

Atividade Anti-Hemolítica de Tiossemicabazona diante da α -Hemolisina de *S. Aureus*

Anti-Hemolytic Activity of Thiosemicabazone against α -Hemolysin from S. Aureus

Mayse Manuele F. V. Leal¹, Wyndly Daniel Cardoso Gaião¹, Cláudio Gabriel Rodrigues¹, Janilson José da Silva Júnior¹, Dijanah da Cota Machado¹, Diego Santa Clara Marques¹, Iranildo José da Cruz Filho¹ e Maria do Carmo Alves de Lima¹

1. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

maysseleal1234@gmail.com

Palavras-chave

Atividade anti-hemolítica
Hemólise
Infecção bacteriana

Keywords

Antihemolytic activity
Hemolysis
Bacterial infection

Resumo:

No âmbito do desenvolvimento de agentes terapêuticos capazes de combater as infecções bacterianas causadas pelo *Staphylococcus aureus*, emerge a busca de substâncias que inibem a sua virulência, visando mitigar a sintomatologia desta afecção. Diante dessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-hemolítica de um derivado tiossemicabazona diante da α -HL de *S. aureus*. Utilizando um ensaio de hemólise em coelhos, foi constatado que a PB-12 apresenta uma atividade anti-hemolítica significativa. Assim, a PB-12 protege as hemácias contra a ação hemolítica provocada pela α -HL de *S. aureus*. Esse efeito anti-hemolítico está diretamente ligado à capacidade desses complexos de bloquear o canal heptamérico formado pela α -HL, tornando esse composto um agente co-terapêutico no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*.

Abstract:

In the context of the development of therapeutic agents capable of combating bacterial infections caused by *Staphylococcus aureus*, the search for substances that inhibit its virulence, aiming to mitigate the symptoms of this condition, has emerged. Given this perspective, the present study aimed to evaluate the antihemolytic activity of a thiosemicarbazone derivative against α -HL of *S. aureus*. Using a hemolysis assay in rabbits, it was found that PB-12 has significant antihemolytic activity. Thus, PB-12 protects red blood cells against the hemolytic action caused by α -HL of *S. aureus*. This antihemolytic effect is directly linked to the ability of these complexes to block the heptameric channel formed by α -HL, making this compound a co-therapeutic agent in the treatment of infections caused by *S. aureus*.

Artigo recebido em: 08.12.2024.

Aprovado para publicação em: 31.01.2025.

INTRODUÇÃO

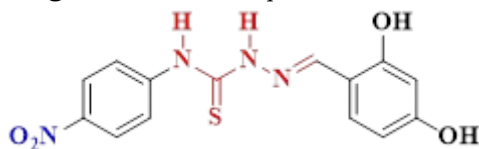
Diversos estudos destacam o aumento das cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. Portanto, cresce na mesma proporção a busca por alternativas terapêuticas capazes de combater infecções causadas pelo *S. aureus*. Como forma de combater a infecção causada por esse agente infeccioso, tem sido observada uma expressiva busca por substâncias capazes de antagonizar seus fatores de virulência, entre os quais, destaca-se a α -hemolisina (α -HL). A α -HL é um monômero secretada pelo *S. aureus* durante o crescimento exponencial, que se oligomeriza nas membranas do hospedeiro como um poro transmembranar, causando citólise osmótica. Estudos anteriores avaliaram a atividade de vários compostos para inibir a ação da α -HL,

impedindo sua montagem na membrana ou bloqueando o poro heptamérico (Rani et al. 2014; Melo et al., 2016). Tendo em vista os recentes avanços na descoberta de propriedades bioativas das tiossemicarbazonas (Shoukat et al., 2024), o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-hemolítica de um derivado tiossemicarbazona diante da α -HL de *S. aureus*.

METODOLOGIA

Foi empregado um ensaio padrão de hemólise com eritrócitos de coelho sob concentrações micromolares dos compostos e ensaios de bloqueio da corrente iônica do canal (nanoporo) formado pela α -HL. Para avaliar a atividade hemolítica de um derivado de 2-cloro-quinolina-tiossemicarbazona - PB-12 (Figura 1) em hemácias de coelho (obtidas comercialmente), foram realizados ensaios hemolíticos em microplacas de 96 poços, seguindo protocolo bem descrito na literatura (Melo et al., 2016), por meio de suspensão a 2% (p/v) de hemácias de coelho em solução tampão composta por NaCl 150 mM, Tris-OH 5mM em pH 7,5. Em cada poço foram adicionados a suspensão de hemácias, a α -HL e a PB-12 em concentrações de 0, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μ M, durante 60 min, com leituras realizadas a cada 5 min. A quantificação (porcentagem) da hemólise foi obtida de acordo com o nível de lise celular por meio de análise espectrofotométrica a 655nm por meio de leitor de microplacas.

Figura 1. Estrutura química do PB-12



Todas as medidas foram realizadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Os poços contendo apenas a suspensão de hemácias a 1% foram considerados controle negativo (0% hemólise), enquanto os poços contendo apenas hemácias lisadas com Triton X-100 a 2% foram considerados controle positivo (100% hemólise).

Os ensaios de bloqueio de corrente do canal da α -HL foram realizados por meio da técnica de Montal & Mueller (1972), bem descrita na literatura e amplamente utilizada pelo nosso grupo. Após a montagem e estabilização da membrana artificial, foi incorporado o canal da α -HL, por meio do qual flui uma corrente iônica. A presença de PB-12, causa bloqueios transitórios na corrente do canal da α -HL. A avaliação da corrente residual (i/i_0) e do tempo de residência, fornecem permitem quantificar a capacidade da PB-12 em bloquear o canal da α -HL. A solução banhante foi composta por solução eletrolítica de 4 M de KCl, 5 mM de tampão Tris-ácido cítrico (pH 7,5). A PB-12 foi diluída em DMSO e adicionada no lado CIS, tal como descrito por Melo et al., 2016.

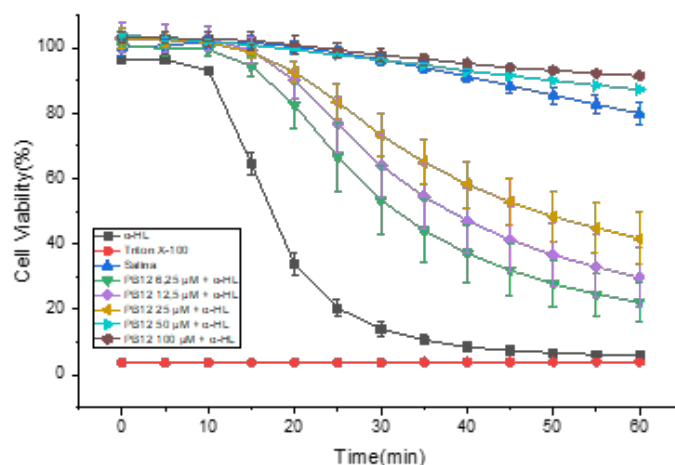
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados apontam que todas as concentrações utilizadas protegem as hemácias da atividade hemolítica causada pela α -HL. Mesmo após 20 min de exposição à α -HL, mais de 70% das hemácias se mantiveram viáveis em todas as concentrações. Nas concentrações de 25, 50, e 100 μ M, mais de 80% das hemácias se man-

tiveram viáveis. Nesse contexto, a PB-12 mostrou-se promissora como agente protetor frente à infecção causada por *S. aureus*.

A PB-12 diminuiu o fluxo iônico através do canal da α -HL. A adição de 25 μ M da PB-12 ao lado cis da membrana causou bloqueios do poro. A análise de corrente permitiu a identificação de dois níveis de bloqueio: bloqueios com transições rápidas de corrente, com tempo de residência de aproximadamente 0,17 ms e aproximadamente 53% de bloqueio da corrente do nanoporo; e bloqueios mais duradouros, com tempo de residência da ordem 3 s e aproximadamente 81% bloqueio da corrente (Figura 2).

Figura 2. Atividade hemolítica causada pela α -HL



CONCLUSÕES

Neste estudo, foi avaliada a atividade inibitória de um derivado de tiossemicarbazona (PB-12) contra a atividade de dano à membrana da α -HL de *Staphylococcus aureus*, bem como a atividade da PB-12 em bloquear o nanoporo heptamérico formado pela α -HL.

Empregando ensaio de padrão de hemólise de coelho, foi observado que a PB-12 possui uma atividade anti-hemolítica significativa. Portanto, a PB-12 protege as células vermelhas da ação hemolítica causada pela α -HL de *S. aureus*.

O efeito anti-hemolítico está diretamente relacionado à capacidade desses complexos em bloquear diretamente o canal heptamérico formado pela α -HL, tornando esta tiossemicarbazona um agente co-terapêutico no tratamento de infecções cujo agente etiológico é o *S. aureus*.

FINANCIAMENTO: Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS: Ao Laboratório de Química e Inovação terapêutica (LQIT) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e ao Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-Tronco Dr. Oleg Krasilnikov do Departamento de Biofísica e Radiobiologia do CB-UFPE.

FINANCIAMENTO: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

AGRADECIMENTOS: A Universidade Federal de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

MELO, M. C. A. et al. Inhibition of the hemolytic activity caused by *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin through isatin-Schiff copper(II) complexes. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 1, p. fnv207, 1 jan. 2016.

MONTAL, M. & MUELLER, P. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid. Monolayers and A Study of Their Electrical Properties. Proceedings of the National **Academy of Sciences of the United States of America**. 69:3561-3566. 1972.

OLCHOWIK-GRABAREK, E. et al. Inhibition of interaction between *Staphylococcus aureus* α -hemolysin and erythrocytes membrane by hydrolysable tannins: structure-related activity study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 7 jul. 2020.

RANI, N. et al. Inhibition of Pore Formation by Blocking the Assembly of *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin Through a Novel Peptide Inhibitor: an In Silico Approach. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, n. 4, p. 575–583, 18 ago. 2014

SHOUKAT, W. et al. Design, Synthesis, characterization and biological screening of novel thiosemicarbazones and their derivatives with Potent Antibacterial and Antidiabetic Activities. **Journal of Molecular Structure**, v. 1320, p. 139614–139614, 18 ago. 2024.

