



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Avaliação de tetrahidropiridinas como antimicrobianos e inibidores do mecanismo de efluxo em *Mycobacterium abscessus*

Dienefer Venske Bierhals

Ivy Bastos Ramis

Pedro Eduardo Almeida da Silva

Monografia apresentada como requisito da Disciplina de Trabalho de Graduação II - 15125 - do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Outubro/2016

1 **AGRADECIMENTOS**

2

3 Primeiramente agradeço a Deus, é a ele que todas as noites peço para que me guiar nas
4 fazer as escolhas certas, e agradeço pelas pessoas maravilhosas que tem colocado no
5 meu caminho!

6

7 À minha amada JUBOP, a qual tentei conciliar a presidência e o TCC, espero que tenho
8 conseguido exercer as duas atividades da maneira certa. Foi ao lado de vocês que cada
9 sábado encontrei abrigo e amizades verdadeiras, que me alegravam até nos momentos
10 mais complicados. Obrigada por cada lanche no Bierhals hein galera!!

11

12 Aos meus pais Simone e Claudinei, aos quais devo pedir desculpas pelos surtos,
13 choradeiras pré e pós provas, brigas enquanto estava estressada com toda loucura da
14 tensão do TCC. Enfim, mil desculpas!! E também ao meu irmão Natanael e a keke,
15 mesmo brigando vocês foram fundamentais nessa caminhada.

16

17 Ao meu alemãozinho Vinícius, pela parceria nas noites de estudo (enquanto eu estudava
18 tu jogava Play, mas ta valendo mesmo assim). Eu te amo pestinha!!

19

20 Ao meu namorado Michel, por todo o apoio e puxões de orelha que foram fundamentais
21 durante essa reta final. TE AMO

22

23 Aos meus avós Hilberto, Cleide e Arminda, por todo o carinho e preocupação, efim a
24 toda a minha família!!

25

26 Ao Professor Pedro, meu orientador, pela oportunidade, confiança e cada ensinamento.
27 Desculpa pelos erros cometidos, os puxões de orelha foram muito válidos para o meu
28 crescimento profissional.

29

30 À banca, Pri e Júlia, que gentilmente aceitaram o convite. Obrigada por acrescentarem
31 na minha formação.

32

33 À minha co-orientadora Ivy, pela mega paciência e dedicação ao me passar um pouco
34 do seu conhecimento prático e teórico, os quais foram fundamentais para que juntas
35 pudéssemos realizar este trabalho.

36

37 À Dani, pela ajuda e apoio em todos os momentos enquanto desenvolvia este trabalho,
38 vou ser eternamente grata por tudo.

39

40 Não posso esquecer que agradecer a todos os integrantes do Nupemm (não vou citar
41 nomes para não esquecer de ninguém), cada um com seu jeitinho certamente foi mega
42 influenciador no meu crescimento como profissional, obrigada por aguentarem meus
43 surtos e nervosismos, vocês sempre tinham as palavras certas para me acalmar.

44

45 Óbvio que tinha que ter um parágrafo só dela né, Jaciara minha linda. Com seu jeitinho
46 mineirinho, toda carismática foi me cativando e me fazendo crescer principalmente
47 como pessoa. Saudades tua, queria que estivesse presente, mas tenho certeza que estas
48 ai orando e torcendo por mim.

49

1 Especialmente quero agradecer a Isis, Paulinha, Jenifer e Lucas. Amizades que
2 iniciaram na primeira semana de aula e que com certeza se estenderá para toda vida.
3 Obrigada por me aguentar, amo vocês.
4
5 Enfim toda ATBio2016, está chegando a hora, vamos copar tuuudo galera. Rumo a
6 formatura!!!

1	SUMÁRIO	
2	LISTA DE ABREVIATURAS	5
3	LISTA DE FIGURAS	6
4	RESUMO	8
5	ABSTRACT	9
6	INTRODUÇÃO	10
7	Objetivo Geral	16
8	Objetivos específicos	16
9	ARTIGO CIENTÍFICO	17
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
11	REFERÊNCIAS	36

- 1 **LISTA DE ABREVIATURAS**
- 2 **ABC** *ATP-binding cassette*
- 3 **AMI** Amicacina
- 4 **ATCC** *American Type Culture Collection*
- 5 **ATP** Adenosina trifosfato
- 6 **CCCP** Cianeto de carbonila m-clorofenil-hidrazona
- 7 **CIPRO** Ciprofloxacina
- 8 **CLA** Claritromicina
- 9 **CLSI** *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- 10 **CMI** Concentração mínima inibitória
- 11 **CPZ** Clorpromazina
- 12 **erm (41)** *Erythromycin ribosome metilase*
- 13 **FM** Fator modulatório
- 14 **MATE** *Multidrug and Toxic Compounds Extrusion*
- 15 **MCL** Micobactérias de crescimento lento
- 16 **MCR** Micobactérias de crescimento rápido
- 17 **MDR** Múltiplas drogas resistente
- 18 **MFS** *Major Facilitator Superfamily*
- 19 **MNT** Micobactérias não tuberculosas
- 20 **RND** *Resistance-nodulation-division*
- 21 **RSP** Reserpina
- 22 **SIDA** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- 23 **SMR** *Smal lMultidrug Resistance*
- 24 **SULFA/TRI** Sulfametoxazol/Trimetropim
- 25 **VERA** Verapamil

1 LISTA DE FIGURAS

2

3 **Figura 1.** Evolução da descrição das subspécies de *M. abscessus*..... 114 **Figura 2.** Figura demonstrativa da classificação das famílias de bomba de efluxo..... 135 **Figura 3.** Estrutura química dos compostos

6 tetrahidropiridínicos..... 23

1 **LISTA DE TABELAS**

2 **Tabela 1.** Concentrações iniciais dos antimicrobianos e inibidores..... 20

3 **Tabela 2.** Resultados das concentrações mínimas inibitórias aos antimicrobianos e
4 moléculas Tetrahidropiridínicas testadas..... 22

5 **Tabela 3.** Resultados do Efeito Modulatório para *M. abscessus* ATCC (19977)..... 23

6 **Tabela 4.** Resultados do Efeito Modulatório para *M. abscessus* subsp. *abscessus*
7 T07/0415..... 24-25

8 **Tabela 5.** Resultados do Efeito Modulatório para *M. abscessus* subsp. *bolletii*
9 AT46/0415..... 25

10 **Tabela 6.** Resultados do Efeito Modulatório para *M. abscessus* subsp. *bolletii*
11 AT52/0415..... 26

1 TÍTULO: Avaliação de tetrahidropiridinas como antimicrobianos e inibidores do
2 mecanismo de efluxo em *Mycobacterium abscessus*

3
4 **RESUMO**

5 As Micobactérias Não-Tuberculosas (MNTs) são microrganismos ubíquos,
6 envolvidos em infecções superficiais ou sistêmicas. Uma das mais frequentes MNTs
7 isoladas em surtos de infecções hospitalares ou em pacientes imunocomprometidos,
8 com fibrose cística por exemplo, é o *Mycobacterium abscessus*, que apresenta
9 resistência intrínseca frente aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de
10 doenças infecciosas. Um dos mecanismos envolvidos nesta resistência é a extrusão dos
11 antimicrobianos mediada por bombas de efluxo. Atualmente, a partir de compostos
12 naturais e sintéticos, algumas substâncias inibidoras deste mecanismo tem sido
13 investigada como adjuvantes no tratamento de infecções causadas pelo *M. abscessus*.
14 Com isso esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de oito tetrahidropiridinas
15 como antimicrobiano e inibidoras do mecanismo de efluxo, frente as cepas de *M.*
16 *abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC 19977), *M. abscessus* subsp. *abscessus* (AT
17 07/0415), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (AT 46/0415) e *M. abscessus* subsp. *bolletii* (AT
18 52/0415). Interessantemente, apenas um dos compostos tetrahidropiridínicos avaliados,
19 NUNL 2, apresentou atividade antimicobacteriana frente as micobactérias citadas
20 acima, em concentrações de 200, 100, 100 e 50µg/mL respectivamente. Além disso, este
21 composto apresentou-se como um bom candidato a adjuvante aos antimicrobianos
22 testados, devido a atividade inibidora de efluxo identificada. O fato de apenas um dos
23 compostos testados apresentar atividade antimicobacteriana e inibitória do efluxo, pode
24 estar relacionado a presença da natureza dos substituintes na posição da prirdina, onde é
25 possível destacar os substiruintes da posição 1 e 6. Estudos biotecnológicos de relação
26 estrutura atividade poderão elucidar quais as modificações deste composto, em relação
27 aos demais, poderia ser responsável pelas atividades observadas.

28 Palavras-chave: resistência, micobactéria, moléculas sintéticas

1 Title: Tetrahydropyrimidines assessment as antimicrobial agents and inhibitors of efflux
2 mechanism in *Mycobacterium abscessus*

3 **ABSTRACT**

4 Non-tuberculous mycobacteria (NTMs) are ubiquitous microorganisms involved
5 in superficial or systemic infections. One of the most frequent MNTs isolated in
6 outbreaks of hospital infections or in immunocompromised patients with cystic fibrosis
7 for example is *Mycobacterium abscessus*, which presents intrinsic resistance to
8 antimicrobials commonly used in the treatment of infectious diseases. One of the
9 mechanisms involved in this resistance is the extrusion of antimicrobials mediated by
10 efflux pumps. Currently, from natural and synthetic compounds, some substances
11 inhibiting this mechanism have been investigated as adjuvants in the treatment of
12 infections caused by *M. abscessus*. The objective of this work was to evaluate the
13 activity of eight tetrahydropyridines as antimicrobial and inhibitors of the efflux
14 mechanism, against the strains of *M. abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC 19977), *M.*
15 *abscessus* subsp. *abscessus* (AT 07/0415), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (AT 46/0415)
16 and *M. abscessus* subsp. *bolleiti* (AT 52/0415). Interestingly, only one of the
17 tetrahydropyridine compounds evaluated, NUNL 2, presented antimycobacterial activity
18 against the above-mentioned mycobacteria at concentrations of 200, 100, 100 and 50
19 µg/mL, respectively. In addition, this compound was shown to be a good adjuvant
20 candidate to the antimicrobials tested, due to the identified efflux inhibitory activity.
21 The fact that only one of the tested compounds exhibits antimycobacterial and
22 inhibitory efflux activity may be related to the presence of the substituent nature in the
23 piridine position, where it is possible to highlight the substituents of the 1 and 6
24 positions. Biotechnological studies of activity structure relationship may elucidate
25 Which modifications of this compound, in relation to the others, could be responsible
26 for the observed activities.

27 Key-words: resistance, mycobacteria, synthetic molecules

1. INTRODUÇÃO

Em 1896 os pesquisadores Lehmann e Neumann, classificaram as micobactérias no gênero *Mycobacterium*, pertencente a família Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales e classe Actinomycetes. Neste gênero está incluso as micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* e o *M. leprae*, agentes etiológicos da tuberculose e da lepra, respectivamente (LEÃO et al., 2005). Além destes, há também um grupo chamado de micobactérias não tuberculosas (MNT), que inclui mais de 200 espécies, algumas das quais estão associadas a importantes infecções humanas, especialmente em pacientes imunocomprometidos e imunodeprimidos, sendo o Complexo *M. avium* (MAC), *M. kansasii* e o grupo *M. chelonae-abscessus* os mais frequentes (EGELUND et al., 2015).

Em geral, as micobactérias são microrganismos aeróbicos, imóveis, sem flagelos e sem cápsula (HONG & HOPFINGER, 2004). Uma das principais características do gênero *Mycobacterium* é a presença da parede celular rica em lipídios, especialmente os ácidos graxos de cadeia longa, conhecidos como ácidos micólicos, que determinam alta lipofilicidade transformando o envoltório celular pouco permeável aos antimicrobianos e biocidas (LEÃO et al., 2005).

De certo modo, as MNTs por sua vez são consideradas microrganismos saprófitas, comensais, simbióticos ou potenciais patógenos (oportunistas), causando infecções tanto em indivíduos imunocompetentes como imunodeprimidos (PRIMM et al., 2004). Estes microrganismos têm sido isolados de diferentes fontes ambientais tais como solo, água, poeira e material vegetal. Além disso, são tolerantes a temperaturas altas, variações de pH e resistentes a desinfetantes, ocorrendo relatos de infecções causadas pela inadequada desinfecção de equipamentos médicos (WU et al., 2009; ZHENG & FANTA, 2013). Ademais, apresentam a capacidade de formar biofilmes, podendo desse modo persistir no meio ambiente (PRIMM et al., 2004).

Pelo fato desse grupo de micobactérias ser causador de infecções oportunistas torna-se difícil a determinação da incidência e prevalência das patogenias, pois estas não são de comunicação compulsória como a tuberculose. As MNTs isoladas de amostras clínicas costumavam ser descritas como contaminação, sendo desvalorizada a sua importância clínica (JARZEMBOWKI & YOUNG, 2008; WU et al., 2009). Com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), estes microrganismos passaram a ser frequentemente isolados como agentes etiológicos de infecções em indivíduos imunodeprimidos (GRIFFITH et al., 2007). Além dos pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), as MNTs têm sido descritas como

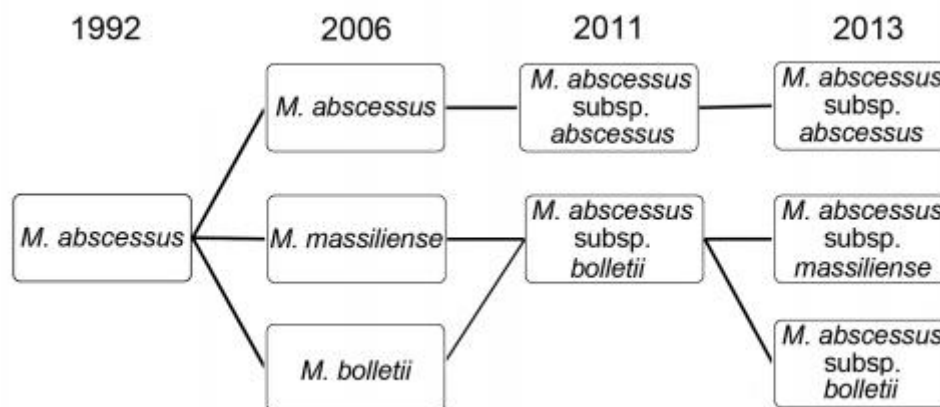
1 agentes etiológicos de surtos de infecções hospitalares e em pacientes imunodeprimidos
2 (NASH, 2016).

3 A classificação de Runyon, para as MNTs utiliza como critério para
4 identificação aspectos como o tempo de crescimento, dividindo-as em micobactérias de
5 crescimento rápido (MCR) e micobactérias de crescimento lento (MCL). As MCR são
6 aquelas que apresentam colônias em meio de cultura sólido, visíveis em até sete dias, e
7 as MCL são aquelas que apresentam colônias visíveis após sete dias. Além disso, as
8 MNTs podem ser classificadas também de acordo com a produção ou não de pigmentos.
9 Micobactérias fotocromógenas são as que apresentam pigmentação somente em
10 presença de luz, escotocromógenas são as que apresentam pigmentação tanto em
11 presença quanto em ausência de luz e acromógenas, são as que não produzem
12 pigmentos (RUNYON et al., 1959).

13 No Brasil, a partir de 1998, foram detectados surtos de infecções causadas por
14 MCR. De acordo com a literatura, entre os anos de 2004 e 2008, mais de 2.000
15 pacientes foram identificados com infecções em sítios cirúrgicos, causadas por *M.*
16 *abscessus*, fazendo com que o problema fosse considerado uma emergência
17 epidemiológica (CARDOSO, et al., 2008; MONEGO, et al., 2011). Além disso, *M.*
18 *abscessus* é a espécie de MCR mais comum isolada de infecções pulmonares, sendo
19 considerado um patógeno emergente que causa um amplo espectro clínico de
20 síndromes, causando infecções em diferentes órgãos e tecidos (MEDJAHED et al.,
21 2010). São responsáveis por doenças pulmonares, principalmente em pacientes com
22 fibrose cística, que são caracterizadas por uma colonização crônica de micobactérias nas
23 vias aéreas, o que acelera o dano pulmonar inflamatório, levando a um aumento da
24 morbidade e mortalidade e por infecções cutâneas, principalmente após procedimentos
25 cirúrgicos (SERMET-GAUDELUS et al. 2003; WU et al., 2009). Essa micobactéria
26 também é responsável por infecções disseminadas após transplantes e tem a capacidade
27 de atravessar barreiras cerebrais, podendo causar meningite e meningoencefalite
28 (MEDJAHED et al., 2010).

29 O *M. abscessus* foi descrito pela primeira vez em 1953, nos Estados Unidos por
30 Moore e Frerichs (MOORE & FRERICHS, 1953). Eles descreveram um microrganismo
31 até então desconhecido, isolado de uma paciente de 63 anos, que possuía um abscesso
32 subcutâneo no joelho. Primeiramente, *M. abscessus* e *M. chelonae* foram considerados
33 como pertencentes à mesma espécie, porém, em 1992, foi realizada uma reclassificação
34 onde se passou a considerar o *M. abscessus* como uma espécie individual (BROWN-

1 ELLIOTT et al., 2002). Posteriormente foi identificado o *M. massiliense* e *M. bolletii*
 2 como novas subespécies de *M. abscessus*. A taxonomia bacteriana a partir da ampla
 3 disponibilidade de sequenciamento do genoma tornou-se um desafio. Em 2011, Leão e
 4 colaboradores, consideraram que *M. massiliense* e *M. bolletii* eram geneticamente
 5 idênticos e portanto deveriam formar uma única subespécie: *M. abscessus* subsp.
 6 *bolletii* (LEÃO et al., 2011). Recentemente, a comparação do genoma destes
 7 microrganismos, definiu que o complexo *M. abscessus* é constituído por *M. abscessus*
 8 subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*
 9 (BENWILL et al., 2014). Essas mudanças na nomenclatura podem ser observadas na
 10 Figura 1.



11

12 **Figura 1:** Evolução da descrição das subespécies de *M. abscessus*.

13

Fonte: LEE et al., 2015

14 Uma avanço importante relacionado ao *M. abscessus*, é a presença do gene
 15 *erythromycin ribosome metilase* (41) que leva a resistência aos macrolídeos. Este gene
 16 codifica uma metiltransferase, que por sua vez, metila o local de ação dos macrólidos no
 17 nível de rRNA. A partir disso, já foi observado resistência a claritromicina em *M.*
 18 *abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*, os quais possuem este gene
 19 *erm* (41). O qual não ocorre no *M. abscessus* subsp. *massiliense*, logo, não possui
 20 resistência induzível aos macrolídeos, tornando a resposta ao tratamento melhor entre os
 21 pacientes com infecções causadas por este. (LEE et al., 2015).

22 O primeiro surto de *M. abscessus* subsp. *bolletii* relatado no Brasil, ocorreu em
 23 2004 onde envolveu 68 pacientes, os quais foram submetidos a cirurgia laparoscópica
 24 (VIANA-NIERO et al., 2008). Atualmente, apresenta-se como uma subespécie

1 patogênica, porém quando comparado aos demais subespécies é considerada um
2 patógeno raro, representando cerca de 5% de todas as infecções causadas por *M.*
3 *abscessus* (LEE et al., 2014). Além disso, podem ser resistentes a claritromicina,
4 contudo, Nunes e colaboradores (2014) observaram em seu estudo que somente 14%
5 dos isolados clínicos foram resistentes a claritromicina, podendo então ser encontrado
6 um número relativamente alto de isolados suscetíveis (ADEKAMBI et al., 2006).

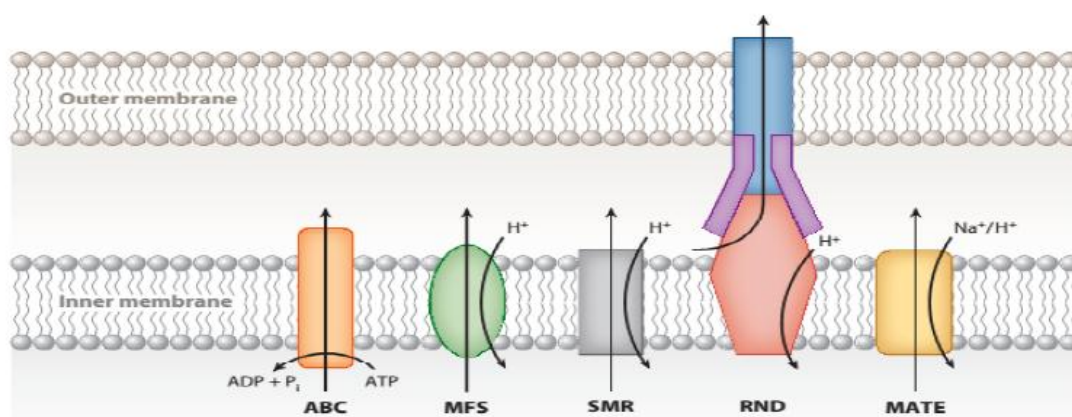
7 O tratamento para *M. abscessus* pode levar até seis meses, e é baseado na
8 associação de macrolídeos (claritromicina e azitromicina) com os aminoglicosídeos
9 (amicacina), ou cefamicinas (cefexitina), ou carbapenemos (imipenem), ou glicilciclina
10 (tigeciclina), ou oxazolidinones (linezolida) ou, ainda, com quinolonas (ciprofloxacina)
11 (KASPERBAUER & DE GROOTE, 2015). Essa espécie é intrinsecamente resistente a
12 vários fármacos, tornando a cura muito difícil em alguns casos. A intervenção cirúrgica
13 é considerada uma forma de tratamento aos pacientes que não respondem ao tratamento
14 e que apresentam resistência aos antimicrobianos (COWMAN et al., 2012).

15 A resistência aos antimicrobianos tem evoluído constantemente, tornando-se um
16 problema no controle global das doenças, podendo ser ocasionada por dosagens
17 inadequadas e também pela longa duração do tratamento (SILVA et al., 2013). Os
18 mecanismos intrínsecos de resistência geralmente estão relacionados com a
19 impermeabilidade da parede celular, que funciona como uma barreira impedindo a
20 entrada de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, produção de enzimas hidrolíticas ou
21 acetiladoras, bem como mecanismo de efluxo, que exporta substâncias tóxicas do
22 interior da célula para o meio externo (KLEINNIJENHUIS et al., 2011). Os
23 mecanismos de resistência adquiridos envolvem modificação do alvo (gerada por
24 mutações). Além disso, os mesmos mecanismos intrínsecos como modificação
25 enzimática, alteração da permeabilidade e efluxo, podem ser exacerbados aumentando o
26 grau de comprometimento com a resistência (VIVEIROS et al., 2003).

27 O efluxo é um mecanismo que exporta substâncias do interior da célula através
28 de proteínas transportadoras, ancoradas na membrana plasmática. Em células vivas, este
29 mecanismo tem relação fisiológica ao processo de desintoxicação, expelindo compostos
30 prejudiciais ao funcionamento da célula, e ainda pode reduzir a concentração
31 intracelular do antimicrobiano (PAGÈS et al., 2005). Em micobactérias este mecanismo
32 de efluxo pode ser específicos para um reduzido número de compostos, como os
33 antimicrobianos, que compartilham características físico químicas, ou, o que é mais

1 frequente, serem altamente inespecíficos exportando substratos dissimilares
2 quimicamente. (LIU, TAKIFF & NIKAIDO 1996).

3 As bombas de efluxo podem ser divididas em cinco famílias, com base na sua
4 estrutura ou fonte de energia. As famílias *Major Facilitator Super family*, *Small*
5 *Multidrug Resistance*, *Resistance-nodulation-division* e *Multidrug and Toxic*
6 *Compounds Extrusion* utilizam como fonte de energia um gradiente eletroquímico
7 gerado por prótons que são transportados e distribuídos para a superfície da célula;
8 enquanto que os membros da família *ATP-binding cassette* hidrolisam adenosina
9 trifosfato (ATP) como fonte de energia (PUTMAN et al., 2000) (Figura 2).



10

11 **Figura 2.** Figura demonstrativa da classificação das famílias de bomba de efluxo.

12 *ATP-binding cassette* (ABC), *Major Facilitator Super family* (MSF), *Small Multidrug*
13 *Resistance* (SMR), *Resistance-nodulation-division* (RND) e *Multidrug and Toxic*
14 *Compounds Extrusion* (MATE)

15

Fonte: DELMAR et al., 2014

16

17 Considerando que o efluxo compõe o conjunto de barreiras intrínsecas que
18 determinam um grau de resistência natural aos antibióticos e que pode estar envolvido
19 na aquisição de maior nível de resistência durante o tratamento, é razoável supor que
20 substâncias inibidoras do efluxo poderiam ser adjuvantes no tratamento das
21 micobacterioses causadas por *M. abscessus* (PASIPANODYA & GUMBO 2011).

22

23 Vários compostos que inibem o efluxo têm sido descritos, alguns deles já
24 utilizados na prática médica com objetivos distintos. Nesta categoria vem sendo
25 estudado o verapamil, e as fenotiazinas (tioridazina e clorpromazina), antiarrítmico e
psicotrópicos, respectivamente. Outros compostos como a reserpina, um alcaloide e o
cianeto de carbonila m-clorofenil-hidrazona (CCCP), um dissipador de prótons também

1 têm sido usados em experimentos laboratoriais (RODRIGUES et al., 2009; VIVEIROS
2 et al., 2012).

3 Além dos inibidores do mecanismo de efluxo descritos acima, outras substâncias
4 inibidoras têm sido estudadas, tanto a partir de fontes naturais quanto sintéticos. Apesar
5 da ampla gama de inibidores de efluxo já descritos, alguns deles não estão em utilização
6 na prática médica, possivelmente pela toxicidade que estes compostos possam
7 apresentar. No entanto, alguns já são utilizados para outras finalidades, como
8 psicotrópicos, e é possível que a dose necessária para inibir o efluxo seja maior que
9 aquela utilizada para outras finalidades (VIVEIROS et al., 2012).

10 De acordo com os altos níveis de resistência aos fármacos antimicrobacterianos, é
11 de extrema importância pesquisas de novos compostos, as tetrahidropiridinas, por sua
12 vez, são compostos sintéticos que fazem parte de uma importante classe de moléculas
13 orgânicas, as piridinas. Atualmente já foi observada a atividade antimicrobiana frente a
14 bactéria Gram-negativa, *Pseudomonas aeruginosa*, e a fungo, como *Candida albicans*
15 (ZANATTA, et al., 2009). Além disso, já foram observados níveis de atividade
16 antimicrobacteriana frente a bactérias suscetíveis e resistentes aos fármacos
17 comumente utilizados em tratamentos, como bactérias Gram-positivas, incluindo *M.*
18 *tuberculosis* (ARIDOSS, et al., 2008). Ademais, já foi identificado que estas moléculas
19 tem um potencial para inibir sistema de extrusão (ZANATTA, et al., 2009).

20 Partindo do pressuposto que o efluxo está estreitamente relacionado à resistência
21 intrínseca e adquirida em MNT, além do número limitado de antimicrobianos úteis para
22 o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos, o estudo de novos
23 inibidores de efluxo, que possam ser utilizados no tratamento, devem continuar,
24 diversificando as fontes e estruturas físico-químicas, bem como adicionando ao estudo
25 ferramentas de bioinformática que possam elucidar o(s) mecanismo(s) de ação.

1 **Objetivo Geral**

2 Avaliar a atividade de tetrahidropiridinas como antimicrobiano e inibidor do
3 mecanismo de efluxo para as seguintes cepas: *M. abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC
4 19977), *M. abscessus* subsp. *abscessus* (AT 07/0415), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (AT
5 46/0415) e *M. abscessus* subsp. *boletti* (AT 52/0415).

6 **Objetivos específicos:**

- 7 - Avaliar a atividade antimicrobiana a partir da determinação da concentração mínima
8 inibitória dos antimicrobianos: claritromicina (CLA), ampicacina (AMI), ciprofloxacina
9 (CIPRO), Sulfametoxazol/Trimetropim (SULFA/TRI), e dos inibidores: reserpina
10 (RSP), Cianeto de carbonila m-clorofenil-hidrazona (CCCP), clorpromazina (CPZ) e
11 verapamil (VERA) e dos 8 compostos tetrahidropiridínicos;
12
13 - Analisar o efeito modulatório dos inibidores clássicos CPZ, CCCP, VERA e RSP e
14 dos compostos tetrahidropiridínicos na atividade antimicrobiana da CLA, AMI, CIPRO
15 e SULFA/TRI frente às cepas descritas acima.

1 **2. ARTIGO CIENTÍFICO** - Tetrahidropiridina como inibidora do mecanismo
2 de efluxo em *Mycobacterium abscessus*

3 Dienefer Venske Bierhals¹; Ivy Bastos Ramis¹; Daniela Fernandes Ramos¹; Nilo
4 Zanatta²; Pedro Eduardo Almeida da Silva¹

5 ¹ Universidade Federal do Rio Grande – FURG (Núcleo de Pesquisa em Microbiologia
6 Médica – Rio Grande, RS - Brasil), Faculdade de Medicina.

7 ² Universidade Federal de Santa Maria - UFSM (Núcleo de Química de Heterociclos)

8 Manuscrito a ser submetido à Revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

9 *Autor para correspondência:* Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva.

RESUMO

1 Atualmente existem mais de 200 espécies pertencentes ao gênero
2 *Mycobacterium*, sendo a maior parte delas classificadas como Micobactérias Não-
3 Tuberculosas (MNTs). As infecções por MNTs têm sido consideradas uma emergência
4 global. Um diagnóstico rápido e acurado, e um tratamento eficaz são prioridades para
5 um desfecho clínico favorável. O tratamento das micobacterioses é difícil, uma vez que
6 as MNTs são naturalmente resistentes a muitos antimicrobianos. Um dos mecanismos
7 relacionados à resistência é o efluxo, razão pela qual a busca por substâncias inibidoras
8 deste mecanismo tem crescido nos últimos anos. Neste estudo foi avaliada a atividade
9 de uma série de oito tetrahidropiridinas como antimicrobianos e inibidores do
10 mecanismo de efluxo frente a *M. abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC 19977), *M.*
11 *abscessus* subsp. *abscessus* (AT 07/0415), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (AT 46/0415) e
12 *M. abscessus* subsp. *boleiti* (AT 52/0415). Interessantemente, apenas um composto
13 demonstrou atividade antimicrobiana e inibidora do mecanismo de efluxo, o NUNL 2,
14 com as concentrações e fator modulatório variáveis entre as quatro cepas estudadas. Isso
15 pode estar relacionado a diferença da natureza do substituinte da piridina, onde foi
16 essencial a presença de um alcalóide na posição 6, aliado a presença de um n-
17 propilbenzeno (C₉H₁₂) na posição 1 para este composto ser ativo.

1 **INTRODUÇÃO**

2 O gênero *Mycobacterium* inclui espécies do complexo *M. tuberculosis*, *M.*
3 *leprae* e micobactérias não causadoras da tuberculose (MNTs). As MNTs são
4 microrganismos que geralmente estão associadas a infecções da pele, tecidos moles e
5 osso, além de doenças pulmonares, podendo acometer pacientes saudáveis e
6 imunocomprometidos (1).

7 O *M. abscessus* é uma MNT de crescimento rápido, ou seja, leva no máximo
8 sete dias para formar colônias visíveis em meio sólido. Esta micobactéria é responsável
9 por causar doenças pulmonares, principalmente em pacientes imunodeprimidos, como
10 na fibrose cística, além de infecções cutâneas após procedimentos cirúrgicos. (2, 3).

11 O tratamento para as micobacterioses causadas por *M. abscessus* é difícil, pois
12 estas são altamente resistentes aos antimicrobianos, tanto *in vitro* como *in vivo*. A
13 resistência não ocorre somente com os agentes antituberculosos clássicos (Isoniazida e
14 Rifampicina), mas também com a maioria dos antimicrobianos que estão disponíveis
15 atualmente para o tratamento, o que resulta em opções terapêuticas limitadas e possíveis
16 falhas no tratamento (4). Atualmente recomenda-se o uso de agentes antimicrobianos
17 como, os macrolídeos incluindo a claritromicina e azitromicina, os aminoglicosídeos
18 como a amicacina, as cefamicinas (cefoxitina), os carbapenems (imipenem), e as
19 glicilciclinas (tigeciclina) (5).

20 A resistência aos antimicrobianos pode ser considerada intrínseca, onde os
21 mecanismos podem ser atribuídos à presença dos ácidos micólicos na parede celular que
22 conferem alta impermeabilidade celular, além de um mecanismo de efluxo, o qual
23 consiste em uma grande família de proteínas de membrana dependentes de energia, que
24 atuam fazendo a extrusão de substratos ou substâncias que podem ser tóxicas para a
25 bactéria (6). Essas bombas podem ser classificadas em cinco famílias: *Major Facilitator*

1 *Super family, Small Multidrug Resistance, Resistance-nodulation-division, Multidrug*
2 *and Toxic Compounds Extrusion e ATP-binding cassette*. Atualmente, com o avanço
3 tecnológico e das pesquisas por mecanismo de efluxo, já foi possível observar que em
4 *M. abscessus* existem membros de proteínas da família ABC (7).

5 Uma forma de diminuir a extrusão do fármaco pelo mecanismo de efluxo é
6 utilizando inibidores, sendo os mais comumente estudados em estudos com
7 micobactérias: verapamil, reserpina, fenotiazinas (tioridazina e clorpromazina) e o
8 cianeto de carbonila m-clorofenil-hidrazona (CCCP), (8). Quando estes atuam como
9 inibidores do efluxo, contribuem para o restabelecimento da atividade dos fármacos
10 frente às micobactérias.

11 Atualmente, vários compostos sintéticos e orgânicos vem sendo avaliados como
12 antimicrobianos e inibidores do efluxo. As tetrahidropiridinas, por exemplo, já foram
13 testadas como antimicrobianos e a sua atividade foi comprovada frente a *Pseudomonas*
14 *aeruginosa* e *Candida albicans* (9). Esses compostos podem ser candidatos promissores
15 a inibidores do mecanismo de efluxo em bactérias, devido as suas propriedades
16 terapêuticas e farmacológicas como reguladores do fluxo de íons cálcio (10, 9).

17 Considerando que as MNTs são microrganismos ubíquos associados a
18 importantes infecções humanas e que apresentam resistência intrínseca pelo mecanismo
19 de efluxo frente aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento, tem-se
20 investigado algumas substâncias inibidoras deste mecanismo. As tetrahidropiridinas
21 são moléculas sintéticas com possível potencial farmacológico e inibitório, o que as
22 torna, portanto, candidata à avaliação como inibidora de bombas de efluxo em *M.*
23 *abscessus*. Com isso, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade de
24 tetrahidropiridina como antimicrobiano e/ou inibidor do mecanismo de efluxo em *M.*
25 *abscessus*.

1 **MATERIAIS E MÉTODOS**

2 **Cultivo das cepas e suspensão bacteriana**

3 Foram utilizadas cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC 19977), *M.*
4 *abscessus* subsp. *abscessus* (AT 07/0415) isolada de uma amostra de escarro, *M.*
5 *abscessus* subsp. *bolletii* (AT 46/0415) isolada da secreção de uma ferida de cirurgia
6 plástica, e *M. abscessus* subsp. *bolletii* (AT 52/0415) que também foi isolada de um
7 paciente com secreção na ferida cirúrgica, todos os isolados utilizados neste estudo
8 foram provenientes da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. Estas foram
9 cultivadas em meio sólido Ogawa-Kudoh e incubadas em estufa bacteriológica à 37°C
10 por até 15 dias. A suspensão bacteriana foi preparada em água destilada estéril em uma
11 turvação referente a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). O inóculo foi
12 preparado a partir dessa suspensão, na proporção de 1:10 em caldo Mueller-Hinton (11).

13 **Compostos tetrahidropiridínicos**

14 As tetrahidropiridinas foram cedidas pela Universidade Federal de Santa Maria.
15 Estas foram obtidas de acordo com o método de reação com piranos descrito por
16 Zanatta e colaboradores (9), solubilizadas em dimetil sulfóxido 99,5% (DMSO) na
17 concentração de 10mg/mL e estocadas à temperatura de 4°C. No presente estudo foram
18 avaliados 8 compostos tetrahidropiridínicos. Suas estruturas químicas são demonstradas
19 na figura 3.

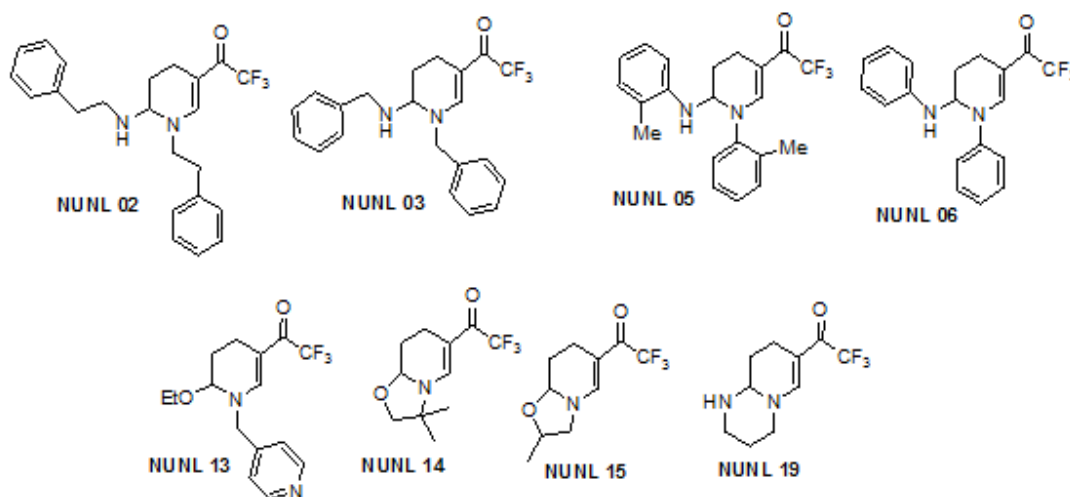


Figura 3. Estrutura química dos compostos tetrahidropiridínicos

Teste de suscetibilidade

A avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi realizada como descrita no *Clinical e Laboratory Standards Institute* (CLSI), e em triplicatas (11). Resumidamente, a metodologia consiste na utilização de uma microplaca de 96 poços para realizar a microdiluição seriada (1:2) de 100 μ L dos antimicrobianos, inibidores clássicos e das tetrahidropiridinas em 100 μ L de caldo Mueller-Hinton. Ao final da microdiluição, foram adicionados 100 μ L do inóculo, preparado conforme descrito acima. Após dois dias de incubação a 37 °C foram adicionados 30 μ L de resazurina a 0,02 %. Esta, por sua vez, funciona como um indicador de viabilidade celular através da sua oxi-redução. Após 24 horas de incubação foi realizada a leitura da absorbância a 620 nm em espectrofotômetro e também observada mudança de coloração, a partir da qual foi definida a CMI, como a menor concentração dos antimicrobianos e das moléculas capazes de inibir o crescimento das micobactérias (12). O CLSI propõe os seguintes pontos de corte para determinar a sensibilidade de MNTs de crescimento rápido: AMI \leq 16 μ g/mL, CIPRO \leq 1 μ g/mL, SULFA/TRI \leq 38/2 μ g/mL, CLA \leq 2 μ g/mL (11). Com relação ao ponto de corte para as tetrahidropiridinas, estas foram

1 consideradas ativas com a CMI $\leq 200 \mu\text{g/mL}$. As concentrações iniciais dos
 2 antimicrobianos e das moléculas avaliadas estão descritas na tabela abaixo.

Microrganismo/ Antimicrobiano	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> (ATCC19977)	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> (AT 07/0415)	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (AT 46/0415)	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (AT 52/0415)
AMI	5 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$
CLA	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
CIPRO	16 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$
SULFA/TRI	304/2500 $\mu\text{g/mL}$	76/625 $\mu\text{g/mL}$	38/312,5 $\mu\text{g/mL}$	312,5/38 $\mu\text{g/mL}$
CPZ	37,5 $\mu\text{g/mL}$	37,5 $\mu\text{g/mL}$	37,5 $\mu\text{g/mL}$	37,5 $\mu\text{g/mL}$
CCCP	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	6,2 $\mu\text{g/mL}$	3,1 $\mu\text{g/mL}$
VERA	1250 $\mu\text{g/mL}$	1250 $\mu\text{g/mL}$	1250 $\mu\text{g/mL}$	1250 $\mu\text{g/mL}$
RSP	1600 $\mu\text{g/mL}$	1600 $\mu\text{g/mL}$	1600 $\mu\text{g/mL}$	3200 $\mu\text{g/mL}$
Tetrahidropiridinas	200 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$

3 **Tabela 1** – Concentrações iniciais dos antimicrobianos e inibidores

4 AMI: Amicacina, CLA: Claritromicina, CIPRO: Ciprofloxacina, SULFA/TRI:
 5 Sulfametoxazol/Trimetropim, CPZ: Clorpromazina, CCCP: carbonila m-clorofenil-
 6 hidrazona, VERA: Verapamil, RSP: Reserpina.

7 **Avaliação do efeito modulatório dos inibidores clássicos de efluxo e de**
 8 **tetrahidropiridinas na atividade antimicrobiana dos fármacos.**

9 Para o estudo do fator de modulação, utilizou-se $\frac{1}{2}$ da CMI dos inibidores
 10 clássicos de efluxo e das tetrahidropiridinas, com o objetivo de assegurar que uma
 11 eventual potencialização dos antibióticos não ocorresse por uma atividade
 12 antimicrobiana dos inibidores. Foi utilizado o Fator de Modulação (FM), para avaliar o

1 efeito dos inibidores de efluxo sobre a CMI dos antimicrobianos, através da fórmula
2 proposta por Gröblacher et al., 2012:

$$3 \quad FM = \frac{\text{CMI do antimicrobiano}}{\text{CMI do antimicrobiano na presença do inibidor de efluxo}}$$

4 O FM refere-se a redução dos valores da CMI dos antimicrobianos na presença dos
5 inibidores de efluxo, sendo considerado significativo quando ≥ 4 (13).

6 **RESULTADOS**

7 A CMI dos antimicrobianos, inibidores clássicos e compostos tetrahidropiridínicos
8 frente à cepa de *M. abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC 19977) e aos três isolados
9 clínicos não foram uniformes, o que pode ser observado na tabela 2. Podemos observar
10 que *M. abscessus* subsp. *bolletii* (AT52/0415) demonstrou uma CMI para AMI igual a
11 5µg/mL, e para CLA igual a 128µg/mL. Porém quando estes mesmos antimicrobianos
12 são testados para *M. abscessus* subsp. *bolletii* (AT46/0415), os resultados mostraram-se
13 diferentes. Não foi observada a resistência a CLA geralmente encontrada nesta
14 subspécie, com CMI igual a 0,25µg/mL, colocando em dúvida a identificação desse
15 isolado. Já com relação aos 8 compostos tetrahidropiridínicos avaliados, apenas a
16 molécula NUNL 2 apresentou atividade frente as cepas analisadas (Tabela 2).

Compostos/ ATB	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC (19977)	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> (07/0415)	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletti</i> (46/0415)	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletti</i> (52/0415)
AMI	1,25 µg/mL	1,25 µg/mL	2,5 µg/mL	5µg/mL
CLA	0,5 µg/mL	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL	128µg/mL
CIPRO	2 µg/mL	2 µg/mL	8 µg/mL	8µg/mL
SULFA/TRI	76/625 µg/mL	76/625µg/mL	38/312,5µg/mL	38/312,5µg/mL
CPZ	9,38µg/mL	9,38µg/mL	9,38µg/mL	9,38 µg/mL
CCCP	0,39µg/mL	0,39µg/mL	1,56 µg/mL	0,78µg/mL
VERA	312,5µg/mL	312,5µg/mL	312,5µg/mL	312,5 µg/mL
RSP	400,0µg/mL	400,0µg/mL	400,0µg/mL	800 µg/mL
NUNL 02	200 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/MI
NUNL	>200 µg/mL	>200 µg/mL	>200 µg/mL	>200 µg/MI

03/05/06/13/14/15/19

1 **Tabela 2** – Resultados das concentrações mínimas inibitórias dos antimicrobianos,
2 inibidores clássicos e compostos tetrahidropiridínicos.

3 AMI: Amicacina, CLA: Claritromicina, CIPRO: Ciprofloxacina, SULFA/TRI
4 Sulfametoxazol/Trimetropim, CPZ: Clorpromazina, CCCP: carbonila m-clorofenil-
5 hidrazona, VERA: Verapamil, RSP: Reserpina.

6 A determinação da CMI dos antimicrobianos na presença dos inibidores de
7 efluxo avalia uma possível relação do mecanismo de efluxo com a resistência. Os
8 resultados da análise do efeito modulatório dos inibidores clássicos CPZ, CCCP, VERA
9 e RSP, e do composto NUNL 2 na atividade antimicrobiana da AMI, CIPRO, CLA e
10 SULFA/TRI frente ao *M. abscessus* são demonstrados nas tabela 3.

1 A partir disso, foi observado nos resultados do fator de modulação que a
2 presença da NUNL 2, juntamente com os antimicrobianos, demonstrou um FM variando
3 entre 1 e >16 (Tabelas 3, 4, 5 e 6). NUNL 2 e inibidores clássicos demonstraram valores
4 de FM significativos, embora com desempenho diferente, considerando o
5 antimicrobiano bem como o microrganismo avaliado. Porém, os valores dos inibidores
6 clássicos não ultrapassou um FM de 4, diferentemente do que ocorre na
7 tetrahidropiridina, NUNL 2, onde foi encontrado FM de até >16. (Tabela 3).

Cepas	µg/mL	AMI	FM	CIPRO	FM	CLA	FM	FULFA/TRI	FM
<i>M.</i>	ATB	1,25	-	2	-	0,5	-	76/625	-
<i>abscessus</i>	CPZ	0,625	2	1	2	0,5	1	38/312,5	2
subsp.	CCCP	0,625	2	1	2	0,125	4	38/312,5	2
<i>abscessus</i>	VERA	0,312	4	1	2	0,25	2	38/312,5	2
ATCC	RSP	1,25	1	1	2	0,5	1	38/312,5	2
(19977)	NUNL2	≤ 0,08	>16	1	2	0,0625	8	≤4,8/39,1	>16
<i>M.</i>	ATB	1,25	-	2	-	0,25	-	76/625	-
<i>abscessus</i>	CPZ	0,625	2	2	1	0,25	1	38/312,5	2
subsp.	CCCP	0,625	2	2	1	0,25	1	38/312,5	2
<i>abscessus</i>	VERA	0,625	2	2	1	0,25	1	38/312,5	2
AT 07/0415	RSP	0,625	2	2	1	0,125	2	38/312,5	2
	NUNL2	0,625	2	2	1	0,125	2	19/156,25	4
<i>M.</i>	ATB	2,5	-	8	-	0,25	-	38/312,5	-
<i>abscessus</i>	CPZ	0,625	4	8	1	0,25	1	19/156,25	2
subsp.	CCCP	1,25	2	8	1	0,25	1	38/312,5	1
<i>bolletii</i>	VERA	0,625	4	8	1	0,25	1	19/156,25	2
AT46/0415	RSP	1,25	2	8	1	0,125	2	38/312,5	1
	NUNL2	2,5	1	8	1	0,0625	4	19/156,25	2
<i>M.</i>	ATB	5	-	8	-	128	-	38/312,5	-
<i>abscessus</i>	CPZ	2,5	2	4	2	64	2	9,5/78,1	4
subsp.	CCCP	2,5	2	2	4	32	4	19/156,25	2
<i>bolletii</i>	VERA	2,5	2	4	2	64	2	19/156,25	2
AT52/0415	RSP	2,5	2	2	4	64	2	19/156,25	2
	NUNL2	2,5	2	2	4	32	4	19/156,25	2

1 **Tabela 3** – Resultados do Fator de modulação para *M. abscessus* subsp. *abscessus*
2 ATCC (19977), *M. abscessus* subsp. *abscessus* AT07/0415, *M. abscessus* subsp. *bolletii*
3 AT46/0415, *M. abscessus* subsp. *bolletii* AT52/0415
4 FM: Fator de Modulação, AMI: Amicacina, CLA: Claritromicina, CIPRO:
5 Ciprofloxacina, SULFA/TRI Sulfametoxazol/Trimetropim, CPZ: Clorpromazina,
6 CCCP: carbonila m-clorofenil-hidrazona, VERA: Verapamil, RSP: Reserpina, NUNL
7 02: tetrahidropiridina.

8 **DISCUSSÃO**

9 A prevalência das infecções causadas por MNTs tem aumentado mundialmente,
10 sendo o *M. abscessus* o segundo principal agente causador de infecções pulmonares,
11 atrás somente do *M. avium*. As micobacterioses causadas por *M. abscessus*
12 compreendem um complexo desafio terapêutico, devido ao limitado arsenal terapêutico
13 e aos diferentes mecanismos de resistência (14). Além disso, *M. abscessus* é
14 considerado um dos microrganismos mais resistentes aos agentes quimioterápicos,
15 dificultando ainda mais o tratamento (15).

16 Dentre os compostos tetrahidropiridínicos testados somente a NULN 2 mostrou
17 atividade antimicrobiana. Naicker e colaboradores (2015) avaliaram a atividade de
18 derivados de piperidina, os quais possuem estrutura química semelhante as piridinas.
19 Analisaram estas frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*
20 *aeruginosa*, entre outras bactérias, e observaram que alguns compostos foram ativos
21 para as bactérias, e outros não. A hipótese para esses resultado é com relação a natureza
22 das substituições no agrupamento de piperidina, onde a partir disso foram obtidos vários
23 graus de atividade de inibição das cepas (16). Esse resultado é similar com os
24 observados neste estudo, onde apenas uma molécula foi ativa, podendo ter relação com
25 a natureza de seus substituintes.

1 Os substituintes, bem como a estrutura dos compostos tetrahidropiridínicos são
2 fundamentais para que estes demonstrem atividades antimicrobianas frente às cepas
3 avaliadas, em especial os presente nas posições 1 e 6. Com relação a posição 1, é
4 possível observar que os compostos NUNL 14, 15 e 19 são os mais diferenciados dos
5 demais, pela presença dos substituintes cíclicos. Além disso, observa-se diferenças na
6 quantidade de carbonos nesta posição. Ao comparar os compostos NUNL 2 e NUNL 3,
7 o primeiro possui n-propilbenzeno (C₉H₁₂) enquanto que NUNL 3 possui um
8 Etilbenzeno (C₈H₁₀). Esta diferença no número de carbonos conferiu ao composto
9 NUNL2 (C₉H₁₂) uma atividade frente as cepas de *M. abscessus*.

10 Já em relação aos substituintes na posição 6 da piridina, destaca-se diferenças
11 estruturais entre os compostos NUNL 2, 3 e 6, sendo respectivamente N-metil-2-
12 feniletanamina (C₉H₁₃N), Benzilmetilamina (C₈H₁₁N) e N-Metilbenzilamina (C₇H₉N),
13 estes substituintes diferem entre si, sendo os dois primeiros considerados alcalóides. De
14 acordo com um estudo realizado por Newton e colaboradores, onde foi encontrada a
15 atividade de alcalóides frente a espécies micobacterianas, sendo que estes achados
16 corroboram com os obtidos neste trabalho (17). Diante disso, a presença de um
17 substituinte alcalóide na posição 6 aliado a presença de um n-propilbenzeno (C₉H₁₂)
18 parece ser essencial para a atividade antimicobacteriana dos compostos
19 tetrahidropiridínicos avaliados.

20 A NUNL 2 foi ativa como inibidora de efluxo quando associada a AMI (FM
21 >16), CLA (FM =8) e SULFA/TRI (FM >16) frente ao *M. abscessus* subsp. *abscessus*
22 ATCC 19977, já para *M. abscessus* subsp. *abscessus* (AT07/0415), apenas quando
23 combinada com SULFA/TRI, possibilitou a redução da CMI (FM = 4). Quando testada
24 em associação com CLA frente ao isolado de *M. abscessus* subsp. *bolletii* AT46/0415, o
25 fator modulatório foi significativo, sendo igual a 4, e para *M. abscessus* subsp. *bolletii*

1 AT52/0415 foi visto que a associação com CLA e também com CIPRO demonstrou um
2 FM igual a 4.

3 De acordo com a Tabela 3, foi possível observar que frente ao *M. abscessus*
4 subsp. *abscessus* (AT07/0415) nenhum dos clássicos inibidores de efluxo utilizados no
5 trabalho demonstraram fator de modulação significativo, apenas a tetrahidropiridina foi
6 capaz de reduzir em quatro vezes a CMI da SULFA/TRI. Esse resultado pode estar
7 relacionado com as diferenças dos mecanismos de ação dos antimicrobianos testados,
8 bem como, com a existência de outros mecanismos de resistência além do efluxo, que
9 não foram avaliados neste estudo. Um exemplo seria a presença do gene *erm* (41) no *M.*
10 *abscessus* subsp. *abscessus*, que esta associada a resistência intrínseca aos macrolídeos
11 (18). No entanto, o *M. abscessus* subsp. *massiliense* por exemplo, não apresenta este
12 gene de resistência fazendo com que este seja muito mais suscetível ao tratamento com
13 os antimicrobianos (19).

14 No presente estudo o isolado de *M. abscessus* subsp. *bolletii* AT46/0415
15 demonstrou-se suscetível a claritromicina, e o *M. abscessus* subsp. *bolletii* AT52/0415
16 resistente. Resultados semelhantes já foi encontrados na literatura, Nunes e
17 colaboradores (2014) observaram que somente 14% dos isolados clínicos avaliados em
18 seu estudo foram resistentes a claritromicina, podendo então ser encontrado um número
19 relativamente alto de isolados suscetíveis (20). O mesmo ocorreu no estudo de Youn
20 Kim e colaboradores (2010), onde um dos isolados apresentou a CMI de 16µg/mL
21 sendo considerado resistente e outro a CMI de 0,25µg/mL sendo com isso suscetível
22 (21).

23 Conclui-se que concentrações sub-inibitórias dos inibidores e tetrahidropiridinas
24 associadas aos fármacos utilizados no esquema terapêutico de *M. abscessus*, aumentam

1 a atividade destes antimicrobianos. Sugerindo a possibilidade de acrescentar estes como
2 adjuvantes nas terapias das micobacterioses.

3 **REFERÊNCIAS**

4 1 Shanmugham B, Pan A. 2013. Identification and characterization of potential
5 therapeutic candidates in emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus*: a novel
6 hierarchical in silico approach. PLoS One. Vol:8 59126.

7

8 2 Wu T, Lu, C, Lai, H. 2009. Current Situations on Identification of Nontuberculous
9 Mycobacteria. Journal of Biomedical Laboratory Sciences. Vol:21 pag:1-6.

10

11 3 Medjahed, H, Gaillard, J, Reyrat, J. 2010. *Mycobacterium abscessus*: a new player in
12 themycobacterial field. Trends Microbiol. vol:18 pag:117-123.

13

14 4 Koh JW, Stout EJ, Yew WW. 2014 Advances in the management of pulmonary
15 disease due to *Mycobacterium abscessus* complex. International Journal of Tuberculosis
16 and Lung Disease. Vol:18 pag: 1141-1148.

17

18 5 Kasperbauer HS, De Groote AM. 2015. The treatment of rapidly growing
19 mycobacterial infections. Clinicsin Chest Medicine. vol:36 pag: 67-78.

20

21 6 Piddock, L. J. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance.
22 Nature Reviews Microbiology vol:46 pag:629-36.

23

24 7 Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, Macheras E, Heym
25 B, Herrmann JJ, Daffé M, Brosch R, Risler LJ, Gaillard LJ. 2009. Non-mycobacterial

- 1 virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*.
2 PLoS One vol:4 e:5660.
- 3 8 Rodrigues L, Ramos J, Couto I, Amaral L, Viveiros M. 2011. Ethidium bromide
4 transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic
5 resistance. BMC Microbiology. Vol:11 pag:35.
- 6
- 7 9 Zanatta NL, Fernandes F, Nachtigall H, Coelho S, Amaral A, Flores H, Bonacorso M,
8 Martins. 2009. Highly Chemoselective Synthesis of 6-Alkoxy-1-alkyl(aryl)-3-
9 trifluoroacetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridines and 1-Alkyl(aryl)-6-amino-3-trifluoroacetyl-
10 1,4,5,6-tetrahydropyridines. European Journal of Organic Chemistry. Pag:1435–1444.
- 11
- 12 10 Taylor M, Badger E, Steffen R, Hallen S, Pugsley T, Shih Y, Weishaarf R. 1988. 2-
13 (2-Aryl-2-oxoethylidene)-1,2,3,4-tetrahydropyridines. Novel Isomers of 1,4-
14 Dihydropyridine Calcium Channel Blockers. *Journal of Medicinal Chemistry*. Vol:31
15 pag:1659-1664
- 16
- 17 11 Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Susceptibility testing of
18 mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard, 2nd edn.
19 CLSI document M24-A2.
- 20
- 21 12 Palomino JC, Martins A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. 2002.
22 Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of
23 Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and*
24 *Chemotherapy*. Vol:46 pag:2720-2722.
- 25

- 1 13 Groblacher BO, Kunert F, Bucar. 2012. Compounds of Alpinia katsumadai as
2 potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. Bioorganic & Medicinal
3 Chemistry. Vol:20 pag:2701-2706.
4
- 5 14 Prevots DR, Marras TK. 2015. Epidemiology of human pulmonary infection
6 with nontuberculous mycobacteria: a review. Clinics In Chest Medicine. Vol:36 pag:13–
7 34.
8
- 9 15 NASH KA., 2016. Multidrug Resistance in Mycobacteria. Current Clinical
10 Microbiology Reports. vol:3 pag:53–56
11
- 12 16 Naicker L, Venugopala, Narayanaswamy K, Shode F, Odhav B. 2015. Antimicrobial
13 and antioxidant activities of piperidine derivatives. African Journal of Pharmacy
14 and Pharmacology. Vol: 9 pag: 783-792.
15
- 16 17 Newton SM, Lau C, Wright CW. 2000. A review of antimycobacterial natural
17 products. Phytotherapy Research vol:14 pag:303–322
18
- 19 18 Lee RM, Sheng HW, Hung CC, Yu JC, Lee NL, Hsueh RP. 2015. *Mycobacterium*
20 *abscessus* Complex Infections in Humans. Emerging Infectious Diseases. Vol: 21 pag:
21 1638-46.
22
- 23 19 Griffith ED, Aksamit T, Brown-Elliott AB, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland
24 MS, Horsburgh R, Huitt G, Iademaro FM, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn
25 FC, Wallace JR, Winthrop K. 2007. An official ATS/IDSA statement.

- 1 Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease:
2 Joint Tuberculosis Committee guidelines. American Journal of Respiratory and Critical
3 Care Medicine. Vol: 75 pag:367–416.
4
- 5 20 Nunes, LS, Baethlgen, LF, Ribeiro, MO, Cardoso, CM, Paris, F, De David, MM, Da
6 Silva, MG, Duarte, RS, Barth, AL. 2014. Outbreaks due to *Mycobacterium abscessus*
7 subsp. *bolletii* in southern Brazil: persistence of a single clone from 2007 to 2011.
8 Journal of Medical Microbiology. vol:63 pag:1288–1293
9
- 10 21 Youn Kim, H, Kim, BJ, Kook, Y, Jun Yun, Y, Shin, JH, Kim, BJ, Kook, YH. 2010.
11 *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and
12 *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and
13 clarithromycin susceptibility patterns. Microbiology and Immunology. vol:54 pag:347–
14 353.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

M. abscessus é uma das espécies de micobactérias de crescimento rápido, responsável por infecções pulmonares, disseminadas e cutâneas, apresentando alto índice de resistência aos antimicrobianos usuais na terapia desta micobactéria (Costa et al., 2009; Medjahedet al., 2010; Maurer et al., 2012). Com isso, neste trabalho, foram selecionados isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC 19977), *M. abscessus* subsp. *abscessus* (AT 07/0415), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (AT 46/0415) e *M. abscessus* subsp. *bolletii* (AT 52/0415) para avaliar a atividade de compostos tetrahidropiridínicos como antimicrobiano e/ou inibidor de um mecanismo de resistência aos fármacos.

Atualmente existe uma necessidade constante de novos agentes terapêuticos. As tetrahidropiridinas, por sua vez, têm despertado atenção no campo da química e biotecnologia, por apresentar propriedades biológicas úteis (Zanatta et al., 2009). Através de testes de suscetibilidade realizados neste presente estudo, foi possível observar que o composto tetrahidropiridíno demonstrou ser ativos quando usado como antimicrobiano para as cepas avaliadas.

O ensaio realizado para avaliar a atividade inibitório do mecanismo de efluxo, demonstrou que o composto NUNL 2 apresentou o melhor resultado frente as 4 cepas de *M. abscessus*. A natureza das substituições no anel da tetrahidropiridina pode ter sido o que conferiu esse resultado.

Conclui-se que concentrações sub-inibitórias dos inibidores associadas aos fármacos utilizados no esquema terapêutico de *M. abscessus*, ajudam a melhorar a suscetibilidade a estes antimicrobianos. Neste contexto, este pode ser o caminho para o aumento de alternativas farmacológicas no tratamento das infecções causadas por este microrganismo.

Ademais, são necessários estudos com o composto NUNL 2, como acumulação e efluxo do brometo de etídeo para verificar a presença de efluxo na resistência em *M. abscessus*. Visto que, reduções da CMI associada ao aumento da acumulação e efluxo de brometo de etídeo poderiam indicar o bloqueio do mecanismo de efluxo pelo composto e a possível reversão da resistência aos fármacos utilizados no tratamento.

1 REFERÊNCIAS

- 2 ADEKAMBI, T., BERGER, P., RAOULT, D., DRANCOURT, M. 2006. rpoB gene
3 sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with
4 descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and
5 *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. International Journal of Systematic and
6 Evolutionary Microbiology. vol:56 pag:133–143.
7
- 8 ARIDOSS, G., AMIRTHAGANESAN, A, KUMAR, NA., KIM, JT., LIM, KT.,
9 KABILAN, S., JEONG, YT. 2008. A facile synthesis, antibacterial, and antitubercular
10 studies of some piperidin-4-one and tetrahydropyridine derivatives. Bioorganic &
11 Medicinal Chemistry Letters. vol:18 pag:6542–6548.
12
- 13 BENWILL, JL, WALLACE, RJ Jr., 2004. *Mycobacterium abscessus*: challenges in
14 diagnosis and treatment. Current Opinion in Infectious Diseases. vol:27 pag:506–10.
15
- 16 Brasil. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília.
17 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
18 Vigilância Epidemiológica.
19
- 20 BROWN-ELLIOTT, BA., WALLACE, RJ Jr., 2002. Clinical and taxonomic status of
21 pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. clinical
22 microbiology reviews. Vol:15 pag:716–46.
23
- 24 CARDOSO, AM., MARTINS DE SOUZA, E., VAIANA-NIERO, C., BONFIM, BF.,
25 PEREIRA, NZC., LEAO, SC., JUNQUEIRA-KIPNNIS, AP, KIPNIS, A.2008.
26 Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil.
27 Microbes and Infection. vol:10 pag:1552–1557.
28
- 29 COSTA, ARF., LOPES, ML., LEÃO, SC., SCHENEIDER, MPC., SOUZA, MS.,
30 SUFFYS, PN.,CORVELO, TCO., LIMA, KVB, 2009. Molecular identification of
31 rapidly growing mycobacteria isolates from pulmonary specimens of patients in the
32 State of Pará, Amazon region, Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.
33 vol:65 pag:358-64.

- 1
2 COWMAN, S., WILSON, R., LOEBINGE, MR., 2012. Opportunistic mycobacterial
3 diseases. *Infection*. vol:40 pag:346-348.
4
- 5 DELMAR, JA., SU, CC., YU, E. 2014. Bacterial Multidrug Efflux Transporters.
6 *Annual Review of Biophysics*. vol:43 pag:93–117.
7
- 8 EGELUND, EF., FENNELLY, KP., PELOQUIM, CA., 2015. Medications and
9 Monitoring in Nontuberculous Mycobacteria Infections. *Clinics In Chest*
10 *Medicine*.vol:36 pag:55–66.
11
- 12 GRIFFITH, DE, T, AKSAMIT, BA, BROWN-ELLIOTT, A, CATANZARO, C,
13 DALEY, F, GORDIN., 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment,
14 and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of*
15 *Respiratory and Critical Care Medicine*. vol:175 pag:367–416.
16
- 17 HONG, X. AJ, HOPFINGER., 2004. Construction, molecular modeling, and simulation
18 of *Mycobacterium tuberculosis* cell walls. *Biomacromolecules*. vol:5 pag:1052-1065.
19
- 20 JARZEMBOWSKI, JA.,YOUNG., MB., 2008. Nontuberculous mycobacterial
21 Infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. vol:132 pag:1333-1341.
22
- 23 KASPERBAUER, SH., MA, DE GROOTE.,2015. The treatment of rapidly growing
24 mycobacterial infections. *Clinics In Chest Medicine*. vol:36 pag: 67-78.
25
- 26 KLEINNIJENHUIS, JM., OOSTING, LA., JOOSTEN, MG., NETEA, RV., CREVEL.,
27 2011. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and*
28 *Developmental Immunology*.:405310.
29
- 30 LEAO, SC., MARTIN, A., MEIJA, GI., PALOMINO, JC., ROBLEDO, J., TELLES,
31 PORTAELS, F., 2005. Practical handbook for the phenotypic and genotypic
32 identification of mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. vol:61 pag:193-
33 199.

- 1 LEAO, SC., TORTOLI, E., EUZÉBY, JP., GARCIA, MJ., 2011. Proposal that
2 *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as
3 *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium*
4 *abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium*
5 *abscessus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol: 61
6 pag: 2311–2313.
7
- 8 LEE, RM., SHENG, HW., HUNG, CC., YU, JC., LEE, NL., HSUEH, RP.
9 2015. *Mycobacterium abscessus* Complex Infections in Humans. Emerging Infectious
10 Diseases. vol:21 pag:1638-46.
11
- 12 LEE, SH., YOO, HK., KIM, SH., KOH, WJ., KIM, CH., PARK, YK., KIM, HK. 2014.
13 The drug resistance profile of *Mycobacterium abscessus* group strains from Korea.
14 Annals of Laboratory Medicine. vol: 34 pag: 31–37.
15
- 16 LIU, J, HE, TAKIFF, H, NIKAIDO., 1996. Active efflux of fluoroquinolones in
17 *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. Journal of
18 Bacteriology. vol:178 pag:3791-3795.
19
- 20 MEDJAHED, H., GAILLARD, J., REYRAT, J., 2010. *Mycobacterium abscessus*: a new
21 player in themycobacterial field. Trends Microbiology. vol:18 pag:117-123.
22
- 23 MONEGO, F., DUARTE, RS, NAKATANI, SM, ARAUJO, WN, RIEDIGER, IN,
24 BROCKELT, S, SOUZA, V, CATALDO, JI, DIAS, RC, BIONDO, AW. 2011.
25 Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from
26 postsurgical infections in Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases vol:15
27 pag:436–441.
28
- 29 MOORE, M., FRERICHS, BJ. 1953. An unusual acid fast infection of the knee with
30 subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region: report of a case study with a
31 study of the organism, *Mycobacterium abscessus*. Journal of Investigative Dermatology
32 vol: 20 pag:133–169.
33

- 1 NASH KA., 2016. Multidrug Resistance in *Mycobacteria*. Current Clinical
2 Microbiology Reports vol: 3 pag:53–56.
- 3 NASH, KA., BROWN-ELLIOT, BA., WALLACE, RJ Jr., 2005. Molecular basis of
4 intrinsic macrolideoresistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. Journal
5 of Antimicrobial Chemotherapy. vol:55 pag:170-177.
- 6
- 7 PAGÈS J AND AMARAL L. 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to
8 combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. Biochimica et
9 Biophysica Acta. Pag: 826–833.
- 10
- 11 PASIPANODYA, JG., T, GUMBO., 2011. A new evolutionary and pharmacokinetic
12 pharmacodynamic scenario for rapid emergence of resistance to single and multiple anti
13 tuberculosis drugs. Current Opinion of Pharmacology, vol: 11(supple 5) pag:457–463.
- 14
- 15 PRIMM, TP., LUCERO, TP. FALKINHAM, JO., 2004. Health impacts of
16 environmental mycobacteria. Clinical Microbiology Reviews, vol:17 pag: 98-106.
- 17
- 18 PUTMAN, M., VAN VEEN, HW., KONINGS WN., 2000. Molecular properties of
19 bacterial multidrug transporters. Microbiology and Molecular Biology Review, vol:64
20 pag:672-693.
- 21
- 22 RODRIGUES, L.; SAMPAIO, D.; COUTO, I.; MACHADO, D.; KERN, 2 W.V.;
23 AMARAL, L. & VIVEIROS, M, 2009. The role of efflux pumps in macrolide
24 resistance 3 in *Mycobacterium avium* complex. International Journal of Antimicrobial
25 Agents. vol: 34 pag:529–533.
- 26
- 27 RUNYON, EH., 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Medical
28 Clinics of North America.vol:43 pag:273-90.
- 29
- 30 SERMET-GAUDELUS, I., BOURGEOIS, ML., PIERRE-AUDIGIER, C., OFFREDO,
31 C., GUILLEMOT, D., HALLEY, S., AKOUA-KOFFI, C., VINCENT, V., SIVADON-
32 TARDY, V., FERRONI, A., BERCHE, A., SCHEIMANN, P., LEONIR, P.,

- 1 GAILLARD., JL. 2003 *Mycobacterium abscessus* and children with cystic. Emerging
2 Infectious Diseases. Vol: 9.
3
- 4 SILVA, CCAV., ANDRADE, MS., CARDOSO, MD., 2013. Fatores associados ao
5 abandono do tratamento de tuberculose em indivíduos acompanhados em unidades de
6 saúde de referência na cidade do Recife, Estado de Pernambuco, Brasil, entre 2005 e
7 2010. Epidemiologia e Serviços de Saúde. Vol:22 pag:77-85.
8
- 9 VIANA-NIERO, C., LIMA, KV., LOPES, M L., DA SILVA RABELLO, MC.,
10 MARSOLA, LR., BRILHANTE, VC., DURHAM, AM., LEAO, SC. (2008).
11 Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii*
12 in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and
13 cosmetic procedures. Journal of Clinical Microbiology. vol:46 pag: 850–855.
14
- 15 VIVEIROS, MC., LEANDRO., AMARAL, L., 2003. Mycobacterial efflux pumps and
16 chemotherapeutic implications. International Journal of Antimicrobial Agents. vol:22
17 pag:274– 278.
18
- 19 VIVEIROS, M., MARTINS, M., RODRIGUES, L., MACHADO, D., COUTO,I.,
20 AINSA, J., AMARAL., 2012. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential
21 boosters for anti-tubercular drugs. Expert Review of Anti-Infective Therapy. vol:10
22 pag:983–998.
23
- 24 ZANATTA, NL., FERNANDES, F., NACHTIGALL, H., COELHO, S., AMARAL, A.,
25 FLORES, H., BONACORSO, M., MARTINS., 2009. Highly Chemoselective Synthesis
26 of 6-Alkoxy-1-alkyl(aryl)-3-trifluoroacetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridines and 1-
27 Alkyl(aryl)-6-amino-3-trifluoroacetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridines. European Journal of
28 Organic Chemistry. pag:1435–1444.
- 29 ZHENG, C, FANTA, CH., 2013. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary infection
30 in the immunocompetent host. vol:106 pag:307–315.
31
- 32 WU, T., LU, C.,LAI, H., 2009. Current Situations on Identification of Nontuberculous
33 Mycobacteria. Journal of Biomedical Laboratory Sciences. vol:21 pag:1-6.