de 0,25 a 512 µg/mL entre os isolados ERC testados. TSC e CCCP modularam a atividade de PB em todos isolados resistentes a este antimicrobiano (FM de 4 a > 64), com reversão das CIMs para pontos de corte de sensibilidade. Entretanto, o mesmo padrão de redução na CIM da PB não foi observado em ERCs PB-sensíveis. Uma concentração 64 vezes menor que a CIM da PB associada a TSC reduziu em > 2 log₁₀ o número de viáveis de um isolado clínico PB-resistente, entretanto essa redução não se manteve ao longo de 24 h. Diferente do CCCP, o resgate da atividade da PB pela TSC pode não ser em consequência da inibição de bombas de efluxo.

Conclusão: Os resultados obtidos destacam o efeito modulador da TSC e do CCCP na atividade da PB, resgatando a sensibilidade dos isolados de ERC para este antimicrobiano.

Palavras-chave: Carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona/ *Enterobacteriaceae*/ Polimixina B/ Resistência Bacteriana a medicamentos/ Tiossemicarbazida

ABSTRACT

Objective: To analyze the action of thiosemicarbazide (-)-camphene derivative (TSC) or carbon-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) efflux pump inhibitor in combination with polymyxin B (PB) on carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE).

Material and Methods: Clinical isolates of PB-susceptible and -resistant CREs were used. Minimum inhibitory concentration (MIC) of PB associated or not with TSC and CCCP were determined by broth microdilution. The effect of CCCP or TSC on PB inhibitory activity was evaluated by modulation factor (FM), time-kill curve and ethidium bromide accumulation assay.

Results: PB MICs ranged from 0.25 to 512 µg/mL among the CRE isolates tested. TSC and CCCP modulated PB activity in all isolates resistant to this antimicrobial (FM 4 to > 64). Thus, CCCP and different TSC concentrations rescued PB activity in PB-resistant CREs, with a reversal of MICs to sensitivity cutoffs. However, the same reduction pattern in PB MIC was not observed in PB-susceptible CREs. The time-kill curve test showed that a concentration 64 times lower than the TSC-associated PB MIC reduced by $> 2 \log_{10}$ the number of viable PB-resistant clinical isolates, however, this reduction was not maintained over 24 h. Unlike CCCP, the rescue of PB activity by TSC may not be to efflux pumps inhibition.

Conclusion: The results highlighted the modulating effect of TSC and CCCP on PB activity, rescuing the sensitivity of CRE isolates to this antimicrobial.

Keywords: Drug resistance, bacterial/ Carbonyl cyanide-*m*-chlorophenylhydrazone/ *Enterobacteriaceae*/ polymyxin B/ thiosemicarbazide

Introdução

Bactérias Gram-negativas pertencentes a família *Enterobacteriaceae* estão comumente envolvidas em infecções. Embora façam parte da microbiota intestinal de humanos e animais, diversas espécies desta família são capazes de causar desde infecções simples, como uma cistite não complicada, até graves infecções de corrente sanguínea que podem rapidamente resultar em morte (1).

A multirresistência aos antimicrobianos é bastante comum em *Enterobacteriaceae* e carbapenêmicos são considerados a última opção de escolha para o tratamento de infecções por esses multirresistentes (2). Com o crescente uso de carbapenêmicos na prática clínica, surgiram patógenos Gram-negativos resistentes a estes antimicrobianos e, atualmente, *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) representam uma das três bactérias para as quais políticas globais de pesquisa e desenvolvimento de novas opções terapêuticas devem ser priorizadas (3).

Polimixina B (PB) representa uma das poucas opções terapêuticas para o tratamento de infecções por ERCs (1). Consideradas polipeptídeos catiônicos, as duas polimixinas usadas na prática clínica (PB e colistina) possuem afinidade pela membrana externa, em especial pelo lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas. Essa atração pelo LPS facilita a passagem da molécula pela parede bacteriana e sua ação contra a bicamada fosfolipídica da membrana interna, levando a lise celular (4). Entretanto, ERCs resistentes às polimixinas, geralmente devido ao remodelamento do LPS, também têm sido relatadas (5).

Em razão da crescente resistência bacteriana e do lento desenvolvimento de novos antimicrobianos, restituir a atividade dos antimicrobianos existentes pode representar uma interessante estratégia terapêutica.

O canfeno, um monoterpeneo natural encontrado em altas concentrações no óleo essencial de folhas e flores de diversas espécies de plantas, tem sido empregado como base para síntese de diversos derivados, como a tiossemicarbazida (6). Esses derivados têm demonstrado ação satisfatória contra alguns microrganismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários (7,8). Em estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisas, a tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) mostrou importante ação inibitória sobre *Mycobacterium tuberculosis* e baixa toxicidade em células epiteliais da linhagem VERO (6).

O carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) é um conhecido inibidor de bombas de efluxo que já foi reportado como redutor das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da colistina em bacilos Gram-negativos colistina-resistentes. A restauração da carga negativa das paredes dessas bactérias pelo CCCP também pode ser o mecanismo responsável pela recuperação da atividade da colistina, além do esperado efeito sobre as bombas de efluxo (9).

O desenvolvimento de novas moléculas que por alterar a carga negativa da parede bacteriana ou por outros mecanismos sejam capazes de resgatar a atividade dos antimicrobianos já existentes, poderia representar uma opção terapêutica em bactérias Gram-negativas multirresistentes, especialmente em ERCs resistentes às polimixinas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade da combinação de TSC ou CCCP com PB em ERCs.

Material e métodos

Amostras bacterianas

Foram testados 27 isolados clínicos de ERCs sensíveis e resistentes à polimixina, provenientes da bacterioteca do setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. Os isolados bacterianos estocados a -80 °C em caldo triptona de soja (TSB - Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) adicionado de 15 % de glicerol foram reativados no momento da realização de cada teste.

Substâncias testadas

A TSC foi sintetizada a partir do isotiocianato derivado do (-)-canfeno como realizado por Souza et al. (8). Resumidamente, o isotiocianato derivado do (-)-canfeno (12,8 mmol) foi dissolvido em etanol absoluto (50 mL) e à esta solução foi adicionado hidrato de hidrazina 80% (13,5 mmol) diluída em etanol absoluto (10 mL). A mistura foi mantida sob refluxo durante 4 horas e a reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (hexano:acetato de etila 70:30). Após o complemento da reação, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o sólido obtido foi lavado com hexano e recristalizado com uma mistura de etanol:água (80:20). O sólido obtido foi filtrado e lavado com água, resultando na TSC (Rendimento: 85%). Cristais brancos; pf. 150-154°C; $[\alpha]_D -4$ (c=4.5 mg.mL⁻¹, CHCl₃); FTIR (KBr/cm⁻¹): (NH) 3130, 3320, (C=S)

1228, 850; HRMS (ESI) calcd para $C_{11}H_{21}N_3S$ 228.1456[M+H]⁺, encontrado: 228.1403; ¹H NMR (500.13 MHz, CDCl₃): 1.04 (3H, s), 1.16-1.85 (2H, m), 1.18-1.59 (2H, m), 1.21 (3H, s), 1.59 (2H, m), 1.70 (3H, s), 1.81 (1H, m), 2.99 (1H, m), 3.80 (m, 1H), 7.38 (1H, s), 7.98 (1H, s); ¹³C NMR (125.75 MHz, CDCl₃): 17.8, 23.3, 23.3, 23.4, 26.7, 34.4, 45.8, 47.9, 50.3, 65.8 e 180.7 (C=S).

O CCCP e o sulfato de PB foram adquiridos comercialmente (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA e Inlab, São Paulo, SP, Brasil, respectivamente).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As CIMs da PB, TSC e CCCP foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, usando *Mueller Hinton Broth* com ajuste de cátions (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA), segundo recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (10). Para interpretação do perfil de sensibilidade da PB foi utilizado o ponto de corte referente a colistina para *Enterobacterales* determinado pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (isolados com CIM ≤ 2 µg/ml foram categorizados como sensíveis, e aqueles com CIM >2 µg/ml como resistentes) (11). *Escherichia coli* ATCC 25922 foi empregada como controle, todas as determinações foram realizadas em triplicatas e repetidas em dias diferentes.

Determinação da ação combinada

A avaliação do efeito combinado da TSC ou CCCP com a PB foi realizada empregando a técnica de microdiluição em CAMHB, usando microplaca de 96 orifícios. A PB foi diluída seriadamente na razão 2, em concentrações variáveis, conforme a CIM de cada isolado. Em seguida, o composto a ser combinado (TSC ou CCCP) foi adicionado em cada poço em concentrações fixas (50, 25 e 10 µg/mL de TSC ou 12,5 µg/mL de CCCP). O inóculo bacteriano foi adicionado a cada orifício da microplaca na concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. A microplaca foi incubada a 35 ± 2 °C por 16 a 20 h. A PB diluída na mesma razão foi utilizada como controle. O efeito da ação combinada foi avaliado pelo fator de modulação (FM), sendo que $FM = (CIM \text{ da PB}) / (CIM \text{ da combinação PB + TSC ou CCCP})$. O efeito modulatório foi definido quando uma redução ≥ 4 na CIM da combinação de PB + TSC ou CCCP em relação a PB foi observada (12).

Ensaio de curva de tempo-morte

Para avaliar a atividade da combinação PB + TSC e PB + CCCP ao longo de 24 h um ensaio de curva de tempo de morte foi realizado para um isolado clínico (Kp1) de ERC PB-resistente como descrito por Siqueira et al., (13) com modificações. A PB foi testada na CIM para o isolado clínico (64 µg/ml) e na concentração subinibitória de 1 µg/mL associada a 100 e 50 µg/ml de TSC ou 12,5 µg/ml (1/4 da CIM) de CCCP. Os ensaios incluíram um controle de crescimento sem as substâncias. O inóculo bacteriano inicial utilizado foi de aproximadamente 10⁵ UFC/mL. Os tubos com crescimento bacteriano foram incubados em agitador rotatório contínuo (120 rpm). Alíquotas (0,1 mL) foram removidas a 0, 3, 6, 9, 12 e 24 h e diluídas em série em solução salina estéril para retirada da PB, TSC e CCCP e semeadas em ágar tripton de soja (TSA - Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) em triplicata para contagem de bactérias viáveis. O limite inferior de detecção foi de 50 UFC/mL. Os dados foram plotados como log₁₀ UFC/mL *versus* tempo (h) para cada ponto de tempo ao longo de 24 h.

Acúmulo de Brometo de Etídio

O ensaio de acúmulo de brometo de etídio (EtBr) para avaliar a inibição de bombas de efluxo foi realizado como descrito por Caleffi- Ferracioli et al. (14), com modificações. O isolado Kp1 (ERC PB-resistente) foi testado em uma DO₆₀₀ de 0,4 em uma placa escura de 96 poços. Cinquenta microlitros de TSC (1/5 CIM: 250 µg/mL) e 50 µL de EtBr (1/2 CIM: 25 µg/mL) foram adicionados aos poços contendo 100 µL de PBS e 100 µL da suspensão bacteriana. O CCCP (1/2 CIM: 31,25µg/mL) foi utilizado como controle. A fluorescência relativa foi determinada utilizando o *VICTOR Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA) a um comprimento de onda de 530/25nm (excitação) e 590/20 nm (emissão) a cada 1 minuto. A fluorescência relativa final (FRF) foi calculada utilizando a formula: FR-ensaio – FR-ref /FR-ref, na qual FR-ensaio representa a fluorescência obtida em 30 minutos com a substância testada e FR-ref a fluorescência em 30 minutos sem nenhuma substância.

Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

A avaliação *in silico* da absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) das substâncias testadas foi realizada empregando os softwares *Swiss ADME* e *Molinspiration*.

Resultados

A possibilidade da TSC ou do CCCP melhorar a atividade da PB foi avaliada frente a diferentes isolados clínicos de ERC PB-sensíveis e –resistentes. A distribuição das espécies bacterianas e o fenótipo dos 27 isolados testados estão descritos na tabela 1. A TSC apresentou fraca ação inibitória sobre os isolados de ERC estudados (CIM \geq 1250 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, a ação inibitória do CCCP foi moderada, com CIM variando de 31,2 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 1. Espécies bacterianas, perfil de sensibilidade, concentração inibitória mínima (CIM) da polimixina B (PB) e marcador de resistência para isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERCs).

| ERCs | Perfil de sensibilidade à PB | CIM PB ($\mu\text{g/mL}$) | Marcador de resistência |
|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | R | 4 | KPC |
| <i>Escherichia coli</i> | R | 4 | ND |
| <i>Escherichia coli</i> | R | 4 | ND |
| <i>Klebsiella aerogenes</i> | R | 8 | ND |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | 16 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | 32 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | 32 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | 32 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | 64 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | 64 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | 64 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | >64 | ND |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | 256 | NDM |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | 256 | KPC |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | R | 64 | KPC |
| <i>Escherichia coli</i> | S | 0,25 | NDM |
| <i>Escherichia coli</i> | S | 0,25 | KPC |
| <i>Escherichia coli</i> | S | 0,5 | NDM |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | S | 0,25 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | S | 0,25 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | S | 0,25 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | S | 0,25 | KPC |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | S | 0,25 | NDM |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | S | 0,5 | KPC |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | S | 0,25 | NDM |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | S | 0,25 | ND |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | S | 2 | ND |

R: resistente; S: sensível; ND: não determinado; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM: *New Delhi* metalobetalactamase.

Todos os isolados clínicos de ERCs PB-resistentes apresentaram reduções das CIMs quando a PMB foi associada às diferentes concentrações de TSC (Tabela 2). O FM confirmou que em todos os isolados clínicos PB-resistentes TSC na concentração de 50 µg/mL modulou a ação da PB (FM 4 a >64). Na concentração de 50, 25 e 10 µg/mL a TSC alterou a categoria de 86,7 %, 86,7 % e 33,3 % dos isolados de PB-resistentes para PB-sensíveis, respectivamente (Tabela 2). Apenas dois isolados que apresentavam CIMs de PB muito elevadas (> 128 µg/mL) não tiveram alteração de resistente para sensível quando 50 ou 25 µg/mL de TSC foram associadas a PB. Quando a PB foi associada a 10 µg/mL de TSC, apenas os isolados com CIMs superiores a 32 µg/mL não tiveram reduções para zona de sensível.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) da polimixina B (PB) associada ou não a diferentes concentrações (50, 25 e 10 µg/mL) de tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) e fator de modulação (FM) das diferentes concentrações de TSC sobre a PB em *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERCs) PB-resistentes.

| Concentração de TSC (µg/mL) | CIM Polimixina B (µg/mL) | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----------------------------|----|----|---|---|----|----|----|-----|-----|
| | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| | ERCs PB-Resistentes (n=15) | | | | | | | | | |
| 0 | | | | 3 | 1 | 1 | 3 | 4 | | 3 |
| 10 | | 2 | 3 | 4 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | |
| 25 | 3 | 6 | 4 | 1 | | | 1 | | | |
| 50 | 2 | 10 | 1 | 1 | | 1 | | | | |
| FM (TSC=50 µg/mL) | | | | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | >64 | |
| ERCs PB-R (n=15) | | | | 4 | 1 | 1 | 4 | 3 | 2 | |
| FM (TSC=25 µg/mL) | | | <4 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | >64 | |
| ERCs PB-R (n=15) | | | 3 | 1 | | 4 | 1 | 3 | 3 | |
| FM (TSC=10 µg/mL) | | | <4 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | >64 | |
| ERCs PB-R (n=15) | | | 5 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | | |

Entre os isolados clínicos de ERCs PB-sensíveis, apenas em um isolado (*Enterobacter cloacae* com CIM = 2 µg/mL), aconteceu a redução da CIM com FM = 4, nos demais a TSC não reduziu as CIMs da PB (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) e Fator de modulação (FM) da polimixina B (PB) em associação com tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) em *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERCs) PB-sensíveis.

| Concentração TSC ($\mu\text{g/mL}$) | CIM Polimixina B ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | | | | |
|---------------------------------------------|---------------------------------------|------|------|-----|---|---|---|---|----|----|
| | 0,06 | 0,12 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 |
| | ERCs PB-sensíveis (n=12) | | | | | | | | | |
| 0 | | | 9 | 2 | | 1 | | | | |
| 25 | | 2 | 8 | 2 | | | | | | |
| Variação do fator modulatório | | | | | | | | | <4 | 4 |
| ERCs PB-sensíveis (n=12) | | | | | | | | | 11 | 1 |

O CCCP também modulou a ação da PB (FM 8 a >64) nos isolados clínicos ERC PB-resistentes, reduzindo 4 x ou mais a CIM e não teve ação modulatória (FM <4) nos isolados ERC PB-sensíveis (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) e Fator de modulação (FM) da polimixina B (PB) associada ou não ao carbonilcianeto *m*-clorofenil hidrazona (CCCP) em enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERCs).

| Concentração CCCP ($\mu\text{g/mL}$) | CIM Polimixina B ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------|---------------------------------------|------|------|-----|---|---|----|---|----|----|----|-----|
| | 0,06 | 0,12 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | >64 |
| | ERCs (n=10) | | | | | | | | | | | |
| 0 | | | 1 | 1 | | 1 | | | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 12,5 | | | 5 | 5 | | | | | | | | |
| FM | | | | | | | <4 | 8 | 16 | 32 | 64 | >64 |
| ERCs (n=10) | | | | | | | 2 | 1 | | 1 | 2 | 4 |

A curva de tempo de morte (Figura 1) mostrou uma redução $>2\text{-log}_{10}$ no número de viáveis de um isolado clínico (Kp1) com CIM para a PB de 64 $\mu\text{g/mL}$ no tempo 3 h quando uma concentração subinibitória de PB (1 $\mu\text{g/mL}$) associada a TSC (100 $\mu\text{g/mL}$) foi empregada, porém esta redução não foi sustentada ao longo das 24 h. O mesmo padrão, mas com redução $<2\text{-log}_{10}$, ocorreu na associação de 1 $\mu\text{g/mL}$ de PB + 50 $\mu\text{g/mL}$ de TSC. Em relação a PB testada isoladamente na CIM para o isolado Kp1 (64 $\mu\text{g/mL}$), houve inicialmente uma diminuição $>3\text{-log}_{10}$ que também não se manteve ao longo das 24 h. A associação de PB em concentração subinibitória (1 $\mu\text{g/mL}$) com CCCP (12,5 $\mu\text{g/mL}$) inibiu o crescimento, mas sem significativa redução no número de viáveis do isolado Kp1 nos tempos avaliados.

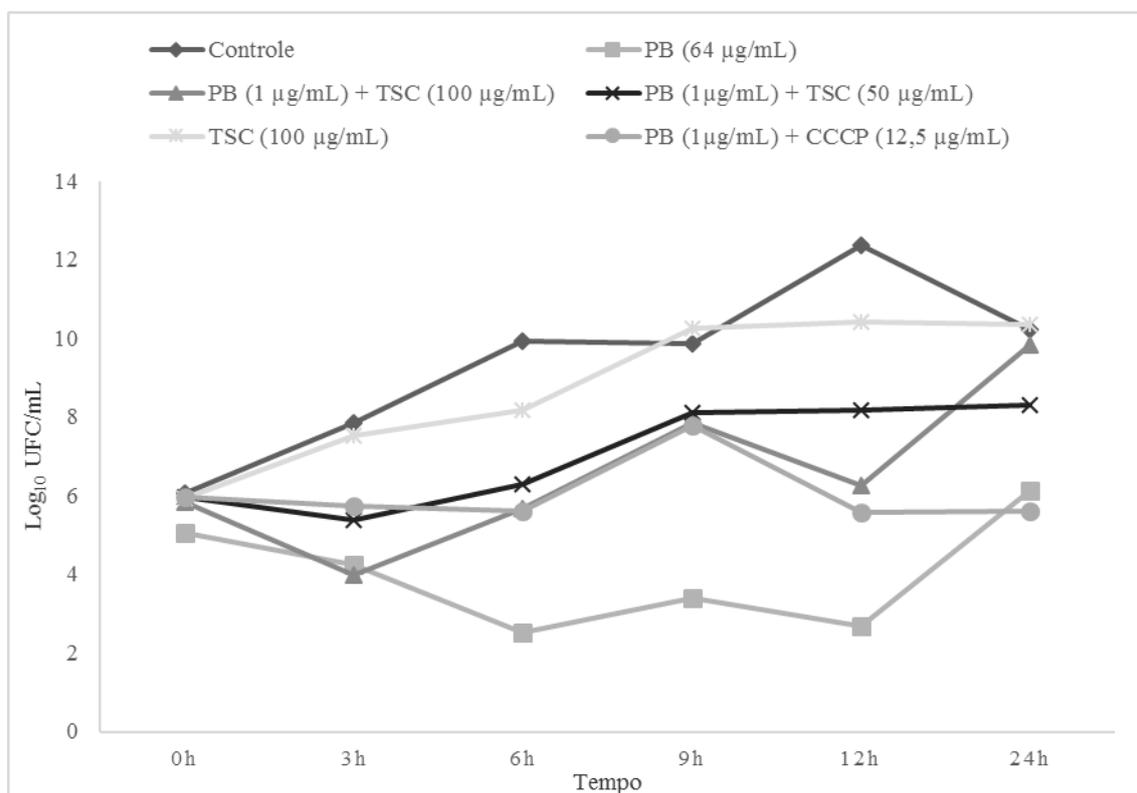


Figura 1. Curva de tempo de morte de isolado clínico (CIM de 64 µg/mL para polimixina B (PB), com as concentrações de polimixina B e Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) ou carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) associadas.

Analisando os resultados obtidos pelo estudo *in silico* (tabela 5), utilizando o *software Swiss ADME* foi possível observar que tanto a PB como a TSC não inibem as enzimas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6), porém o CCCP inibe a enzima CYP1A2. Em relação as 5 regras de Lipinski, a PB Viola 3 regras: peso molecular (PM) >500, acceptor de ligação de hidrogênio (HBA) >10, doadores de ligação de hidrogênio (HBD) >5, enquanto o CCCP e a TSC não violam nenhuma. A PB apresenta baixa absorção gastrointestinal, porém CCCP e TSC são altamente absorvidos pelo trato gastrointestinal.

Tabela 5. Parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) para as substâncias utilizadas.

| Substância | PM (g/mol) ^(a) | miLogP ^(a) | ASPT (Å ²) ^(a) | Permeabilidade da BHE ^(b) | HBA ^(b) | HBD ^(b) |
|------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|--------------------|
| PB | 1301,56 | -5,62 | 1203,5 | Não | 22 | 20 |
| CCCP | 204,62 | 3,46 | 71,97 | Sim | 3 | 1 |
| TSC | 227,38 | 1,71 | 50,08 | Não | 1 | 3 |

PM: Peso molecular; miLogP: coeficiente octanol-água logP; ASPT: área de superfície polar topológica; Permeabilidade BHE: permeabilidade da barreira hematoencefálica; HBA: Aceptores de ligação de hidrogênio; HBD: doadores de ligação de hidrogênio; ^(a): Molinspiration, ^(b): SwissADME;

Com os dados obtidos no ensaio de acúmulo de EtBr (figura 2) observamos que a TSC na concentração de 250 µg/mL não atuou como um inibidor de bomba de efluxo (IBE) no isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae*.

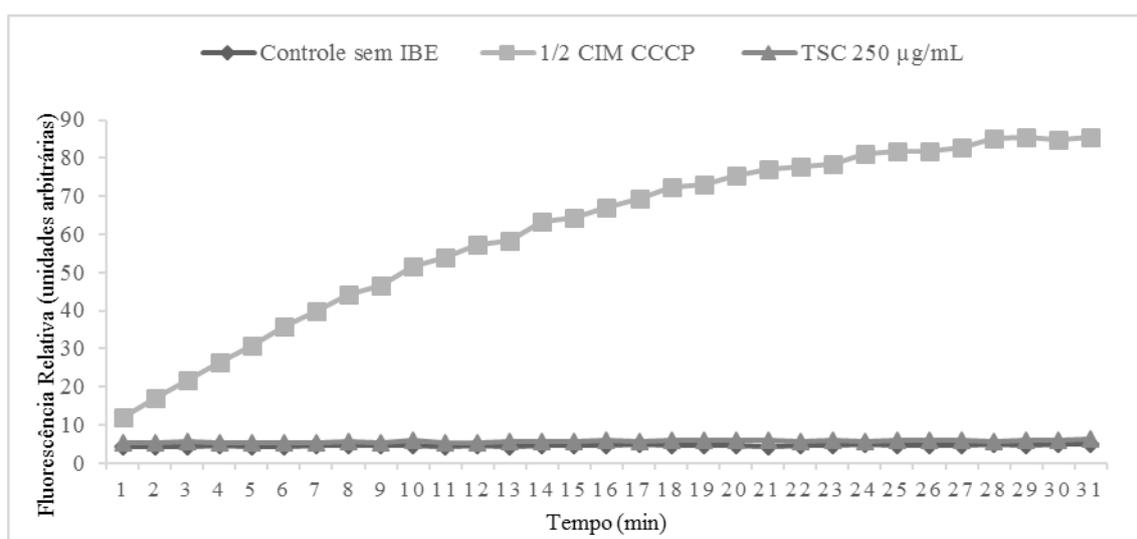


Figura 2. Acúmulo de brometo de etídio (EtBr) do isolado clínico de *K. pneumoniae* ERC PB-resistente, realizado com a presença e ausência de inibidor de bomba de efluxo (IBE).

Discussão

A polimixina B representa uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções por ERCs e sua utilização tem sido dificultada em decorrência de sua toxicidade e da emergência de isolados resistentes (15). Assim, a busca por novas

alternativas para o tratamento dessas infecções torna-se essencial para o sucesso terapêutico.

Como é de nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avalia a ação modulatória de TSC e CCCP sobre a PB em isolados de ERCs resistentes e sensíveis à PB. Nesse estudo, observamos que a TSC, uma substância caracterizada quimicamente e com ação antifúngica e antituberculosa descritas em estudos anteriores (6,16), se mostrou ativa para o resgate da atividade da PB contra ERCs. Observamos que além da TSC, o conhecido inibidor de bomba de efluxo, CCCP também foi capaz de diminuir as CIMs da PB para níveis dentro do limite definido de sensibilidade (11).

Bactérias Gram-negativas, como as *Enterobacteriaceae*, tornam-se resistentes a PB por diversos mecanismos. Embora bombas de efluxo sejam reportadas, modificações na estrutura da membrana externa bacteriana, em especial do lipopolissacarídeo (LPS), é o mecanismo mais comumente encontrado em isolados PB-resistentes. Essa modificação do LPS altera a carga da membrana bacteriana, tornando-a menos negativa, diminuindo a interação com agentes catiônicos, como as polimixinas (17).

Wentao et al. (2016), trabalhando com inibidores de bombas de efluxo (IBE) combinados com colistina, observaram reduções significativas nas CIMs deste antimicrobiano quando associado ao CCCP, em bactérias Gram-negativas, inclusive em *K. pneumoniae*. Embora os mecanismos envolvidos nessa alteração de susceptibilidade não sejam totalmente conhecidos, esses autores acreditam que o CCCP não tenha atuado como IBE, mas sim restaurando a carga negativa das bactérias pelo rompimento da força motriz do próton (9). Outros autores também observaram a ação do CCCP na diminuição das CIMs da colistina em bactérias Gram-negativas, mas estes sugerem a inibição de bombas de efluxo como o mecanismo de ação envolvido (18,19). No presente estudo o CCCP apresentou um importante efeito inibidor de bombas de efluxo, como detectado pelo ensaio de acúmulo de EtBr. Entretanto a diminuição da CIM da PB quando associada ao CCCP foi observada apenas nos isolados PB-resistentes, o que pode estar relacionado à alteração do LPS provavelmente presente nesses isolados.

Em nosso trabalho observamos que concentrações de 50 e 25 µg/mL de TSC foram capazes de resgatar a sensibilidade à PB na grande maioria dos isolados clínicos. Em apenas dois isolados, cujas CIMs para PB foram superiores a 128 µg/mL, foi observado uma redução significativa da CIM da PB pela TSC (FM ≥ 4), porém a

sensibilidade à PB não foi resgatada, o que pode ser consequência da somatória de mecanismos de resistência nesses isolados, uma maior alteração na carga da parede bacteriana ou até mesmo uma maior ativação de bombas de efluxo. Por outro lado, a TSC, assim como o CCCP, não foi capaz de reduzir significativamente a CIM dos isolados PB-sensíveis, ou seja, isolados sem prováveis alterações no LPS. A exceção foi um isolado de *Enterobacter cloacae* com CIM = 2 µg/mL, o qual apesar de ainda ser considerado sensível (11), apresentou uma CIM superior aos demais isolados sensíveis, podendo significar a existência de algum nível de alteração na carga da parede celular.

O ensaio de acúmulo de EtBr confirmou a atividade do CCCP como um IBE, mas descartou a possibilidade de a TSC atuar da mesma forma. Esse achado poderia reforçar a hipótese da ação da TSC como um possível modificador da carga da parede bacteriana, levando ao resgate da atividade da PB.

Apesar da importante ação do CCCP no resgate da atividade inibitória da PB em isolados resistentes, esta substância não pode ser usada na prática clínica devido a sua intrínseca citotoxicidade (9). O desenvolvimento de novas moléculas com ação semelhante ao CCCP e com potencial citotóxico reduzido poderiam ser utilizadas para o tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes. Nesse sentido, a TSC se mostra como um promissor adjuvante no tratamento de ERCs PB-resistentes.

No ensaio de curva de tempo de morte, nós observamos que a CIM de PB levou a uma redução superior a 2-log_{10} do número de células viáveis do isolado bacteriano testado. Entretanto, esse efeito não foi sustentado após a 12ª hora de exposição, o que pode ser devido à heterorresistência, ou seja, existência de subpopulações resistentes em uma população mais susceptível. A heterorresistência tem sido relatada após monoterapia com polimixinas (20). Outros autores trabalhando com polimixinas associadas ou não a diferentes antimicrobianos, em ensaio de curva de tempo de morte, observaram que em isolados resistentes, mesmo quando expostos a concentração superior a CIM, o efeito na diminuição de viáveis não foi sustentado ao longo das 24 horas (21,22).

Avaliações computacionais (*in silico*) podem fornecer informações importantes sobre algumas propriedades de moléculas candidatas a fármacos antes da realização de testes *in vivo* (23). Diversos parâmetros são analisados sendo a concordância com a regra dos cinco de Lipinski uma característica muito importante (24,25). A TSC e o CCCP não violam nenhuma das regras de Lipinski, porém o CCCP inibe a enzima

CYP1A2 do citocromo P450, tal enzima é responsável pela metabolização de diversos medicamentos (26) e inibidores da CYP-450, quando administrados concomitantemente, podem sofrer interferências resultando em alteração da atividade farmacológica (27). Além das características já mencionadas, a TSC e CCCP apresentam alta absorção gastrointestinal, enquanto a PB, um antimicrobiano já utilizado na clínica, apresenta baixa absorção gastrointestinal. Esta propriedade pode ser inferida a partir da área de superfície polar topológica (ASPT) que se correlaciona com o transporte molecular passivo pelas membranas (27).

Mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo pelo qual a TSC modula a atividade inibitória da PB em ERCs. Entretanto, considerando a baixa citotoxicidade da TSC (8) e atividade semelhante ao CCCP no resgate da ação da PB, esta substância constitui um fármaco promissor a ser utilizado como adjuvante no tratamento de infecções por ERCs PB-resistentes.

Referências

1. Sheu C-C, Chang Y-T, Lin S-Y, Chen Y-H, Hsueh P-R. Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An Update on Therapeutic Options. *Front Microbiol.* 2019;10:80.
2. Norgaard SM, Jensen CS, Aalestrup J, Vandembroucke-Grauls CMJE, de Boer MGJ, Pedersen AB. Choice of therapeutic interventions and outcomes for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative pathogens: a systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8:170.
3. Antibacterial agents in clinical development: an analysis, of the antibacterial clinical development pipeline including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017 (WHO/EMP/IAU/2017.12). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258965/1/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf?ua=14>.
4. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int [Internet].* 2015;2015. Available from: <https://doi.org/10.1155/2015/679109>
5. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. [Internet]. Vol. 47, *Brazilian Journal of Microbiology.* scielo; 2016. p. 31–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>.
6. Souza MRP, Coelho NP, Baldin VP, Scodro RBL, Cardoso RF, da Silva CC, et al. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. *Nat Prod Res.* 2018 May;1–6.
7. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4449–62.
8. Pitucha M, Woś M, Miazga-Karska M, Klimek K, Mirosław B, Pachuta-Stec A, et al. Synthesis, antibacterial and antiproliferative potential of some new 1-pyridinecarbonyl-4-substituted thiosemicarbazide derivatives. *Med Chem Res.* 2016;25(8):1666–77.
9. Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R, et al. Effects of Efflux Pump

- Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 May;60(5):3215–8.
10. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; 11th Edition. CLSI standard M07. Wayne, PA: USA, 2018.
 11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. Available from: <http://www.eucast.org>
 12. Caleffi-Ferracioli KR, Cardoso RF, de Souza JV, Murase LS, Canezin PH, Scodro RB, et al. Modulatory effects of verapamil in rifampicin activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol*. 2019 Feb;14:185–94.
 13. Siqueira VLD, Cardoso RF, Caleffi-Ferracioli KR, Scodro RB de L, Fernandez MA, Fiorini A, et al. Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jul;58(7):3957–67.
 14. Caleffi-Ferracioli KR, Amaral RCR, Demitto FO, Maltempe FG, Canezin PH, Scodro RBL, et al. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016 Mar;97:65–72.
 15. Velkov T, Roberts KD. Discovery of Novel Polymyxin-Like Antibiotics. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1145:343–62.
 16. Yamaguchi MU, Da Silva APB, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Da Silva CC, Nakamura CV. Effects of a thiosemicarbazide camphene derivative on *Trichophyton mentagrophytes*. *Molecules*. 2009;14(5):1796–807.
 17. Poirel L, Aurélie Jayol PN. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2017;30(2):557–96. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
 18. Park YK, Ko KS. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistin. *J Microbiol*. 2015 Jan;53(1):53–9.
 19. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*.

- 2010;54(1):177–83.
20. Bergen PJ, Smith NM, Bedard TB, Bulman ZP, Cha R, Tsuji BT. Rational Combinations of Polymyxins with Other Antibiotics. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:251-88.
 21. Sharma R, Patel S, Abboud C, Diep J, Ly NS, Pogue JM, et al. Polymyxin B in combination with meropenem against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: pharmacodynamics and morphological changes. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2017 Feb 23;49(2):224–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5786158/>
 22. Huang D, Yu B, Diep JK, Sharma R, Dudley M. *In Vitro* Assessment of Combined Polymyxin B and Minocycline Therapy against *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae*. 2017;61(7):1–9.
 23. Alqahtani S. *In silico* ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017 Nov;13(11):1147–58.
 24. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 2004 Dec;1(4):337–41.
 25. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Mar;46(1–3):3–26.
 26. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 Apr;25(4):193–200.
 27. Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem.* 2000 Oct;43(20):3714–7.

CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSÕES

O estudo realizado com a TSC e CCCP em associação à PB mostrou que:

- 1) A TSC em associação à polimixina B é promissora candidata à fármacos, com ação contra ERC PB-resistentes.
- 2) A combinação de TSC + PB diminuiu a CIM da PB em ERC PB-resistentes.
- 3) O CCCP associado a PB diminuiu a CIM da PB em ERC PB-resistentes.
- 4) Tanto o CCCP, como a TSC não foram capazes de reduzir as CIMs de ERC PB-sensíveis.
- 5) A TSC não foi capaz de atuar como IBE em um isolado clinico de ERC PB-resistente.
- 6) O CCCP atuou como um IBE em um isolado clinico de ERC PB-resistente.

3.2 PERSPECTIVAS

Frente aos promissores resultados obtidos, faz-se necessário estudos para o entendimento do mecanismo de ação da TSC na modulação da atividade da PB em ERCs PB-resistentes, empregando análises adicionais como: estudos de avaliação de bombas de efluxo, microscopia eletrônica de varredura e transmissão, estudos genômicos, proteômicos e transcriptômicos.