



## AVALIAÇÃO DO TEMPO DE MORTE DE *Mycobacterium abscessus* EXPOSTO À CLARITROMICINA EM COMBINAÇÃO COM PIPERINA

Carolina Trevisolli Palomo<sup>1\*</sup>, Letícia Sayuri Murase<sup>1</sup>, Renata Alexandre de Oliveira<sup>1</sup>, Giulienne Karla Pereira da Silva<sup>1</sup>, Gabriella Letícia Bonone<sup>1</sup>, Jean Eduardo Meneguello<sup>1</sup>, Juliano Hiroyuki Ito<sup>1</sup>, Natan Nascimento<sup>1</sup>, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli<sup>1</sup>, Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>1</sup>, Rosilene Fressatti Cardoso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, Brasil.

\*[trevisollicarolina@gmail.com](mailto:trevisollicarolina@gmail.com)

**Área Temática:** Doenças infecciosas e parasitárias

### Resumo

Dentre as principais espécies de MNTs de crescimento rápido (RGM) causadoras de micobacterioses estão as pertencentes ao Complexo *Mycobacterium abscessus* (MAB), que são capazes de causar infecções, principalmente pulmonares, mas também sistêmicas e disseminadas. A claritromicina (CLR) ainda é umas das opções terapêuticas mais utilizadas, porém, algumas espécies possuem genes de resistência a esse fármaco. Por isso, sua administração deve ser feita em combinação com outros fármacos durante o tratamento, a fim de atingir e prevenir o surgimento de bacilos resistentes. A piperina (PIP) é um composto alcaloide extraído da pimenta já descrito com diversas atividades biológicas e promissoras contra diversas espécies de micobactérias, sua utilização em conjunto para melhorar a atividade de fármacos pode ser a chave para o reposicionamento deles, principalmente em casos que já apresentam resistência dos bacilos. Por isso, determinamos o tempo de morte de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977 quando exposto a CLR em diferentes concentrações e CLR em combinação com PIP. Quando exposto a concentrações subinibitórias de CLR combinadas com PIP há uma pausa no crescimento em comparação com o observado na exposição pela concentração inibitória mínima de CLR, que apresentou um crescimento gradual a partir das 24 horas de exposição. Entretanto, observou-se um platô na atividade bacteriostática de CLR em altas concentrações, que se manteve semelhante na combinação com PIP durante as 96 horas de exposição. Dessa forma, foi observado que a atividade bacteriostática das concentrações subinibitórias de CLR foi expandida quando combinada com PIP durante as 96 horas analisadas no ensaio de curva de morte.

**Palavras-chave:** Claritromicina; Piperina; *Mycobacterium abscessus*.

### Introdução

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) são classificadas de acordo com o seu crescimento, sendo rápido (RGM) ou lento. Dentre as principais causadoras de micobacterioses, podemos destacar *Mycobacterium abscessus*, uma espécie patogênica de crescimento rápido responsável pela maioria das infecções pulmonares isoladas comumente em pacientes acometidos com fibrose cística (To *et al.*, 2020). O tratamento das micobacterioses é de acordo com a espécie envolvida e a sua suscetibilidade aos fármacos, sendo poliquimioterápico. A claritromicina (CLR) está dentre as principais opções terapêuticas, porém, espécies pertencentes ao MAB podem apresentar resistência constitutiva ou induzível à CLR, pela presença dos genes *rrl* e *erm*, respectivamente (Portell-Buj *et al.*, 2021). Uma terapêutica com



eficácia limitada é a realidade quando pensamos em MNTs, principalmente no caso dos macrolídeos frente às RGMs. Por isso, sua administração deve ser feita em combinação com outros fármacos durante o tratamento, a fim de atingir e prevenir o surgimento de bacilos resistentes (Nasiri *et al.*, 2017 e Takei *et al.*, 2020). A piperina (PIP) é um composto alcaloide extraído da pimenta preta (*Piper nigrum*) e pimenta longa (*Piper longum*) já descrito com diversas atividades biológicas, dentre elas, antibacteriana e imunomoduladora. Possui sinergismo descrito com RIF contra isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* e MNTs de crescimento lento e rápido (Murase; De Souza; *et al.*, 2023). O papel adjuvante de PIP com fármacos já utilizados nos tratamentos contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* e outras espécies de MNTs já foi demonstrado e possui resultados promissores (Murase; De Souza; *et al.*, 2023). Com a intenção de melhorar a ação dos fármacos da terapêutica, a utilização em conjunto com um composto que melhora a atividade deles pode ser a chave para o seu reposicionamento, principalmente em casos que já apresentam resistência dos bacilos. Dessa forma, o presente estudo determinou o tempo de morte de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977 quando exposto a CLR em diferentes concentrações e CLR em combinação com PIP.

## Materiais e métodos

### *Cepa padrão e medicamentos*

*M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977 foi descongelada da coleção de micobactérias do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. O estudo está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número AB486FE. Foi primeiramente cultivada em caldo Mueller Hinton cátions ajustados (Difco Laboratories, Detroit, EUA) (MHBCa) e incubada por 3 dias a 30 °C. PIP (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e CLR (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram dissolvidos e diluídos, de acordo com as instruções do fabricante, em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a uma concentração de 10000 µg/ml e armazenados a -20 °C até à utilização.

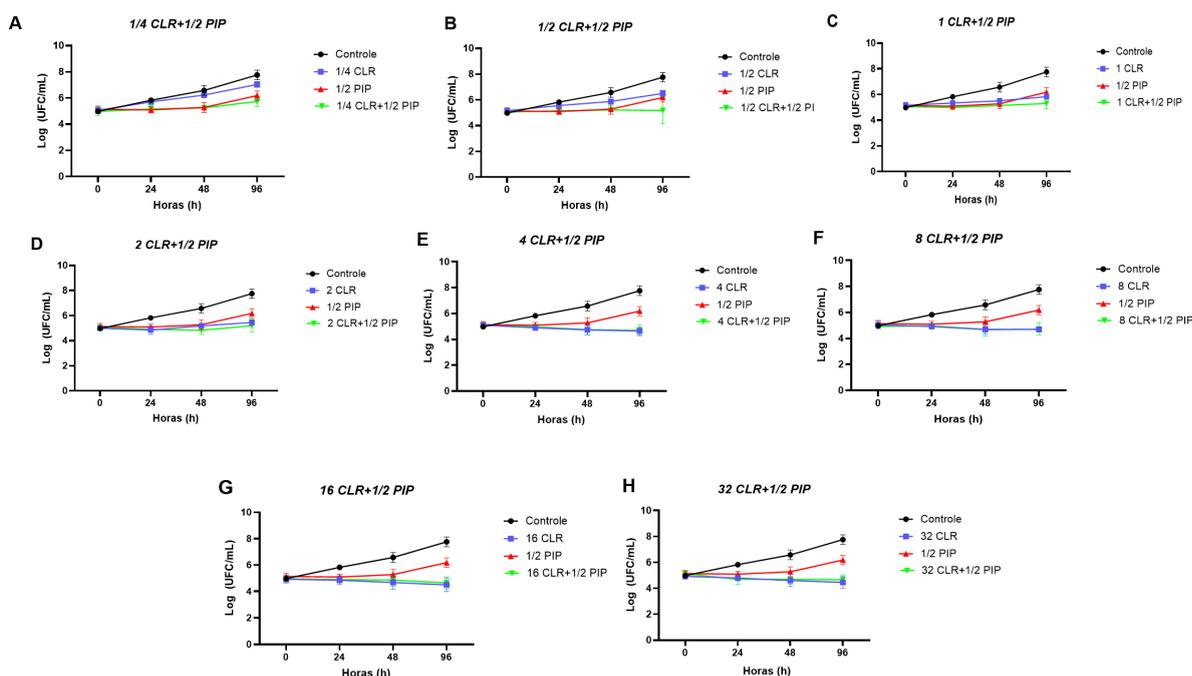
### *Curva de morte de M. abscessus subsp. abscessus ATCC 19977 exposto a claritromicina e piperina*

A curva de morte foi realizada de acordo com Wetzstein *et al.* (2022) e Zhang *et al.* (2020) com modificações, avaliando diferentes concentrações de CLR e PIP frente a *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977. Cinquenta microlitros do inóculo bacteriano padronizado por escala McFarland 0,5 foi adicionado em meio de cultura CaMHB contendo CLR em várias concentrações, sendo 1/4, 1/2, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 x CIM), PIP (1/2 x CIM), e CLR em combinação com PIP nas mesmas concentrações citadas anteriormente, em um volume total de 20 mL, mantidos em rotação de 120 rpm a 30°C por 96 h. Um controle de crescimento sem a presença de CLR e PIP foi incluído no experimento. Alíquotas (0, 1 mL) foram retiradas nos tempos de 0, 24, 48 e 96 horas de exposição e diluídas seriadamente em uma solução estéril de PBS para posteriormente serem semeados 10 µL de cada diluição em meio de cultura Middlebrook 7H11 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com OADC (BD™BD BBL™ Middlebrook OADC, USA). As placas utilizadas para a semeadura foram incubadas a 30 °C por 7 dias e após esse período foi realizada a contagem de colônias. Os experimentos foram realizados em triplicatas e análises estatísticas foram aplicadas para interpretação dos resultados.



## Resultados e discussão

A Figura 1 mostra o ensaio de curva de morte de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977 exposto a diferentes concentrações de CLR e em combinação com uma concentração fixa de PIP (1/2 x CIM). Em concentrações subinibitórias de CLR combinadas com PIP (Figura 1A e 1B), há uma pausa no crescimento em comparação com o observado na exposição pela concentração inibitória mínima de CLR, que apresentou um crescimento gradual a partir das 24 horas de exposição (Figura 1C). Observou-se um platô na atividade bacteriostática de CLR em altas concentrações, que se manteve semelhante na combinação com PIP durante as 96 horas de exposição (Figura 1E, 1F, 1G e 1H). Ferro *et al.* avaliaram a atividade da CLR contra a cepa padrão de *M. abscessus* CIP 104536, encontrando resultados semelhantes aos nossos com as mesmas concentrações do antimicrobiano, não tendo sido observada morte significativa dos bacilos (Ferro *et al.*, 2015). Durante nossa exposição de 96 horas, não houve retorno do crescimento bacteriano com o tratamento em altas concentrações, porém, em baixas concentrações (1/4, 1/2, 1 e 2 x CIM) esse retorno foi observado a partir de 24 horas de exposição, o que corrobora os achados de Schildkraut *et al.* que expuseram *M. abscessus* subsp. *abscessus* CIP 104536 à CLR 1 x CIM e observaram uma redução mínima no crescimento bacteriano no terceiro dia de exposição à droga e um retorno do crescimento bacilar do 4º ao 14º dia avaliado (Schildkraut *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Curva de morte de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977. **A, B, C e D:** Exposição a diferentes concentrações baixas de CLR e a uma combinação com concentração fixa de PIP; **E, F, G e H:** Exposição a diferentes concentrações elevadas de CLR e a uma combinação com concentração fixa de PIP.

CLR: Claritromicina; PIP: Piperina; UFC: Unidades formadoras de colônias.

## Conclusões

A atividade bacteriostática das concentrações subinibitórias de CLR foi expandida quando combinada com PIP durante as 96 horas analisadas durante o ensaio de curva de morte.



## Agradecimentos

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

## Referências

- FERRO, B. E.; VAN INGEN, J.; WATTENBERG, M.; VAN SOOLINGEN, D.; MOUTON, J. W. Time-kill kinetics of antibiotics active against rapidly growing mycobacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 811–817, 2015. Oxford University Press.
- MUKHERJEE, D.; WU, M.-L.; TEO, J. W. P.; DICK, T. Vancomycin and Clarithromycin Show Synergy against *Mycobacterium abscessus* *In Vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AAC>>.
- MURASE, L. S.; VÍTOR PEREZ DE SOUZA, J.; MENEGUELLO, J. E.; *et al.* Possible Binding of Piperine in *Mycobacterium tuberculosis* RNA Polymerase and Rifampin Synergism. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2019.
- NASIRI, M. J.; HAEILI, M.; GHAZI, M.; *et al.* New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria. **Frontiers in Microbiology**, 25. abr. 2017.
- PORTELL-BUJ, E.; BONET-ROSSINYOL, Q.; LÓPEZ-GAVÍN, A.; *et al.* Comparison of two-drug combinations, amikacin/tigecycline/imipenem and mikacin/tigecycline /clarithromycin against *Mycobacteroides abscessus* *subsp. abscessus* using the *in vitro* time-kill assay. **Journal of Antibiotics**, v. 74, n. 4, p. 285–290, 2021.
- SCHILDKRAUT, J. A.; PENNING, L. J.; RUTH, M. M.; *et al.* The differential effect of clarithromycin and azithromycin on induction of macrolide resistance in *Mycobacterium abscessus*. **Future Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 749–755, 2019.
- TAKEI, S.; IHARA, H.; TOGO, S.; *et al.* The synergetic effect of Imipenem-clarithromycin combination in the *Mycobacteroides abscessus* complex. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, 2020.
- TO, K.; CAO, R.; YEGIAZARYAN, A.; OWENS, J.; VENKETARAMAN, V. General overview of nontuberculous mycobacteria opportunistic pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*. **Journal of Clinical Medicine**, 2020.
- WETZSTEIN, N.; WICHELHAUS, T. A. Phenotypic drug susceptibility testing of rapid growing mycobacteria and the issue of antibiotic stability. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 102, n. 1, 2022.
- ZHANG, S.; ZOU, Y.; GUO, Q.; *et al.* AR-12 exhibits direct and host-targeted antibacterial activity toward *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 8, 2020.