



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade antimicrobiana de peptídeos isolados ou combinados contra cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*.

Alessandra Godoi Cardoso Kostopoulos

Orientação: Dra. Simoni Campos Dias

Coorientação: Dra. Márcia Renata Mortari

Brasília, Distrito Federal.

2018



Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade antimicrobiana de peptídeos isolados ou combinados contra cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Strictu Senso* em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Animal.

Autora: Alessandra G. C. Kostopoulos

Orientação: Dra. Simoni Campos Dias

Coorientação: Dra. Márcia Renata Mortari

Brasília, Distrito Federal.

2018

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Dissertação de Mestrado

Alessandra Godoi Cardoso Kostopoulos

Título

Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade antimicrobiana de peptídeos isolados ou combinados contra cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*.

Comissão examinadora

Prof.^a Dra. Simoni Campos Dias
Presidente/Orientadora - UnB/UCB

Prof.^a Dra. Márcia Renata Mortari
Coorientadora - UnB

Prof.^o Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior
Membro titular – interno/UnB

Prof.^o Dr. Octávio Luiz Franco
Membro titular – externo/UCB

Prof.^a Dra. Jacqueline Coimbra Gonçalves
Suplente - UniCEUB

Brasília, Distrito Federal.

2018

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus por me dar colo todas as vezes que necessito. Por segurar minhas mãos quando me perco em meio à multidão. Por ser meu amigo fiel, confidente e por ouvir, pacientemente, todas as minhas queixas. Por me amar sem nada querer. Por não me deixar desistir da missão. A ti, Pai Celestial, toda gratidão.

Tocando em frente

(Almir Sater e Renato Teixeira)

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais.
Hoje, me sinto mais forte mais feliz, quem sabe.
Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei.
Ou nada sei...

Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso chuva para florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou.
Estrada eu sou.

Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso chuva para florir

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora
Um dia a gente chega no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz...

Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso chuva para florir.



AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de me reeducar todos os dias.

À professora Doutora Simoni Campos Dias pelo carinho de mãe, paciência e bom humor que sempre elevam nossa autoestima. Agradeço pelas palavras de encorajamento durante esses anos em que estive ao meu lado instruindo-me e acreditando no meu potencial. Obrigada por não desistir de mim. Só você sabe o quanto foi difícil chegarmos até aqui. Mas o seu amor pelo trabalho é remédio para os alunos aflitos, adoecidos e desencorajados. A ti, toda minha admiração, respeito e gratidão.

À professora Doutora Márcia Renata Mortari por ter me acolhido e confiado a mim o desafio da pesquisa, pelo apoio nos momentos de dificuldades durante essa longa e difícil caminhada sempre acreditando que eu conseguiria. Sou grata pela paciência, palavras de força e carinho.

À professora Doutora Luciana de Mendonça Galvão pelo apoio ofertado sempre que necessitei. Pelo carinho, amizade e palavras de conforto. Seu profissionalismo e competência são fontes de inspiração.

Ao senhor Ioannis Stavros Kostopoulos (*in memoriam*) pelas palavras de conforto, apoio nas tarefas domésticas, pelas palavras de força e por acreditar no meu potencial. Obrigada pelo amor que me ofertou gratuitamente e por ter estado ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida. Sua ausência é dolorosa, mas o amor que temos um pelo outro é a força que me move. Não desistir e ir adiante! Obrigada pelos ensinamentos que, hoje, me impulsionam a não desistir.

Aos amigos do laboratório Maurício, Stella Maris, Mariana Dorneles, Ana Paula Cantuária, Nicole, Kamilla Sampaio, Camila Campos, Kamilla Suellen, Bel, Osmar, Liana, Rayssa Oliveira, Andreza Maria, Sthepan, Arthur (Vulgo magrelo), Dianny, Michel, Ingrid, Mirna, Thuany, Gisele, Marcelo, Seba e em especial a Loiane Alves a quem devo parte deste trabalho, pois, sem ela eu teria desistido no início. Mas, como uma mãe ajuda um filho a segurar o lápis da maneira correta, ela me ensinou a manusear todos os materiais e equipamentos do laboratório.

À Camila Guimarães Freitas pelo exemplo de ser humano. Pessoa ímpar, sublime, amorosa, de espírito elevado e bem instruído. Você é minha fonte de inspiração!

Aos técnicos Lucas, Adevilton e Kênia pelo excelente trabalho prestado, pelo carisma, respeito e auxílio nos momentos em que as dúvidas surgiam.

À Mara pela amizade, competência e agilidade na resolução de problemas, pelas terapias gratuitas ofertadas quando o desespero sobrevinha.

Aos amigos da segurança pelo carisma com que nos auxilia, aos colegas da limpeza que sempre mantêm os espaços limpos e organizados e a amiga do cafezinho pelo maravilhoso café que me despertava nas horas de cansaço, fome e sono.

Aos amigos São Paulinos roxo (Fernando) e rosa (Maurício), pelos momentos de muita descontração durante os dias tensos em que tudo parecia dar errado. Principalmente para o time de vocês.

Ao amigo Doutor Mohammad Jalal pelos medicamentos fornecidos para este estudo e, principalmente, pelos cuidados com a minha saúde quando eu estava fragilizada.

À Doutora Julianna Passos pelos cuidados com minha saúde mental, preocupação e dedicação para que eu pudesse retomar a vida e não desistir. Obrigada pelas palavras de força, pelas preces e carinho nos momentos em que o desespero parecia me consumir. Sem você eu não conseguiria voltar a sorrir. Tão pouco viver.

À Doutora Míriam pelo carinho, dedicação, amor e pelas longas horas em que se doou em meu favor ouvindo pacientemente todas as minhas queixas. Sem você eu não conseguiria finalizar este projeto e seguir adiante.

Aos amigos do Biotério Vanessa, Eliane e Adriana sem os quais parte deste estudo não teria dado certo.

Aos meus irmãos por todo amor dedicado, pelas brincadeiras e palavras de conforto. Aos meus pais José Cardoso (*in memoriam*) e Maria que, juntos, me ensinaram que no caminho haveria pedras, mas que eu seria capaz de removê-las mesmo que parecessem gigantes. Amo-os profundamente!

Ao meu amado esposo Christos Ioannis Kostopoulos pelo companheirismo, compreensão e, principalmente, pelo amor e dedicação para que eu não desistisse da caminhada.

KOSTOPOULOS, A. G. C. **Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade antimicrobiana de peptídeos isolados ou combinados contra cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae***. Brasília, 2018. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília.

RESUMO

O surgimento de estirpes com resistência múltipla aos fármacos mais potentes é motivo de preocupação dos profissionais de saúde e de toda comunidade científica reforçando a necessidade de formulação de novos medicamentos ou terapias coadjuvantes capazes de inibir a rápida proliferação de microrganismos multirresistentes. Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como uma alternativa farmacológica podendo ser estudados isolados ou associados a outros antibióticos. Neste trabalho foi avaliado, *in vitro*, o efeito isolado e combinado dos peptídeos Synoeca-MP e IDR-1018 contra isolados clínicos multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* (Kp1410503; Kp1536816; Kp2016295 e Kp2177569 – LACEN). Além disso, o peptídeo Synoeca-MP também foi avaliado *in vitro* quanto a sua capacidade de combinação com antimicrobianos pertencentes a três classes distintas revelando atividade sinérgica quando combinado ao antimicrobiano levofloxacina. Nos experimentos *in vivo*, foi observada uma alta mortalidade de camundongos BALB/c quando os mesmos foram inoculados com as concentrações do peptídeo Synoeca - MP 0,64 mg.kg⁻¹; 6,4 mg.kg⁻¹; 12,8 mg.kg⁻¹ e 19,2 mg.kg⁻¹, definidas *in vitro* após a definição da Concentração Inibitória Mínima (CIM), levando todos os animais a óbito em até 24 horas demonstrando a necessidade de análises complementares e/ou a utilização de outras concentrações para uma melhor avaliação da atividade antimicrobiana de Synoeca-MP *in vivo*.

Palavras chaves: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobiano, multirresistência, peptídeos, interação farmacológica de fármacos.

ABSTRACT

The emergence of strains with multiple resistance to the most potent drugs is a motive for concern of health professionals and the entire scientific community reinforcing the need of formulation of new drugs or adjuvant therapies capable of inhibiting the rapid proliferation of multiresistant microorganisms. In this context, antimicrobial peptides (PAMs) appear as a pharmacological alternative and can be studied isolated or associated with other antibiotics. This work was evaluated *in vitro* effect isolated and combined of the peptides Synoeca - MP and IDR - 1018 against multi-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* (Kp1410503; Kp1536816; Kp2016295 and Kp2177569 - LACEN). In addition, the Synoeca peptide was also evaluated *in vitro* for its ability to combine with antimicrobials belonging to three distinct classes revealing synergistic activity when combined with the antimicrobial levofloxacin. In the *in vivo* experiments, a high mortality of BALB/c mice was observed when they were inoculated with the concentrations of Synoeca – MP peptide 0,64 mg.kg⁻¹; 6,4 mg.kg⁻¹; 12,8 mg.kg⁻¹ and 19,2 mg.kg⁻¹, defined *in vitro* after the definition of the Minimal Inhibitory Concentration (CIM), leading to all deaths within 24 hours, demonstrating the need for complementary analyzes and / or the use of other concentrations for a better evaluation of the antimicrobial activity of Synoeca-MP *in vivo*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial, multiresistance, peptides, drug interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Microscopia Eletrônica de Varredura de *Klebsiella pneumoniae*, apresentando algumas características morfológicas estruturais. (Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/219907-overview#a4>.....18
- Figura 02:** (A) Colônias de *Klebsiella pneumoniae* crescendo em meio LB ágar (Invitrogen) apresentando aspecto mucoide. (B) – Colônias de *Klebsiella pneumoniae* em meio MacConkey Agar (Medium Himedia).....19
- Figura 03:** Fatores de virulência caracterizados em *Klebsiella pneumoniae*. É possível localizar na imagem a Cápsula, LPS, Fímbrias (Tipo 1 e Tipo 3) e sideróforos presentes nas superfícies de espécies clássicas (Imagem superior) e de estirpes hipervirulentas (imagem inferior).....23
- Figura 04:** Estrutura do lipopolissacarídeo mostrando os três componentes: lipídio “A”, oligossacarídeo e antígeno O.....25
- Figura 05:** Classes de antibacterianos mais prescritos mundialmente e seus sub grupos (A) Estrutura do anel β -lactâmico e antibióticos que possuem esse anel em sua estrutura conformacional, dentre eles as penicilinas (B) e as cefalosporinas (C). Imagens reproduzidas de ROSÁRIO and GRUMACH (2006). Figura (D) carbapenêmicos e (E) monobactâmicos. Imagens reproduzidas de WILLIAMS, J.D, 1999.....32
- Figura 06:** Figura representa o modo de interação dos peptídeos antimicrobianos com as membranas celulares. Adaptado de NGUYEN *et. al.*, 2011.....40
- Figura 07:** Representação esquemática da placa de Elisa de 96 poços para avaliar o efeito antimicrobiano dos fármacos em combinação e em diferentes concentrações pela Técnica *Checker-board*. Como controle do meio de cultura foi usado somente meio LB; no controle negativo meio LB mais 5×10^4 UFC.mL⁻¹ e no controle positivo $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de amicacina, meio LB e 5×10^4 UFC.mL⁻¹. Ex: Levofloxacina + Synoeca – MP contra *Klebsiella pneumoniae* Kp2177569.....55
- Figura 08.** Gel de agarose 1,5% para análise das amplificações de PCR. MM - marcador de peso molecular. Linha 1: Controle positivo *K. pneumoniae* Kp1412719.; Linha 2: Controle negativo *K. pneumoniae* ATCC 13883; Linha 3: *Klebsiella pneumoniae* Kp1410503; Linha 4: *Klebsiella pneumoniae* kp2177569. Linha 5: *Klebsiella pneumoniae* Kp2016816, Linha 6: *Klebsiella pneumoniae* kp1536816.....61

Figura 09: Curva de sobrevida de camundongos C57BL/6 com septicemia experimental por *K. pneumoniae*. Grupos de animais tratados com diferentes concentrações da bactéria variando de $\sim 2,9 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ a $\sim 2,9 \times 10^{12}$ UFC.mL⁻¹
Grupo controle: não infectados (Sem tratamento).....68

Figura 10: Curva de sobrevida de camundongos C57BL/6 com septicemia experimental por *K. pneumoniae* após tratamento com peptídeo Synoeca – MP. Grupos controles: *K. pneumoniae* (10^8), Amicacina (6,4 mg.kg⁻¹), Solução fisiológica e grupo Sem tratamento. Grupos tratados com as quatro diferentes concentrações do peptídeo Synoeca-MP (0,64 mg.kg⁻¹ a 19,2 mg.kg⁻¹).....69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01.** Principais classes de antimicrobianos utilizados na prática clínica, mecanismo de ação e principais representantes.....29
- Tabela 02:** Reagentes e as concentrações utilizadas no *mix* da reação de PCR para a amplificação das sequencias de carbapenemases.....48
- Tabela 03.** Gene e sequencia dos *primers* a serem amplificados na reação de PCR. Sequência dos *primers* Forward (KPCF) e Reverse (KPCR).....48
- Tabela 04:** Delineamento experimental dos grupos de animais para definição da concentração bacteriana a ser utilizada no experimento definitivo e os grupo controle Sem tratamento (não receberam nada/controle do ambiente). Os animais dos tratamentos T1 a T5 receberam 200 µL da concentração de *K. pneumoniae*58
- Tabela 05:** Características observadas nas curvas de crescimento microbiano das diferentes cepas de *K. pneumoniae* utilizadas neste estudo, representando o início da fase *Lag*, metade da fase *Log*, e número de UFC de todas as cepas utilizadas neste estudo.....62
- Tabela 06:** CIMs obtidas quando o peptídeo Synoeca – MP foi avaliado contra diferentes isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes.....63
- Tabela 07:** Concentração Inibitória Mínima do peptídeo IDR - 1018 contra os isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes quando testado a concentração máxima de 128 µg.mL⁻¹ (Resultados da atividade antimicrobiana de três réplicas biológicas)64
- Tabela 08:** Resultados da atividade antimicrobiana de cada fármaco contra cepa de *K. pneumoniae* kp2177569.....64
- Tabela 09:** Resultado da interação por *Checker-board* entre Synoeca - MP e levofloxacina, amicacina e ceftazidime bem como da combinação de Synoeca-MP e IDR-1018. Todos os fármacos foram testados contra a cepa de *Klebsiella pneumoniae* Kp2177569 em três ensaios independentes para cada um dos fármacos.66
- Tabela 10:** Média de sobrevida dos animais tratados com o peptídeo Synoeca – MP e tempo médio de sobrevida observados após a indução da infecção por *K. pneumoniae* Kp1410503 e o tratamento.70

GRÁFICOS

Gráfico 01: Ensaio hemolítico utilizando as concentrações de 1 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do peptídeo Synoeca-MP. O percentual de hemólise foi determinado a partir do controle positivo (Triton X -100, 0,1%) e controle negativo (Solução salina).....72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. RESISTÊNCIA MICROBIANA: UM DESAFIO CONSTANTE.	16
1.2. AGENTE ETIOLÓGICO: <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	18
1.2.1. FATORES DE VIRULÊNCIA	23
1.3. RESISTÊNCIA DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	26
1.4. ANTIMICROBIANOS E MECANISMOS DE AÇÃO.....	29
1.4.1. Cefalosporina.....	32
1.4.2. Aminoglicosídeos	34
1.4.3. Quinolonas	35
1.5. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COMO ALTERNATIVA FARMACOLÓGICA.....	37
2.0. JUSTIFICATIVA	44
3.0. OBJETIVOS	45
3.1. GERAL	45
3.2. ESPECÍFICOS.....	45
4.0. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. BACTÉRIAS UTILIZADAS NO ESTUDO	47
4.2. DETECÇÃO MOLECULAR DE GENES CARBAPENEMASES.....	47
4.3. CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS MULTIRRESISTENTES DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	49
4.4. PEPTÍDEOS SINTÉTICOS SYNOECA - MP E IDR - 1018: OBTENÇÃO, ANÁLISE DA PUREZA, QUANTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO.	50
4.5. ANTIMICROBIANOS AMICACINA, LEVOFLOXACINA E CEFTAZIDIME: OBTENÇÃO, PREPARO E ARMAZENAMENTO.	51
4.6. AVALIAÇÃO, <i>IN VITRO</i> , DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS SYNOECA - MP E IDR - 1018 CONTRA CEPAS CLÍNICAS DE <i>K. PNEUMONIAE</i>	51
4.7. DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ANTIBIÓTICOS AMICACINA, CEFTAZIDIME E LEVOFLOXACINA CONTRA <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	53
4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COMBINADA DE FÁRMACOS – <i>CHEKER-BOARD</i> (TABULEIRO DE XADREZ).	53
5. EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VIVO</i> – MODELO DE INFECÇÃO GENERALIZADA (SEPTICEMIA).....	56
5.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	56
5.2. ANIMAIS	56
5.3. PREPARO DA CARGA BACTERIANA PARA INDUÇÃO DA INFECÇÃO SISTÊMICA – DEFINIÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA... ..	57
5.4. INOCULAÇÃO, <i>IN VIVO</i> , DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO PEPTÍDEO SYNOECA – MP	58
5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	59
5.6. RECUPERAÇÃO DA CARGA BACTERIANA	60
6. RESULTADOS	61
6.1. DETECÇÃO MOLECULAR DE GENES CARBAPENEMASES.....	61
6.2. CURVAS DE CRESCIMENTO DAS CEPAS Kp2177569; Kp1410503, Kp2016816 E Kp1536816.....	62
6.3. ENSAIOS ANTIMICROBIANOS COM OS PEPTÍDEOS SYNOECA – MP E IDR - 1018 CONTRA AS CEPAS MULTIRRESISTENTES DE <i>K. PNEUMONIAE</i>	62
6.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FÁRMACOS AMICACINA, CEFTAZIDIME E LEVOFLOXACINA CONTRA A CEPA Kp2177569 DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	64
6.5. BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS <i>CHEKER-BOARD</i> - (TABULEIRO DE XADREZ).....	65
6.6. DEFINIÇÃO DA CARGA BACTERIANA DE INFECÇÃO INDUZIDA PARA POSTERIOR TRATAMENTO COM SYNOECA-MP.....	67

6.7. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PEPTÍDEO SYNOECA - MP EM CONTROLAR UMA INFECÇÃO SISTÊMICA EXPERIMENTAL CAUSADA POR <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> MULTIRRESISTENTE (Kp1410503).....	68
6.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	70
7. RECUPERAÇÃO DA CARGA BACTERIANA	71
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	72
9. DISCUSSÃO	73
10. CONCLUSÕES	80
11. PERSPECTIVAS:	81
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
13. ANEXOS	108
ANEXO 01. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE DAS CEPAS DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> QUE FORAM SELECIONADAS PARA SEREM UTILIZADAS NESTE ESTUDO CONTRA VÁRIAS CLASSES DE ANTIBIÓTICOS.....	108

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resistência microbiana: um desafio constante.

O surgimento generalizado de agentes bacterianos patogênicos resistentes a múltiplos fármacos representa um desafio de saúde pública em todo o mundo (World Health Organization, 2014). A resistência bacteriana aos antimicrobianos deve-se, principalmente, a capacidade de adaptação genética frente às mudanças ocorridas no ambiente (SILVEIRA *et. al.*, 2006), sendo um fenômeno ecológico que ocorre, principalmente, em resposta ao amplo uso desses fármacos (LEVY, 2001). Além do aumento destes microrganismos resistentes em ambiente hospitalar, o número de casos na comunidade vem aumentando a cada ano (STEFANIUK *et. al.*, 2016; World Health Organization, 2014), graças à capacidade que as bactérias possuem de trocar material genético entre as diversas linhagens e de se adaptarem frente a agentes químicos potentes (LEVY, 2001; FERNANDES, 2006).

No final dos anos 20, com o desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos e outros meios de combate a infecções, bem como o advento da penicilina, culminou em uma situação mais favorável aos seres humanos. Porém, as bactérias reagiram e rapidamente criaram novos mecanismos de resistência capazes de degradar os fármacos recém-criados (TENOVER, 2006). Os antibióticos lançados após a Segunda Guerra Mundial, rapidamente perderam a sua eficácia. Os análogos penicilínicos metilina e cefalosporinas, tetraciclinas e eritromicinas foram aos poucos se tornando limitados devido ao surgimento de microrganismos resistentes (SILVEIRA *et. al.*, 2006).

Os fatores que contribuem para o aumento da resistência aos antimicrobianos vão desde uma terapia inadequada de pacientes infectados, a um atraso na iniciação da antibioticoterapia apropriada. Esses fatores associados à falta de cuidados básicos no ambiente hospitalar e o uso indiscriminado de fármacos favorecem o surgimento de cepas resistentes (SILVEIRA *et. al.*, 2006; TENOVER, 2006; BARROS *et. al.*, 2012).

Compreender os processos relacionados à resistência microbiana, à ação dos antimicrobianos, a avaliação farmacológica de agentes mais efetivos e sua aplicação terapêutica de forma racional, controle das infecções nosocomiais bem como a aplicação de cuidados básicos no meio hospitalar representam medidas imprescindíveis para o combate à resistência aos antimicrobianos (OLIVEIRA *et. al.*, 2016, SILVEIRA *et. al.*, 2006).

Além disso, a falta de cuidados nas unidades de saúde, como lavar as mãos após a manipulação de objetos ou de pacientes hospitalizados, por exemplo, reduziria consideravelmente a pressão seletiva que contribui para o surgimento de cepas resistentes (TENOVER, 2006). A adoção de um controle rígido na utilização de antimicrobianos a partir de diagnósticos que de fato justifiquem sua real necessidade também contribuiria para a redução da resistência aos antimicrobianos (SILVEIRA *et. al.*, 2006). Conhecer os mecanismos de ação dos fármacos e a importância dos mesmos para o tratamento do paciente é fundamental.

As bactérias continuarão a desenvolver mecanismos de resistência aos fármacos antibacterianos existentes atualmente, seja por mutações ou recombinação genética. Essa possibilidade preocupa a medida que aumenta o número de cepas, antes sensíveis, mas que passam a adquirir a capacidade de resistirem aos antimicrobianos. Muitos patógenos bacterianos expressam múltiplos mecanismos de resistências aumentando a morbidade humana e elevando os custos financeiros para tratamento das infecções por eles causadas (TENOVER, 2006). No Brasil, a resistência aos antimicrobianos em *Enterobacteriaceae*, por exemplo, consiste num problema emergente e que requer ações rigorosas e medidas de controle de infecções, bem como o uso racional de antibióticos em humanos e animais (SAMPAIO *and* GALES, 2016).

A luta para criar novos compostos antimicrobianos deve ser contínua uma vez que fármacos que lideram a lista dos mais vendidos e utilizados podem tornar-se obsoletos à medida que os microrganismos criam estratégias de resistência. Neste contexto, compreender os mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana (WRIGHT, 2005) é fundamental para a descoberta de novas ferramentas capazes de combatê-la (SILVEIRA *et. al.*, 2006; LEVYHARA *et. al.*, 2013).

1.2. Agente etiológico: *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* foi designado por Trevisan, em 1885, para homenagear o microbiologista alemão Edwin Klebs, sendo *Klebsiella pneumoniae* a espécie representante do gênero e pertencente à Família *Enterobacteriaceae* (QURESHI, 2017; BRISSE *et. al.*, 2006) (Figura 1). Esta estirpe foi isolada pela primeira vez dos pulmões de pacientes que foram a óbito após pneumonia. Denominada, inicialmente, de *Friedlander's bacillus* e renomeada, posteriormente de *Klebsiella*, é descrito como um microrganismo saprofítico que coloniza o trato gastrointestinal humano, pele e nasofaringe, vias urinárias, trato biliar causando por vezes, osteomielite e bacteremia (BAGLEY, 1985; PODSCHUN *and* ULLMANN, 1998; VARALDO, 1988).

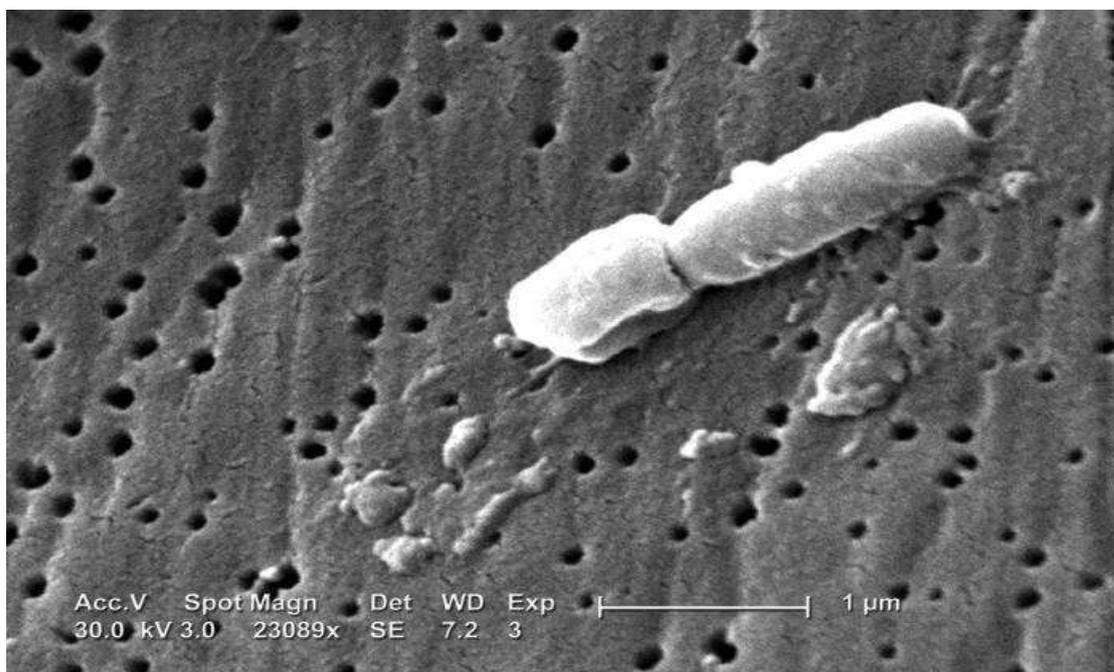


Figura 1 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *Klebsiella pneumoniae*, apresentando algumas características morfológicas estruturais. (Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/219907-overview#a4>)

Bacilo Gram-negativo, não móvel e não esporulado, *K. pneumoniae* faz parte da flora intestinal normal de mamíferos, podendo ser encontrada também em plantas, solo e águas superficiais (PODSCHUN *et. al.*, 2001). Este

microrganismo pode causar infecções severas em imunocomprometidos, crianças e idosos. Além disso, são responsáveis por infecções nosocomiais graves adquiridas como pneumonia e infecções do trato urinário, sendo comumente isoladas em septicemias e pneumonias (BRISSE *et. al.*, 2009), e considerado um dos patógenos mais comuns em infecções hospitalares (LANDMAN *et. al.*, 2007) perdendo apenas para *Escherichia coli* (GHANDIRI *et. al.*, 2012; LV *et. al.*, 2014). Também há relatos de que essa estirpe tem sido responsável por infecções adquiridas na comunidade (PACZOSA & MECSAS, 2016; HU *et. al.*, 2016).

K. pneumoniae apresenta melhores condições de crescimento em ambientes aeróbios. Produz colônias com aspecto mucoso em meio Luria-Bertani (LB) ágar (Figura 2 A) e rosadas e mucoides quando inoculado em meio seletivo MacConkey (Figura 2 B)..

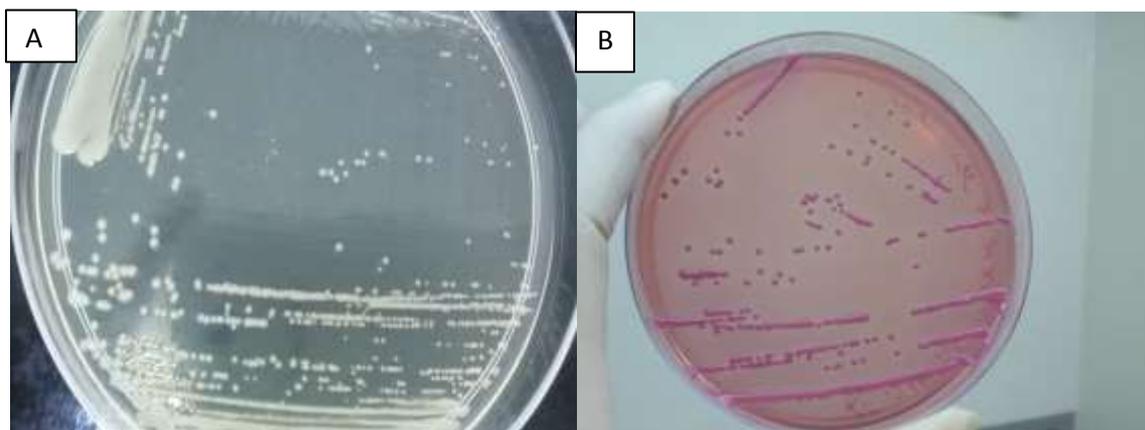


Figura 2 (A) - Colônias de *Klebsiella pneumoniae* crescendo em meio LB ágar (Invitrogen) apresentando aspecto mucóide. (B) – Colônias de *Klebsiella pneumoniae* em meio MacConkey Agar (Medium Himedia). Foto: KOSTOPOULOS, 2015.

Considerado um agente oportunista (CHAPMAN, 1946; JONES, 2010; SCAPARE *et. al.*, 2009) é capaz de sobreviver por longos períodos em superfícies secas e na pele humana (PERNA *et. al.*, 2015).

Outro fator a ser considerado é a capacidade de *K. pneumoniae* colonizar pacientes vítimas de queimaduras. Entre os anos de 2000 a 2010 essa bactéria esteve entre as cepas mais isoladas em pacientes queimados estando atrás apenas de *Pseudomonas aeruginosa* (AZZOPARDI *et. al.*, 2014).

Procedimentos invasivos e a utilização de glicocorticoides são fatores que elevam a incidência de infecções de corrente sanguínea por *K.*

pneumoniae causando a morte de inúmeros pacientes (LV *et. al.*, 2014; WANG *et. al.*, 2016). Além disso, essa bactéria também é responsável por infecções do trato urinário, estando relacionada a um grande número de casos relatados em 2009 tornando-se uma causa proeminente de infecções em indivíduos com cateteres urinários (RONALD 2002, FRANK *et. al.*, 2009) estando diretamente ligada a cerca de 70% de casos de infecções em pacientes com cateterismo (NIVEDITHA *et. al.*, 2012). Num estudo realizado em um Hospital Escola na cidade de Maringá, Paraná, Brasil, entre os anos de 2013 e 2014, *K. pneumoniae* foi o segundo microrganismo responsável pelos casos de infecção urinária, cerca de 54,1% das amostras coletadas na urina de pacientes hospitalizados eram por essa cepa. Além disso, 26,2% das infecções de corrente sanguínea, 8,2% de infecções obtidas de secreções e 4,9% obtidas de cateteres também eram causadas por *K. pneumoniae* (OLIVEIRA *et. al.*, 2016).

Há uma incidência muito grande de infecções por *Klebsiella pneumoniae* em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) acometendo entre 6% e 17% dos pacientes principalmente os que apresentam diabetes mellitus ou bexigas neuropáticas (LYE *et. al.*, 1992; BENNETT *et. al.*, 1995). Nos Estados Unidos, em 2013, por exemplo, infecções por essa bactéria foram consideradas elevadas em UTIs onde as internações se davam por longos períodos que aquelas hospitalizações de curto prazo (LIN *et. al.*, 2013). Essa cepa, altamente resistente a inúmeros antimicrobianos têm sido relacionada com infecções graves provenientes de surtos hospitalares acometendo adultos e neonatos principalmente nestes locais (CASSETTARI 2006; PERNA *et. al.*, 2015).

A maioria das infecções associadas a diferentes dispositivos médicos como os urinários ou intravasculares foram causadas por *K. pneumoniae* multirresistente. Segundo Singhai e colaboradores (2012), em Israel, esta espécie foi a segunda mais comum respondendo por 10% das bacteremias associadas a cateteres intravasculares, perdendo apenas para *Staphylococcus aureus* que acometeu 30% dos pacientes.

Em Pequim, na China, um estudo revelou que *K. pneumoniae* ESBL (Betalactamase de Espectro Estendido) positivo apresentaram maiores taxas de resistência à maioria dos antibacterianos que as ESBL negativo. Os pacientes infectados por essas estirpes ESBL eram provenientes de UTI e

havia estado na mesma sala, demonstrando a fácil disseminação das cepas em ambiente nosocomial (WANG *et. al.*, 2013). Essa bactéria causou 11,3% de infecções sanguíneas entre os anos de 2011 e 2012 na China. Neste país, 53,3% dos isolados dessa estirpe eram ESBL o que conferia a estas cepas a capacidade de degradar uma variedade de fármacos tais como penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (LV *et. al.*, 2014).

Em outro estudo realizado entre janeiro de 2012 e dezembro de 2015 em Shanghai na China, mais de 80 estirpes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes hospitalizados e que estavam associadas a infecções de corrente sanguínea foram analisadas. Comprovou-se que mais de 50% das cepas eram resistentes a cefuroxima, ampicilina-sulbactam e piperacilina sendo a maioria delas ESBL e *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC). Os resultados do estudo preocupam a comunidade médica uma vez que um número crescente de microrganismos está adquirindo resistência a maioria dos antibióticos de rotina em unidades de tratamento à saúde (XIAO *et. al.*, 2017). Outro dado preocupante é o fato de que as taxas de resistência para meropenem, imipenem, amicacina, cefepime e ciprofloxacina determinadas em Shanghai entre 2012 e 2015 foram mais elevadas que as encontradas na vigilância de 2011 e 2012 (XIAO *et. al.*, 2017), comprovando a rápida disseminação de genes de resistência. Em estudos anteriores, *Klebsiella pneumoniae* já era o segundo bacilo Gram-negativo mais isolado em hemoculturas nesta região (ZHAO *et. al.*, 2014).

Nos anos de 2008 e 2009, foram registrados no Hospital Brigadeiro, um hospital que faz parte do Sistema Nacional de Saúde, em São Paulo (Brasil) 33 casos de infecções cujo agente causador era *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC). Destes, 42% eram referentes a infecções do trato urinário, 33% a infecções de corrente sanguínea, 21% apresentaram pneumonia e um paciente apresentava doença de pele. Também em Teresina, Piauí, nos anos de 2010 e 2011, um surto de *Klebsiella pneumoniae* em uma UTI neonatal de uma maternidade pública estava diretamente associada a transmissão através das mãos dos trabalhadores dessa Unidade de Saúde (PEREIRA *et. al.*, 2013).

Neste mesmo estudo, constatou-se que em 2010, o número de infecções de corrente sanguínea ocasionado por este microrganismo no

Hospital Brigadeiro havia sido consideravelmente maior que o diagnosticado em 2009.

Entre janeiro de 2010 e julho de 2011, dos 233 recém-nascidos internados na UTI deste hospital, 166 foram diagnosticados com IRAs (Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde) dos quais 21 eram causadas por *K. pneumoniae* ESBL resultando em 12 óbitos (LIMA *et. al.*, 2014).

O primeiro caso de *K. pneumoniae* KPC no Estado do Mato Grosso foi relatado em 2010 num paciente idoso com infecção urinária. Esta mesma cepa foi a causadora de outros casos de infecções no hospital HRMS - Hospital Regional do Mato Grosso do Sul - em 2009, período que coincide com surtos em diferentes regiões do país (BIBERG *et. al.* 2015). Em três hospitais públicos no Mato Grosso do Sul pôde ser visto o perfil de resistência da KPC – *Klebsiella pneumoniae*. Para ceftazidime, por exemplo, a taxa de perfil de resistência foi de 86,5% no hospital ABCG – Associação beneficente de Campo Grande, 91,7% no HRMS e de 88,5% no HUFMS Maria Aparecida Pedrossian Hospital Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. A maioria dos pacientes infectados por *K. pneumoniae* nestes hospitais e em Mato Grosso do Sul eram do sexo masculino, idade variando entre 55,4 a 60,7 anos. As amostras foram obtidas principalmente de cateteres, urina e aspirador traqueal. O que preocupa é que boa parte das cepas que transportam enzimas carbapenemases transportam outros genes de resistência (CAMPOS *et. al.*, 2017; PAVEZ *et. al.*, 2009; PENA *et. al.*, 2011).

Klebsiella pneumoniae foi considerada agente causadora importante de infecção no trato urinário, pneumonia e infecção sanguínea em pacientes de UTI em todo o Brasil (CAMPOS *et. al.*, 2017).

O uso excessivo de antimicrobianos pode potencializar a resistência por cepas de *K. pneumoniae* para os fármacos como as cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluorquinolonas e até mesmo carbapenêmicos (GUANA *et. al.*, 2014). Paralelamente, a adoção de medidas preventivas, como lavar as mãos, por exemplo, reduz de forma significativa a disseminação de cepas com resistência (LIMA *et. al.*, 2014).

1.2.1. Fatores de Virulência

A classificação dos isolados de *K. pneumoniae* é dada conforme serotipagem capsular (tipagem em *K*), utilizando-se antissoros específicos (PODSHUN *and* ULLMANN, 1998). Atualmente, existem 79 sorotipos capsulares descritos, porém a maioria das infecções em humanos é causada por um número limitado deles, ou seja, a maioria é pertencente aos sorotipos K1 e K2 (BRISSE *et. al.*, 2013), os quais são reconhecidos como hipervirulentos, causadores de infecções adquiridas na comunidade sob a forma de abscessos hepáticos piogênicos (STRUVE *et. al.*, 2015).

A cápsula (Figura 3) é uma camada densa de aproximadamente 160 nm de espessura constituída de fibras de polissacarídeos que protegem a bactéria de ambientes hostis (AMAKO *et. al.*, 1988). A presença da cápsula em estipes de *K. pneumoniae* é um dos mecanismos que confere resistência aos antimicrobianos aumentando a virulência das mesmas (MARCH *et. al.*, 2013) permitindo proteção contra a fagocitose, ataque de peptídeos antimicrobianos e a lise mediada pelas defesas do hospedeiro (MARTINO *et. al.*, 1995; PODSCHUN *and* ULLMANN 1998).

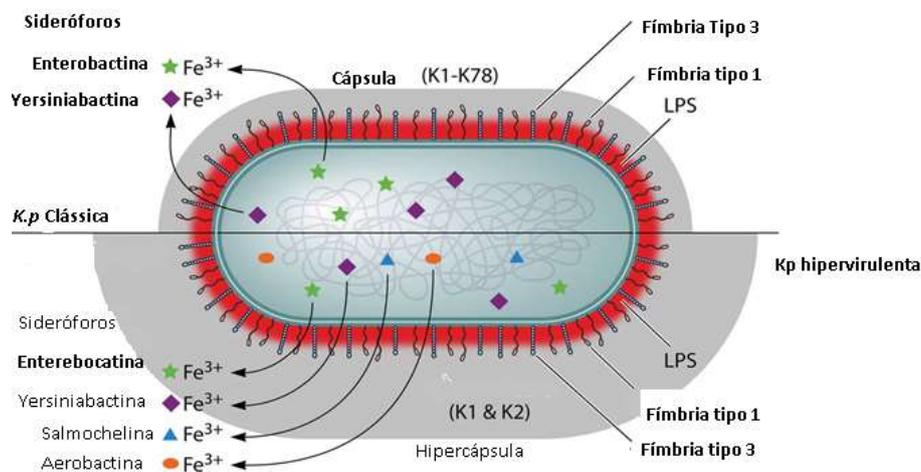


Figura 3: Fatores de virulência caracterizados em *Klebsiella pneumoniae*. É possível localizar na imagem a Cápsula, LPS, Fímbrias (Tipo 1 e Tipo 3) e sideróforos presentes nas superfícies de espécies clássicas (Imagem superior) e de estirpes hipervirulentas (imagem inferior).

Estirpes de *K. pneumoniae* clássicas produzem uma cápsula que pode ser de qualquer um dos sorotipos - K1 a K78, sendo que os sorogrupos K1 e

K2 estão associados ao aumento da patogenicidade. Estirpes virulentas amplificam a produção de material capsular (hipercápsulas) e são predominantemente do sorotipo K1 enquanto as demais são estirpes do sorotipo K2 (PACZOSA *and* MECSAS, 2016).

Todas as estirpes de *K. pneumoniae* são classificadas por seu tipo de sequência (STs) que são definidas pelas sequências de seus nucleotídeos em 7 Loci (*mdh*; *infB*; *tonB*; *gapA*; *phoE*, *rpoB*, *pgi*), sendo que as estirpes intimamente relacionadas são denominadas complexos clonais. Algumas cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* pertencentes ao complexo clonal 23, por exemplo, são capazes de codificar diversos fatores para virulência incluindo a produção de sideróforos que permitem que a bactéria capte ferro que é um elemento primordial para o seu crescimento e hipervirulência durante o ataque ao hospedeiro (STRUVE *et. al.*, 2015).

Num estudo usando modelo de infecção pulmonar em murinos percebeu-se que a perda do gene que codifica a aerobactina no sideróforo reduz, de forma significativa, a virulência e a disseminação das estirpes (RUSSO *et. al.*, 2015), corroborando com os dados de Struve e colaboradores (2015) que demonstraram a importância de sideróforos para o aumento da virulência.

Dentre outras formas de colonizar o hospedeiro, cepas de *K. pneumoniae* utilizam os pili do tipo I para aderir às mais diversas superfícies como as paredes das mucosas, sendo que a deleção de genes que sintetizam e regulam a expressão de pili tipo I reduz a virulência em modelos de infecção em ratos (MURPHY *et. al.*, 2013; ROSEN *et. al.*, 2015).

As estirpes de *K. pneumoniae* possuem uma camada de lipopolissacarídeo (LPS) o qual é composto por três subunidades principais: o lipídeo "A", um núcleo de oligossacarídeos e o antígeno O (Figura 4).

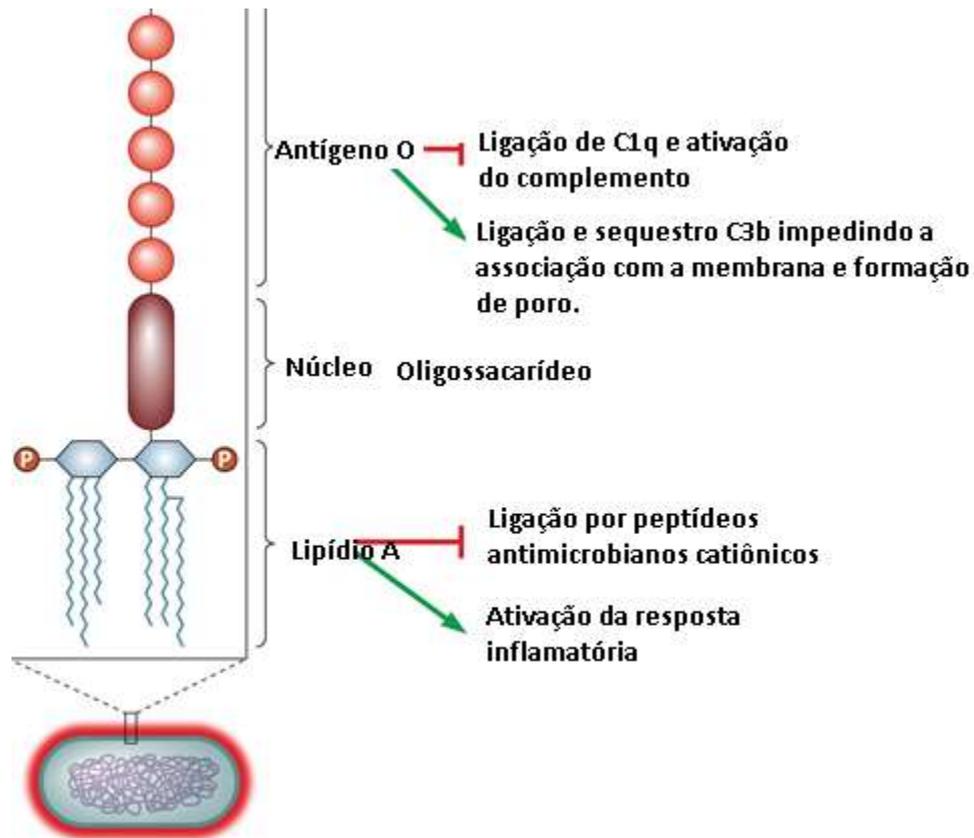


Figura 4: Estrutura do lipopolissacarídeo mostrando os três componentes: lipídio “A”, oligossacarídeo e antígeno O. (PACZOSA and MECSAS, 2016.)

O lipídeo “A” é um ativador da inflamação e está inserido na membrana bacteriana. Este lipídeo está envolvido na proteção da bactéria da ação bactericida de peptídeos antimicrobianos catiônicos. Além disso, *K. pneumoniae* é capaz de mudar a estrutura do lipídeo “A” para garantir a sobrevivência no hospedeiro, uma vez que esta estrutura pode ser reconhecida por células imunes (LLOBET *et. al.*, 2009). O antígeno O é a subunidade mais externa do LPS sendo importante na proteção contra o complemento. Esse antígeno sobressai à membrana externa formando um componente essencial da parede celular de bactérias Gram-negativas, sendo um fator importante para o aumento da virulência e resistência aos antimicrobianos (HANSEN *et. al.*, 1999)

A estrutura de LPS difere em cepas de *K. pneumoniae* e influencia na potência por ativar a primeira linha de defesa imunológica do hospedeiro denominada via do complemento. Padrões de polissacarídeos capsulares de algumas estirpes podem induzir a ativação da via do complemento de lectina através da interação com lectina de ligação manose - MBL (SAHLY *et. al.*,

2009) e isso ocorre devido o reconhecimento de polissacarídeos capsulares. Dessa forma, estirpes cujo as cápsulas não são tão proeminentes tornam-se alvos para uma maior deposição de C3b, sendo facilmente fagocitadas por células epiteliais do pulmão (ASTORZA *et. al.*, 2004). A perda de polissacarídeos capsulares inibe a virulência e, conseqüentemente, a perda da resistência (DOORDUJN *et. al.*, 2016).

1.3. Resistência de *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é considerada, pela Organização Mundial de Saúde e pelos Centros para o Controle e Prevenção de Doenças dos EUA, um microrganismo MDR (*Multidrug-resistant*), sendo caracterizado como uma forte ameaça à saúde humana devido, principalmente, à capacidade de produzir enzimas que degradam uma variedade de antimicrobianos (World Health Organization, 2014; European Centre for Disease Prevention and Control, 2010).

Nos anos 80, estirpes de *K. pneumoniae* já expressavam inúmeras penicilinasas cromossômicas, sendo capazes de captar plasmídeos de resistência a múltiplos fármacos conferindo, também, resistência aos aminoglicosídeos. Posteriormente, algumas cepas passaram a produzir as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), principalmente Temoniera (TEMs) e variável de Sulfidryl (SHVs) que são ativas contra cefalosporinas de última geração. Além disso, começaram a expressar uma variedade de genes que conferem resistência a diferentes β -lactâmicos (VARALDO *et. al.*, 1990; PODSCHUN *and* ULLMANN, 1998). Na Europa, 21,7% dos isolados clínicos de pacientes com algum tipo de infecção gerada por *K. pneumoniae* eram ESBL. Na América Latina, esse número foi de 42,7% e na América do Norte de 5,8% no ano de 2004 (BIEDENBACH *et. al.*, 2004). Na Grécia, em 2013, 60,6% das cepas de *K. pneumoniae* isoladas eram produtoras de Carbapenemases – KPC (DAIKOS *et. al.*, 2014).

As principais enzimas de importância clínica produzidas por estirpes de *K. pneumoniae* são as betalactamases de espectro estendido (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), metalobetalactamases (MBL) e

betalactamases Classe C (*AmpC*) as quais são capazes de degradar uma grande variedade de antimicrobianos amplamente empregados no tratamento de infecções graves (MEYER & PICOLI, 2011). Estirpes produtoras dessas enzimas têm se disseminado globalmente elevando os custos de tratamentos e aumentando as taxas de morbimortalidade (HAWKEY and JONES, 2009).

ESBLs são enzimas capazes de degradar a cadeia oximino-betalactâmico de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, exceto carbapenêmicos e são inibidas por clavulanato, sulbactam e tazobactam. A enzima *KPC*, a qual confere resistência à totalidade de betalactâmicos mesmo àqueles associados a inibidores de betalactamases, embora mais frequentemente isolada em *Klebsiella pneumoniae*, já foi relatada também em *Enterobacter* sp. e *Salmonella* sp. (MEYER & PICOLI, 2011).

A enzima MBL degrada betalactâmicos com exceção de aztreonam e é inibida por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o ácido 2-mercaptopropionico (2-MPA) (YONG *et. al.*, 2002). A enzima *AmpC* é capaz de hidrolisar betalactâmicos como penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas (até as de terceira geração) e tem sido frequentemente encontrada em *Klebsiella pneumoniae* (ROSSY *et. al.*, 2005).

Um estudo realizado em 23 cidades italianas mostrou que estirpes de *KPC* foram responsáveis pela disseminação epidêmica em Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos com uma propagação de estirpes do complexo clonal 258. Este complexo clonal está entre as estirpes mais difundidas em todo o planeta e trata-se de uma junção entre outras duas estirpes também muito conhecidas denominadas ST11 e ST442. Essa estirpe produz enzimas Carbapenemases denominadas KPC-2 e KPC-3. Atualmente, são conhecidas as enzimas KPCs variando de KPC-2 a KPC-17, sendo KPC-2 e KPC-3 as mais comuns dentre a variedade de enzimas *KPCs* codificadas (GIANI *et. al.*, 2013). A linhagem ST-258 é um exemplo de *K. pneumoniae* que transporta frequentemente, gene para Carbapenemase além de numerosos outros determinantes de resistência antimicrobiana (AMR) adquiridos sendo que esta cepa foi responsável por surtos em diversos continentes (PACZOSA and MECSAS, 2016).

Da mesma forma, as metalo- β -lactamases da classe B (dependentes de zinco – MBLs) representadas pelas metalo- β -lactamases (VIM) codificada pelo

integron Verona, as imipenases metalo- β -lactamase (IMP) e as metalo- β -lactamases New Delhi (NDM) são codificadas por plasmídeos sendo facilmente expandidas entre as bactérias uma vez que não dependem da proliferação clonal. Exemplo disso é a NDM – 1, originada na Ásia e que já se disseminou por diversos países no prazo de um ano após ser identificada, inicialmente, na Índia (MOLTON *et. al.*, 2013) e as Carbapenemases classe D (Conforme Classificação de Ambler), que são expressadas por plasmídeos oxacilinases–48 (OXA-48) (GRUNDMANN *et. al.*, 2010; TZOUVELEKIS *et. al.*, 2012).

Também são relatados casos de isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a todos os fármacos disponíveis (ELEMAN *et. al.*, 2009), como a cepa Kp1412719 doada à UCB pelo laboratório Central de Brasília (Anexo 1) que demonstrou resistência a todos os antimicrobianos testados.

O aumento de casos envolvendo *Klebsiella pneumoniae* com resistência múltipla aos fármacos mais utilizados na terapia antimicrobiana fez com que a colistina (polimixina E) fosse reintroduzida no tratamento de infecções por esta bactéria. No entanto, casos de cepas resistentes a colistina também já foram reportados (LIU *et. al.*, 2015; OLAITAN *et. al.*, 2014a). Este antimicrobiano tem sido a última opção terapêutica para o tratamento de infecções por KPC. Desta forma, o aumento da incidência de isolados de *Klebsiella* resistentes a colistina estão reduzindo as opções no tratamento de infecções ocasionadas por este microrganismo (OLAITAN *et. al.*, 2014b; NATION *et. al.*, 2015).

Estudos diversos comprovam que a ocorrência de mutações e perda de função do gene *mgrB*, que é um regulador negativo do sistema de sinalização PhoPQ que atua na remodelação do envelope, principalmente, no lipídio “A” (LPS) contribui para a resistência bacteriana ao sistema imune inato. O Sistema PhoPQ regula a plasticidade do lipídio “A”. A inativação desse gene resulta na resistência a colistina aumentando a virulência de *Klebsiella pneumoniae*, diminuindo a susceptibilidade a uma infinidade de peptídeos antimicrobianos e atenuando a ativação das respostas de defesa do hospedeiro (WRIGHT *et. al.*, 2015), com aumento da virulência (KIDD *et. al.*, 2017).

A resistência de *Klebsiella pneumoniae* a múltiplos fármacos limita as opções de tratamento que impeçam a disseminação de infecções causadas por esta bactéria. É urgente a necessidade de novas estratégias terapêuticas para

prevenir o aumento de infecções nosocomiais e adquiridas provocadas por esta bactéria. Vários fármacos tidos como os mais potentes estão se tornando obsoletos e ineficazes contra bactérias Gram-negativas devido à barreira da membrana externa (VAARA *et. al.*, 2010).

1.4. Antimicrobianos e mecanismos de ação

Os seres humanos são expostos frequentemente a uma infinidade de microrganismos os quais podem em algum momento, causar infecções quando conseguem driblar a ação protetora do sistema imune inato do hospedeiro. Dessa forma, surge a necessidade da elaboração de substâncias capazes de conter e/ou causar a morte de bactérias e fungos que podem ser danosos ao hospedeiro. Os antimicrobianos são compostos provenientes de fontes naturais e sintéticas e são capazes de atuarem inibindo o crescimento ou levando à bactéria a morte.

Desde o advento da penicilina em 1928, pelo cientista Alexander Flemming, novos fármacos foram sendo criados à medida que os anos avançavam. Estes fármacos eram utilizados de forma significativa no combate às infecções bacterianas sendo classificados como bactericidas, quando causavam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promoviam uma inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES *et. al.*, 2010).

Existem inúmeros fármacos antimicrobianos disponíveis para a comercialização, atualmente. Algumas classes são mais utilizadas e possuem maior número de representantes no comércio. As principais classes de antimicrobianos conhecidas e utilizadas na prática clínica são os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos), aminoglicosídeos, tetraciclínas, fenicóis, quinolonas, fluorquinolonas, sulfonamidas, macrolídeos, lincosamidas, glicopeptídeos, oxazolidinonas, clorafenicol, estreptograminas, glicilciclínas, gemifloxacina, daptomicinas e as polimixinas (Tabela 1) (GUIMARÃES *et al.*, 2010; ANVISA, 2017).

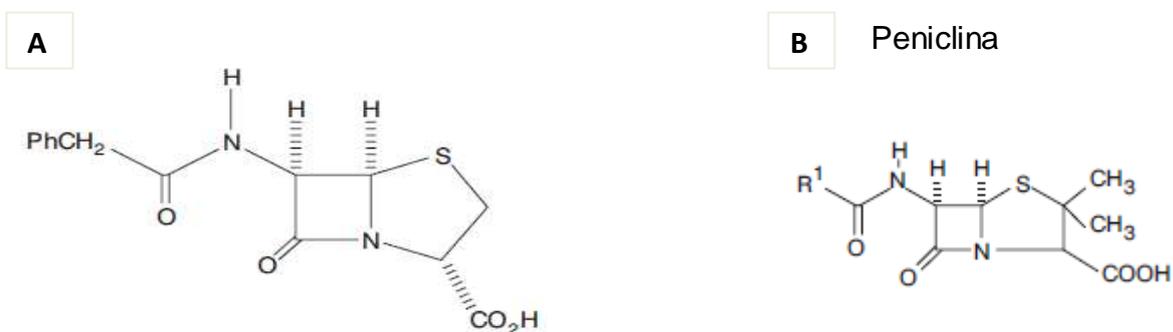
Tabela 1. Principais classes de antimicrobianos utilizados na prática clínica, mecanismo de ação e principais representantes. *Fármacos selecionados para este estudo.

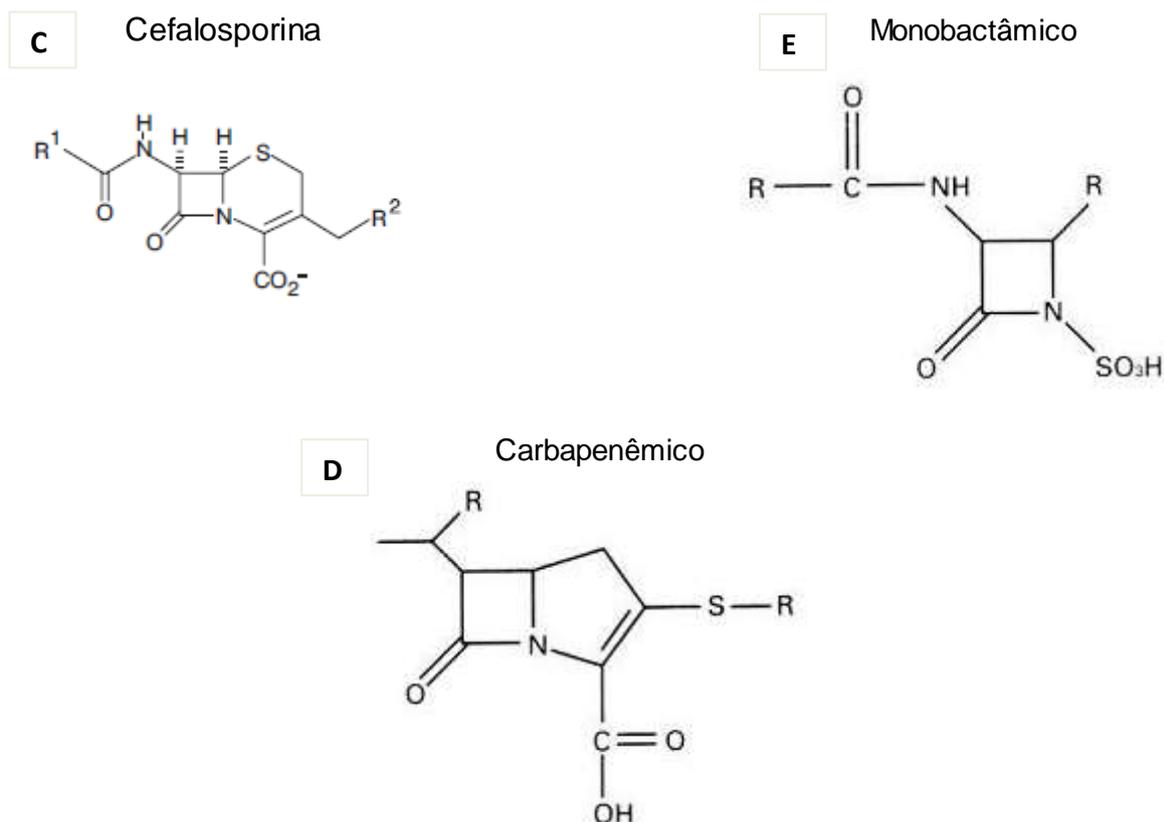
Classe de antibiótico	Mecanismo de ação	Representantes	Bibliografia
β-Lactâmicos	Inibição da síntese da parede celular (ligação às PBPs)	Penicilina (amoxicilina) cefalosporinas (cefalotina; *ceftazidima) Monobactâmicos (aztreonam) carbapenêmicos (imipenem; meropenem)	WORTHINGTON, 2013
Aminoglicosídeos	Interrupção da síntese proteica (ligação à subunidade 30S ribossomal)	*amicacina estreptomicina gentamicina	GOODMAN, 2010
Tetraciclinas	Interrupção da síntese proteica (ligação à subunidade 30S ribossomal)	tetraciclina	GOODMAN, 2010
Fenicóis	Interrupção da síntese proteica (ligação à subunidade 50S ribossomal)	cloranfenicol	GOODMAN, 2010
Quinolonas e Fluorquinolonas	Inibição da replicação do DNA (ligação às topoisomerasas II e IV)	ácido nalidíxico ciprofloxacina *levofloxacina	MONTEIRO, 2011
Macrolídeos	Inibição da síntese proteica (ligação à subunidade 50S)	eritromicina azitromicina	CUNHA, 2012
Lincosamidas	Inibição da síntese proteica (ligação à subunidade 50S)	clindamicina	PEREIRA, 2014
Glicopeptídeos	Inibição da síntese da parede celular (ligação ao resíduo dipeptídico terminal D-Ala-D-Ala do peptideoglicano)	vancomicina teicoplanina	MANFREDINI, 2011
Oxazolidinonas	Inibição da síntese proteica (ligação à subunidade 50S)	linezolida	VASCONCELLOS, 2015
Polimixinas	Desestabilização da membrana celular	Polimixina B colistina (polimixina E)	PINTO, 2011

As classes de antibacterianos mais prescritos mundialmente pertencem a quatro subgrupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (KATZUNG, 2010). Os β -lactâmicos (Figura 5) atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana em sua etapa de finalização os quais se ligam as proteínas de ligação da penicilina (PBPs), impedindo que sintetizem a camada de peptidoglicano, o qual confere rigidez a parede celular destes microrganismos. Estes fármacos possuem excelente perfil de segurança para o organismo humano, uma vez que atuam especificamente nas PBPs, presentes apenas em bactérias (WORTHINGTON *and* MELANDER, 2013).

Para este trabalho, daremos ênfase a três classes de antibacterianos distintos cujos mecanismos de ação são diferenciados frente à *Klebsiella pneumoniae*. São eles a levofloxacina (quinolona) que atua na Inibição da replicação do DNA (ligação às topoisomerasas II e IV) das bactérias, amicacina (aminoglicosídeo) que inibe a síntese de proteínas, ao ligarem-se à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, impedindo a leitura correta do RNA mensageiro e a cefalosporina de 3ª geração, ceftazidime, que atua na inibição da síntese da parede celular bacteriana seguida da fixação às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), resultando na interrupção da biossíntese da parede celular (peptidoglicano), que leva à lise e morte da célula bacteriana. A cepa selecionada para as análises de combinação de fármacos, Kp2177569, é, dentre as bactérias doadas pelo LACEN, a única que apresenta sensibilidade simultânea aos três fármacos escolhidos.

Anel betalactâmico





Figuras 5: Classes de antibacterianos mais prescritos mundialmente e seus subgrupos **(A)** Estrutura do anel β -lactâmico e antibióticos que possuem esse anel em sua estrutura conformacional, dentre eles as penicilinas **(B)** e as cefalosporinas **(C)**. Imagens reproduzidas de ROSÁRIO and GRUMACH (2006). Figura **(D)** carbapenêmicos e **(E)** monobactâmicos. Imagens reproduzidas de WILLIAMS, J.D., 1999.

1.4.1. Cefalosporina

As cefalosporinas são antimicrobianos pertencentes aos β -lactâmicos de amplo espectro. Quimicamente se assemelham às penicilinas apresentando o ácido 7-aminocefalosporânico (7 – ACA) como núcleo central. É constituída por um anel β -lactâmico e outro anel denominado di-hidrotiazina.

Obtida a partir de um fungo conhecido por *Cephalosporinum acremonium*, atualmente, denominado *Acremonium chrysogenum*, todas as cefalosporinas em uso clínico são derivadas semi – sintéticas de Ácido 7-aminocefalosporônico (7-ACA) da cefalosporina C isolada naturalmente. A prescrição e uso desta classe de antimicrobianos variam dependendo do país.

Somente na Dinamarca o uso dessa classe de antimicrobianos varia de 0,2% a 23,5% do total de fármacos prescritos (*European Centre for Disease Prevention and Control*, 2012).

Elas são classificadas em gerações, referentes à atividade antimicrobiana e características farmacocinéticas e farmacodinâmicas com a ordem de desenvolvimento e espectro de ação que ocorre devido alterações na cadeia lateral da estrutura química básica das cefalosporinas (NOEL, 2007).

As cefalosporinas de 1ª geração (cefalexina, cefazolina e cefalotina) são muito ativas contra cocos Gram-positivos tais como *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Sua atividade contra Gram-negativos é restrita aos bacilos das linhagens de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus mirabilis*. São indicadas para patologias como infecções urinárias, faringites, sinusites, infecções respiratórias, tonsilites e infecções da pele, provocadas por estas bactérias (CASTANHEIRA, 2013; DIAS, 2015).

As cefalosporinas de 2ª geração possuem atividade ligeiramente aumentada contra Gram-negativos do que as cefalosporinas de 1ª geração. No entanto, também não apresentam cobertura sobre *Enterococos*, *Estafilococos* resistentes à meticilina e *Pseudomonas aeruginosa*. Os principais representantes são: cefuroxima, cefoxitina, cefaclor e cefamandol (DIAS, 2015). Estão indicadas para infecções do trato respiratório, urinário e infecções da pele (CASTANHEIRA, 2013).

As cefalosporinas de 3ª geração incluem as cefalosporinas de amplo espectro e são mais potentes contra bacilos Gram-negativos. As principais representantes são: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefoperazona, cefixima (AZEVEDO, 2014; CASTANHEIRA, 2013). A cefixima não é degradada pelas enzimas β -lactamases e utilizadas no tratamento de infecções graves nosocomiais, infecções respiratórias e urinárias, meningites bacterianas por Gram-negativos (CASTANHEIRA, 2013).

A cefalosporina de 4ª geração possui maior espectro sobre Gram-negativos que as outras gerações e atua sobre *Pseudomonas aeruginosa* e algumas espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* que normalmente são resistentes às cefalosporinas de 3ª geração. No entanto, também não é ativa contra *Enterococos* e *Estafilococos* resistentes à meticilina. A maior

vantagem em relação às outras gerações é que esta apresenta elevada resistência à maioria das β -lactamases. A representante é a cefepima. Tem indicação para o tratamento de infecções nosocomiais graves (INFARMED, 2012; CASTANHEIRA, 2013).

As cefalosporinas de 5ª geração têm espectro de ação semelhante ao cefepime contra *Pseudomonas aeruginosa* e é efetiva contra *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina e a maioria das Enterobactérias sendo a ceftarolina uma de seus representantes (LOPES, 2012).

O mecanismo de ação está relacionado à inibição da síntese de um dos constituintes da parede celular das bactérias, o peptidoglicano, o qual é responsável por manter a integridade da parede bacteriana. Nas Gram-positivas, o polímero de peptidoglicano encontra-se superficialmente na célula permitindo que o composto se ligue mais facilmente as PBP's e com relação às Gram-negativas, o antibiótico deve penetrar através das porinas, localizadas na membrana externa da parede celular, e se ligar a receptores proteicos bacterianos, denominados PBPs (*Penicillin Binding Proteins*) ou transpeptidases e inativá-las. Assim, impedem a fase final da síntese da parede celular (AUTO, 2008).

O mecanismo de resistência pode ocorrer em função da alteração estrutural do sítio de ação (PBP), diminuição da permeabilidade da membrana externa, hidrólise por enzimas e por mecanismo de efluxo do antibiótico (CASTANHEIRA, 2013).

1.4.2. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são agentes que possuem um grupo amino básico e uma unidade de açúcar. O principal representante da classe, a estreptomicina, foi isolada em 1944 de *Streptomyces griseus* um microrganismo encontrado no solo. Apresentam atividade melhorada em pH em torno de 7,4, levemente alcalino, onde ficam carregados positivamente facilitando a interação contra Gram-negativos (PATRICK, 1995). Sua atividade está relacionada à sua ligação a subunidade 30S do ribossomo bacteriano

impedindo-o seu deslocamento sobre o mRNA e, conseqüentemente, interrompendo a síntese de proteínas microbianas (PATRICK, 1995; DURANTE-MANGONI *et. al.*, 2009) ou resultando na produção de proteínas defeituosas que ao serem incorporadas na membrana celular, afetam a permeabilidade e fazem com que haja um efluxo de moléculas e íons essenciais para a bactéria. Fazem parte dessa classe, a gentamicina, neomicina, ampicacina, netilmicina e estreptomicina (KOTRA, 2000; SHI *et. al.*, 2013).

Os aminoglicosídeos possuem grande atividade contra bacilos e cocos Gram-negativos aeróbios (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) e Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* apresentando efeito sinérgico com β -lactâmicos (WALSH, 2003). São indicados contra septicemias, infecções do trato urinário, endocardites, infecções respiratórias, infecções intra-abdominais, meningites em recém-nascidos, infecções oculares, osteomielites e infecções de articulações (SILVA & CARVALHO, 2007).

Os mecanismos de resistência bacteriana ligados aos aminoglicosídeos estão relacionados à alteração dos sítios de ligação no ribossomo, alteração na permeabilidade e a modificação enzimática do fármaco. Os genes, que conferem resistência, podem estar associados a plasmídeos ou em transposons, e não são induzidos pela presença do antimicrobiano (DRUSANO, 2007).

1.4.3. Quinolonas

Nos anos 60, com a introdução do ácido nalidíxico na prática clínica, as primeiras quinolonas começaram a ser utilizadas. Na década de 80, foi acrescentado um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico, surgindo assim as fluorquinolonas, com aumento do espectro para os bacilos Gram-negativos e boa atividade contra alguns cocos Gram-positivos. Porém, há pouca ou nenhuma ação sobre *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. e anaeróbios. Os principais representantes são as levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina e gemifloxacina (ALDRED *et. al.*, 2014).

O mecanismo de ação deste fármaco está relacionado ao bloqueio da síntese do DNA bacteriano ao inibir a topoisomerase IV e a topoisomerase II (DNA girase), enzima essencial à replicação e transcrição do DNA bacteriano. A inibição do DNA girase impede o relaxamento do DNA, o que é necessário para que ocorra a transcrição e replicação normais. Logo, não há síntese proteica, o que resulta na morte das bactérias (KATZUNG, 2010).

Cepas resistentes mostram alterações na enzima DNA girase, a qual passa a não sofrer ação do antimicrobiano. Pode se dar por mutação cromossômica dos genes responsáveis pelas enzimas alvo (DNA girase e topoisomerase IV) ou por atuação nas porinas, alterando a permeabilidade ao fármaco. Há a possibilidade de existir um mecanismo que aumente a retirada do interior da célula, como uma bomba de efluxo (GUIMARAES *et al.*, 2010; MINARINI, 2008).

A levofloxacina é um dos representantes dessa classe sendo indicada no tratamento de infecções do trato respiratório superior e inferior, trato urinário e osteomielite (SOUZA, 2010; ARBEX, 2010).

O Brasil é o quarto maior país em consumo de medicamentos do mundo, e o maior em números de drogarias/ farmácias. A introdução de medicamentos genéricos possibilitou que muitos brasileiros tivessem acesso a medicamentos de baixo custo e adquiridos em farmácias sem prescrição médica. (NOVARETTI; AQUINO; PISCOPO, 2014).

Um estudo realizado na cidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, durante abril de 2014 a março de 2015, demonstrou que os princípios ativos mais prescritos, foram das seguintes classes: 21,4% fluorquinolona, 21,2% penicilinas, e por princípios ativos mais prescritos foram: azitromicina 500mg com 7.826 caixas vendidas, cefalexina 500mg com 5.256 caixas, ciprofloxacina 500mg com 4.662 caixas, amoxicilina 500mg com 4.596 caixas e norfloxacina 400mg com 3.507 caixas vendidas (PESCADOR; SPADA, 2015).

O uso adequado de antibióticos diminui a taxa de resistência bacteriana, conforme estudo realizado no Hospital Universitário de Sergipe, no período de janeiro a agosto de 2013, através da análise de 274 formulários de solicitação de antibióticos. Este estudo relata que 91,2% dos casos de uso de antibiótico foram de forma empírica e a classe de antimicrobianos mais utilizados foi a das cefalosporinas (DANTAS *et al.*, 2015).

Na cidade de Sorocaba, São Paulo, no ano de 2006, um estudo constatou que crianças de zero a dez anos, correspondiam ao principal público na utilização de antibióticos, fato este relacionado a um sistema imunológico imaturo. Outro fator preponderante é o grande contato entre as crianças em creches e parques de diversão, o que possibilitaria a disseminação de agentes patogênicos (SÁ DEL FIOLE *et. al.*, 2010).

1.5. Peptídeos Antimicrobianos como alternativa farmacológica

Nas últimas décadas foi possível observar um aumento considerável do número de infecções causadas por microrganismos que demonstram alta resistência aos fármacos mais utilizados na prática clínica, reduzindo as opções terapêuticas e, conseqüentemente, dificultando a recuperação do paciente. O desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos a partir de peptídeos antimicrobianos (AMPs) pode ser uma opção viável. Os AMPs são moléculas fundamentais na imunidade inata, sendo denominados peptídeos de defesa do hospedeiro (OLIVEIRA & LACERDA, 2014).

Há evidências de que as sequências gênicas que codificam para a síntese dos peptídeos se mantiveram intactas ao longo da evolução dos seres vivos, com expressão em níveis basais e transcrição ocorrendo possivelmente em virtude do contato ou exposição à patógenos (MITH *et. al.*, 2015).

Possuem uma variedade imensa de sequências de aminoácidos, estruturas e conformação sendo estas características consideradas facilitadoras e relevantes para a criação de novos antimicrobianos, como também a possibilidade de serem utilizadas em sinergismo com outros fármacos de uso convencionais, e capazes de neutralizar endotoxinas, atuando como moléculas sinalizadoras dificultando o desenvolvimento da resistência microbiana. Além disso, os AMPs são vantajosos por serem encontrados em todos os organismos multicelulares, podendo ser isolados de insetos, artrópodes, plantas, bactérias e fungos, anfíbios, entre tantos outros seres vivos e não vivos facilitando a sua obtenção (OLIVEIRA & LACERDA, 2014).

Além disso, para aqueles que não necessitam de processos pós-traducionais, a síntese química de peptídeos pode ser realizada com o objetivo de obter grandes quantidades destas moléculas (FOX, 2013). Possuem baixa

massa molecular (ate 50 Kda), sendo a grande maioria anfipáticos e catiônicos podendo apresentar espectro amplo de atividade antimicrobiana, além de atuar no sistema imune (ESPAND e VOGEL, 1999).

O modo de ação dos AMPs está relacionado principalmente em função da interação dos peptídeos com a membrana alvo, através de rupturas ou permeabilização e, dessa forma, podem atuar nos constituintes celulares internos efetuando a inibição da síntese do DNA/RNA e de proteínas (OLIVEIRA & LACERDA, 2014).

Há uma relação estritamente direta entre a atividade dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) com a sequência e a composição de resíduos de aminoácidos assim como a estrutura e as características físico químicas das moléculas como a carga líquida total, e percentual de hidrofobicidade (NGUYEN *et. al.*, 2011), principalmente no que se refere a interação dessas moléculas com as membranas dos microrganismos, quanto a neutralização ou interferência em alvos intracelulares (SCOCCHI *et. al.*, 2016).

Dessa forma, os peptídeos antimicrobianos possuem uma gama de atividade contra uma série de patógenos (BROGEDEN, 2005). Suas propriedades catiônicas e hidrofóbicas permitem que estes participem da imunidade inata reconhecendo e inativando microrganismos aniônicos (WANG, *et al.*, 2014).

Na membrana bacteriana podem ultrapassar a membrana interna e externa de maneira letal levando ao rompimento da membrana os quais podem ser denominados de modelos carpete, barril e poro toroidal. Esta interação do peptídeo na membrana leva a formação de poros e, conseqüentemente a perda do potencial elétrico devido a movimentação de íons (WANG *et. al.*, 2014).

Para muitas dessas moléculas o que contribui para sua atividade são o fato de possuírem carga líquida, maior parte positiva, possuírem tanto resíduos hidrofóbicos quanto hidrofílicos que permitem sua solubilização em meio aquoso e com a possibilidade de atravessarem as membranas hidrofóbicas.

Essas características privilegiam a interação com as membranas negativamente carregadas dos microrganismos ao invés da estrutura celular

dos mamíferos, diminuindo a possibilidade de efeitos tóxicos dessas moléculas (LOHNER, 2009).

A carga catiônica dos peptídeos pode motivar sua atração pelas superfícies das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas possuem paredes porosas e os peptídeos podem facilmente atravessá-las. Segundo Anunthawan e colaboradores (2015), no caso da membrana externa de bactérias Gram-negativas, as mesmas são atravessadas por peptídeos devido ao mecanismo de troca de cargas competindo por Ca^{2+} e Mg^{2+} (ligados ao LPS) tendo, assim, acesso à parede e a membrana, além de acesso aos componentes intracelulares (ANUNTHAWAN *et. al.*, 2015).

Os PAMs são capazes de causar rupturas e desorganizar a membrana plasmática sendo capazes de formar poros, em estruturas na forma de barris se atingirem concentrações que permitam esse tipo de formação, a elaboração de estruturas micelares denominado modelo carpete e a formação de poros toroidais que se dá quando uma mesma concentração de PAMs se intercalam na membrana de forma mais desorganizada que aquela proposta no modelo barril (Figura 6) (ARIAS e MURRAY, 2009).

A figura abaixo exemplifica resumidamente os modelos propostos para os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos.

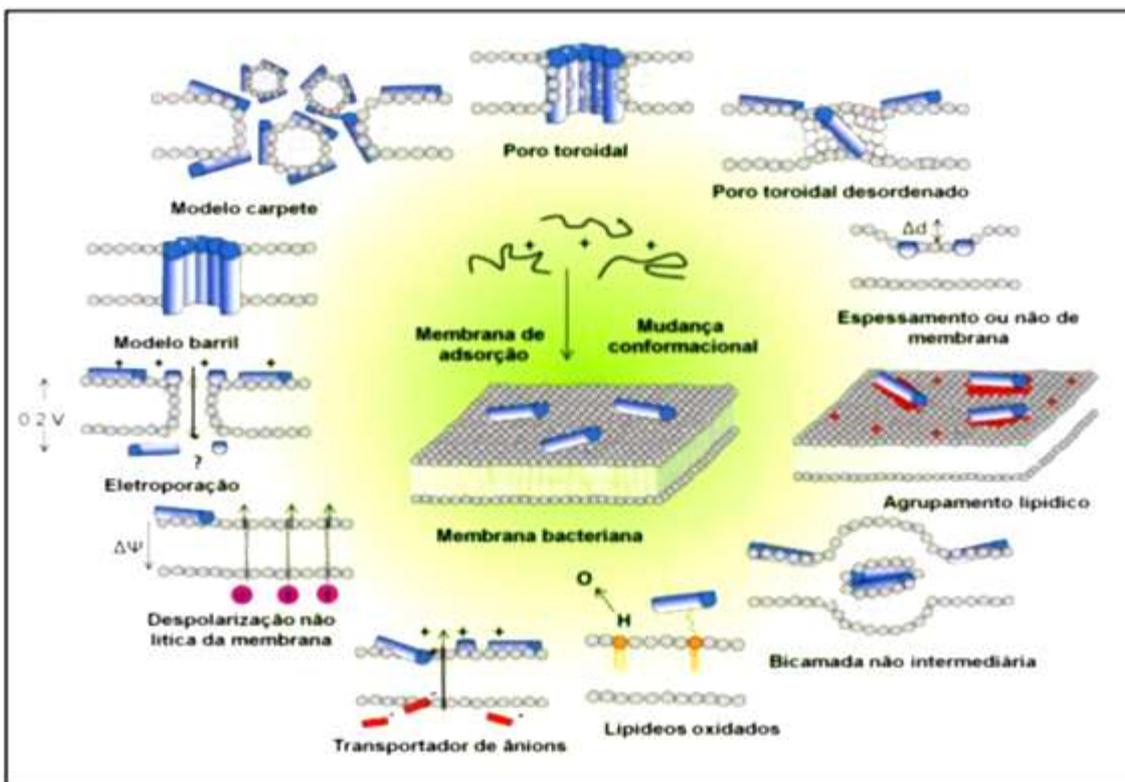


Figura 6: Figura representa o modo de interação dos peptídeos antimicrobianos com as membranas celulares. Adaptado de NGUYEN *et. al.*, 2011.

Também é possível que os PAMs favoreçam a atração de fosfolipídios carregados para regiões menos espessas e mais frágeis da membrana tornando-a mais delgada. Outro modo de ação pode ser a atividade dos peptídeos em favorecer a oxidação de lipídios por intermédio da geração de espécies intermediárias de oxigênio e atraírem ânions que possam afetar o potencial da membrana e, conseqüentemente, diminuir, a permeabilidade dessas estruturas de várias moléculas, dificultando o metabolismo celular (NGUYEN *et. al.*, 2011). Outros alvos para ação dos peptídeos antimicrobianos envolvem alvos para a síntese de DNA e de proteínas, assim como enovelamento proteico, atividade enzimática e síntese da parede celular (JENSSEN *et. al.*, 2006).

Recentemente, alguns autores tem sugerido que os PAMs atuam interferindo sobremaneira no metabolismo celular, podendo conduzir à morte da célula a partir de possíveis interações com os genes promotores e sequências codantes, sendo possível que interfiram na síntese enzimática e enovelamento de proteínas (DA CUNHA *et. al.*, 2016; SCOCCHI *et.al.*, 2016).

Outra característica importante é a capacidade de alguns PAMs constituírem um grupo de moléculas capazes de serem empregadas na imunoterapia, definida como a modalidade terapêutica que utiliza ou aumenta a resposta imune do hospedeiro como estratégia para evitar o dano tecidual causado por agentes agressores (DATTA *and* HAMAH, 2015).

Entretanto, conforme exposto anteriormente, os peptídeos possuem várias vantagens, mas, no entanto, há algumas características que dificultam a criação de novos fármacos, como por exemplo, a de serem expressos em sistemas procarióticos segundo sua sequência de resíduos de aminoácidos, a presença de atividade hemolítica e instabilidade proteolítica apresentada por alguns, bem como a possível inibição da atividade antimicrobiana dos AMPs ao entrarem em contato com o sal dos fluidos corporais do hospedeiro (OLIVEIRA & LACERDA, 2014).

Estas moléculas têm sido descritas em todos os organismos vivos estudados, incluindo bactérias, fungos, insetos, anfíbios, répteis, peixes, aves, mamíferos e plantas (ZASLOFF, 2002; PASUPULETI *et. al.*, 2012). Devido ao constante contato com diversos organismos, os artrópodes desenvolveram em seu sistema imune inato peptídeos antimicrobianos capazes de destruir imediatamente uma variedade de patógenos (NENTWIG, 2003).

O peptídeo Synoeca - MP, utilizado neste projeto, foi extraído da peçonha da vespa *Synoeca surinama* purificado e caracterizado por Freire (2014). Este possui massa molecular de 1594.8 Da sendo composto por 14 resíduos de aminoácidos (INWLKLGKKIIASL-NH₂). Ensaio preliminares antimicrobianos contra cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 apresentaram concentrações mínimas inibitórias (MIC – *minumum inhibitory concentration*) de 25 µg.mL⁻¹ e 12.5 µg.mL⁻¹, respectivamente. Em ensaios posteriores, a atividade antimicrobiana do peptídeo sintético foi avaliada novamente contra cepas bacterianas resistentes e sensíveis a antibióticos e demonstrou efetividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* com a concentração inibitória mínima variando de 1.24 µM.mL⁻¹ a 17.8 µM.mL⁻¹. No caso específico de cepas de casos clínicos multirresistentes de *K. pneumoniae* o MIC obtido foi de 8 µM.mL⁻¹. Além disso, segundo Freire

(2014), o peptídeo apresenta atividade hemolítica somente em doses 17 vezes maiores que as efetivas como antimicrobianos, mostrando características para ser utilizado em projetos de aplicações biotecnológicas.

Outro peptídeo antimicrobiano sintético quem vem sendo largamente estudado é o IDR-1018 (*Innate Defense Regulator*) por se trata-se de um peptídeo catiônico que possui 12 resíduos de aminoácidos (VRLIVAVRIWRR) e massa molecular de 1536,9 Da com importante atividade antimicrobiana e, principalmente imunomodulatória. O IDR 1018 foi desenhado a partir de deleções do peptídeo Bac2A que é um derivado linear de uma bactericina do tipo catelicidina encontrada em neutrófilos de bovinos. O IDR-1018 atua de sobremaneira sobre macrófagos estimulando a produção de quimiocinas bem como o recrutamento de células imunes (RIVAS-SANTIAGO *et. al.*, 2013). Diferentemente do Syoeca-MP, IDR-1018 atua sobremaneira recrutando células de defesa para os locais da infecção auxiliando na destruição de patógenos.

A atividade antimicrobiana do IDR-1018 é relativamente modesta contra alguns microrganismos como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, contudo, possui funções imunomoduladoras influentes na eliminação de diversas infecções em modelos animais sendo estreitamente relevante no combate a infecções (RIVAS-SANTIAGO *et. al.*, 2013). Além disso, esse peptídeo protege contra muitos tipos de infecções bacterianas em modelos animais através de modulação favorável da imunidade inata (SCOTT *et. al.*, 2007).

Segundo relatos de Hyonmim Choe e colaboradores (2015) durante uma infecção bacteriana, o peptídeo atua sobre macrófagos visando o desencadeamento de super produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Num estudo *in vivo* realizado em modelo de implantes ortopédicos em camundongos, os pesquisadores constataram uma redução da infecção por *Staphylococcus aureus* e ao mesmo tempo proteção dos implantes da falta de osseointegração concluindo-se que IDR-1018 foi capaz de aumentar o recrutamento de macrófagos para o local da infecção em 40%, acelerando a eliminação do microrganismo. Os efeitos imunomoduladores *in vivo* de IDR-1018 foram melhores observados quando ocorreram níveis mais elevados de

citocinas, quimiocinas e recrutamento de macrófagos. Ou seja, IDR-1018 foi capaz de proteger os implantes da falta de osseointegração causadas pela infecção por *S. aureus* no modelo murino (HYONMIN CHOE *et. al.*, 2015).

Num estudo que tratava lesões cerebrais em neonatos, IDR-1018 mostrou aplicabilidade clínica a medida que conferiu neuroproteção com apenas uma dosagem tendo, *in vivo*, efeitos benéficos sobre o cérebro de murinos em desenvolvimento, desencadeando genes que conduzem respostas inflamatórias através de mediadores neuroprotetores concluindo-se que este peptídeo é capaz de proteger contra a neuroinflamação, ou seja, ele modula a resposta inflamatória enquanto a cicatrização de feridas é melhorada podendo ser considerado um agente neuroprotetor promissor em recém-nascidos com lesão cerebral (BOLOURI *et. al.*, 2014).

O sinergismo entre diferentes peptídeos têm se mostrado uma abordagem racional para o controle de infecções bacterianas (LUDERS *et. al.*, 2003; ZHANG, J. *et. al.*, 2009). Esta estratégia pode resolver o problema da dose a ser administrada, pois os efeitos da combinação dos antibióticos na maioria das vezes são maiores que a soma dos efeitos dos compostos individuais, além da utilização de peptídeos com funções diferentes.

Apesar dos elevados custos para isolamento e síntese química, essas moléculas têm despertado o interesse das indústrias farmacêuticas e pesquisadores em diversas partes do mundo e o uso destas moléculas como antimicrobiano apresenta-se como uma alternativa terapêutica promissora e a sua utilização para o controle de doenças bacterianas ou fúngicas ainda é tímida constituindo-se, de certa forma, como um desafio a comunidade científica sendo os dados encontrados na literatura ainda pouco frequentes (DATTA and HAMAH, 2015).

De acordo com Maria-Neto *et. al.*, (2015), a resistência dos PAMs aos microrganismos não pode ser descartada. Embora seja pouco mencionada, quando comparada aos fármacos de uso rotineiro. A literatura traz relato de bactérias que podem tornar-se resistentes aos PAMs por características intrínsecas ou adquiridas. Os microrganismos podem alterar a composição lipídica da membrana celular, além da produção de enzimas que podem atuar na clivagem proteolítica dos PAMs (FREITAS E FRANCO, 2016).

2.0. JUSTIFICATIVA

As infecções bacterianas sistêmicas oportunistas, como as causadas por cepas de *Klebsiella pneumoniae* que apresentam resistência aos mais diversos fármacos, constituem-se num problema de saúde pública à medida que aumentam o tempo de internação dos pacientes e, conseqüentemente, os custos do tratamento. *Klebsiella pneumoniae* está relacionada, etiologicamente, a infecções graves e surtos nosocomiais sendo responsável pelo aumento da morbidade e mortalidade de pessoas infectadas. A resistência intrínseca e adquirida à grande parte das classes de antimicrobianos conhecidos tem comprometido a terapêutica das doenças microbianas. A descoberta de novas substâncias capazes de inibir a rápida proliferação deste microrganismo é imprescindível. O peptídeo Synoeca—MP, isolado e caracterizado por Freire (2014) a partir da vespa social *Synoeca surinama* demonstrou grande eficácia quando testado preliminarmente frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mostrando-se também eficaz na eliminação de microrganismos resistentes. Adicionalmente, o peptídeo IDR-1018, demonstrou grande potencial imunomodulatório e atividade antimicrobiana contra *Cândida albicans* em estudos anteriores (FREITAS, 2018). A combinação de antibióticos pode ser uma excelente alternativa à medida que reduz de forma significativa a dose utilizada no tratamento bem como da toxicidade de alguns fármacos como aminoglicosídeos e polimixina E (LORIAN, 2006). O uso dos PAMs em combinação com diferentes classes de antimicrobianos desperta interesse dado à ampla capacidade de atuarem contra um grande espectro de microrganismos resistentes aos antibióticos, principalmente os empregados na prática clínica, ampliando as possibilidades terapêuticas e reduzindo os efeitos colaterais causados pelos fármacos utilizados isoladamente.

3.0. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar, *in vitro*, a capacidade antimicrobiana dos peptídeos IDR - 1018 e Synoeca - MP de inibirem, isoladamente e em combinação, o crescimento de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* bem como avaliar a capacidade, *in vivo*, de Synoeca - MP de controlar a infecção sistêmica provocada pela cepa multirresistente de *Klebsiella pneumoniae* (Kp1410503).

3.2. Específicos

- Caracterização molecular por PCR multiplex das cepas de *Klebsiella pneumoniae* selecionadas para a presença de genes que codificam carbapenemases (*blaKPC*).
- Realizar a curva de crescimento de quatro isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*.
- Determinar a concentração mínima inibitória (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos peptídeos Synoeca-MP e IDR-1018 contra quatro cepas de *Klebsiella pneumoniae* com resistência múltipla.
- Determinar, *in vitro*, a concentração mínima inibitória (CIM) dos antimicrobianos amicacina (aminoglicosídeo), levofloxacina (quinolona) e ceftazidime (cefalosporinas de 3^a geração) contra a cepa Kp2177569 de *Klebsiella pneumoniae*.
- Realizar teste de combinação de fármacos para caracterização da interação entre amicacina, levofloxacina e ceftazidime com o peptídeo Synoeca-MP e deste com IDR-1018 frente a *K. pneumoniae* Kp2177569.

- Avaliar, utilizando modelo murino, diferentes doses do peptídeo Synoeca-MP quanto a capacidade de controlar a infecção sistêmica induzida experimentalmente pela cepa de *k. pneumoniae* Kp1410503.

4.0. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Bactérias utilizadas no estudo

Um total de 96 cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes procedentes do Hospital de Base de Brasília nos anos de 2010 a 2012 foram doadas pelo Laboratório Central de Brasília – LACEN a Universidade Católica de Brasília (UCB). As bactérias foram analisadas com relação a sua resistência contra antibióticos pertencentes às classes dos betalactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), macrolídeos, sulfonamidas, tetraciclinas, glicopeptídeos, glicilciclinas e quinolonas. Das 96 amostras doadas ao CAPB, foram selecionadas as cepas com base no perfil de resistência, ou seja, as que demonstraram maior resistência frente aos 24 fármacos testados previamente. Estas estirpes denominadas Kp1410503; Kp1536816; Kp2016295 e Kp2177569 (ANEXO 1) foram selecionadas para os ensaios, *in vitro* e *in vivo* a serem realizados posteriormente tais como definição da concentração mínima inibitória (CIM), combinação de fármacos e dose de peptídeo a ser utilizada nos ensaios *in vivo*.

4.2. Detecção molecular de genes carbapenemases

Para caracterização molecular das cepas selecionadas para o estudo foi realizado um PCR (YIGIT *et. al.*, 2001; JAMES, 2010) com o objetivo, de detectar genes que codificam as enzimas carbapenemases (*blaKPC*). Para a obtenção de DNA das cepas, uma colônia de cada isolado clínico foi inoculada em 500µL de água deionizada (Milli-Q® System, Millipore, Bedford, MA) e fervida por 15 minutos. Como controle negativo nos ensaios, utilizou-se uma estirpe KPC negativa de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC13883). Os reagentes e volumes utilizados para a PCR estão descritos na Tabela 2.

Tabela 02: Reagentes e as concentrações utilizadas no *mix* da reação de PCR para a amplificação das sequências de carbapenemases.

Reagente	Concentração final
10X High Fidelity Buffer (Invitrogen)	600 mM Tris-SO ₄ (pH 8.9), 180 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
MgCl ₂ (Invitrogen)	2mM
dNTPs	160 μM
Primer Forward	200 nM
Primer Reverse	200 nM
Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen)	5 U/μL
DNA molde	1ng/μL
Volume final	20 μL

Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 3 (YIGIT, 2001). O *mix* foi desnaturado por 2 minutos a 95°C em um termociclador (MJ thermalcycler - EUA), e o DNA foi amplificado após 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos) com um ciclo final de 5 minutos a 72°C. Posteriormente foi preparado um gel de agarose 1,5% (p/v) e corado com Brometo de Etídio para checagem do tamanho dos fragmentos obtidos. Cada tubo de PCR continha 20μL de mistura de reação.

Tabela 03. Gene e sequência dos *primers* a serem amplificados na reação de PCR. Sequência dos *primers* Forward (KPCF) e Reverse (KPCR).

Gene	Primers	Sequencia (5'-3')	Tamanho esperado do produto (pb)
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	TGTCACTGTATCGCCGTC	1000
	KPC-R	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	

4.3. Curva de crescimento das cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*

Para uma melhor determinação dos MICs dos peptídeos e dos antibióticos comerciais foi realizado, para cada uma das cepas de *Klebsiella pneumoniae* utilizadas neste trabalho (Kp1410503; Kp1536816; Kp2016295 e Kp2177569), a curva de crescimento microbiano.

Inicialmente, um pré inóculo de uma das cepas doadas e triadas para os testes foi preparado a partir do isolamento de uma colônia que, posteriormente, foi inoculada em meio LB (Luria – Bertani [Invitrogen, EUA]) sólido e mantida a 37°C, em estufa bacteriológica, para crescimento das estirpes. Posteriormente, uma colônia isolada do pré inóculo foi transferida para um tubo de polipropileno de fundo cônico com capacidade total de 50 mL contendo 10 mL de meio LB líquido (10g de triptona, 5g de extrato de levedura e 10g de NaCl para 1L de água destilada, pH 7.0). O pré inóculo foi incubado por 18 horas, a 37°C e 220 rpm em *skaker* orbital. Deste inóculo, uma alíquota de 50 µL da cepa foi transferido para outro tubo de polipropileno de 50 mL contendo 5mL de meio LB líquido e incubada sob as mesmas condições acima.

A cada 30 minutos, e durante 12 horas, foram retiradas alíquotas de 100 µL da cultura para leitura da densidade óptica (OD) no espectrofotômetro (BioTek *PowerWaver*, HT, EUA) utilizando uma placa de 96 poços, a λ 595nm, para posterior construção da curva de crescimento. Para a contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), 100 µL do cultivo bacteriano foram diluídos em série em solução salina a 0,09% (NaCl) e *Tween* 20% estéril e dispostos em microtubos tipo *Eppendorf* contendo cada um deles 900 µL da solução.

Foi utilizada a técnica de microgotas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão (ROMEIRO, S. R., 2009), onde 2µL de cada diluição (18 diluições seriadas) foram plaqueados em triplicata, em placas com meio LB ágar, e incubadas por até 24 horas, a 37°C em estufa bacteriológica. Após este período, foram contadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). De posse dos valores de O.D. e número de UFCs para cada

tempo, os valores foram correlacionados e a curva de crescimento microbiana para cada cepa construída.

4.4. Peptídeos sintéticos Synoeca - MP e IDR - 1018: obtenção, análise da pureza, quantificação e armazenamento.

Os peptídeos Synoeca - MP e IDR - 1018 foram sintetizados pela Aminotech Indústria e Comércio Ltda (Campinas-Brasil) através de um protocolo de síntese química, de acordo com a metodologia em fase sólida Fmoc (uso de 9-fluorenilmetoxicarbonila como protetor do grupo amino), purificados (> 95%), liofilizados e armazenados a -20° C.

A pureza e a massa de cada peptídeo foram avaliadas por espectrometria de massas *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight* (MaldiToF). Cada peptídeo foi diluído em água ultrapura e analisados numa matriz (ácido saturado α -ciano-4-hidroxicinâmico, preparada com 50 μ L de ácido trifluoroacético à 3%, acetonitrila 100% e 200 μ L de água ultrapura) numa proporção 1:3. A amostra foi depositada em triplicata na placa (*Anchorchip* – Var 384) e mantida a temperatura ambiente por aproximadamente 05 minutos até sua total cristalização. A massa molecular foi determinada por Maldi-ToF Ultra Flex III (*Bruker Daltonics*, Billerica, MA) e a massa monoisotópica obtida por *Peptide Calibration Standard II* para espectrometria de massas (*Bruker Daltonics*, Billerica, MA) a partir do modo de operação refletivo e positivo com calibração externa.

Para a realização dos experimentos, cada peptídeo foi diluído em água ultrapura autoclavada e quantificado pela absorção UV a λ 205, 215 e 225nm, utilizando a fórmula de concentração (MURPHY *et. al.*, 1960):

$$A = (225_{nm} - 215_{nm}) \times 0,144 =$$

$$B = 205_{nm} \times 0,31 =$$

$$(A+B)/2 = [] \text{ mg.mL}^{-1}$$

Após quantificados, os mesmos foram aliqotados numa concentração de 128 μ g. mL⁻¹ e armazenados a -20° C até sua utilização.

4.5. Antimicrobianos amicacina, levofloxacin e ceftazidime: obtenção, preparo e armazenamento.

O antibiótico amicacina utilizado neste estudo foi cedido pela farmácia do Hospital de Base de Brasília ao CAPB. O antibiótico apresentava-se em ampola na forma líquida, sendo restrito à ambiente hospitalar contendo 50 mg.mL⁻¹ de cloridrato de amicacina, produzido pelo laboratório Teuto. Para os bioensaios, foram preparadas alíquotas numa concentração de 128 µg.mL⁻¹ e armazenadas, posteriormente, a -80° Celsius.

O antibiótico ceftazidime (cefalosporina de 3° geração, pentaidratada) também foi cedido pela farmácia do Hospital de Base de Brasília em frascos contendo 1g. Este foi diluído em água ultrapura autoclavada, alíquotado na concentração de 128 µg.mL⁻¹ e armazenado a -80° Celsius.

Por fim, o antibiótico levofloxacin (quinolona), foi adquirido na Farmácia do Hospital São Mateus, Cruzeiro – DF, em forma de solução injetável com 100 mL de levofloxacin (5mg.mL) produzido pelo Laboratório Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. As alíquotas foram preparadas numa concentração de 128 µg.mL⁻¹ e inseridas em microtubos de 200µL envoltos por papel alumínio, e armazenados a -80° Celsius até os experimentos. O preparo e alíquotagem de todos os antibióticos foram realizados em fluxo laminar com as luzes desligadas conforme orientação do fabricante para evitar degradação e, conseqüentemente, perda da qualidade do produto.

4.6. Avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana dos peptídeos Synoeca - MP e IDR - 1018 contra cepas clínicas de *K. pneumoniae*.

Experimentos para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos foram realizados contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae* Kp1410503, Kp1536816, Kp2016295 e Kp2177569 seguindo as normas padronizadas pelo protocolo de bioensaio de inibição por microdiluição em caldo estabelecido pela *Clinical And Laboratory Standards Institute* – CLSI, norma M07-A9 (2012) com adaptações. Uma colônia de cada isolado foi

inoculada em 10 mL de meio LB líquido e incubadas por 18 horas, a 37^oC, 220 rpm, em *Shaker* orbital. Embora a recomendação do *CLSI* seja a da utilização do meio Müeller Hintor nos ensaios com microrganismos, durante nossos experimentos percebemos que os microrganismos cresciam bem em Lúria Berani (LB) e os sais presentes no meio não interferiam nos resultados. Dessa forma, optamos em dar prosseguimento aos bioensaios utilizando meio LB. Desse inoculo, uma alíquota de 50 µL foi transferida para um tubo de polipropileno de fundo cônico de 50 mL contendo 4950 µL de meio LB líquido e incubada até que a absorvância atingisse 0,6 a λ 595nm. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (BioTek *PowerWaver*, HT, EUA) utilizando uma alíquota de 100µL do inóculo disposto num poço da placa de Elisa.

Os bioensaios antibacterianos foram realizados em meio LB líquido, com o inóculo em fase logarítmica utilizando uma concentração de 5×10^4 UFC por poço. Para determinação da concentração inibitória mínima, avaliou-se concentrações dos peptídeos que variaram de 128 a 01 µg.mL⁻¹. Além dos grupos com diferentes concentrações dos peptídeos, fizeram parte do experimento o grupo controle positivo (100% de inibição da bactéria) no qual foi utilizado o antibiótico amicacina na concentração de 64 µg.mL⁻¹ e o grupo controle negativo onde 5×10^4 UFC foram adicionadas ao meio de cultura LB e para o qual esperava-se 100% de crescimento bacteriano.

Para determinação do percentual de inibição, os testes foram realizados em triplicata técnica e biológica. A CIM foi estimada a partir do crescimento microbiano nos pontos da metade da fase logarítmica comparados com o controle positivo. Para a avaliação da atividade bactericida ou bacteriostática de cada peptídeo, ao final do experimento, 2µL da solução contida em cada poço da placa com as diferentes concentrações dos peptídeos testados, foram inoculadas em triplicata, em meio LB sólido e incubadas por 24 horas a 37^oC em estufa bacteriológica. Dessa forma, não havendo crescimento de nenhuma colônia do microrganismo considera-se que houve efeito bactericida, ou seja, o peptídeo foi capaz de causar a morte de todas as bactérias. Caso ocorra crescimento na placa de alguma colônia, considera-se que o peptídeo tem atividade bacteriostática, ou seja, havia crescimento bacteriano mesmo não sendo visível nos poços da placa de Elisa.

O teste de MBC (Concentração Bactericida Mínima) é de extrema importância uma vez que a metodologia aqui utilizada não determina se o peptídeo é bactericida ou bacteriostático, Por essa razão, é importante a confirmação em meio sólido onde será possível averiguar com precisão a morte ou não dos microrganismos. A técnica de MBC é simples e os resultados são obtidos em até 24 horas.

4.7. Definição da concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos amicacina, ceftazidime e levofloxacina contra *Klebsiella pneumoniae*.

A concentração mínima inibitória seguiu as normas estabelecidas no protocolo de ensaio de inibição por microdiluição em caldo estabelecido pela *Clinical And Laboratory Standards Institute* – CLSI, norma M07-A9 (2012), com adaptações. Cada antibiótico foi testado, separadamente, somente contra a cepa Kp2177569, por ser a única que apresentou em experimentos prévios, sensibilidade aos três fármacos. As concentrações testadas de cada antimicrobiano variaram de 128 a 0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e biológica em placa de Elisa de 96 poços, incubadas por 24 horas, a 37° Celsius com leituras efetuadas a cada trinta minutos em leitor de microplacas (BioTek *PowerWaver*, HT, EUA). Após o período de incubação, 2 μL de cada poço da placa de Elisa foram inoculados em meio LB ágar e deixados em estufa bacteriológica por 24 horas para confirmação da atividade bactericida ou bacteriostática de cada fármaco.

4.8. Avaliação da atividade combinada de fármacos – *Cheker-Board* (Tabuleiro de Xadrez).

Para analisar se ocorreria algum tipo de interação (sinérgica, aditiva, antagônica, indiferente) entre os peptídeos combinados entre si e de Synoeca - MP com cada um dos três antibióticos, foi realizado o bioensaio de combinação de fármacos utilizando a técnica denominada técnica tabuleiro de xadrez preconizada por Moody (1992). Os peptídeos Synoeca - MP e IDR - 1018 liofilizados foram pesados, ressuspendidos em 1mL de água ultrapura,

quantificados utilizando a fórmula de concentração de MURPHY *et. al.*, (1960), aliquotados e armazenados a -20°C até os experimentos. Para os ensaios, as alíquotas dos antimicrobianos foram preparadas em concentrações que representavam o dobro do MIC encontrado sendo 64 µg.mL⁻¹ para Synoeca - MP (MIC 32 µg.mL⁻¹), 128 µg.mL⁻¹ para IDR - 1018 (MIC 64 µg.mL⁻¹), 128 µg.mL⁻¹ para amicacina (MIC 64 µg.mL⁻¹), 32 µg.mL⁻¹ para ceftazidime (MIC 16 µg.mL⁻¹) e 16 µg.mL⁻¹ para levofloxacina (MIC 08 µg. mL⁻¹).

Os testes de susceptibilidade foram realizados pelo método de Microdiluição baseado nas orientações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012). Cada concentração sofreu diluições seriadas partindo-se do dobro do MIC. O experimento foi realizado em placas de Elisa de 96 poços, para cada combinação de fármacos onde foram adicionados os antibióticos nas concentrações descritas anteriormente, acrescido de água ultrapura e da suspensão bacteriana de *K. pneumoniae* Kp2177569, com aproximadamente 5x10⁴ UFC.mL⁻¹ e volume final de cada poço ajustado para 200 µL com o meio LB líquido. Um dos antimicrobianos é disposto nos poços na vertical (Concentração do fármaco aumenta de baixo para cima) e o outro antimicrobiano é pipetado na posição horizontal (Concentração aumenta da esquerda para direita) de modo que todas as concentrações de cada antimicrobiano possam ser combinadas entre si (Figura 07).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A												
Antimicrobiano 1: Levofloxacina ↕	8µg	B	1µg/ 8µg	2µg/ 8 µg	4µg/ 8 µg	8µg/ 8 µg	16µg/ 8 µg	32µg/ 8 µg					
	4µg	C	1µg/ 4µg	2µg/ 4 µg	4µg/ 4 µg	8µg/ 4 µg	16µg/ 4 µg	32µg/ 4 µg					
	2µg	D	1µg/ 2µg	2µg/ 2 µg	4µg/ 2 µg	8µg/ 2 µg	16µg/ 2 µg	32µg/ 2 µg	Meio de cultura	Meio de cultura	Meio de cultura	Controle do meio	
	1µg	E	1µg/ 1µg	2µg/ 1 µg	4µg/ 1 µg	8µg/ 1 µg	16µg/ 1 µg	32µg/ 1 µg	Bact	Bact	Bact	Controle negativo	
	0,5µg	F	1µg/ 0,5µg	2µg/ 0,5 µg	4µg/ 0,5 µg	8µg/ 0,5 µg	16µg/ 0,5 µg	32µg/ 0,5 µg	Antib + Bact	Antib + Bact	Antib + Bact	Controle positivo	
	0,25 µg	G	1µg/ 0,25 µg	2µg/ 0,25 µg	4µg/ 0,25 µg	8µg/ 0,25 µg	16µg/ 0,25 µg	32µg/ 0,25 µg					
	0,125 µg	H	1µg/ 0,125 µg	2µg/ 0,125 µg	4µg/ 0,125 µg	8µg/ 0,125 µg	16µg/ 0,125 µg	32µg/ 0,125 µg					
			1µg	2µg	4µg	8µg	16µg	32µg					
Antimicrobiano 2 – Synoeca - MP ↔													

Figura 07: Representação esquemática da placa de Elisa de 96 poços para avaliar o efeito antimicrobiano dos fármacos em combinação e em diferentes concentrações pela Técnica *Checker-board*. Como controle do meio de cultura foi usado somente meio LB; no controle negativo meio LB mais 5×10^4 UFC.mL⁻¹ e no controle positivo $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de amicacina, meio LB e 5×10^4 UFC.mL⁻¹. Ex: Levofloxacina + Synoeca – MP contra *Klebsiella pneumoniae* Kp2177569.

O crescimento bacteriano foi observado após incubação da microplaca a 37°C, por 24h, sob agitação constante e leitura de densidade óptica de λ 595nm, com leituras a cada 30 minutos em leitor de microplacas (*BioTek PowerWaver*, HT, EUA). As combinações dos antimicrobianos foram testadas em três ensaios independentes. O índice de concentração inibitória fracional (FICI – *Fractional inhibitory concentration index*) foi calculado de acordo com a equação abaixo: (HALL *et. al.*, 1983; FERNÁNDEZ CUENCA *et. al.*, 2003; ORHAN *et. al.*, 2005).

$$\text{FICI} = \frac{\text{MIC 1 em combinação com 2} + \text{MIC 2 em combinação com 1}}{\text{MIC de 1} + \text{MIC de 2}}$$

O FICI foi interpretado da seguinte forma:

- FICI \leq 0,5: sinergismo;
- FICI $>$ 0,5 e \leq 1,0: Aditiva;
- FICI $>$ 1,0 e \leq 4: indiferente;
- FICI \geq 4: antagonismo.

5. Experimentação *in vivo* – Modelo de infecção generalizada (septicemia)

5.1. Considerações éticas

A experimentação *in vivo* foi executada no Biotério da Universidade Católica de Brasília e cujo projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal sob o número de protocolo 035/15. Todo o experimento foi realizado buscando amenizar o sofrimento dos camundongos respeitando-se todas as orientações contidas na legislação vigente quanto ao uso de animais em pesquisas.

5.2. Animais

Camundongos da linhagem C57BL/6, machos, entre 6 e 8 semanas foram selecionados para a realização deste estudo. Os mesmos foram provenientes do Biotério da Universidade Católica de Brasília e durante o estudo foram mantidos em ambiente com temperatura constante de 22°C, regime de 12 horas claro/12 escuro, alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram separados em grupos de 5 camundongos e dispostos em gaiolas apropriadas forradas com maravalha.

5.3. Preparo da carga bacteriana para indução da infecção sistêmica – Definição da curva de sobrevida

Colônias isoladas de *K. pneumoniae* foram cultivadas em meio LB ágar em estufa bacteriológica por até 24 horas. Posteriormente, 01 colônia isolada deste cultivo foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido contido num tubo de polipropileno de fundo cônico com capacidade total de 50 mL e mantido por 18 horas em *Shaker* orbital, a 37°C, a 220 rpm. Transcorridas 18h, 100 µL da amostra foi transferida para outro tubo de polipropileno (inoculo II), também de 50 mL, contendo 9900 µL de meio LB líquido. A amostra foi deixada no *shaker* orbital sob as mesmas condições anteriores até que a absorbância atingisse 0,6 verificada em cubetas descartáveis (BSA 002) de 1mL da solução bacteriana a $\lambda 595\text{nm}$ e que corresponde a fase de crescimento exponencial, previamente determinada para a cepa utilizada no ensaio. Atingida a absorbância de 0,6, onde tem-se $\sim 2,9 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$. Um 1mL dessa amostra foi então distribuída em tubos de 1,5mL do tipo *Eppendorf*, e centrifugada por 5 minutos, a 4°C, a 1600 rpm (FENSTERSEIFER, 2014) e lavada duas vezes com solução fisiológica 0,09%. Cada *pelet* (contendo cerca de $\sim 2,9 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$) foi, então, ressuspendido em 200µL de solução fisiológica. A partir dessa densidade ($\sim 2,9 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$), procedeu-se com o preparo das demais concentrações $\sim 2,9 \times 10^4$ e $\sim 2,9 \times 10^6$ por diluição seriada 1:10. Os tubos com as diferentes densidades de células foram mantidos no gelo, até a inoculação nos animais por via intraperitoneal, em que cada animal recebeu 200µL da solução contendo soro fisiológico e as diferentes densidades de bactéria.

O mesmo procedimento foi realizado para as concentrações de $\sim 2,9 \times 10^{10}$ e $\sim 2,9 \times 10^{12}$ UFC.mL⁻¹ tendo por base a curva de crescimento microbiana realizada anteriormente para a cepa Kp1410503. Para confirmação das UFC, 2 μ L das amostras foram semeados em meio LB ágar e mantido em estufa bacteriológica, a 37°C, por até 24 horas para contagem e confirmação das unidades formadoras de colônia inoculadas. Os grupos que fizeram parte do experimento estão descritos na tabela 04.

Tabela 04: Delineamento experimental dos grupos de animais para definição da concentração bacteriana a ser utilizada no experimento definitivo e os grupo controle Sem tratamento (não receberam nada/controle do ambiente). Os animais dos tratamentos T1 a T5 receberam 200 μ L da concentração de *K. pneumoniae* conforme descrito na tabela.

Tratamento	Concentração bacteriana
C1	Sem tratamento algum
T1	$\sim 2,9 \times 10^4$ UFC.mL ⁻¹
T2	$\sim 2,9 \times 10^6$ UFC.mL ⁻¹
T3	$\sim 2,9 \times 10^8$ UFC.mL ⁻¹
T4	$\sim 2,9 \times 10^{10}$ UFC.mL ⁻¹
T5	$\sim 2,9 \times 10^{12}$ UFC.mL ⁻¹

5.4. Inoculação, *in vivo*, de diferentes concentrações do peptídeo Synoeca – MP

Para a realização do experimento, o peptídeo Synoeca – MP liofilizado foi pesado em balança de precisão (Balança Marte AD500, 510g x 0,001g, com capela) e ressuspenso em 200 μ L de soro fisiológico para ser aplicado em cada animal. Para o ajuste das dosagens experimentais do peptídeo, todos os camundongos pertencentes a cada grupo de tratamento foram pesados e a média do peso estimada seguida pela indução da infecção para posterior tratamento com o peptídeo.

Os animais foram infectados com a carga bacteriana da cepa Kp1410503 de *K. pneumoniae* definida no teste piloto. Após 12 horas de indução da infecção, cada camundongo foi tratado por via intraperitoneal com

200 µL de solução contendo o peptídeo diluído em soro fisiológico em diferentes concentrações as quais foram determinadas nos testes de definição da concentração inibitória mínima resultando em 0,64 mg.kg⁻¹ (conversão de µg para mg.kg⁻¹ x 10); 6,4 mg.kg⁻¹ (10 x a CIM 0,64 mg.kg⁻¹); 12,8 mg.kg⁻¹ (2 x a CIM 6,4 mg.kg⁻¹) e 19,2mg.kg⁻¹ do animal (3 x a CIM 6,4 mg.kg⁻¹). Posteriormente à inoculação do peptídeo, os animais foram acondicionados nas gaiolas e levados para a sala apropriada e observados a cada 01 hora para averiguar se algum deles apresentava comportamento que demonstrasse algum tipo de sofrimento comparando-os sempre com o grupo controle “sem tratamento”. As observações eram realizadas durante o dia (manhã e tarde) totalizando 168 horas.

No entanto, para otimizar a análise/visualização dos resultados nas figuras 9 e 10, consideramos somente as primeiras 36 horas para elaboração dos gráficos uma vez que os animais pertencentes aos grupos que foram tratados com o peptídeo e o antibiótico amicacina morreram antes desse período restando apenas os animais que não receberam tratamento algum e o grupo que recebeu apenas solução salina. Cabe ressaltar que a dosagem do peptídeo para o tratamento dos camundongos foi convertida de µg (encontrado nos testes *in vitro*) para mg em função do peso do animal e calculadas em mg.Kg⁻¹ do animal. Os testes foram adaptados de outros delineamentos experimentais já usados em modelos murinos (MILANO *et. al.*, 1997; LEUNG and HASHIMOTO *et. al.* 1986; LIMA *et. al.*, 2011; GLEN *et. al.*, 2003).

5.5. Avaliação da atividade hemolítica

Para realização do experimento, foi solicitado ao Comitê de ética autorização via projeto (protocolo 035/15) para coleta de sangue de cada animal via punção cardíaca. A atividade hemolítica do peptídeo Synoeca – MP foi determinada em conformidade com a metodologia proposta por BIGNAMI (1993) com adaptações.

Após os animais terem sido anestesiados com 100 mg.kg⁻¹ de Cetamina (Dopalen, Division Veltbrands animal Health, Jacareí, São Paulo –SP, Brasil) e 7,5 mg.Kg.mL⁻¹ de Xilazina a 4% (Anasedan, Agribands do Brasil, LTDA,

Paulínia, SP, Brasil) via Intraperitoneal e eutanasiados via punção cardíaca, o sangue proveniente deste procedimento foi então coletado com seringas estéreis e dispostos em tubos com heparina para evitar coagulação do mesmo. Após a separação das células e plasma por sedimentação, uma suspensão com 1% de células em PBS (*phosphate buffer solution*) foi preparada e centrifugada duas vezes (1000 g por 2 minutos). Em seguida, 350µL da solução de eritrócitos foi utilizada para testar diferentes concentrações do peptídeo Synoeca-MP. Como controle negativo foi utilizada solução salina a 0.09% (0% de hemólise) e como controle positivo Triton X – 100 a 0,1% (100% de hemólise). Decorridos 1 hora, os tubos foram centrifugados e 100 µL do sobrenadante coletado e dispostos em placas de 96 poços para determinar a densidade óptica em leitor de microplacas (BioTek *PowerWaver*, HT, EUA) à λ 406 nm.

5.6. Recuperação da carga bacteriana

Os pulmões e rins foram removidos de cada animal sobrevivente 7 dias após o início do experimento para recuperação da carga bacteriana, observando os preceitos e protocolos de eutanásia previamente aprovados pelo CEUA. Os órgãos foram macerados em ambiente estéril com 01 mL de solução salina e, posteriormente, submetido a diluições seriadas (1:10), em que 100 µL da suspensão de um tubo eram transferidos para outro tubo tipo *Eppendorf* contendo 900 µL de solução salina. Foram realizadas 8 diluições seriadas para cada amostra. O lavado peritoneal também foi coletado a partir da inoculação de 3mL de soro fisiológico na região abdominal de cada animal e recolhidos novamente com o auxílio de uma seringa estéril um quantitativo de, pelo menos, 1mL. O lavado também sofreu 8 diluições seriadas. Para cada uma das diluições realizadas dos pulmões, rins e lavado peritoneal, 2 µL foram semeados em meio LB ágar e mantidos em estufa bacteriológica, a 37° C por até 24 horas para contagem de possíveis UFC.

6. RESULTADOS

6.1. Detecção molecular de genes carbapenemases

As cepas selecionadas foram submetidas a análise por PCR (Reação em cadeia da Polimerase) para a amplificação de fragmentos gênicos que codificam enzimas capazes de degradar o anel β -lactâmico de uma diversidade de antimicrobianos (Betalactamases).

A figura 08 mostra o gel de agarose 1,5 %, onde foram aplicados em cada poço 10 μ L da reação de PCR. Pode-se observar nas linhas 1, 3, 5 e 6 uma banda de aproximadamente 1000 pb, referente à amplificação de fragmentos de DNA genômico das cepas de *Klebsiella pneumoniae* referente as sequencias do gene de carbapenemases, confirmando a resistência destas cepas a classe dos antibióticos carbapenêmicos. A linha 2 representa o controle negativo para carbapenemases e a linha 4 a estirpe Kp2177569 que apresentou resultado negativo para a presença do gene que codifica a enzima carbapenemase.

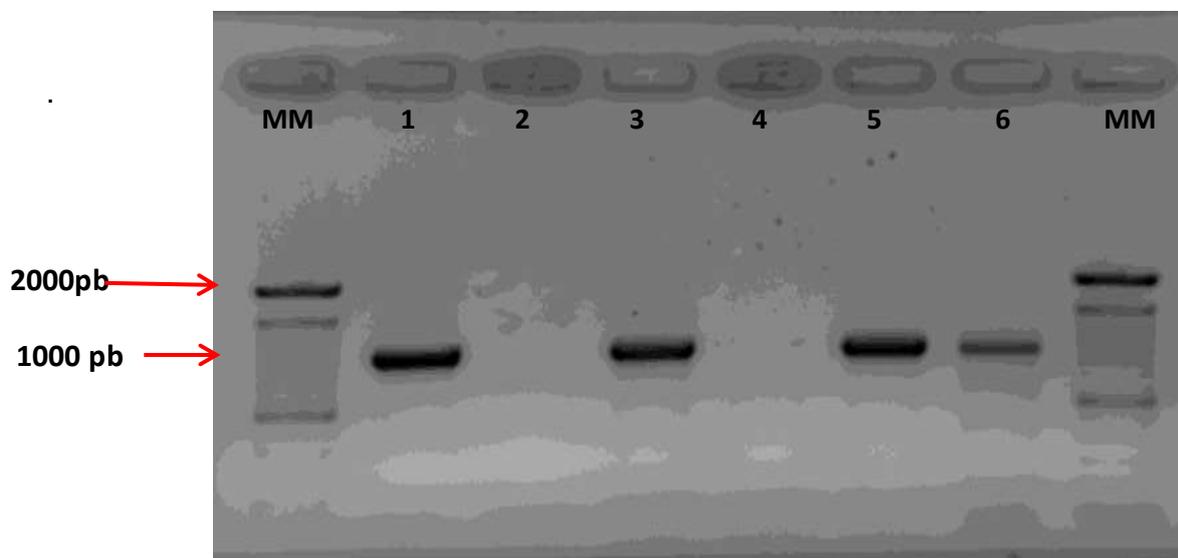


Figura 8. Gel de agarose 1,5% para análise das amplificações de PCR. MM - marcador de peso molecular. Linha 1: Controle positivo *K. pneumoniae* Kp1412719.; Linha 2: Controle negativo *K. pneumoniae* ATCC 13883; Linha 3: *Klebsiella pneumoniae* Kp1410503; Linha 4: *Klebsiella pneumoniae* kp2177569. Linha 5: *Klebsiella pneumoniae* Kp2016816, Linha 6: *Klebsiella pneumoniae* kp1536816.

6.2. Curvas de crescimento das cepas Kp2177569; Kp1410503, Kp2016816 e Kp1536816.

Os dados referentes ao tempo médio da fase *Lag* e *Log* e as UFCs para cada uma das cepas encontram-se na tabela 5. Podemos observar uma homogeneidade no tocante aos dados avaliados entre as 4 cepas estudadas. Todas mostraram uma fase *Lag* iniciando aproximadamente 02 horas e meia após o inoculo ter sido deixado no Shaker em agitação, 37°C e uma fase logarítmica entre as O.D. 0,6 e 0,7 correspondente a metade da fase *Log*.

A partir destes dados, o tempo necessário para as cepas atingirem a fase *log*, foi padronizado para os experimentos posteriores *in vitro*. Foi utilizado um inóculo na concentração celular de $\sim 2,9 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ quando a absorbância encontrava-se entre 0,6 - 0,7, à λ 595nm.

Tabela 05: Características observadas nas curvas de crescimento microbiano das diferentes cepas de *K. pneumoniae* utilizadas neste estudo, representando o início da fase *Lag*, metade da fase *Log*, e número de UFC de todas as cepas utilizadas neste estudo.

Cepa	Início da Fase <i>Lag</i>	UFC.mL ⁻¹	Metade da Fase <i>Log</i>	UFC.mL ⁻¹
Kp2177569	2:30 horas	$1,2 \times 10^4$	6 -7 horas	$1,8 \times 10^8$
Kp2016816	2:30 horas	$0,8 \times 10^4$	6 -7 horas	$0,6 \times 10^8$
Kp1410503	2:30 horas	$1,0 \times 10^4$	6 -7 horas	$6,4 \times 10^8$
Kp1536816	2:30 horas	$2,0 \times 10^4$	6 -7 horas	$2,9 \times 10^8$

6.3. Ensaios antimicrobianos com os peptídeos Synoeca – MP e IDR - 1018 contra as cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*.

A tabela 6 apresenta os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) obtidas quando o peptídeo Synoeca-MP foi avaliado com relação a sua capacidade antimicrobiana contra os isolado clínico de *K. pneumoniae*, com valores de CIM variando de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dependendo da cepa de *K. pneumoniae* analisada. A maior CIM observada foi contra a cepa Kp1536816 (128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e o menor contra a cepa Kp2177569 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Essa variação

nos resultados da concentração inibitória mínima (CIM) pode estar relacionada com o perfil de resistência de cada cepa, ou a produção de diferentes moléculas de virulência como sideróforos, o tamanho da cápsula e o tipo de antígeno “O” presente no LPS de cada uma. Com exceção da cepa Kp2177569, carbapenemase negativo, todas as demais apresentam o gene que codifica a enzima que degrada inúmeros antimicrobianos. São cepas altamente resistentes e algumas delas sensíveis apenas a amicacina e gentamicina. De qualquer modo, os resultados comprovaram a eficácia do peptídeo ao ter efeito bactericida sobre todas as estirpes multirresistentes testadas.

Tabela 06: CIMs obtidas quando o peptídeo Synoeca – MP foi avaliado contra diferentes isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes.

Cepa	Dose $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Bactericida/bacteriostático
(Kp1410503)	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	bactericida
(Kp1536816)	128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	bactericida
(Kp2016295)	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	bactericida
(Kp2177569)	32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	bactericida

As mesmas bactérias mencionadas acima também foram testadas contra o peptídeo IDR - 1018 (Tabela 7). Dentre as quatro cepas de *K. pneumoniae* utilizadas, somente a Kp2177569 (carbapenemase negativo) foi inibida. O MBC realizado posteriormente para essa cepa mostrou que o peptídeo IDR - 1018 foi capaz de eliminar todas as colônias dessa bactéria resultando num efeito bactericida. Nossos resultados comprovam os dados citados por outros autores que indicam uma maior capacidade imunomodulatória deste peptídeo do que antimicrobiana, Além disso, IDR - 1018 apresenta melhor efeito fungicida frente a *Candida albicans* (FREITAS, 2017). Entretanto, neste trabalho o objetivo não é a comprovação da atividade imunomodulatória do IDR - 1018, relatadas por outros autores e por essa razão

o mesmo não foi avaliado contra as cepas de *K. pneumoniae* em dosagens mais elevadas.

Tabela 07: Concentração Inibitória Mínima do peptídeo IDR - 1018 contra os isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes quando testado a concentração máxima de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Resultados da atividade antimicrobiana de três réplicas biológicas)

Cepa	MIC (Dose $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Cepa
(Kp1410503)	Não obtido	incontáveis
(Kp1536816)	Não obtido	incontáveis
(Kp2016295)	Não obtido	incontáveis
(Kp2177569)	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (bactericida)	0

6.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos amicacina, ceftazidime e levofloxacina contra a cepa Kp2177569 de *Klebsiella pneumoniae*.

A Tabela 8 mostra o resultado da dose de inibição obtida quando os antibióticos amicacina, levofloxacina e ceftazidime foram analisados isoladamente contra *Klebsiella pneumoniae* Kp2177569. Conforme mostrado no anexo 01, esta cepa em antibiograma realizado mostrou sensibilidade a amicacina, ceftazidime e levofloxacina. Corroborando com os resultados do antibiograma, nossas análises demonstraram que a levofloxacina foi o fármaco que apresentou melhor atividade bactericida (08 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Tal resultado bactericida observado em nossas análises também comprovam os resultados de sensibilidade deste isolado a estes antimicrobianos.

Tabela 08: Resultados da atividade antimicrobiana de cada fármaco contra cepa de *K. pneumoniae* kp2177569.

Fármaco	Dose $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Efeito
amicacina (aminoglicosídeo)	64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	bactericida
levofloxacina (quinolona)	08 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	bactericida
ceftazidime (cefalosporina)	16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	bactericida

6.5. Bioensaios para avaliação de combinação de fármacos *CHEK-BOARD* - (TABULEIRO DE XADREZ).

Os resultados das combinações dos peptídeos Synoeca - MP e IDR - 1018 e de Synoeca - MP com cada um dos antibióticos (amicacina, levofloxacina e ceftazidime) estão listados na tabela abaixo (Tabela 09). Synoeca - MP apresentou atividade sinérgica somente quando combinado ao antimicrobiano levofloxacina sendo necessário apenas $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ deste fármaco e $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do peptídeo Synoeca - MP associados para uma atividade bactericida de uma concentração de $5 \times 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ da cepa de *Klebsiella pneumoniae* (Kp2177569).

O sinergismo é uma interação positiva e seus efeitos considerados benéficos (LORIAN, 2006). Antes do teste de combinação, eram necessários $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Synoeca-MP e de $08 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de levofloxacina, em ensaios isolados, para inibir o crescimento da mesma concentração de microrganismos.

Quando combinados, os peptídeos IDR - 1018 e Synoeca - MP, mostraram interação do tipo indiferente. Isso significa que na associação entre ambos, o mecanismo de ação de um fármaco, não interfere no mecanismo de ação do outro, isso pode ocorrer talvez por atuarem em diferentes sítios na célula alvo, ou seja, os dois fármacos não interagem sob nenhum aspecto farmacocinético e farmacodinâmico (OLIVEIRA, 1986). Isso também ocorreu com a combinação dos fármacos Synoeca - MP e ceftazidime. A combinação da amicacina que atua na subunidade 30S do ribossomo também não apresentou atividade sinérgica ao ser associada ao Synoeca - MP.

Tabela 09: Resultado da interação por *Checker-board* entre Synoeca - MP e levofloxacina, amicacina e ceftazidime bem como da combinação de Synoeca-MP e IDR-1018. Todos os fármacos foram testados contra a cepa de *Klebsiella pneumoniae* Kp2177569 em três ensaios independentes para cada um dos fármacos.

MIC isolado ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)		MIC combinado ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)		CIFI	Interação
Synoeca-MP 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	IDR-1018 64 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Synoeca-MP 16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	IDR-1018 64 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	1,5	Indiferente
Synoeca-MP 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	amicacina 64 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Synoeca-MP 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	amicacina 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	1,5	Indiferente
Synoeca-MP 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	levofloxacina 8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Synoeca-MP 8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	levofloxacina 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	0,5	Sinérgico
Synoeca-MP 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	cefalosporina 16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Synoeca-MP 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	cefalosporina 8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	1,5	Indiferente

6.6. Definição da carga bacteriana de infecção induzida para posterior tratamento com Synoeca-MP.

Na figura 01, é possível verificar a porcentagem de sobrevivência de cada grupo de animais após a indução da infecção sistêmica com as diferentes cargas bacterianas. Os grupos que receberam as cargas $\sim 2,9 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹; $\sim 2,9 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹ e $\sim 2,9 \times 10^{12}$ UFC.mL⁻¹ durante as observações, apresentaram redução das atividades, ou seja, mantinham-se quase que imóveis num dos cantos da caixa, agrupados, respiração alterada quando comparados com o grupo controle que não recebeu nenhum tratamento. Além disso, a resposta aos estímulos externos (como se deslocar de um lado para outro quando o pesquisador movia a caixa) não acontecia com todos os animais, principalmente os que receberam as maiores doses da bactéria além de apresentarem dorso arqueado. Todos esses sinais não foram notados no grupo controle sem tratamento.

Com relação aos grupos T1 e T2 ($\sim 2,9 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ e $\sim 2,9 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ respectivamente), ambos respondiam aos estímulos externos movendo-se de um lado para o outro com rapidez, bebiam e comiam, subiam a grade da gaiola, mantendo-se em constante atividade durante as observações. A média de sobrevida foi estabelecida através da análise estatística utilizando o programa *GraphPad Prism®*, Software, versão 7.2 (San Diego, CA, EUA, 2016). A análise dos dados evidenciou uma média de sobrevida de 18% (18 horas) para o grupo T3 ($\sim 2,9 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹), média de 14,3% (17:04 horas) para o grupo T4 $\sim 2,9 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹ e média de 12,3% (16:43 horas) para o grupo T5 ($\sim 2,9 \times 10^{12}$ UFC.mL⁻¹) desde o início da indução da infecção (Figura 1). Portanto, para o teste com o peptídeo optou-se pela carga microbiana de inoculação em que o grupo de animais que tivesse apresentado a patologia e maior percentual de sobrevida. A concentração de inoculação que preencheu esses requisitos foi $\sim 2,9 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, tendo sido utilizada no experimento de sobrevida a partir no tratamento dos animais experimentalmente infectados com diferentes concentrações do peptídeo Synoeca – MP.

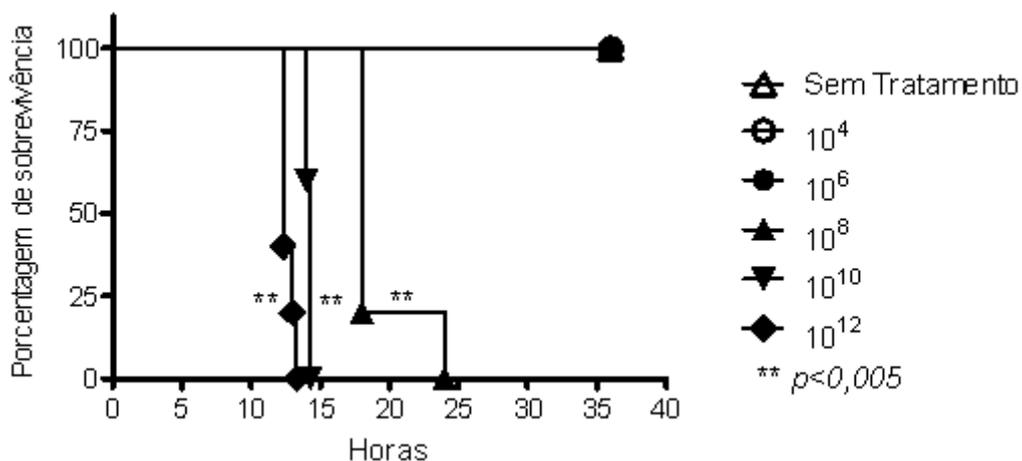


Figura 9: Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 com septicemia experimental por *K. pneumoniae*. Grupos de animais tratados com diferentes concentrações da bactéria variando de $\sim 2,9 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ a $\sim 2,9 \times 10^{12}$ UFC.mL⁻¹. Grupo controle: não infectados (Sem tratamento), cada grupo com n = 5.

Os grupos tratados com as concentrações bacterianas $\sim 2,9 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ e $\sim 2,9 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ (tratamentos 1 e 2, respectivamente) e grupo controle que não recebeu tratamento algum, sobreviveram durante todo o experimento. Os demais grupos foram a óbito antes das primeiras 25 horas. O grupo infectado com $\sim 2,9 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ (T3) foi o que apresentou maior tempo de sobrevivência.

6.7. Avaliação da eficiência do peptídeo Synoeca - MP em controlar uma infecção sistêmica experimental causada por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente (Kp1410503).

A figura 2 apresenta todos os grupos tratados com o peptídeo e os grupos controles. Os animais pertencentes ao grupo controle do ambiente (que não recebeu nenhum tratamento e não foram infectados) sobreviveram durante todo o experimento, ou seja, 07 dias assim como o grupo controle dos animais não infectados e tratados com 200µL de solução salina, os quais não apresentaram nenhuma alteração comportamental ao longo do período total de observação. Já o grupo tratado com 6,4 mg.Kg⁻¹ de amicacina sobreviveu por 23 horas (64% de sobrevivência).

Nos demais grupos experimentais, a maioria dos animais infectados e tratados com o peptídeo Synoeca - MP nas diferentes concentrações foram a óbito antes das primeiras 20 horas após o início da indução da infecção. Já nos primeiros 60 minutos, havia animal morto pertencente ao grupo infectado com $\sim 2,9 \times 10^8$ UFC m.L⁻¹ e tratado com 19,2 mg.kg⁻¹ de Synoeca-MP.

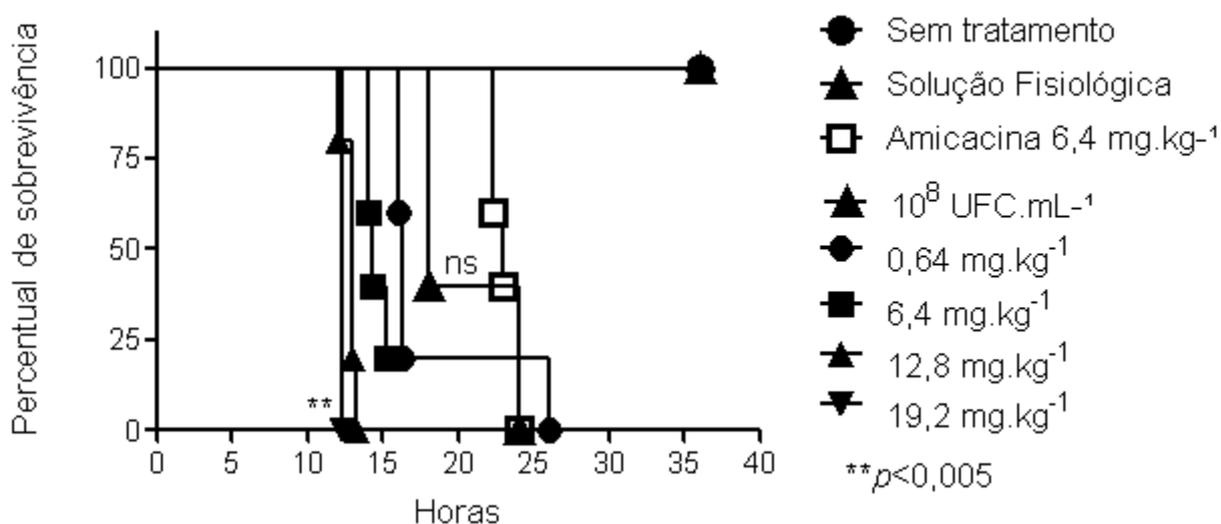


Figura 10: Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 com septicemia experimental por *K. pneumoniae* após tratamento com peptídeo Synoeca – MP. Grupos controles: *K. pneumoniae* (10^8), Amicacina (6,4 mg.kg⁻¹), Solução fisiológica e grupo Sem tratamento. Grupos tratados com as quatro diferentes concentrações do peptídeo Synoeca-MP (0,64 mg.kg⁻¹ a 19,2 mg.kg⁻¹).

Baseado nos dados obtidos após análise utilizando o programa *GraphPad Prism®*, Software, versão 7.2 (San Diego, CA, EUA, 2016) notou-se que não há diferença estatística significativa entre os grupos controles entre si e entre os grupos 0,64 mg.kg⁻¹ e 6,4 mg.kg⁻¹ comparados com o grupo tratado somente com a carga bacteriana de *K. pneumoniae*. No entanto, os grupos tratados com 12,8 mg.kg⁻¹ e 19,2 mg.kg⁻¹ apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$) quando comparados ao grupo tratado somente com a bactéria.

Na tabela abaixo é possível estimar o tempo em que cada grupo de animais sobreviveu durante o experimento.

Tabela 10: Média de sobrevivência dos animais tratados com o peptídeo Synoeca – MP e tempo médio de sobrevivência observados após a indução da infecção por *K. pneumoniae* Kp1410503 e o tratamento.

Inoculação intraperitoneal da carga bacteriana	Tratamento com Synoeca – MP 12 horas após a indução da infecção sistêmica	Tempo Médio Total em que o animal permaneceu vivo (horas) desde o início do tratamento	Tempo Médio Total em que o animal permaneceu vivo após a inoculação do peptídeo (12 horas após a indução da infecção)
$\sim 2,9 \times 10^9$ UFC.mL ⁻¹	19,2 mg.kg ⁻¹	16:43	4:43
$\sim 2,9 \times 10^8$ UFC.mL ⁻¹	12,8 mg.kg ⁻¹	17:08	5:08
$\sim 2,9 \times 10^9$ UFC.mL ⁻¹	6,4 mg.kg ⁻¹	17:15	5:15
$\sim 2,9 \times 10^9$ UFC.mL ⁻¹	0,64 mg.kg ⁻¹	18:26	6:26
Controle $\sim 2,9 \times 10^8$ UFC.mL ⁻¹	6,4 mg.kg ⁻¹ de amicacina	23	-
Controle sem tratamento	-	168	-
Controle (somente bactéria) $\sim 2,9 \times 10^8$ UFC.mL ⁻¹	-	18:48	-
Controle solução fisiológica	200 µL de solução fisiológica	168	-

As análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism®*, Software, versão 7.2 (San Diego, CA, EUA, 2016).

6.8. Avaliação da Atividade hemolítica

Synoeca – MP foi avaliado quanto ao potencial hemolítico a partir dos eritrócitos coletados no sangue dos camundongos (Protocolo CEUA 035/15). Este demonstrou hemólise na taxa de 8% na concentração de 16 µg.mL⁻¹, 30% na concentração de 32 µg.mL⁻¹ e de 64% na concentração de 64 µg.mL⁻¹. Estes dados divergem dos publicados por Freire, 2014 que revela que o peptídeo demonstrou atividade hemolítica somente em doses 17 vezes maiores

que as efetivas como antimicrobianos. Nossos dados revelam que o peptídeo não pode ser utilizado como fármaco, pois, causou alta taxa de hemólise nas concentrações inibitórias mínimas obtidas para cada cepa resistentes de *K. pneumoniae*.

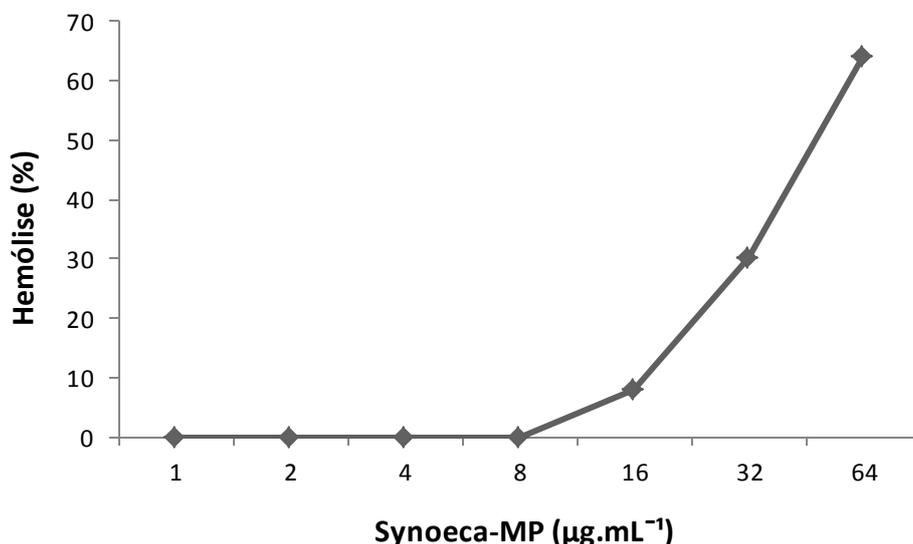


Gráfico 03: Ensaio hemolítico utilizando as concentrações de 1 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do peptídeo Synoeca-MP. O percentual de hemólise foi determinado a partir do controle positivo (Triton X -100, 0,1%) e controle negativo (Solução salina).

7. Recuperação da carga bacteriana

No experimento piloto todos os pulmões, rins e lavado peritoneal de cada animal sobrevivente e eutanasiado foram removidos para análise de recuperação de possíveis microrganismos exceto os que foram a óbito espontaneamente. Os animais inoculados com $\sim 2,9 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ e $\sim 2,9 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ do teste piloto tiveram os pulmões e os rins macerados em ambiente estéril com 1 mL de solução salina. Posteriormente, esse material passou por diluições seriadas (1:10), onde 100 μL da suspensão de um tubo era transferida para outro tubo tipo *Eppendorf* contendo 900 μL de solução salina. Foram realizadas 8 diluições seriadas de cada material coletado. Para cada uma das diluições, 2 μL foram semeados em meio LB ágar e as placas mantidas em estufa bacteriológica, a 37^o C, por até 24 horas, para contagem de possíveis UFC.

Os resultados mostraram que os animais inoculados com concentrações bacterianas de $\sim 2,9 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ e $\sim 2,9 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ foram capazes de eliminar todas as cepas neles inoculadas, pois não foi observado crescimento de UFCs de *K. pneumoniae* quando realizada o teste de recuperação de carga comparado ao grupo controle que não recebeu nenhum tratamento o qual, também, não apresentou crescimento de bactérias.

Já os animais infectados com $\sim 2,9 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ da (carga bacteriana selecionada após realização do teste piloto para os ensaios definitivos) cepa multirresistente de *K. pneumoniae* Kp1410503 e tratados com as diferentes concentrações do Synoeca-MP foram a óbito tão logo receberam a dosagem do peptídeo não sendo possível a coleta de material para análise de recuperação da carga bacteriana. Da mesma forma, o grupo controle tratado com amicacina também não possibilitou a coleta de amostras uma vez que os animais também morreram. Os camundongos pertencentes aos grupos sem tratamento e solução salina não apresentaram nenhum microrganismo após o teste de recuperação de carga bacteriana confirmando a ausência da bactéria atestando que não houve contaminação cruzada.

8. Análise Estatística dos Dados

Os dados apresentados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Os ensaios *In vitro* e *In vivo* foram realizados em triplicatas técnicas e repetidos em tempos diferentes. Os mesmos foram analisados pelo programa *Graphpad Prism*® (Disponível em: <http://www.graphpad.com/>). Para os ensaios que possuíram três ou mais grupos e uma única avaliação das amostras, as diferenças obtidas entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguindo-se do teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas com valores de $p < 0,05$ para os testes *in vitro* e $p < 0,005$ para os testes *in vivo*.

9. DISCUSSÃO

O número crescente de microrganismos multirresistentes que tem emergido nos últimos anos preocupa a comunidade médica a medida que reduz as opções terapêuticas. *Klebsiella pneumoniae* MDR (*Multidrug-resistant*) é uma bactéria que vem causando surtos em diversos países, incluindo o Brasil, tornando-se cada vez mais capaz de driblar o sistema imunológico do hospedeiro e causar a infecção graças a capacidade que possui de sofrer mutações que podem conferir resistência. Além disso, pode trocar genes de resistência com outras Enterobactérias e disseminar-se rapidamente em ambientes nosocomiais. Outras características que favorecem a disseminação rápida deste patógeno é a presença de estruturas como a cápsula e o lipídio “A”. Tais estruturas fazem com que este microrganismo seja capaz de degradar uma grande quantidade de antimicrobianos, principalmente os betalactâmicos (KIDD *et. al.*, 2017; LLOBET *et. al.*, 2009).

Esse cenário preocupa os profissionais de saúde a medida que essa bactéria se torna resistente aos fármacos de uso rotineiro incluindo a colistina, um antimicrobiano que voltou a ser utilizado pelos médicos e que é uma das últimas opções terapêuticas a serem administradas em casos de infecções graves. Ainda assim, já existem relatos de cepas resistentes a colistina (CAMPOS *et. al.*, 2017; KIDD *et. al.*, 2017).

A alta resistência aos antimicrobianos e a capacidade de disseminação de *K. pneumoniae* constitui-se num grave problema de saúde pública exigindo medidas de controle de infecção destes espaços. Estudos capazes de mostrar rapidamente a presença de genes de resistência ajudariam na melhor opção terapêutica desde o começo reduzindo assim, os riscos de surtos em hospitais, principalmente em UTIs (Unidades de terapia intensiva) além da redução dos custos dos tratamentos (OLIVEIRA *et. al.*, 2016).

O presente estudo analisou a atividade antimicrobiana dos peptídeos Synoeca – MP e IDR – 1018 contra isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* buscando conhecer suas ações frente a cepas multirresistentes numa tentativa de aliar um peptídeo antimicrobiano a um imunomodulador e observar seus

efeitos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, avaliou-se a combinação de antimicrobianos a fim de identificar possíveis atividades sinérgicas. Para o estudo *in vivo*, Synoeca – MP foi testado em quatro diferentes concentrações a fim de controlar a infecção sistêmica experimental causada pela bactéria *K pneumoniae* (Kp1410503) sensível somente a amicacina e gentamicina, dois aminoglicosídeos.

Klebsiella pneumoniae é um problema para pacientes acometidos por longos períodos em ambientes nosocomiais devido, principalmente, a capacidade que possuem de infectar os pulmões e causar pneumonia severa. A quantidade de pacientes que adquirem infecção por *K. pneumoniae* durante a internação culmina em altas taxas de mortalidade principalmente em pacientes que fazem uso de ventilação pulmonar (GLEN, 2003).

Diante disso, a elaboração de novos agentes capazes de eliminar estes patógenos, como os peptídeos antimicrobianos, é de grande importância e vem chamando a atenção da comunidade científica graças a resultados exitosos.

O mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos ainda não está completamente elucidado os quais podem apresentar diferentes formas de ação. Há diversas explicações para que estes sejam capazes de eliminar bactérias e fungos multirresistentes. Suas propriedades catiônicas e hidrofóbicas permitem que eles participem da imunidade inata reconhecendo e inativando microrganismos aniônicos (WANG *et al.*, 2014).

Além disso, há diferentes explicações para a atuação dos peptídeos. Estes podem atuar como o modelo barril, (GKEKA E SARKISOV, 2010), carpete (PAULSEN *et al.*, 2013) e formando os poros toroidais (BOZELLI *et al.*, 2012; ELGA, 2006).

Synoeca-MP, isolado da peçonha da vespa social *Synoeca surinama* possui 14 resíduos de aminoácidos, é anfipático podendo ser ativo contra membranas, porém pode apresentar atividade hemolítica (CASTRO e PALMA, 2009). O peptídeo foi inserido na classe dos mastoparanos devido a sua similaridade com os peptídeos já descritos para esta classe (FREIRE, 2014).

Synoeca-MP é rico em resíduos básicos e hidrofóbicos, apresentando uma estrutura em hélice-alfa com capacidade de formar poros em membranas afetando a viabilidade celular a medida que induz a permeabilidade mitocondrial. Este peptídeo pode, inclusive, estimular a liberação de histamina

por mastócitos, serotonina e prolactina da pituitária anterior (HIGASHIJIMA, *et al.*, 1988).

Segundo ROCHA *et al.* (2007), a ação dos mastoparanos pode estar diretamente ligada a desestabilização da membrana causando lise ou interação com a proteína G, o que ocasionará problemas na sinalização com consequente morte da célula por necrose ou apoptose e citotoxicidade a células tumorais.

Os primeiros testes antimicrobianos feitos por Freire (2014) foram realizados pelo método de Microdiluição em caldo (CLSI, 2012) contra cepas sensíveis de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* e com as mesmas estirpes, porém com perfil de resistência sendo *Staphylococcus aureus* - MRSA, *Escherichia coli* ESBL, *Enterococcus faecalis* – Vancomycin resistance, *Pseudomonas aeruginosa* MBL e *Klebsiella pneumoniae* - KPC todas doadas pelo laboratório FIOCRUZ. Os resultados mostraram que todas as estirpes testadas foram sensíveis ao antimicrobiano. Diante dos resultados promissores do peptídeo, decidiu-se testá-lo contra isolados clínicos com resistência múltipla de *Klebsiella pneumoniae* obtidos de pacientes hospitalizados no Hospital de Base de Brasília entre os anos de 2010, 2011 e 2012. Os resultados demonstraram ação antimicrobiana bactericida contra todas as quatro (4) estirpes testadas. Dentre elas, duas cepas sensíveis apenas a gentamicina e amicacina. A cepa Kp2177569, escolhida para os testes de combinação de fármacos, apresentou o menor MIC que foi de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ bactericida.

Já os testes para atividade hemolítica, Synoeca-MP demonstrou 8%, 30% e 64% de hemólise nas concentrações de 16, 32 e 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente corroborando com os dados encontrados por Lima (2017). Tais resultados divergem dos encontrados por Freire (2014) que demonstrou uma atividade hemolítica de 50% somente na concentração aproximada de 295 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Synoeca-MP. As diferenças empregadas na metodologia podem explicar as divergências entre os resultados encontrados neste estudo e de Lima (2017) frente aos de Freire (2014).

Na experimentação *in vivo*, ao inocular o peptídeo nos animais, percebeu-se que uma hora depois, alguns camundongos pertencentes ao grupo que recebeu a maior dosagem do antimicrobiano ($19,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) já estavam mortos e o sangue coagulado o que reforça a ideia de que o peptídeo apresenta-se tóxico.

Por pertencer a classe dos mastoparanos, o peptídeo Synoeca – MP é capaz de causar danos aos mastócitos que são células do tecido conjuntivo que participam dos mecanismos de defesa do organismo e estão envolvidos em reações incomuns locais, reações inflamatórias, eliminação de parasitas e também da imunidade inata contra infecções causadas por bactérias (WEDEMEYER *et. al.*, 2000) e vírus (DE PAULIS *et. al.*, 2000). Além disso, promovem a exocitose de diversas células de mamíferos, participa da atividade hemolítica e de formação de edema, além de provocar falência cardiovascular devido a intensa liberação de íons potássio eritrocitários (CASTRO e PALMA, 2009).

Diante disso, há várias hipóteses que podem justificar a morte prematura dos animais após a inoculação do peptídeo comparado ao grupo controle que foi tratado apenas com $\sim 2,9 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$, o qual teve média de sobrevivência de 18%, dentre elas, a metodologia aplicada, um possível equívoco na pesagem do peptídeo, alta toxicidade do antimicrobiano uma vez que o mesmo pertence a classe dos mastoparanos. Dessa forma, análises mais precisas são necessárias para avaliar o que de fato ocasionou a morte dos camundongos num período de tempo tão curto (Cerca de 60 minutos após a aplicação da dosagem mais alta $19,2 \text{ mg.kg}^{-1}$). Portanto, há a necessidade de estudos minuciosos para que seja possível compreender a atuação do antimicrobiano Synoeca-MP *in vivo*.

Essa variedade de modelo de infecção intraperitoneal permite ao peptídeo atuar aumentando a permeabilidade da membrana com a formação de poros que contribuem para o extravasamento celular (LOPEZ-ABARRATEGUI, *et. al.*, 2012). Porém, não é possível através deste experimento, definir as determinantes que ocasionaram a coagulação do sangue e a morte tão prematura dos animais. O que podemos concluir, inicialmente, é que em virtude dos animais terem morrido poucas horas após a inoculação do peptídeo mostra-nos que o óbito se deu pela dose do

antimicrobiano já que os animais tratados apenas com a estirpe de *K. pneumoniae* mantiveram o padrão do experimento piloto confirmando a tese de que sobreviveriam entre 18 e 24 horas. Além disso, os compostos peptídicos mais comuns em venenos de vespas são pertencentes a classe dos mastoparanos cuja principal função biológica é a degranulação de mastócitos que são células de defesa do organismo envolvido em reações imunes locais (WEDEMEYER *et. al.*, 2000; DE PAULIS *et. al.*, 2000).

A resistência intrínseca ou adquirida a muitos antibióticos tem comprometido a terapêutica e dificultado as opções de tratamento. Dessa forma, a combinação de fármacos pode ser uma alternativa satisfatória. O sinergismo é considerado uma interação positiva quando os efeitos combinados dos antibióticos é relativamente maior que seus efeitos independentes quando usados isoladamente. Já o antagonismo é uma interação negativa na qual o efeito combinado dos fármacos a serem examinados é significativamente menor que seus efeitos independentes quando testados separadamente. Uma interação indiferente entre os antibióticos ocorre quando não há interação significativa entre eles (LORIAN, 2006).

Pensando nisso, o peptídeo Synoeca-MP foi combinado com outros antimicrobianos na tentativa de identificar possíveis combinações sinérgicas capazes de contribuir para a morte do microrganismo sem agredir o hospedeiro uma vez que as concentrações podem ser reduzidas e, conseqüentemente, os efeitos colaterais.

Os testes de combinação de fármacos realizados entre Synoeca – MP, IDR - 1018, amicacina, levofloxacina e ceftazidime demonstrou atividade sinérgica somente quando combinado a quinolona levofloxacina ao peptídeo Synoeca – MP. O fármaco levofloxacina inibe a atividade da DNA girase ou topoisomerase II, que são enzimas fundamentais à sobrevivência bacteriana. A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam uma síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, resultando na morte da bactéria. Já amicacina liga-se à fração 30S dos ribossomos inibindo a síntese de proteínas ou produzindo proteínas defeituosas e o ceftazidime atua como

inibidor da síntese da parede celular bacteriana fixando-se as proteínas de ligação as penicilinas (PBPs) resultando na interrupção da biossíntese da parede celular (peptideoglicano) levando a lise e a morte da bactéria (ANVISA, 2017).

A levofloxacina apresenta como efeitos colaterais náuseas e vômitos em boa parte dos pacientes minutos após a administração. Além disso, o uso prolongado deste fármaco (6/7 dias) pode resultar em hepatotoxicidade severa incluindo hepatite aguda e eventos fatais, miastenia grave, fraqueza muscular, convulsões, psicoses tóxicas e aumento da pressão intracraniana. Também há relatos de insuficiência renal, distúrbios oftalmológicos entre outros (INFAMED, 2012). A junção de levofloxacina com Synoeca - MP pode ser um indicador da possibilidade de diminuição da concentração de cada antimicrobiano e, conseqüentemente, dos danos teciduais gerados por eles isoladamente no hospedeiro. Além da redução/eliminação dos efeitos colaterais, os fármacos são capazes de eliminar a cepa multirresistente de *K. pneumoniae*. O efeito sinérgico entre Synoeca - MP e levofloxacina é uma demonstração de que ambos podem ser efetivos quando combinados o que é interessante para a indústria farmacêutica e um fator importante a ser explorado. A ação do levofloxacina ocorre no DNA, portanto, há a hipótese de que Synoeca - MP tenha causado a lise ou um poro na parede celular da bactéria permitindo a ação mais efetiva do antibiótico levofloxacina.

É muito difícil reconhecer as ações de muitos medicamentos, sobretudo, os efeitos fisiológicos e bioquímicos a base da interação. Esse desconhecimento faz com que uma associação medicamentosa seja danosa ao paciente. De tão relevante que este assunto o é, os órgãos sanitários de autoridades internacionalmente reconhecidas como a OMS, FDA (Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos), A Sociedade Farmacêutica da Inglaterra e a Ordem dos farmacêuticos Franceses estabelecessem uma Doutrina sobre a farmacovigilância, em 1972, pela OMS com o intuito de advertir os Estados membros das possíveis reações adversas causadas por substâncias terapêuticas em uso. A Legislação Brasileira segue tais recomendações (OLIVEIRA, 1986). Diante do exposto fica a sugestão do desenvolvimento de pesquisas que realizem tais testes de combinação entre

fármacos já comercializados e destes com os peptídeos antimicrobianos. Há muitas informações a serem descobertas e que podem ser promissoras para a humanidade a medida que contribuem para a melhoria da qualidade de vida dos cidadãos.

Outro peptídeo estudado neste projeto foi o IDR-1018. De acordo com Freitas (2017), o peptídeo IDR - 1018 é capaz de auxiliar o organismo a eliminar a bactéria por meio do recrutamento de macrófagos para o local da infecção. Dessa forma, IDR - 1018 faz o deslocamento de células imune, agindo sobre macrófagos desencadeando a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. O comportamento deste peptídeo pode explicar o porquê da maioria das cepas de *Klebsiella pneumoniae* testadas não terem tido o crescimento inibido. Esse peptídeo apresenta melhor atividade fungicida frente a *Candida albicans* e alta atividade Imunomodulatória (FREITAS, 2017).

Por fim, *Klebsiella pneumoniae* é uma espécie causadora de surtos nosocomiais além de possuir uma elevada taxa de resistência o que justifica sua vigilância constante além da determinação rápida de seu perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos. Tais ações devem ocorrer com periodicidade oferecendo dados que ajudem na implantação de políticas de controle de infecção hospitalar eficazes para a realidade dos estabelecimentos de saúde pública e privada (OLIVEIRA *et. al.*, 2016).

10. CONCLUSÕES

Conforme os resultados encontrados no estudo *in vitro* e *in vivo* envolvendo os peptídeos Synoeca – MP e IDR – 1018, concluiu-se que:

- ✓ Synoeca – MP apresentou atividade antimicrobiana bactericida contra todas as cepas de isolados clínicos testadas demonstrando melhores resultados que IDR – 1018 que só inibiu a cepa Kp2177569 Carbapenemase negativo (MIC de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ bactericida).
- ✓ PCR mostrou que três cepas eram KPC+ e uma era KPC- Kp 2177569.
- ✓ Cepas apresentam similaridades nas curvas de crescimento sendo escolhido o valor $\sim 2,9 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ para todos os bioensaios *in vitro* (Com ajustes para cada teste).
- ✓ Synoeca – MP demonstrou ação sinérgica quando combinado com levofloxacina.
- ✓ Na experimentação *in vivo*, Synoeca – MP não foi capaz de melhorar a sobrevida dos animais nas quatro concentrações testadas ($0,64 \text{ mg.kg}^{-1}$; $6,4 \text{ mg.kg}^{-1}$; $12,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ e $19,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) levando todos os animais a óbito.

11. PERSPECTIVAS:

- ✓ Repetição dos ensaios in vivo com outras dosagens do peptídeo não hemolítico e em combinação com o fármaco levofloxacina.
- ✓ Avaliar a atividade imunomodulatória utilizando o Synoeca-MP na concentração de $8\mu\text{g.mL}^{-1}$ e deste em combinação com levofloxacina.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYLATH, S. C.; TUROS, E. Drug delivery approaches to overcome bacterial resistance to β -lactam antibiotics. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, p. 931-949, 2008.

ALBERTI, S. *et al.* C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. **Infection and Immunity**, v.61, p. 852–860, 1996.

ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**, v. 53, n° 10, p.1565–1574, 2014.

ALVES, A. P.; BEHAR, P. R. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Rev. AMRIGS**, v. 57, n. 3, p. 213-8, 2013.

AMAKO, K.; MENO, Y.; TAKADE, A. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 4960–4962, 1988.

ANDENA, S. R.; CARPENTER, J. M.; NOLL, F. B. A phylogenetic analysis of *Synocca* de Saussure, 1852, a neotropical genus of social wasps (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini). **Entomologica Americana**. v. 115, n. 1, p. 81-89, jan 2009.

ANTUNEZ, C. *et al.* Immediate allergic reactions to cephalosporins: evaluation of cross-reactivity with a panel of penicillins and cephalosporins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.117, n° 2, p. 404-10, 2006.

ANUNTHAWAN, T. *et al.* Cationic amphipathic peptides Kt2 and Rt2 are taken up into bacterial cells and kill planktonics and biofilm bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, n.6, p 1352-8, 2015.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Antimicrobianos**: Bases teóricas e uso clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm. Acesso em: 12 set. 2017.

ARBEX, M. A., *et. al.*. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 2: Fármacos de segunda linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, nº 5, p. 641-656, 2010.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-resistant bugs in 21st century: a clinical super challenge. **The New England Journal Medicine**, v. 360: 439-43, 2009.

ARNOLD, R. S. *et. al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **South Med Journal**, v. 104, n. 1, p. 40-45, 2011.

ASTORZA, B.; DE CORTÉS, G.; CRESPI, C. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. **Infection Immunity**. v. 72, p. 1767–1774, 2004.

AUTO, H. F.; CONSTANT, J. M. C.; CONSTANT, A. B. L. **Antibióticos e quimioterápicos**. 5 ed. Maceió: EDUFAL, 2008.

AZEVEDO, M. M. S. **Farmacologia dos antibióticos β -Lactâmicos**. 70 f. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2014.

AZZOPARDI, E.A. *et. al.*. Gram negative wound infection in hospitalised adult burnpatients-systematic review and metanalysis. **PLoS One** e95042, v. 9, 2014.

BAGHAL, S. M. L.; GARGARI, S. L. M.; RASOOLI, I. Production and immunogenicity of recombinant ferric enterobactin protein (FepA). **International Journal of Infectious Diseases**. v. 14, n. 3, p. e166–e170, 2010.

BAGLEY, S.T. Habitat association of *Klebsiella* species. **Journal of Infection Control.**, v.6, p. 52–58, 1985.

BARROS, L. M. *et. al.* Prevalência de microrganismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Rev. Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v. 33 n. 3, p.429-35, 2012.

BENNETT, C. J.; YOUNG, M. N.; DARRINGTON, H. Differences in urinary tract infection in male and female spinal cord injury patients on intermittent catheterization. **Paraplegia**, v. 33,p. 69–72, 1995.

BERENDS, E. T. M. *et. al.* Bacteria under stress by complement and coagulation. **FEMS Microbiology Review**, 2014.

_____. Contribution of the complement membrane attack complex to the bactericidal activity of human serum. **Mol. Immunol.** v. 65, p. 328–335, 2015.

BIALEK-DAVENET, S. *et. al.* Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. **Emerg. Infect. Dis.** v. 20, 1812–1820, 2014.

BIBERG, C. A. *et. al.* KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwest region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 501–504, 2015.

BIEDENBACH, D. J.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 50, p. 59–69, 2004.

BOLOURI, H. *et. al.* Child Neurology Society. **American Neurological Association**, v. 75, n° 3, p. 395–410, 2014.

BOWDISH, D. M. *et. al.* Impact of LL-37 on anti-infective immunity. **Journal Leukocyte Biology**. v. 77, p. 451–459, 2005.

BOZELLI, J. C. *et. al.* Effects of head groups and curvature on binding of the antimicrobial peptide tripticin to lipid membranes. **Chemistry and Physics of lipids**. v.165, n° 5, p. 356-73, 2012.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.4, p.933-951, 2001.

BRADLEY, J. S. *et. al.* Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, pp. 93-100, 1999.

BRASIL. Investigação e controle de bactérias multirresistentes. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**, 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/reniss/manual%20controle_bacterias.pdf. Acesso em 07 de março de 2017.

BRISSE, S. *et. al.* Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PLoS One**, v. 4, pp. 49-82, 2009.

_____. The Genus *Klebsiella*. **Prokaryotes**, v. 6, Chapter 3.3.8, p. 159–196, 2006.

_____. wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, pp. 4073–4078, 2013.

BROBERG, C. A.; PALACIOS, M.; MILLER, V. L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. **F1000Prime Rep**, v. 6, n. 64, 2014.

BROGEDEN, K. A. Antimicrobial peptide: pore forms or metabolic inhibitor in bacteria? **Nature Reviews, Microbiology**. 3. 238-50, 2005.

BROGEDEN, N. K.; BROGEDEN, K. A. Will new generation of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **International Journal of Antimicrobial agentes**, v. 38, pp. 2177-25, 2017.

BRÖTZ-OESTERHELT, H.; BRUNNER, N. A. How many modes of action should an antibiotic have? **Current Opinion in Pharmacology**. v. 8, p. 564, 2008.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010.

_____; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, nº 6, p. 1211–1233, 1995.

CAI, J. C. *et. al.*. Detection of KPC-2 and qnrS1 in clinical isolates of *Morganella morganii* from China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Journal**, v. 73, n. 2, p. 207-209, 2012.

CAMPOS, C. C. *et. al.* KPC: an important mechanism of resistance in *K. pneumoniae* isolates from intensive care units in the Midwest region of Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, nº 8, p. 646-651, 2017.

CASSETTARI, V. C. *et. al.* Outbreak of extended-spectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a health care worker. **Journal of Pediatrics** (Rio Janeiro), v. 82, n. 4, p. 313-6, 2006.

CASTANHEIRA, B. A. M. G. **Mecanismos de resistência a antibióticos**. Universidade Lusofona de Humanidades e Tecnologias (Dissertação de Mestrado), Lisboa, 2013.

CASTRO, M. F. F.; PALMA, S. M. **Alergia a venenos de insetos**. 1ª ed. São Paulo: Manole Editora, p. 46-48, 2009.

CHAMBERLAIN J. S. *et. al.*. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Res.**, nº23, p.11141-11156, 1982.

CHANG, M. R. *et. al.* The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the *bla*KPC gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46: 114-5, 2013.

CHANG, W.; HUANG, C.; LU, C.; CHIEN, C. Adult *Klebsiella pneumoniae* meningitis in Taiwan: an overview. **Acta Neurologica Taiwan**, v. 21, p. 87-96, 2012.

CHAPMAN, O. D. The Genus *Klebsiella*. **Journal of Bacteriology**, v. 51, n. 5, p. 637, 1946.

CHEUNG, R. C. F.; NG, T. B.; WONG, J. H. Marine Peptides: Bioactivities and Applications. **Marine Drugs**, v. 13, nº 7, p. 4006–4043, 2015.

CHUNG, D. R. *et. al.*. Korean Study Group for Liver Abscess. Emerging invasive liver abscess caused by K1 serotype *Klebsiella pneumoniae* in Korea. **Journal of Infection**, v. 54, p. 578–583, 2007.

CLOETE, T. E. Resistance mechanisms of bacterial antimicrobial compounds. **Biodeter Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 277-282, 2003.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 10. ed. Approved standard M07-A10. CLSI, Wayne, PA, 2016.

_____. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 26. ed, CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.

CUNHA, B.A. **Antibiotic Essentials**. 11. ed., Cidade: Jones and Bartlett Learning, 2012.

CUNLIFFE, R. N.; MAHIDA, Y. R. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. **Journal Leukocyte Biology**, v. 75, p. 49–58, 2004.

DA CUNHA, N. B. *et. al.*. The next generation of antimicrobial peptides (AMPDs) as molecular therapeutic tools for treatment of diseases with social and economic impact. **Drugs Discovery Today**, v. 1, p. 1, 2016.

DATTA, K.; HAMAD, M. Immunotherapy of fungal infection. **Immunological Investigations**, v. 44: 738-76, 2015.

DAIKOS, G. L., *et. al.*. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of Carbapenems. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, 2322–2328, 2014.

DEINSTMANN, R. *et. al.*. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-7, 2010.

DEMAIN, A. L. Prescription for an ailing pharmaceutical industry. **Nat. Biotechnology**, v. 20, p. 331, 2002.

DESIMONI, M. C.; ESQUIVEL, G. P.; MERINO, L. A. Fecal colonization by extended-spectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v.22, n.9, p.507-11, 2004.

DIAS, V. C. **Resistência aos Carbapenêmicos e Virulência de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* Isolados de um Serviço de Saúde Terciário.** 118f. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Juiz de Fora, 2015.

DOMENICO, P. *et. al.*. Surface antigen exposure by bismuth dimercaprol suppression of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 67, 664–669, 1999.

DOORDUIJN, D. J. *et. al.*. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. **Immunobiology**, v. 221, p.1102–1109, 2016.

DRUSANO, G. L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. Supplement 1, p. S89 – S95, 2007.

DURANTE-MANGONI, E. *et. al.*. Do we still need the aminoglycosides? **Internationa.Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, nº 3, p. 201-205, 2009.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technol. Biotech.**, v. 46 (1), p. 11-21, 2008.

ELEMAN, A.; RAHIMIAN, J.; MANDELL, W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 271–274, 2009.

ELGAR, D. Cysteine-free peptides in scorpion venom: geographical distribution, structure-function relationship and mode of action. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 2495-2502, 2006.

ELLISON, R. T.; GIEHL, T. J. Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. **Journal of Clinical Investigation.**, v. 88, p. 1080–1091, 1991.

ELSBACH, P. What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 1643–1645, 2003.

ESPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1-2, p.11-28, 1999.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010**. Stockholm: ECDC, 2010.

_____. **ECDC surveillance report: Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012**. Stockholm: ECDC; 2014. [citado 8 Ago 2015]. Disponível em: <http://www.ecdc.europa.eu/>.

FANG, C. T. *et al.*. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **Journal Exp. Med.**, v. 199, p. 697–705, 2004.

FENSTERSEIFER, I. C. M. **Avaliação da atividade antibacteriana e imunomodulatória de ciclotídeos**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Patologia molecular Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

FERNANDES, L. S. **Resistência Bacteriana aos Betalactâmicos por Mecanismo Enzimático: Uma Revisão de Literatura com Enfoque nas Betalactamases de Espectro Extendido**. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development the failure of success? **Nature Biotechnology**, v. 24, nº 12, p. 1497, 2006.

FERNÁNDEZ-CUENCA, F. *et al.*. In vitro activity of azithromycin in combination with amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin or imipenem against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Chemotherapy**, v. 49 (1-2), p. 24-26, 2013.

FRANK, D.N. *et. al.*. Culture independent microbiological analysis of Foley urinary catheter biofilms. **PLoS One**, v. 4, e7811, 2009.

FRANKLIN, G. A. *et. al.*. A novel model of pneumonia from intraperitoneal injection of bacteria. **The American Journal of Surgery**, v. 186, p. 493–499, 2003.

FREIRE, D. O. **Atividade antimicrobiana do novo peptídeo Synoeca-MP isolado de *Synoeca surinama* frente a bactérias resistentes**. 60 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

FREITAS, C. G.; FRANCO, O. L. Antifungal peptide with potential against pathogenic fungi. In: A. B., *et. al.*. (ED) **Recente Trends in Antifungal Agents and Antifungal Therapy**. Índia: Springer India, 2-16, cap. 3, p. 75-95, 2016. ISBN 978-81-322-2782-3.

FREITAS, C. G. **IDR-1018**: um peptídeo com atividade fungicida e imunomodulatória contra *Candida albicans*. Tese de Doutorado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. Brasília, 2017.

FOX, J.L. Antimicrobial peptides stage a comeback. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 379-82, 2013.

GHADIRI, H. *et. al.*. The antibiotic resistance profiles of bacterial strains isolated from patients with hospital acquired bloodstream and urinary tract infections. **Critical Care Research and Practice**, 2012.

GIANI, T. *et. al.*. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: Results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. **Euro Surveill.**, v. 30, p. 18–22, 2013.

GIRMENIA, C.; SERRAO, A.; CANICHELLA, M. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in mediterranean countries. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 8, nº 1, 2016.

GKEKA, P.; SARKISOV, L. Interactions of phospholipid bilayers with several classes of amphiphilic alpha-helical peptides: insights from coarse-grained

molecular dynamics simulations. **Journal of Physical Chemistry**, v. 114, nº. 2, p. 826-39, 2010.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: Pergamon Press, 2010.

GRUNDMANN, H. *et al.*. CNSE Working Group. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: Conclusions from a meeting of national experts. **Euro Surveill**, v. 15, 2010.

GUANA, J.; ZHUO, C.; DH, S. CHINET 2012 surveillance of antibiotic resistance in *Klebsiella spp* in China. Chin. **Journal of Infection Chemother**, v. 14, 398–404, 2014.

GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, nº. 3, 667-679, 2010.

HAIDAR, G.; ALKROUD, A.; CHENG, S. Association between the presence of aminoglycoside-modifying enzymes and in vitro activity of gentamicin, tobramycin, amikacin, and plazomicin against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase- and extended-spectrum--lactamase-producing *Enterobacter* species. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 60, p. 5208-5214, 2016.

HALL, M. J.; MIDDLETON, R. F.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 11, nº 5, p. 427-433, 1983.

HANCOCK, R. E.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends Biotechnology**, v.16, p. 82–88,1998.

HANCOCK, R. E.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends Microbiology**, v. 8, p. 402–410, 2000.

HANCOCK, R. E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 156–164, 2001.

HANSEN, D. S. *et al.*. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates

from different sources and countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 56–62, 1999.

HASDEMIR, U. O. *et. al.* Detection and Prevalence of Active Drug Efflux Mechanism in Various Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Turkey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2701–2706, 2004.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **Journal of British Medical**, v. 317, p. 657-660, 1998.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v. 64, 2009.

HIGASHIJIMA, T. *et. al.* Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP – binding regulatory proteins (G proteins). **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n° 14, p. 6491-4, 1988.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAOKI, H. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v. 350, p. 1670–1673, 1997.

HYONMIN CHOE, M. D. *et. al.* Immunomodulatory Peptide IDR-1018 Decreases Implant Infection and Preserves Osseous integration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 473, p. 2898–2907, 2015.

HSIEH, P.F. *et. al.* *Klebsiella pneumoniae* peptidoglycan-associated lipoprotein and murein lipoprotein contribute to serum resistance, antiphagocytosis, and proinflammatory cytokine stimulation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, p. 1580–1589, 2013.

HU, F. P. *et. al.* Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005–2014. **Clinical Microbiology Infection**, v. 22, p. S9–S14, 2016.

IMLER, J. L.; BULET, P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. **Chemical Immunology Allergy**, v. 86, p. 01–21, 2005.

INFARMED. **Prontuário terapêutico**. 11. ed. Lisboa: Infarmed, Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/>. Acesso em: 08 mar. 2017.

JAMES, G. S. Universal bacterial identification by PCR and DNA sequencing of 16S rRNA gene. in: SCHULLER, M. *et. al.* **PCR for Clinical Microbiology**. Eds., pp. 209–214, Springer, New York, USA, 2010.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JENSSEN, H. *et. al.* Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 491:511, 2006.

JIN, W.; WACHINO, J.; KIMURA, K. New plasmid-mediated aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-Ia, and ESBL, TLA-3, from a *Serratia marcescens* clinical isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70. p.1331-1337, 2015.

JONES, R. N. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, S81–S87, 2010.

KANG, C. I.; KIM, S. H.; PARK, W.B. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant Gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 760–766, 2005.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010.

KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, n° 12, p. 3249 – 3256, 2000.

KELLER, J. J. *et. al.* Risk of infections subsequent to pyogenic liver abscess: a nationwide population-based study. **Clinical Microbiology Infection**, v.19, p. 717-22, 2012.

KIDD, T. J. *et. al.* A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence. **EMBO Molecular Medicine**, v. 9, n° 4, 2017.

KLEIN, N. C.; CUNHA, B. A. Third-generation cephalosporins. **Medical Clinics of North American**, v. 79, p. 705-719, 1995.

LAARMAN, A.; MILDER, F.; VAN STRIJP, J. V.; ROOIJAKKERS, S. Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Journal of Molecular Medicine**, 2010.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1451-1470, 2005.

LANDMAN, D. *et. al.* Evaluation of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v. 60, p. 78-82, 2007.

LASCOLS, C. *et. al.* Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel β -lactamases: a snapshot of extended-spectrum β -lactamases throughout the world. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1632-9, 2012.

LAWLOR, M. S. *et. al.* Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. **Molecular Microbiology**, v. 58, p.1054-73, 2005.

LEDERMAN, E. R.; CRUM, N. F. Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics. **American Journal of Gastroenterology**, v. 100, p. 322–331, 2005.

LEUNG, W. C.; HASHIMOTO, K. Modification of Susceptibility to *Klebsiella pneumoniae* during Murine Cytomegalovirus Infection. **Microbiol. Immunol.**, v. 30, n° 8, p. 761-776, 1986.

LEVY, S. B., Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33 (Supple 3), S124-9, 2001.

LEVYHARA, G. *et. al.* Detection, treatment na prevetion of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: recomendations from na international working group: **Journal of Chemoterapy** (Florence, Italy). v. 25, n° 3, p. 129-40, 2013.

LIMA, S. M. F. **Peptídeos de defesa do hospedeiro como adjuvantes na Terapia endodôntica**. Qualificação (Mestrado). Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2017.

LIMA, M. R. S. SOARES, N. S; MASCARENHAS, M. D. M. *et. al.* Intervenção em surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro expandido (ESBL) em unidade de terapia intensiva neonatal em Teresina, Piauí, 2010-2011. **Epidemiol. Serv. Saúde**, vol.23, n.1, pp.177-182, 2014.

LIMA, T. B. *et. al.* In Vivo Effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) Leaf Extracts on Diarrhea Treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2011, Article ID 309390, 10 pages, 2011.

LIN, M. Y. *et. al.* The Importance of Long-term Acute Care Hospitals in the Regional Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase – Producing *Enterobacteriaceae*. **Centers for Disease Control and Prevention Epicenters Program**, v. 57(9), p. 1246–52, 2013.

LIU, Y.Y. *et. al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 16, p. 161-168, 2015.

LLOBETA, H. *et. al.* Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 112, 2015. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/112/46/E6369.full.pdf>. Acesso em: 15 set. 2017.

LLOBET, E. *et. al.* *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. **Antimicrob. Agents Chemotherapy**, v. 53, n° 1, p. 298–302, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2612193/pdf/0657-08.pdf>. Acesso em: 15 set. 2017.

[LOHNER, K. News strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. **General Physiology and Biophysics**, v. 28, p. 105:16, 2009.](#)

LOPES, S. A. Q. **Suscetibilidade a antimicrobianos em isolados de expetorações**. 101f. Dissertação de mestrado, Universidade de Aveiro. Aveiro, 2012.

[LOPEZ-ABARRATEGUI, C. et al. Functional characterizations of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Centhritis muricatus*. *Biochimie*, v. 94, nº 4, p. 968-74, 2012.](#)

LV, Y.; LI, Y.; XUE, F. Mohnarin report of 2011–2012: surveillance for resistance of bacteria causing bloodstream infections. *Chin. J. Clin. Pharmacol.*, v. 30, p. 278–288, 2014.

LYE, W. C.; CHAN, R. K. T.; LEE, E. J. C.; KUMARASINGHE, G. Urinary tract infections in patients with diabetes mellitus. *J. Infect.*, v. 24, p. 169–174, 1992.

MARCH, C. et al.. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. **PLoS One**, v. 8, 2013.

MARIA-NETO, S. et al. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: from the surface to deep inside. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1848, p. 3078-88, 2015.

MARKART, P. et al. Mouse lysozyme M is important in pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 169, p. 454–458, 2004.

MARTIN, E.; GANZ, T., LEHRER, R. I. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. **Journal Leukocyte. Biology.** v. 58, nº 2, p.128–136, 1995

MARTIN-LOECHES, I. et al.. Resistance patterns and outcomes in intensive care unit (ICU)-acquired pneumonia. Validation of European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification of multidrug resistant organisms. **Journal of Infection**, v. 70, p. 213 – 222, 2015.

MARTINEZ, J. et al.. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v.7, n.4, p.261-8, 2004.

MARTINO, P.D. *et. al.* Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, and adhesion of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. **Infection and immunity**, v. 63, p. 4336–4344, 1995.

MERINO, S. *et al.* Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* Resistance to Complement-Mediated Killing. **Infection and immunity**, v. 60, n° 6, p. 2529-2535, 1992.

MEYER G; PICHOLI, U. S. Fenótipos de betlactamase em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 47, n° 1, p. 25-31, 2011.

MICOZZI, A. *et. al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in high-risk haematological patients: factors favouring spread, risk factors and outcome of carbapenemase resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremias. **BMC Infectious Diseases**, v.17, v. 203, p. 2-12, 2017.

MILANO, S. Intraperitoneal Injection of Tetracyclines Protects Mice from Lethal Endotoxemia Downregulating Inducible Nitric Oxide Synthase in Various Organs and Cytokine and Nitrate Secretion in Blood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n° 1, p. 117–121, 1997.

MINARINI, L. A. R. **Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em enterobactérias isoladas de alguns Estados brasileiros**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Dissertação de mestrado) Ribeirão Preto, 2008.

MISHRA, M. *et. al.* Identification of OprF as a complement component C3 binding acceptor molecule on the surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect. Immun.**, v. 83, n° 8, p. 3006–3014, 2015.

MITH, O. *et. al.* The antifungal plant defense AhPDF1.1b is a beneficial factor evolved in adaptive response to zinc overload when it is expressed in yeast cells. **Microbiology Open**, v. 4, p. 409-22, 2015.

MOELLERING, R. C. JR. Antibiotic Resistance: Lessons for the Future. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27 (Supplem 1), p. S135-S140, 1998.

MOLTON, J. S. *et. al.* The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: A perspective from Asia. **Clin. Infect. Dis**, v. 56, p. 1310–1318, 2013.

MONTEIRO, A. R. P. **Resistência adquirida em quinolonas em *Enterobacteriaceae* isoladas de suinoculturas portuguesas**. 79f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

MORENO, M.; GIRALT, E. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan, **Toxins (Basel)**, v. 7, nº 4, p. 1126-50, 2015.

MURPHY, C.N. *et. al.*. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. **Infection Immunity**, v. 81, nº 8, p. 3009–3017, 2013.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v 45, p. 383-384, 1960.

MURRAY, P. R.; PFOLLER, M. A.; ROSENTHAL, K. S. **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

NATION, R. L.; LI, J.; CARS, O. *et. al.*. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. **Lancet Infect. Dis.**, v. 15, p. 225-234, 2015.

NEIDELL, M. J. *et. al.*. Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clin Infect Dis.**, v. 55, nº 6, p. 807-815, 2012.

NEU, H. C. In vitro activity of ceftazidime, a b-lactamase stable cephalosporin. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 8 (Suppl B), p.131-134, 1981.

NGUYEN, L. T. *et. al.* The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modos of action. **Trhends in Biotecnology**, v. 29, p. 464-472, 2011.

NIZET, V. *et. al.*, Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial. **Nature**, v. 414, p. 454-7, 2001.

NIYONSABA, F. *et al.*. The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, p.159-70, 2013.

NIVEDITHA, S. *et al.*. The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). **J. Clin. Diagn. Res.**, v.6, p. 1478-482, 2012.

NOEL, G. J. Clinical profile of ceftobiprole, a novel β -lactam antibiotic. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, suplemento 2, p. 25-29, 2007.

NORDMANN, P.; GIRLICH, D.; POIREL, L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. **Journal Clin. Microbiol**, v. 50, n. 8, p. 2761-6, 2012.

OLAITAN, A. O. *et al.* Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. **Int J Antimicrob Agents**, v. 44, p. 500-507, 2014.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol.**, v. 5, p. 643, 2014.

OLIVEIRA, D. M.; LACERDA, A. F. Peptídeos antimicrobianos: biotecnologia aplicada à saúde. **Revista de Saúde da Faciplac**, Brasília, v. 1, n°. 1, 2014.

OLIVEIRA, D. S. Interação Medicamentosa: Parte II. **Caderno de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 97-110, 1986.

OLIVEIRA C. G. *et al.* Perfil de resistência e incidência de *Klebsiella pneumoniae* em um hospital público de ensino. **Revista UNINGÁ Review.**, v. 25, n.3, p. 36-40, 2016.

OLIVEIRA, H. M.; SILVA, C. P. R.; LACERDA, R. A. Policies for control and prevention of infections related to healthcare assistance in Brazil: a conceptual analysis. **Rev. Esc. Enfermagem**, USP, 50 (3), p. 502-508, 2016.

ORHAN, G. *et al.*. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n° 1, p. 140-143, 2005.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and molecular Biology Review**, v. 80. n° 03. p. 629-661, 2016.

PAL, C. *et al.* The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. **Microbiome**, v. 4, p. 54, 2016.

PAPP-WALLACE, K. M., *et al.*. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, pp. 4943-4960, 2011.

_____; BETHEL, C.R.; DISTLER, A.M. *et al.*. Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 54, p. 890–897, 2010.

PARACHIN, N. S.; FRANCO, O. L. New edge of antibiotal development peptides e corresponding resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford University Press: New York, 1995; 2005.

PAULSEN, V.S. *et al.* Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide arasin 1 - and mode of action studies of the N-terminal, proline-rich region. **PloS one**, v. 8, p. 533-539, 2013.

PAVEZ M.; MAMIZUKA, E. M; LINCOPAN, N. Early Dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 53, p. 2702, 2009.

PAYNE, D. J. *et al.* Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature Reviews Drugs Discovery**, v. 6, p. 29-40, 2007.

PEIRANO, G. *et al.* Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265-8, 2009.

PENA, I. *et. al.* Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. **Int Journal Antimicrob Agents**, v. 43, p. 460-464, 2011.

PENA, O. M.; AFACAN, N.; PISTOLIC, J. *et. al.* Synthetic cationic peptide IDR – 1018 modulates human macrophage differentiation. **PloS One**: e52449, v. 8, 2013.

PEREIRA, G. H. *et. al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: two-year epidemiologic follow-up in a tertiary hospital. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108(1), p. 113-115, 2013.

PEREIRA, J.N.P. **Caracterização fenotípica e molecular da resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B de isolados clínicos de *Staphylococcus* spp.** 88p. Dissertação de Mestrado, Universidade federal de Pernambuco, Recife, 2014.

PERNA, T. D. G. S. *et. al.* Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero *Klebsiella pneumoniae* em Unidade de Terapia Intensiva. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 13, nº 2, p. 119-23, 2015.

PHAN, M.D. *et. al.* The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* clone. **PLoS Genet.**, v. 9, 2013.

PINTO, C. C. F. **Avaliação da Penetração de Agentes Antimicrobianos em Biofilme de *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*: Considerações Físico-químicas.** 87f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, nº 4, p. 589–603, 1998.

PODSCHUN, R. *et al.* Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. **American Society for Microbiology**, v. 67, nº 7, 2001.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, nº. 3, p. 440–458, 2007.

QUINTIN, *et. al.* Differential role of NK cells against *Candida albicans* infection in immunocompetent or immunocompromised mice. **European Journal of Immunology**, v. 44, p. 2405-14, 2014.

RAHIMIAN, J. *et. al.* Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 1654–1659, 2004.

RICKLIN, D. *et. al.* Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat. Immunol.**, v.11, p. 785–797, 2010.

RIVAS-SANTIAGO, B. *et. al.* Ability of Innate Defence Regulator Peptides IDR-1002, IDR-HH2 and IDR-1018 to Protect against Mycobacterium tuberculosis Infections in Animal Models. **PLoS one**, v. 8(3):e59119, 2013.

ROCHA, T. *et. al.* Myotoxic effects of mastoparan from *Polibia paulista* (Hymenoptera, Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle. **Toxicon**, v. 50, nº 5, p. 589-99, 2007.

RONALD, A. The etiology of urinary tract infection: Traditional and emerging pathogens. **Am. J. Med.**, v. 113, p. 14S–19S, 2002.

ROSÁRIO, N. A. AND GRUMACH, A. S. Allergy to beta-lactams in pediatrics: a practical approach. **Jornal de Pediatria**, v. 82, nº 5 (Suppl), 2006.

ROSEN, D.A. *et. al.* *Klebsiella pneumoniae* FimK promotes virulence in murine pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 1–10, 2015.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana**: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005.

RUSSO, T. A. *et. al.* Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* *ex vivo* and *in vivo*. **Infection and Immunity**, v. 83, p. 3325-3333, 2015.

SAHLY, H.; KEISARI, Y.; OFEK, I. Manno(rhamno)biose-containing capsular polysaccharides of *Klebsiella pneumoniae* enhance opsono-stimulation of human polymorphonuclear leukocytes. **Journal Innate Immunity**, v.1, p.136–144, 2009.

SAMPAIO, L. M.; GALESC, A. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47S, p. 31-37, 2016.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Revista Texto & Contexto Enfermagem*, v.13, n.º.esp, p. 64-70, 2004.

SCAPARE, E. C.; COSSATIS, J. J. A presença de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -Lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. *Saúde & Amb Rev.*, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2009.

SCOCCHI, M. *et al.* Non-membrane Permeabilizing mode of action of antimicrobial peptide on bacteria. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 16: 76-88, 2016.

SCOTT, M. G. *et al.* An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nat Biotechnology*, v. 25, p. 465-472, 2007.

SHI, K. *et al.* Prospects for circumventing aminoglycoside kinase mediated antibiotic resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, p. 22, 2013.

SHON, A. S.; BAJWA, R. P.; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*, v. 4: 107-118, 2013.

SIEGMAN-IGRA, Y. *et al.* Epidemiology of vascular catheter-related bloodstream infections in a large university hospital in Israel. *Scand. J. Infect. Dis.* v.32, p. 411–415, 2000.

SILVA, J. G.; CARVALHO, I. New Insights into aminoglycoside antibiotics and derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, v.14, p.1101-1119, 2007.

SILVEIRA, G. P. *et al.* Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Rev. Quim. Nova*, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SINGHAI, M. *et al.*. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 4, p. 193-198, 2012.

SIU, L. K.; YEH, K-M.; LIN, J-C. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 12, p. 881–887, 2012.

SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, nº. 2, p. 413-428, 2010.

SPANU, T. *et al.*. Italian ESBL Study Group. Occurrence of extended-spectrum beta -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, n.º1, p.196-202, 2002.

STEFANIUK, E. *et al.*. Etiology and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens responsible for community acquired urinary tract infections in Poland. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, p. 1363-1369, 2016.

STRUVE, C. *et al.*. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **mBio**, v. 6, p. 1–12, 2015.

TENOVER, C. F. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6 (1), p. S3–S10, 2006.

TJJET, N. *et al.*. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* in Ontario, Canadá, 2008-2011. **PLoS One**, v. 9: 1-12, 2014.

TOMAS, J.M.; BENEDI, V.J. Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. **Infection Immunity**, v. 64, nº 11, p. 4726-4732, 1996a.

TSAI, F-C. *et al.*. Pyogenic liver abscesses endemic disease, Taiwan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1592–1600, 2008.

TUMBARELLO, M. *et al.*. Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors,

Molecular Epidemiology, and Clinical Outcome. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 50, nº 2, p. 498-504, 2006.

TURRINI, R. N. T. Infecção hospitalar e mortalidade. **Revista Esc Enferm, USP**, v. 35, p. 177-83, 2002.

TZOUVELEKIS, L. S. *et. al.*. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: An evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, p. 682–707, 2012.

VAARA, M. *et. al.*. A novel polymyxin derivative that lacks the fatty acid tail and carries only three positive charges has strong synergism with agents excluded by the intact outer membrane. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 3341–3346, 2010.

VARALDO, P.E. *et. al.*. Distribution and antibiotic susceptibility of extraintestinal clinical isolates of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia* species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 4, p. 495–500, 1988.

VARALDO, P.E. *et. al.*. Circulation in Italy of beta-lactamase-producing strains within the major groups of bacterial pathogens. **European Journal of Epidemiology**, v. 6, p. 287–292, 1990.

VASCONCELLOS, J. F. *et. al.*. Desospitalização para cuidado domiciliar: impactos clínico e econômico da linezolida. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 7, n. 2, p. 110–115, 2015.

VON NUSSBAUM, F. *et. al.*. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry-Exodus or Revival? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, 5072, 2006.

VOULGARI, E. *et. al.*. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiol**, v. 8, p. 27–39, 2013.

WAGHU, F. H. *et. al.*. CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 42, nº D1, p. D1154–D1158, 2014.

WANG, G. *et. al.*; High-quality 3d structure shine light on antibacterial anti-biofilm and antiviral activities of humans cathelicidin II-37 and its fragments. **Biochimica at Biophysica Acta**, v. 1838, n. 9, p. 2160-72, 2014.

WANG, Q. *et. al.*. Genotypic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Beijing Hospital reveals high genetic diversity and clonal population structure of drug-resistan isolates. **PLoS one**, v. 8(2): e57091, 2013.

WANG, S. *et. al.* Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing bloodstream infections in three hospitals in Shanghai, China. **PLoS one**, v. 11: e01, 47740, 2016.

WANG, Z.; WANG, G. A. P.D.: the Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Research**, v.32, p. D590–D592, 2004.

WILLIAMS, J. D. Classification of cephalosporins. **Drugs**, v. 34 (Suppl.2), p.15-22, 1987.

WILLIAMS, J. D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 12: 3-7, 1999.

WORTHINGTON, R. J.; MELANDER C. Overcoming Resistance to β -Lactam Antibiotics. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n° 9, p.4207–4213, 2013.

WOODFORD, N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clin. Microbiol. Infec.**, v. 11(Suplemento 3), p. 2-21, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014). **Antimicrobial resistance**: global report on surveillance. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Acesso em: 15 set. 2017.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1451-1470, 2005.

WRIGHT, M. S. et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59, p. 536-543, 2015.

XIAO, S-Z. et al. The Resistance Phenotype and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* in Bloodstream Infections in Shanghai, China, 2012–2015. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 250, 2017.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p.1151–1161, 2001.

YINNON, A.M. et al. *Klebsiella* bacteremia: community versus nosocomial infection. **Mon. J. Assoc. Physicians**, v. 89, p. 933-941, 1996.

YONG, D. et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n° 10, p. 3798-801, 2002.

ZHAO, S. Y. et al. Distribution and antimicrobial resistance of pathogens isolated from hospitalized patients with bloodstream infections Chin. **Journal of Infectious Control**, v. 13, p. 266–270, 2014.

