



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULATÓRIA DE TIMOL NA AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM ESPÉCIES DO COMPLEXO *Mycobacterium avium*

Renata Alexandre de Oliveira^{1*}, Giulienne Karla Pereira da Silva¹, Carolina Trevisolli Palomo¹, Letícia Sayuri Murase¹, Camile Yukari Okochi¹, Leticia Julia Faria², Juliano Hiroyuki Ito², Rosilene Fressatti Cardoso¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

*renataaleoliveiraa@gmail.com

Área Temática: Doenças infecciosas e parasitárias

Resumo

As micobactérias não tuberculosas (MNTs), são patógenos oportunistas com uma crescente relevância clínica, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Atualmente, o tratamento das infecções causadas por complexo *Mycobacterium avium* (MAC) envolve uma terapia combinada de múltiplos fármacos, como etambutol (EMB) e linezolida (LNZ), por exemplo. Porém a eficácia dessa terapia é limitada devido a facilidade com que espécies de MAC desenvolvem resistência e pelos efeitos colaterais dos medicamentos. Para contornar esse problema, a busca por novos fármacos e estratégias terapêuticas é uma necessidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade modulatória de timol (TIM) sobre a ação de antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por MAC. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em três linhagens de MAC pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay*. Os antimicrobianos EMB e LNZ foram utilizados como controle. TIM apresentou baixa atividade contra MAC com CIM 128 µg/mL, EMB 16 µg/mL e LNZ variou de 16 a 32 µg/mL. A atividade combinatória de TIM com EMB e LNZ foi avaliada com o ensaio "resazurin *drug combination microtiter assay*". TIM reduziu a CIM de EMB de 8 vezes e para LNZ de 8 a 32 vezes. Estudos com um número maior de linhagens de MAC são necessários para um melhor entendimento da interação entre TIM e EMB e LNZ de tratamento nesse complexo bacteriano.

Palavras-chave: Timol; antimicrobianos; complexo *Mycobacterium avium*.

Introdução

Micobactérias não tuberculosas (MNTs), são microrganismos ubíquos que habitam uma grande variedade de ambientes como sistemas de distribuição de água potável e solos (Fernandes *et al.*, 2022). Segundo Runyon, as MNTs são potencialmente patogênicas e oportunistas e podem ser classificadas de acordo com a velocidade de crescimento, em MNTs de crescimento rápido e lento (Runyon, 1959). Este último grupo é representado especialmente pelo complexo *Mycobacterium avium* (MAC), constituído principalmente por *M. avium* e *M. intracellulare* (Koh *et al.*, 2012) que são clinicamente relevante pela alta capacidade de causar doenças respiratórias, de forma nodular ou fibrocavitária. Atualmente, MAC é responsável pela maioria dos casos de infecção pulmonar por MNT no mundo (To *et al.*, 2020). O tratamento padrão inclui terapia combinada com múltiplos fármacos (Ministério da Saúde, 2021). Contudo, a taxa de sucesso terapêutico relatada é de apenas 50-55%, devido à duração longa do tratamento, a alta citotoxicidade e custo elevado do tratamento, além da tendência à resistência



intrínseca de MAC ou propensão ao desenvolvimento de resistência durante o tratamento (Busatto *et al.*, 2019). MAC destaca-se por causar infecção principalmente em pacientes imunocomprometidos, com doença crônica subjacente como fibrose cística (Griffith *et al.*, 2021) ou que fazem uso de medicamentos imunossupressores como corticosteróides (Kaczmarkowska *et al.*, 2022), além da capacidade já elucidada de formar biofilmes (Weathered *et al.*, 2022), uma forma persistente de sobrevivência em ambientes hostis à bactéria. Com o aumento de infecções por MAC e a frequência de resistência aos fármacos usados no tratamento, a pesquisa de compostos naturais como alternativa terapêutica para o tratamento de micobacterioses é imperiosa. O timol (TIM) é uma substância encontrada em plantas da família *Lamiaceae*, e tem como seu principal representante o tomilho. Óleos essenciais com TIM vem sendo usado há muito tempo devido suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cicatrizantes, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, dentre outras (Kachur; Suntres, 2020). Apesar de resultados promissores terem sido encontrados em estudos prévios, a atividade de TIM no combate à MAC ainda não foi completamente elucidada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade modulatória de TIM sobre antimicrobianos utilizados contra espécies de MAC.

Materiais e métodos

Linhagens de micobactérias do complexo *Mycobacterium avium* pertencentes à micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica (LEPAC-UEM) foram reativadas em meio de cultura Lowenstein-Jensen e transferidas para crescimento em meio líquido Mueller Hinton Broth (MHB) a 35 °C por 5–7 dias. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de TIM, etambutol (EMB) e linezolida (LNZ) para cada linhagem foi determinada pelo método *resazurin broth microdilution assay* (REBMA), de acordo com Castilho *et al.* (2015). As concentrações utilizadas para cada fármaco variaram de 0,5-128 µg/mL para EMB e LNZ e de 2-512 µg/mL para TIM. O inóculo micobacteriano foi padronizado utilizando escala de McFarland 0,5, diluído 1:200 e semeado (100 µL) nos orifícios das microplacas contendo as diluições dos fármacos e de TIM. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 5 dias. Após incubação, 30 µL de resazurina 0,01% foram adicionados aos orifícios e as microplacas reincubadas por mais 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração de EMB ou LNZ ou TIM capaz de inibir o crescimento micobacteriano, caracterizado pela mudança de cor da resazurina de azul para róseo. Controles de esterilidade e crescimento micobacteriano foram incorporados aos experimentos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A interação entre TIM e EMB bem como TIM e LNZ foi avaliada pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (CALEFFI-FERRACIOLI *et al.*, 2013). As microplacas foram preparadas com diluições seriada na razão 2 para EMB (0,5-128 µg/mL, no eixo X) com TIM (2-512 µg/mL, no eixo Y), e LNZ (0,5-128 µg/mL, no eixo X) com TIM (2-512 µg/mL, no eixo Y). Após, 100 µL da suspensão micobacteriana em concentração ajustada com escala McFarland 0,5 e diluída 1:200 foi adicionada em cada orifício da microplaca. As microplacas foram incubadas por 5 dias a 35 °C. Após esse período, 30 µL de resazurina 0,01% foram adicionados aos orifícios das microplacas, contendo as combinações de fármacos e TIM, e incubadas novamente a 35 °C por 24 h. A mudança de cor de azul para rosa indicou redução da resazurina e, portanto, presença de crescimento bacteriano. O efeito de TIM sobre a atividade de EMB e LNZ em MAC foi determinado pelo fator de modulação (FM), onde FM =



CIM_{antimicrobiano}/ CIM_{combinação}-FM reflete a redução de valores da CIM dos fármacos na presença de TIM. Resultados significativos foram considerados, quando FM $\geq$ 4 (Coelho *et al.*, 2015). Controles de esterilidade e de crescimento micobacteriano foram incorporados a todos os experimentos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados e discussão

TIM apresentou CIM 128 $\mu\text{g/mL}$, EMB 16 $\mu\text{g/mL}$ e LNZ variou de 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$ entre as linhagens de MAC. TIM isoladamente não apresentou atividade antimicobacteriana, porém resultados significativos foram observados nas combinações de TIM com os fármacos. Nas linhagens de MAC na coleção testada, TIM reduziu a CIM de EMB 8 vezes e para LNZ de 8 a 32 vezes (Tabela 1). O perfil de resistência de MAC da coleção selecionada apresentam resistência a LNZ (*M. avium* 1 e 2) e valor intermediário (*M. intracellulare*). De acordo com o CLSI (2011; 2018) esse valor intermediário no teste de susceptibilidade ao macrolídeo LNZ pode indicar resistência emergente a este fármaco, em MAC. Em relação ao EMB, Todas as linhagens de MAC apresentaram CIM alta (16 $\mu\text{g/mL}$) e a adição de TIM foi capaz de reduzir esse valor de CIM para 2. Informações adicionais com maior número de linhagens bem como relacionadas à presença de mutações em genes-alvos, relacionadas com o mecanismo de ação de LNZ e EMB serão de grande relevância para determinar o efeito de TIM na redução da CIM destes dois fármacos em linhagens de MAC.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima e atividade combinatória de Linezolida e Etambutol com Timol em bactérias do Complexo *Mycobacterium avium*.

Espécie	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)				FM		
	TIM	EMB	LNZ	TIM+EM		TIM+E	TIM+L
				B	NZ	MB	NZ
<i>Mycobacterium avium</i> 1	128	16	32	2	4	8	8
<i>Mycobacterium avium</i> 2	128	16	32	2	1	8	32
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	128	16	16	2	1	8	16

TIM: timol; EMB:etambutol; LNZ: linezolida; FM: fator de modulação.

Conclusões

As linhagens de MAC estudadas apresentaram diferentes níveis de suscetibilidade aos fármacos selecionados para este estudo, LNZ e EMB. Embora a CIM de TIM foi alta, o mesmo reduziu a CIM de LNZ e EMB nas linhagens MAC. Essa ação de TIM indica um possível potencial de TIM como um adjuvante no tratamento de infecções causadas por MAC. Para obter um panorama mais representativo da combinação de TIM com EMB e LNZ, um estudo com um maior número de isolados clínicos e com perfis de resistência diferentes e determinado por sequenciamento, se faz necessário.

Referências

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, *Nocardia* spp., and other aerobic actinomycetes. 2nd ed. **CLSI standard document M24-A2**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011;2018.



BUSATTO, C. *et al.* *Mycobacterium avium*: an overview. **Tuberculosis**. Churchill Livingstone, 1 jan. 2019.

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. *et al.* Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 660–663, nov. 2013.

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.

COELHO, Tatiane *et al.* Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 330, 2015.

FERNANDES, Camilo *et al.* Infecções por micobactérias não tuberculosas do Hospital Nereu Ramos, centro de referência em MNT em Santa Catarina. 2022.

GRIFFITH, David E.; AKSAMIT, Timothy R. Managing *Mycobacterium avium* complex lung disease with a little help from my friend. **Chest**, v. 159, n. 4, p. 1372-1381, 2021.

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Bellwether Publishing, Ltd., , 10 out. 2020.

KACZMARKOWSKA, Aleksandra *et al.* The *Mycobacterium avium* complex-an underestimated threat to humans and animals. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 29, n. 1, p. 22-27, 2022.

KOH, W. J. *et al.* Clinical significance of the differentiation between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in *M avium* complex lung disease. **Chest**, v. 142, n. 6, p. 1482–1488, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações para o diagnóstico e tratamento das doenças causadas por micobactérias não tuberculosas no Brasil. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2021

RUNYON, Ernest H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Medical Clinics of North America**, 1959.

TO, K. *et al.* General overview of nontuberculous mycobacteria opportunistic pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*. **Journal of Clinical Medicine**. MDPI, 2020.

WEATHERED, Catherine *et al.* The role of biofilms, bacterial phenotypes, and innate immune response in *Mycobacterium avium* colonization to infection. **Journal of Theoretical Biology**, v. 534, p. 110949, 2022.