



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA MOLECULAR

RAYSSA ALVES PORCINO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COMBINATÓRIA DE ANTIMICROBIANOS
CONTRA *Klebsiella pneumoniae* E *Staphylococcus aureus*

Brasília

2018

RAYSSA ALVES PORCINO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COMBINATÓRIA DE ANTIMICROBIANOS
CONTRA *Klebsiella pneumoniae* E *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Brasília

2018

RAYSSA ALVES PORCINO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COMBINATÓRIA DE ANTIMICROBIANOS
CONTRA *Klebsiella pneumoniae* E *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Aprovado em ___/___/___

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Aos meus pais, Cleuza e Osvaldo, pessoas com quem amo partilhar a vida, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta importantíssima etapa de minha vida, seja não me deixando desistir até me buscando no laboratório de madrugada. Obrigado pela paciência e por suas capacidades de me trazerem paz na correria de cada semestre e compreender a importância desse trabalho para mim. Amo muito todos vocês. “Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.” (Bertrand Russell).

A todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial ao meu Orientador Octávio Luiz Franco, pela imensa oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa CAPB durante 6 anos. Agradeço a oportunidade de aprendizado atual e acredito na possibilidade de uma parceira muito produtiva em trabalhos futuros. Muito obrigada.

Dedico imensamente ao meu Pós-Doc. Osmar, que sem ele certamente não saberia para onde ir na vida e no laboratório. Obrigada pelas orientações acadêmicas, pelas conversas, pelos puxões de orelha, pelos conselhos, pelas oportunidades de trabalho, pelo crescimento intelectual, profissional e pessoal, pela confiança, pelo carinho. Esse é só mais um trabalho de muitos que poderão vir. Jamais esquecerei seu lema “Deboísta”.

A banca examinadora que cederam uma parte de seu tempo para poder avaliar e contribuir na construção desse trabalho.

Aos meus mais fiéis amigos: Állan, Júlia, Fábio, Juliana, Stephan, Maurício. Toda dedicação e amor ao meu amado Clube do Livro do laboratório juntamente com Bel, Liana, Rhayfa e Fefa, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me ajudando, vocês me ajudaram a manter a alegria, e a leitura em dia, apesar das dificuldades. São com vocês, meus amigos, que compartilho angústias, alegrias,

felicidades e tantas outras coisas que só uma amizade trás. Só vocês entendem o meu objetivo, o sumiço, a falta de tempo, o cansaço, a necessidade de isolamento que a escrita exige. Obrigado por fazerem parte desse tão sonhado Mestrado.

Aos colegas de laboratório do Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas - CAPB pela oportunidade de convívio com as mais diferentes figuras, de diferentes lugares, possuidores de peculiaridades e conhecimentos que o decoro não me permite descrever.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para que eu pudesse subir mais esse degrau não canso de agradecer. Não posso dizer que este é o fim. Este é apenas o começo da próxima jornada.

E finalmente agradeço a Deus por me proporcionar estes agradecimentos a todos que tornaram minha vida mais afetuosa, além de ter me dado uma família maravilhosa e amigos sinceros. A todos meus eternos agradecimentos.

RESUMO

Referência: PORCINO, R. A. **Avaliação da atividade combinatória de antimicrobianos contra *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus***. 2018. p. Dissertação (Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, 2018.

A disseminação das cepas de *Klebsiella pneumoniae*, produtora de carbapenemase (KPC+), e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) tornou-se um problema significativo em todo o mundo. Uma das estratégias desenvolvidas para combater esses microrganismos têm sido a terapia combinada de antimicrobianos. No presente trabalho investigamos a efetividade *in vitro* e *in vivo* dos antimicrobianos penicilina G (PNG), cloranfenicol (CAP), estreptomicina (SMA) e cefotaxima (CFT) sozinhos e em combinação contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Um isolado clínico de *K. pneumoniae* KPC+ e um de *S. aureus* MRSA foram expostos aos antimicrobianos em concentrações variadas durante 24 h. Combinações par-a-par de PNG, CAP, SMA e CFT foram testadas para avaliar suas possíveis interações utilizando o método de *checkerboard*. O sinergismo foi definido com ICIF $\leq 0,5$, bem como a redução da carga bacteriana inicial de 10^5 CFU.mL⁻¹ após 24h, proveniente das associações. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por meio de microdiluição seriada em caldo de acordo com CLSI. A atividade citotóxica dos antimicrobianos livres e em combinação foi avaliada sobre monócitos RAW 264.7, células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e eritrócitos. Os valores de CIM obtidos para CFT, CAP, SMA e PNG foram respectivamente de 32, 8, 4 e >512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *K. pneumoniae* e 256, 64, 4 e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, contra *S. aureus*. A combinação de CFT + SMA, dentre as demais associações frente *K. pneumoniae*, apresentou uma efetividade sinérgica de menor valor (ICIF = 0,18), bem como a PNG + SMA contra MRSA (CIF = 0,18). Nenhum dos antibióticos livres e em combinação apresentaram efeitos hemolíticos e citotóxicos frente a células RAW 264.7 e Vero. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a combinação entre CFT + SMA e PNG + SMA pode ser uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas *K. pneumoniae* KPC+ e MRSA, respectivamente.

Palavra chave: beta-lactamases, sinergismo, KPC, MRSA.

Suporte: CAPES, CNPq, FAPDF e UCB.

ABSTRACT

Reference: PORCINO, R. A. **Evaluation of the combinatorial activity of antimicrobials against *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus***. 2018. p. Dissertation (Molecular Pathology) – University of Brasilia, 2018.

The dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC +) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains has become a significant problem worldwide. One of the strategies developed to control such microorganisms has been the antibiotics therapy combination. In the present work we investigated the *in vitro* and *in vivo* efficacy of antimicrobials penicillin G (PNG), chloramphenicol (CAP), streptomycin (SMA) and cefotaxime (CFT) alone and in combination with clinical isolates of *K. pneumoniae* and *S. aureus*. Clinical isolates of *K. pneumoniae* KPC + and *S. aureus* MRSA were exposed to antimicrobials at varying concentrations for 24 h. Peer-to-peer combinations of PNG, CAP, SMA and CFT were tested to evaluate their possible interactions using the *checkerboard* method. Synergism was defined as IFIC \leq 0.5, as well as the reduction of the initial bacterial load of 10^5 CFU.mL⁻¹ after 24 h, from associations. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by serial broth microdilution according to CLSI. The cytotoxic activity of free and combined antimicrobial was evaluated on RAW 264.7 monocytes, African green monkey kidney cells (*Cercopithecus aethiops*) and erythrocytes. The MIC values obtained for CFT, CAP, SMA and PNG were 32, 8, 4 e >512 μ g.mL⁻¹ against *K. pneumoniae*, and 256, 64, 4 e 32 μ g.mL⁻¹, respectively, against *S. aureus*. The combination of CFT + SMA was the most effective against *K. pneumoniae*, demonstrating a synergistic effect (FIC = 0.18). The combination of CFT + SMA, among the other combinations against *K. pneumoniae*, showed effectiveness with a synergistic effect of lower value (IFIC = 0.18), as well as PNG + SMA against MRSA (IFIC = 0.18). None of the free and combined antibiotics showed hemolytic and cytotoxic effects on RAW 264.7 and Vero cells. Based on the results obtained, the combination of CFT + SMA and PNG + SMA may be a therapeutic alternative in the treatment of infections caused by *K. pneumoniae* KPC + and MRSA, respectively.

Keyword: beta-lactamases, synergism, KPC, MRSA.

Supported: CAPES, CNPq, FAPDF and UCB.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração dos quatro principais mecanismos de resistência bacteriana.** Adaptado de Bbosa *et al.*, 2014.....17
- Figura 2. Mapa de distribuição de percentual do uso de antimicrobianos de forma inapropriada.** Em vermelho países com mais de 50%; em roxo países de 20 a 50%; em verde países de 5 a 19% e em azul países com menos de 5%. Áreas em branco não possuem dados. Fonte: Adaptado de Morgan *et al.*, 2011.....20
- Figura 3. Linha do tempo sobre os principais eventos de introdução dos antibióticos na clínica e resistência.** Adaptado de Ventola, 2015.....21
- Figura 4. Número de fármacos antibacterianos aprovadas entre 1980 e 2014, durante período de 4 anos.** Adaptado de Ventola, 2015.....29
- Figura 5. Microplaca de 96 poços pela metodologia de *checkerboard*.** Os poços nos tons de azul, representam a diluição seriada da amostra 1 no eixo das abcissas (da direita para esquerda). Em vermelho, a diluição seriada da amostra 2 no eixo das ordenadas (de cima para baixo). Os poços de cor violeta correspondem a combinação das duas amostras em diferentes concentrações. Os poços em branco são destinados aos controles negativos, positivos e brancos.....32
- Figura 6. Estrutura da penicilina G.** (A) Estrutura química bidimensional da penicilina G; (B) Estrutura tridimensional da penicilina G. As cores azul, vermelho e amarelo correspondem aos átomos de Nitrogênio, Oxigênio e Enxofre, respectivamente. Adaptado do site *PubChemCompound*.....35
- Figura 7. Estrutura da cefotaxima.** (A) Estrutura química bidimensional da cefotaxima; (B) Estrutura tridimensional da cefotaxima. As cores azul, vermelho e amarelo correspondem aos átomos de Nitrogênio, Oxigênio e Enxofre,

respectivamente. Adaptado do site
PubChemCompound.....37

Figura 8. Estrutura do cloranfenicol. (A) Estrutura química bidimensional do cloranfenicol; (B) Estrutura tridimensional do cloranfenicol. As cores azul, vermelho e verde correspondem aos átomos de Nitrogênio, Oxigênio e Cloro, respectivamente. Adaptado do site
PubChemCompound.....38

Figura 9. Estrutura da estreptomicina. (A) Estrutura química bidimensional da estreptomicina; (B) Estrutura tridimensional da estreptomicina. As cores azul e vermelho correspondem aos átomos de Nitrogênio e Oxigênio, respectivamente. Adaptado do site
PubChemCompound.....41

Figura suplementar 1. Avaliação da atividade citotóxica das associações entre PNG + SMA e CFT + SMA. As associações com as melhores atividades sinérgicas foram avaliadas quanto à viabilidade celular contra células RAW 264.7 e VERO. Gráficos (A) e (B) correspondem aos fármacos testados sozinhos, em concentrações altas e de atividade sinérgica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) frente células RAW 264.7 e Vero, respectivamente; (C) corresponde a atividade citotóxica das combinações sinérgicas dos fármaco contra células RAW 264.7 (cinza claro) e VERO (cinza escuro).....96

Capítulo I

Figure 1. Hemolytic activity of the associations between penicillin G, cefotaxime and streptomycin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Evaluation of the hemolytic action among the best synergistic associations against the pathogens under study. In black, the positive control used for hemolysis activity was 0.1% Triton X-100. The dark gray represents the negative control serum. Light gray data represent the associations of antimicrobials tested ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). The combinations were tested at their highest concentrations and at the points that showed synergism.....62

Capítulo II

Figura 1. Atividade antibacteriana *in vivo* de PNG e SMA associados. Os animais foram inoculados com *S. aureus* (1×10^9) seguido por injeções intraperitoneal de PNG (UI.Kg^{-1}) e SMA (mg.mL^{-1}) associados, gentamicina (10 mg.mL^{-1}) ou PBS. Com exceção da gentamicina e do PBS os tratamentos foram administrados 2 vezes ao dia durante 3 dias. Tratamento com a associação de fármacos aumentou o tempo de sobrevivência dos animais quando comparado com o controle negativo e o tratamento com a PNG sozinha.....71

Figura 2. Redução da carga bacteriana (*S. aureus*) em infecção por septicemia. UFC de *S. aureus* recuperado de camundongos tratados com PNG (12000U e 6000 U.Kg^{-1}), SMA (7.5 e 3.75 mg.Kg^{-1}) e Gentamicina como controle (10 mg.Kg^{-1}). Os animais foram eutanasiados 4 dias após a experiência. Barras horizontais representam médias.....69

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Table 1. Antibacterial activity of CFT, PNG and SMA against *S. aureus* and *K. pneumoniae*. Bacteria was cultured in presence of different antibiotics concentrations described CLSI methodology.....63

Table 2. Antibacterial activity of standard antibiotic combinations by checkerboard method.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMR Resistência antimicrobiana

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAP Cloranfenicol

CDC *Center of Diseases Control and Prevention* (Controle de Prevenção de Doenças)

CFT Cefatoxima

CIF/FIC ou ICIF/IFIC Índice de Concentração Fracionada

CIM Concentração Inibitória Mínima

CLSI *National Committee for Laboratory Standards* (Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico)

DMSO Dimetilsulfóxido

ESBL Betalactamase de Espectro Ampliado

FDA *Food and Drug Administration*

IRAS Infecções relacionada à Assistência à Saúde

K. pneumoniae Klebsiella pneumoniae

KPC+ *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase

MDR Bactérias “*multidrug-resistant*” (multiresistentes)

MRSA *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MTT Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NNIS *National Nosocomial Infections Surveillance* (Vigilância Nacional das Infecções Nosocomiais)

OMS ou WHO Organização Mundial da Saúde

PBP ou PLP Proteínas ligantes de penicilina

PBP2A Proteínas ligantes de penicilina similar a PBP

PNG Penicilina G (benzilpenicilina)

RDC Resolução da Diretoria Colegiada

SMA Estreptomicina

S. aureus Staphylococcus aureus

UTI Unidade de Terapia Intensiva

VRSA *Staphylococcus aureus* de resistência total a vancomicina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. A problemática das infecções causadas por <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. aureus</i>	23
1.2. Uso combinado de antimicrobianos como alternativa terapêutica a infecções bacterianas multiresistentes.....	28
1.3. Antibióticos utilizados no presente estudo.....	34
1.3.1. Penicilina G.....	34
1.3.2. Cefotaxima.....	36
1.3.3. Cloranfenicol.....	38
1.3.4. Estreptomicina.....	40
2. JUSTIFICATIVA.....	43
3. OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
<i>Capítulo I</i>	45
<i>Capítulo II</i>	67
1. INTRODUÇÃO.....	67
1.1 Extrapolando os dados <i>in vitro</i> de análise combinatória para testes <i>in vivo</i>	67
2. METODOLOGIA.....	68
2.1 Considerações éticas.....	68
2.2 Animais.....	68

2.3	Modelo	de	infecção			
sistêmica.....				68		
2.3.1	Indução	da	septicemia	e		
tratamento.....				68		
2.3.2	Eutanásia			e		
coleta.....				69		
2.3.3	Análise estatística.....			69		
3.						
RESULTADOS.....				70		
3.1	Avaliação	da	atividade	antimicrobiana	<i>in</i>	
<i>vivo</i>						70
4. DISCUSSÃO.....						73
5. CONCLUSÃO.....						82
6.						
REFERÊNCIAS.....						83
7.						
ANEXOS.....						100

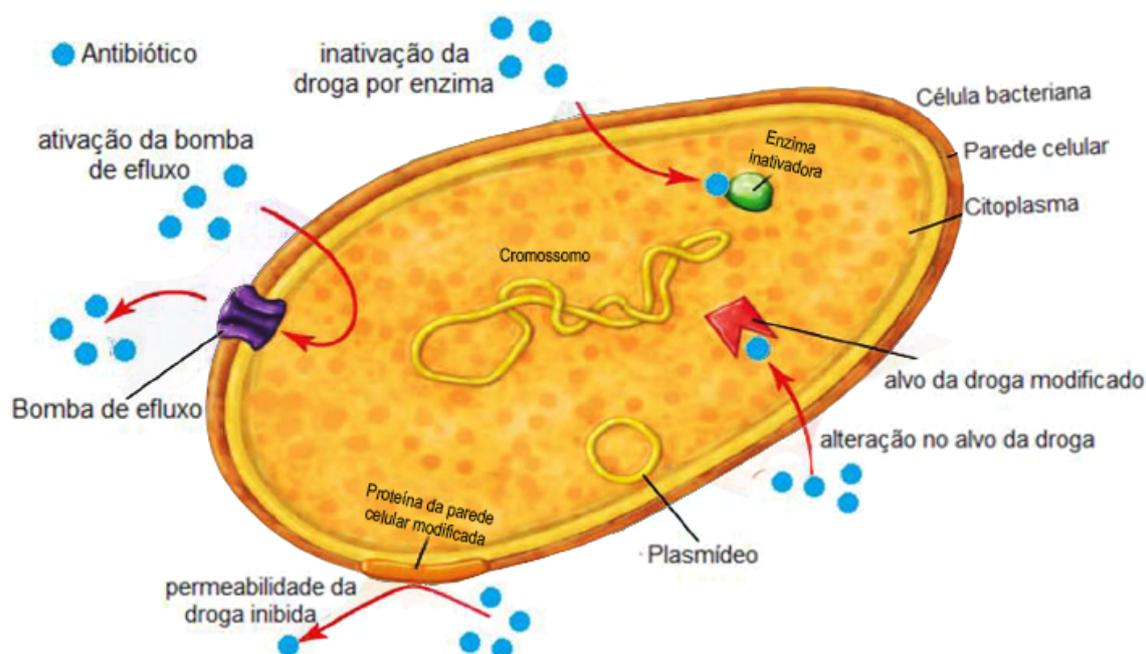
1. INTRODUÇÃO

O período que compreende as décadas de 1930 e 1980 foi considerado a “era de ouro dos antibióticos”, devido a descoberta de diversos compostos que permitiram o tratamento e o controle na disseminação de doenças infecciosas, regenerando a saúde de enfermos e alterando de forma marcante a progressão de certas doenças (GOULD, 2016). Entretanto foi a partir da década de 1928 - com o isolamento da penicilina por Alexander Fleming, e seu posterior uso comercial em 1942 - que os antimicrobianos passaram a existir e ter um papel de destaque na sociedade moderna (FLEMING, 1929; PIDDOCK, 2012; ROSSOLINI *et al.*, 2014; VENTOLA, 2015). Ao longo dos anos subsequentes a introdução da penicilina no mercado os relatos sobre o isolamento de cepas resistentes foram expandindo-se a níveis alarmantes (BARBER; ROZWADOWSKA-DOWZENKO, 1948).

Atualmente, a resistência microbiana tem sido tratada como um dos problemas mais relevantes na saúde pública. Muitos desses microrganismos apresentam mecanismos clássicos para escapar da ação dos antimicrobianos, como bomba de efluxo, mudança na permeabilidade da parede celular e produção de enzimas para inativar esses compostos. Alguns agentes biológicos podem ser capazes de catabolizar esses fármacos e utilizá-los como fonte de carbono (BARNHILL *et al.*, 2010; DANTAS *et al.*, 2008).

Os mecanismos de resistência que algumas bactérias apresentam frente aos compostos nocivos a sua sobrevivência decorrem de um fenômeno biológico natural de adaptação. O fenômeno da resistência bacteriana pode ocorrer quando os microrganismos proliferam-se em concentrações de antimicrobianos mais elevadas do que as doses terapêuticas administradas (BROWN; WRIGHT, 2016; WOAPPI *et al.*, 2014). Os quatro mecanismos de resistência desenvolvidos por esses microrganismos consistem na bomba de efluxo, alteração do sítio alvo do antimicrobiano, produção enzimática e modificação da permeabilidade celular (Figura 1).

Figura 3. Ilustração dos quatro principais mecanismos de resistência bacteriana.
Adaptado de Bbosa *et al.*, 2014.



A capacidade do fármaco de transpor ou interagir com a membrana celular, independente da sua classe antimicrobiana, pode ser imprescindível para que o mesmo possa agir contra determinados microrganismos. Sendo assim, qualquer alteração na permeabilidade celular como seletividade, redução no número de proteínas de membrana, alteração da sua estrutura e tamanho podem conferir uma característica de resistência aos antimicrobianos (BAPTISTA, 2013).

Como componentes da membrana celular bacteriana, as bombas de efluxo consistem em um mecanismo de bombeamento ativo de moléculas do meio intracelular para o extracelular (PIDDOCK, 2006). O aumento no sistema de efluxo dessas bombas pode acarretar em um mecanismo de resistência comum capaz de afetar os antimicrobianos de diversas classes, uma vez que esses compostos não conseguem atingir uma concentração intracelular efetiva devido sua rápida saída da célula (DU; KAN; NEUBERGER, 2018; DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

Outro mecanismo de resistência relatado consiste na alteração do sítio alvo, ou a síntese de uma molécula similar ao alvo dos antimicrobianos. Essa alteração provoca uma redução ou supressão total da afinidade do antimicrobiano pelo local de ligação, cessando sua atividade inibitória ou bactericida. Como exemplo a essas modificações, algumas cepas de *Staphylococcus aureus* produzem a proteína ligante a penicilina 2a (PBP2A), sendo essa molécula similar ao alvo dos antimicrobianos β -lactâmicos, proteína de ligação da penicilina (PBP ou PLP), porém com reduzida afinidade a esses fármacos (PANTOSTI; SANCHINI; MONACO, 2007). A baixa afinidade dos β -lactâmicos pela PBP2A permite que o *S. aureus* mantenha a integridade da sua parede celular enquanto a bactéria cresce e se divide, uma vez que os antimicrobianos em questão ligam-se as PBPs originais (MENDES, 2010).

Dentre os mecanismos de resistência mencionados anteriormente, o mais frequente e importante compreende a produção de enzimas que degradam os antimicrobianos tornando-os inativos. Essas enzimas podem ligar-se aos antimicrobianos ou transportar moléculas, como as β -lactamases e grupos de acetil, respectivamente, tornando o antimicrobiano em questão inativo (NAAS *et al.*, 2017; ZIENKIEWICZ *et al.*, 2017).

Os antimicrobianos que possuem em sua estrutura um anel β -lactâmico, como as penicilinas e cefalosporinas, são os principais alvos das enzimas β -lactamases. As β -lactamases promovem a hidrólise desse anel deixando a estrutura aberta, essa reação torna a nova configuração molecular do antimicrobiano incapaz de se ligar ao seu sítio receptor e inibir a síntese da parede celular bacteriana (AZEVEDO, 2014; STEWART; WILLIAM COSTERTON, 2001). A informação para produção da β -lactamase no microrganismo pode ser mediada pela codificação cromossômica bacteriana, plasmídeo ou *transposon*, podendo ser transferido para outras bactérias tanto de forma vertical quanto horizontal (RATHER *et al.*, 2017). A variação da quantidade e especificidade dessas enzimas dependem dos substratos utilizados.

Outro exemplo de resistência, voltado para a atividade enzimática, inclui a inativação do cloranfenicol e dos aminoglicosídeos. A resistência bacteriana ao cloranfenicol baseia-se na inativação enzimática por acetilação do fármaco

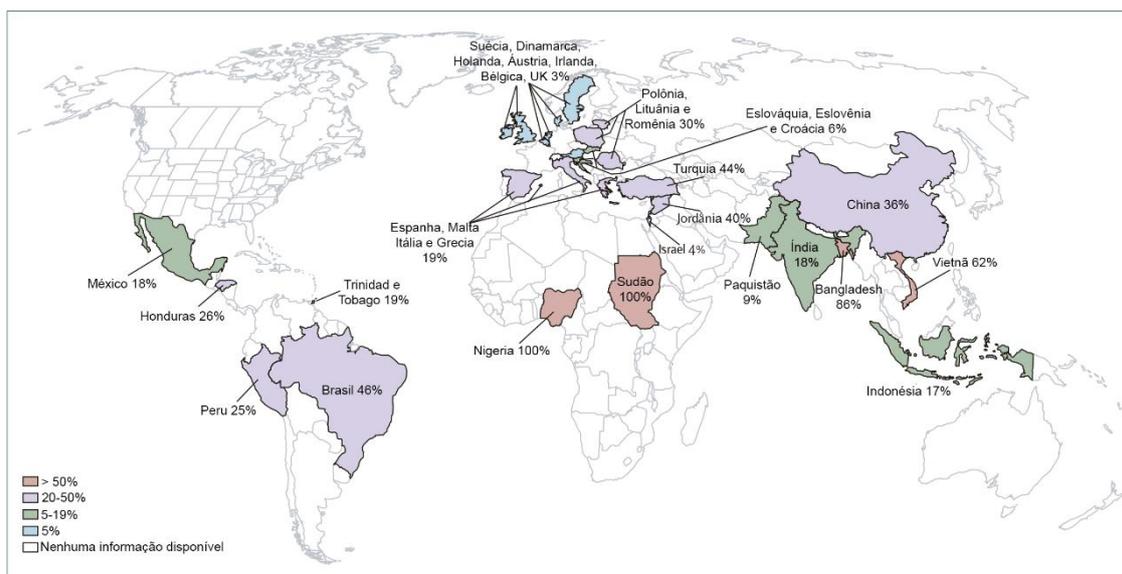
por meio de diversas acetiltransferases (RØNNING; EINARSEN; ASP, 2006). As enzimas acetiltransferases promovem a acetilação da molécula de cloranfenicol por intermédio de ligações covalentes entre um ou dois grupos de acetil, derivados da acetil-CoA sintetase, e um grupo de hidroxila presente no fármaco, impedindo que haja interação com os ribossomos bacterianos (KEHRENBURG *et al.*, 2005).

Similar aos anfenicóis, as enzimas acetiltransferases catalisam uma acetilação em uma região seletiva no grupo amino dos aminoglicosídeos e adicionam um grupo acetil na extremidade criada (PINSETTA, 2010; RENEE *et al.*, 2005). Contudo a resistência ao aminoglicosídeo pode ocorrer, também, por uma mutação no gene *rpsL* que codifica a proteína ribossomal S12 no ribossomo 30S, alterando um nucleotídeo A por G, resultando assim na substituição de uma lisina por uma arginina (CARTER *et al.*, 2000).

Apesar de algumas mutações sofridas pelas bactérias contribuírem para o desenvolvimento de sua resistência, o progresso da resistência aos antimicrobianos vem sendo resultante da pressão seletiva exercida pelo uso inadequado desses compostos, estabelecendo uma conexão entre um maior consumo desses fármacos e os elevados níveis de resistência bacteriana notificados (MELNYK; WONG; KASSEN, 2015; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010; SHAIKH *et al.*, 2014; WHO, 2014).

Estima-se que 25 a 35% dos pacientes recebem antimicrobianos durante a internação (ATIF *et al.*, 2017; CARDINAL *et al.*, 2012), tornando os antimicrobianos responsáveis por 20 a 50% dos gastos com medicamentos em hospitais (FREITAS *et al.*, 2014; MICHAELIDIS *et al.*, 2016). Segundo os dados da OMS, mais de 50% das prescrições de antimicrobianos são feitas sem a real necessidade de uso dos mesmos (ZAMAN *et al.*, 2017). Um levantamento realizado sobre o uso indiscriminado de antimicrobianos em trinta e cinco países ressaltou um elevado índice do uso nos cinco continentes (Figura 1) (MORGAN *et al.*, 2011).

Figura 4. Mapa de distribuição de percentual do uso de antimicrobianos de forma inapropriada. Em vermelho países com mais de 50%; em roxo países de 20 a 50%; em verde países de 5 a 19% e em azul, países com menos de 5%. Áreas em branco não possuem dados. Fonte: Adaptado de Morgan *et al.*, 2011.

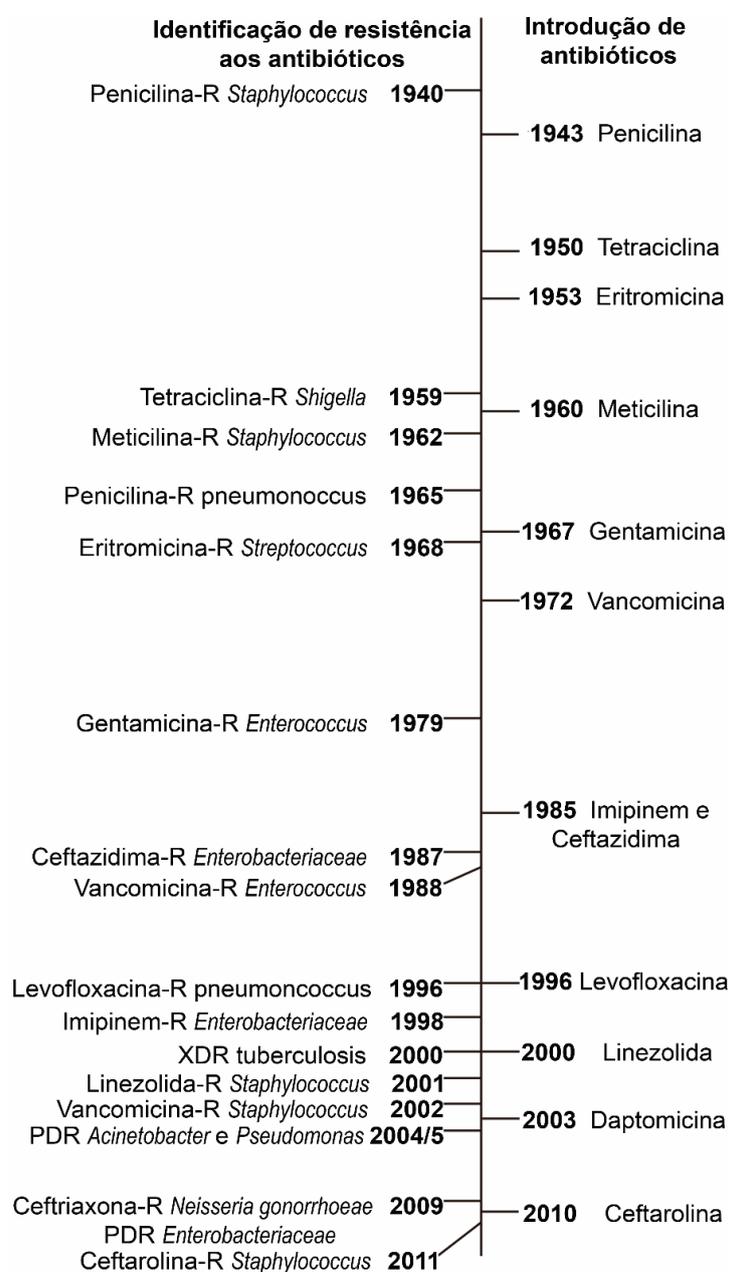


Conseqüentemente a essa problemática, a resistência tem ganhado destaque em âmbito mundial devido seus impactos alarmantes como infecções persistentes e a sua disseminação nos continentes, ampliando a taxa de morbidade e mortalidade (CANTÓN; MOROSINI, 2011; WHO, 2014). Segundo uma revisão realizada pela *UK Review*, estima-se que aproximadamente 700.000 pessoas morrem a cada ano proveniente de infecções resistentes a medicamentos, porém o preocupante aumento da resistência e a dificuldade de tratamento desses microrganismos, estima-se um aumento na taxa de mortalidade para 10 milhões em 2050 (DAVIS *et al.*, 2017; O'NEILL, 2016).

Devido o crescente aumento no número de notificações de infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS), decorrentes dos microrganismos resistentes aos antimicrobianos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu no Brasil medidas regulatórias que visam limitar a comercialização desses fármacos, restringindo-os ao uso hospitalar e a pacientes que portem receita médica (MATTOS *et al.*, 2017), tentando dessa

forma controlar e combater a resistência bacteriana. Apesar da portaria, (RDC 20/2011) publicada pela ANVISA, auxiliar no corte da venda livre de antimicrobianos, a resistência bacteriana continua a ser um problema iminente na saúde pública, uma vez que vem se espalhando mais rápido do que a introdução de novos compostos para a prática clínica (Figura 3) (MATTOS *et al.*, 2017).

Figura 5. Linha do tempo sobre os principais eventos de introdução dos antibióticos na clínica e resistência. Adaptado de Ventola, 2015.



PDR = pan-resistente a drogas; R = resistente;
XDR = extensivamente resistente a drogas

Enfermidades ocasionadas por patógenos que apresentam um perfil resistente frente aos antimicrobianos contribuem, também, com o aumento de gastos no combate desses microrganismos (CASTRO *et al.*, 2002; TAVARES, 1996; TRABULSI, LUIZ R.; ALTERTHUM, 2005). Um estudo realizado nos Estados Unidos, apenas com bactérias Gram-negativas, reportou um custo elevado de US\$ 144,414 dólares por paciente para o tratamento de infecções por patógenos resistentes, sendo esse valor 38 vezes maior do que é gasto com infecções por microrganismos susceptíveis (O'NEILL, 2016). O gasto esperado em tratamentos contra bactérias resistentes, em 2050, apresenta uma estimativa desastrosa de US\$ 100 trilhões por ano (O'NEILL, 2016).

Dentre os diversos desafios na área da saúde, relacionados as infecções por microrganismos resistentes, a sepse consiste em um dos quadros clínicos mais desafiantes para os médicos. A sepse atualmente é definida pela disfunção dos órgãos, com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente uma infecção, podendo apresentar um agravamento no quadro quando acometida por uma infecção de caráter resistente (ILAS, 2017; NAPOLITANO, 2018).

A sepse vem se tornando uma grande preocupação no sistema da saúde, sendo que nos EUA essa patologia é responsável por 20 bilhões de dólares do total de custos hospitalares no país e por apresentar uma alta taxa de letalidade maior que 40% (SINGER *et al.*, 2016). Enquanto no Brasil, esses valores de custo podem chegar a 9,6 mil dólares por paciente (ILAS, 2017), e as taxas mostram-se ainda maior, atingindo 45 a 65,3% dos pacientes em estado de sepse e/ou choque séptico (BARROS; MAIA; MONTEIRO, 2016).

Dentre os microrganismos notificados em âmbito mundial ante quadros infecciosos, a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus* são os patógenos regularmente isolados em infecções urinárias, quadros de pneumonia e sepse. Sendo essas duas últimas bactérias resistentes conhecidas como “*super bugs*” (ARIAS; MURRAY, 2009; LINDSAY; HOLDEN, 2004; VELKOV *et al.*, 2014).

Como últimos recursos no controle desses patógenos, a polimixina B e a polimixina E (colistina), têm sido utilizadas no tratamento de infecções bacterianas resistentes a todos os antibióticos apesar de possuírem graves

efeitos colaterais como distúrbios neurológicos, neurotoxicidade, nefrotoxicidade, paradas respiratórias e bloqueios neuromuscular, sendo por essas razões o seu desuso no passado (CAVALCANTI, 2015; GIRARDELLO; GALES, 2012; JAVAN; SHOKOUHI; SAHRAEI, 2015; VELKOV *et al.*, 2014; VELKOV *et al.*, 2016). Porém numerosos hospitais em todo o mundo sofrem surtos de infecções causadas por *superbugs* que são resistentes a todos os antibióticos atuais, incluindo a polimixina B e a colistina. O mecanismo de resistência à polimixina B ocorre pela modificação do lipídio A, resultando na redução da afinidade da polimixina com o microrganismo sendo mediado cromossomicamente e envolvendo a modulação de sistemas reguladores (GUNN *et al.*, 1998; MCPHEE; LEWENZA; HANCOCK, 2003).

Contudo o gene que confere a bactéria resistência à colistina, *mobilized colistin resistance (mcr-1)*, foi isolado inicialmente na China em cepas de *E. coli* e posteriormente no Brasil e EUA (ANVISA, 2016; FERNANDES *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016; MCGANN, 2016). O gene *mcr-1* codifica uma enzima da família fosfatidiletanolamina transferase (MCR-1), a qual transfere uma fosfatidiletanolamina (pEtN) para o lipídeo A presente no LPS. O que altera o padrão iônico da membrana citoplasmática externa das bactérias Gram-negativas, diminuindo a carga aniônica total, inviabilizando a interação eletrostática entre o LPS e as polimixinas (HINCHLIFFE *et al.*, 2017).

Devido à dificuldade na administração de tratamentos eficientes e recursos finitos contra as cepas resistentes, o sistema da saúde torna-se incapaz de uma solução imediata, estabelecendo um problema relevante que afeta outros setores como a política, ambiental, econômico e social (BALSALOBRE; DROPA; MATTÉ, 2014).

1.1. A problemática das infecções causadas por *K. pneumoniae* e *S. aureus*

Infecções bacterianas, especialmente de caráter multirresistente (MDR) aos antimicrobianos, fazem parte de um problema eminente da saúde global. Dentre os patógenos MDR notificados, as bactérias Gram-negativas vêm ganhando uma maior atenção por serem particularmente difíceis de combater

devido à natureza de sua robusta membrana externa (FAIR; TOR, 2014). Em meio às cepas bacterianas pertencentes as Gram-negativas, a *K. pneumoniae* tem-se destacado por ser atualmente reconhecida como uma ameaça urgente à saúde humana, devido sua emergência na associação de surtos hospitalares bem como infecções graves na comunidade (HOLT *et al.*, 2015).

Surtos ocasionados por *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase foram relatados em Israel (LEAVITT *et al.*, 2007) e nos EUA (WOODFORD *et al.*, 2004), mas recentemente surtos similares também foram registrados em outros países. Entre eles Itália, França, Grécia (GIANI, 2009; NAAS *et al.*, 2005; TSAKRIS *et al.*, 2011), Holanda (SKUTLABERG *et al.*, 2009), Suécia (SKUTLABERG *et al.*, 2009), Irlanda (BOYLE *et al.*, 2012; ROCHE, 2009), Espanha (RODELA, 2012), Bélgica (BOGAERTS, 2016), Alemanha (STEINMANN, 2011; WENDT *et al.*, 2010), o Reino Unido (VIRGINCAR *et al.*, 2011; WOODFORD *et al.*, 2008), Croácia (MAZZARIOL *et al.*, 2012), e Finlândia (KANERVA, 2015; KIRVESKARI; HAKANEN; MONICA, 2012).

A *K. pneumoniae* consiste em um bacilo Gram-negativo, membro da família Enterobacteriaceae, capaz de fermentar lactose e realizar anaerobiose facultativa. Quando em contato com um meio seletivo para bactérias Gram-negativas, MacConkey, a *K. pneumoniae* adquire uma coloração rosa proveniente da fermentação de lactose presente, sendo facilmente reconhecida por macroscopia (BAGLEYT; SEIDLER, 1978; KONEMAN; ELMER; ALLEN, 2008).

Por ser facilmente encontrada em locais como solo, planta, água e esgoto, a colonização da *K. pneumoniae* em seres humanos provavelmente ocorre por contato com as diversas fontes ambientais, porém quando presente no organismo de pessoas imunocomprometidas o microrganismo encontra um ambiente propício para seu crescimento, levando o hospedeiro a quadros de infecções mais avançadas (MARTÍNEZ *et al.*, 2004; PESSOA-SILVA *et al.*, 2003). A ocorrência de infecções por *K. pneumoniae* torna esse patógeno um dos microrganismos mais isolados em infecções no ambiente hospitalar e na comunidade, sendo estas infecções frequentemente relacionadas ao trato urinário, respiratório, biliar e feridas cirúrgicas (NORBERG *et al.*, 2017).

Devido a patogênese da *K. pneumoniae*, casos de pneumonias ocasionados por esse microrganismo têm sido frequentemente relatados. Uma vez dentro dos pulmões, esse patógeno inicia sua multiplicação celular nos espaços alveolares consolidando o parênquima pulmonar e aumentando o acúmulo de exsudato, dominando assim o espaço por macrófagos e fluídos de edema. Tal acúmulo faz com que as paredes pulmonares se comprimam e sofram necrose (FREEMAN *et al.*, 2014; LOPES; MAGALHÃES; PEREIRA, 2016; NORBERG *et al.*, 2017).

O boletim mais recente emitido pela ANVISA, sobre avaliação das IRAS e da resistência antimicrobiana, evidenciou que a *K. pneumoniae* é o microrganismo mais notificado em instalações hospitalares de UTI adulto, pediátrica e neonatal (ANVISA, 2017). O principal mecanismo de resistência da *K. pneumoniae* envolve a sua capacidade de produzir enzimas que hidrolisam os antimicrobianos, como os β -lactâmicos e os carbapenêmicos de amplo espectro. Por apresentar um importante mecanismo de resistência, pesquisas sobre expressão e tratamento de infecções por *Klebsiella spp.*, principalmente *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC+), são relevantes a fim de limitar sua disseminação e auxiliar na redução dos índices de morbidade e mortalidade ligados a diferentes doenças infecciosas (DIENSTMANN, 2010).

Estudos em uma unidade de terapia intensiva no Sudoeste do Paraná, entre os anos de 2012 e 2014, relataram a presença de isolados de *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e KPC+, assim como um agravamento nas infecções por essas cepas em 2014. Dentre sete pacientes avaliados com infecções por *K. pneumoniae* em 2012, 42,8% apresentaram um perfil bacteriano produtor de ESBL e 14,2% de KPC+, enquanto em 2014 o número de casos registrados por essas cepas subiram para 18, sendo que apenas 22,2% dos isolados não apresentavam nenhum mecanismo de resistência (SILVA; VELASQUEZ, 2017).

Um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde em 2010 apresentou 187 notificações de infecção por cepas KPC+, sendo registrado 18 óbitos. Já em São Paulo, desde 2008, são registrados mais de 70 casos por ano (DIENSTMANN, 2010). Dados da Anvisa, em 2015, apontam que *K. pneumoniae* KPC+ foi o microrganismo mais isolado e notificado nas UTIs

brasileiras (BRASIL, 2017). Desta forma, as infecções causadas por *K. pneumoniae* multirresistentes representam um sério problema de saúde pública e um grande desafio terapêutico (KEYNAN; RUBINSTEIN, 2007).

Porém os microrganismos Gram-positivos também representam uma grande parcela das infecções, bem como na resistência aos antimicrobianos. O *S. aureus*, bactéria Gram-positiva, foi um dos primeiros microrganismos bacterianos a serem controlados por meio da descoberta e uso dos antibióticos. Porém devido a pressão seletiva exercida pelo uso frequente do fármaco, o *S. aureus* foi uma das primeiras cepas a apresentar resistência aos antimicrobianos, ganhando assim uma maior importância e frequência em infecções comunitárias e hospitalares. Entre as cepas bacterianas Gram-positivas resistentes, o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) tornou-se um dos patógenos mais notificado atualmente (BARRIERE, 2015).

O *S. aureus* consiste em um microrganismo extracelular pertencente as bactérias Gram-positivas de coagulase positiva, com uma conformação de cocos. Além de ser facilmente encontrado na pele e nas fossas nasais de indivíduos saudáveis, o *S. aureus* é um importante patógeno humano responsável por um amplo espectro de doenças com gravidade variável, em instalações hospitalares e nas comunidades. Esse patógeno se instala, principalmente, em pessoas debilitadas por doenças crônicas ou lesões traumáticas desencadeando quadros como pneumonia, endocardite, flebite, mastite, infecção nas válvulas cardíacas e próteses (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005). Apesar de estar comumente associado as infecções dérmicas e as demais citadas anteriormente, o *S. aureus* tem a capacidade de invadir tecidos ou mucosas comprometidas e infectar qualquer tecido do organismo, avançando para quadros de infecções em níveis sistêmicos invasivos podendo, provavelmente, ocasionar a morte do hospedeiro (BLANCHARD; QUACH; AUTMIZGUINE, 2015).

O uso inadequado de antimicrobianos pela comunidade médica e pela população tem contribuído para o aumento de cepas resistentes desse microrganismo a diversos antibióticos. Inicialmente os antimicrobianos β -lactâmicos eram os principais tratamentos para infecções por esse patógeno, porém ao longo dos anos foram identificados mecanismos de resistência deste

microrganismo frente aos fármacos da respectiva classe (REMONATTO, 2007). Nos últimos anos, o aparecimento de surtos comunitários de cepas *S. aureus* resistentes a meticilina e à vancomicina, MRSA e VRSA respectivamente, tem preocupado toda a área da saúde (MENDES, 2010).

Em alguns países, quadros de infecções nosocomiais por MRSA têm se tornado endêmicos. Um estudo realizado, com embasamento nos dados do *Center of Diseases Control and Prevention* (CDC), mostram que 63% das infecções por *Staphylococcus spp.* nos Estados Unidos são de cepas MRSA (MEJÍA, *et al.*, 2010). Um levante realizado em 11 países na América-Latina, entre eles o Brasil, apontou que dentre os isolados de *S. aureus* notificados 48,3% eram cepas de MRSA (ROSSI *et al.*, 2008). Isolados clínicos de *S. aureus* no Brasil têm-se tornado cada vez mais frequentes, sendo 26,6 a 80% correspondente as linhagens de MRSA (ANVISA, 2013; MACIEL; CÂNDIDO, 2013).

Um estudo feito com crianças no hospital universitário em Salvador – BA, durante um período de 20 anos entre 1994 e 2005, mostrou que dentre os 90 casos obtidos com infecção por *S. aureus*, 37,8% estava relacionado às infecções superficiais (pele e tecido mole) enquanto 62,2% era referente a uma infecção mais profunda ou invasiva. Relacionado aos quadros clínicos invasivos, 26,8% estava acometido a pneumonia, 5,4% pela sepse e 3,6% por endocardite (GOMES; TAVARES, 2012).

Em Brasília, um estudo envolvendo 4375 pacientes em um hospital de ensino, evidenciou que dos 147 pacientes pós-cirúrgicos como gastroplastia, herniorrafia, exérese de tumor, entre outros, apresentaram infecções em seus sítios cirúrgicos, prevalecendo as infecções por *S. aureus* (40%), seguido por *K. pneumoniae* (8,3%), *E. coli* (7,2%), *Proteus vulgaris* (7,2%), *Enterococcus faecalis* (5,9%) e *P. mirabilis* (4,8%) (BATISTA; RODRIGUES, 2012).

Outro estudo entre 2005 e 2010 em Manaus, Brasil, relatou um aumento de infecções por cepas de MRSA de 47,3 para 96,6%. Nesse mesmo estudo envolvendo 113 pacientes, sendo 92% hospitalizados e 8% tratados em ambulatórios, mostrou que 65,5% dos casos clínicos relacionados a *S. aureus* envolvia infecções por pele ou utilizava o mesmo tecido como porta de entrada para infecções profundas, cujo dos 19 óbitos relatados todos eram

provenientes de pacientes já internados e de uma infecção por MRSA (CARVALHO, 2016).

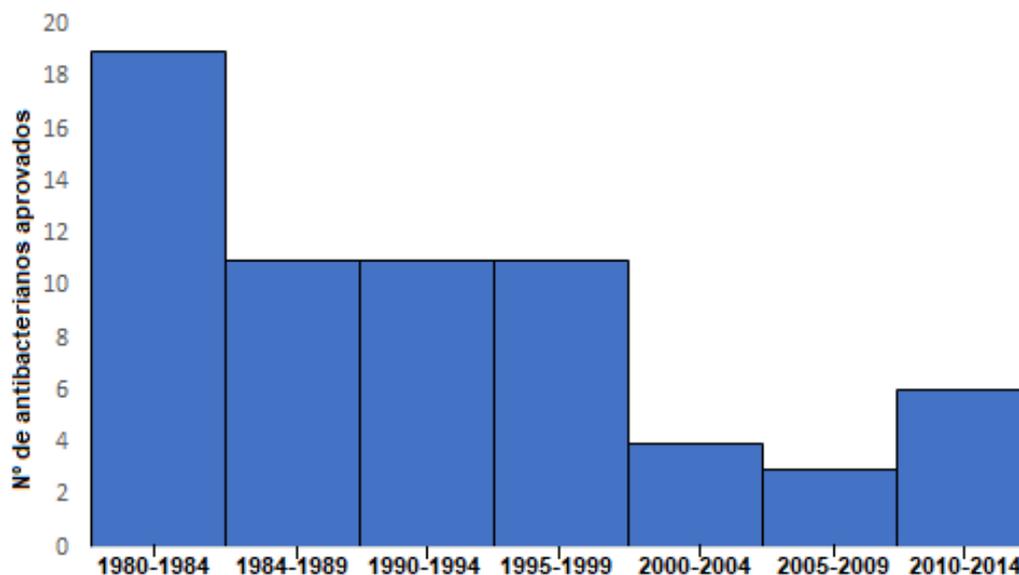
O recente boletim da ANVISA sobre a avaliação das IRAS, mencionado anteriormente acerca dos casos de *K. pneumoniae*, coloca as notificações sobre *S. aureus* como o segundo microrganismo mais isolado em UTIs (neonatal, pediátrica e adulta) no Brasil, colocando esse patógeno em destaque dentre os demais microrganismos (ANVISA, 2017).

1.2. Uso combinado de antimicrobianos como alternativa terapêutica a infecções bacterianas multiresistentes

Segundo relatório da OMS, a *K. pneumoniae* e o *S. aureus* foram classificados como os agentes resistentes frequentemente causadores dos principais tipos de infecções nosocomiais (WHO, 2018). A resistência adquirida e inerente das cepas mencionadas acima, frente a maioria das classes de antimicrobianos desenvolvidos, tem implicado nos usuais tratamentos terapêuticos. Tendo em vista que a resistência bacteriana pode vir a se tornar inevitável, a partir do uso regular do medicamento, a indústria farmacêutica passou a considerar que o desenvolvimento de antimicrobianos, para antibioticoterapia, não consiste em um investimento sensato no atual momento (GOLKAR; BAGASRA; PACE, 2014).

Alguns fatores contribuíram para a perda de interesse das indústrias farmacêuticas pela descoberta de novas drogas, entre eles os altos custos para ensaios clínicos e o longo período para conclusão de testes pré-clínicos e clínicos (MARTENS; DEMAIN, 2017). Devido essas dificuldades econômicas, dispendiosas, e os obstáculos regulatórios, o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos tiveram uma queda drástica entre as décadas de 80 e 2010 cujo 15 das 18 maiores entidades farmacêuticas afastaram-se da área de antibióticos e reduziram o número das equipes de pesquisa (Figura 4) (BARTLETT; GILBERT; SPELLBERG, 2013; PIDDOCK, 2012; VENTOLA, 2015).

Figura 6. Número de fármacos antibacterianos aprovadas entre 1980 e 2014, durante período de 4 anos. Adaptado de Ventola, 2015.



Outro grande empecilho durante o desenvolvimento de novos medicamentos antibacterianos têm sido os obstáculos regulatórios. Destacando-se entre eles a falta de clareza, burocracia, mudança nas regras regulatórias e a diferença das premissas dos estudos clínicos dos países entre si. Como exemplo, protótipos de futuros antibióticos devem ser elaborados de forma que demonstrem uma superioridade aos medicamentos existentes no mercado, a comprovação de tal efetividade deve ser realizada com uma margem estatística variável baseada em uma grande amostra populacional, gerando assim custos elevados durante o desenvolvimento da pesquisa (PIDDOCK, 2012; WRIGHT, 2014).

As substâncias antibacterianas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) se tornam reflexo das modificações realizadas pela agência nos padrões de estudos clínicos, durante as duas últimas décadas, transformando a experimentação terapêutica clínica desafiadora. Em 2017 apenas 3 medicamentos antibacterianos foram aprovados dentre as 46 novas moléculas propostas, sendo eles a delafloxacina (fluoroquinolona), vabomere (associação entre meropenem e vaborbactam) e ozenoxacina (quinolona) (ANDREI *et al.*, 2018; BASSETTI *et al.*, 2017; FDA, 2017; MUNSON *et al.*, 2017).

Durante o início do ano de 2018 nenhum fármaco antibacteriano foi aprovado (ANDREI *et al.*, 2018). Estima-se que o tempo médio gasto na descoberta de um novo medicamento, entre 11.000 compostos propostos, pode ser de aproximadamente 11,5 anos (ANDREI *et al.*, 2018; FDA, 2018; WALSH; WENCEWICZ, 2014).

Apesar da presente falta de encorajamento no desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, pelas grandes indústrias, os antibióticos continuam a proporcionar benefícios para a população no tratamento e eliminação de algumas cepas bacterianas em quadros infecciosos, principalmente, em pacientes de quimioterapias, diabetes, ou que sofreram cirurgias complexas, como transplantes de órgãos (CDC, 2013; GOULD; BAL, 2013; ROSSOLINI *et al.*, 2014). Nos países em desenvolvimento, onde o saneamento continua sendo precário, os antibióticos continuam à auxiliar na redução da morbidade e da mortalidade causadas por infecções, além de serem considerados os principais responsáveis pelo aumento contínuo na expectativa de vida.

Muitas empresas farmacêuticas têm se afastado da área de desenvolvimento de novos compostos para retomarem o uso de antibióticos que foram abandonados ao longo do tempo (HOLMAN *et al.*, 2018; THEURETZBACHER, 2012). Contudo, uma das alternativas mais fundamentáveis inclui o estudo de combinações entre fármacos na tentativa de alcançar resultados de efeitos sinérgicos e significativos frente aos quadros de infecções.

A palavra sinergismo pode ser definida como uma resposta farmacológica obtida a partir da associação de dois ou mais medicamentos, cujo resultado mostra-se maior do que a soma dos efeitos isolados de cada um deles. Uma vez que cada fármaco poderá apresentar um mecanismo diferente sobre um microrganismo, essa metodologia vem sendo abordada com ênfase na elaboração de ferramentas antibacterianas permitindo aumentar a ação bactericida (GOODMAN, 1996; LANGEVELD *et al.*, 2014). Os benefícios associados ao uso combinatório de agentes antimicrobianos consistem na redução das doses administradas, bem como a redução dos efeitos tóxicos de cada um dos fármacos, diminuição dos gastos com medicamentos e atenuação

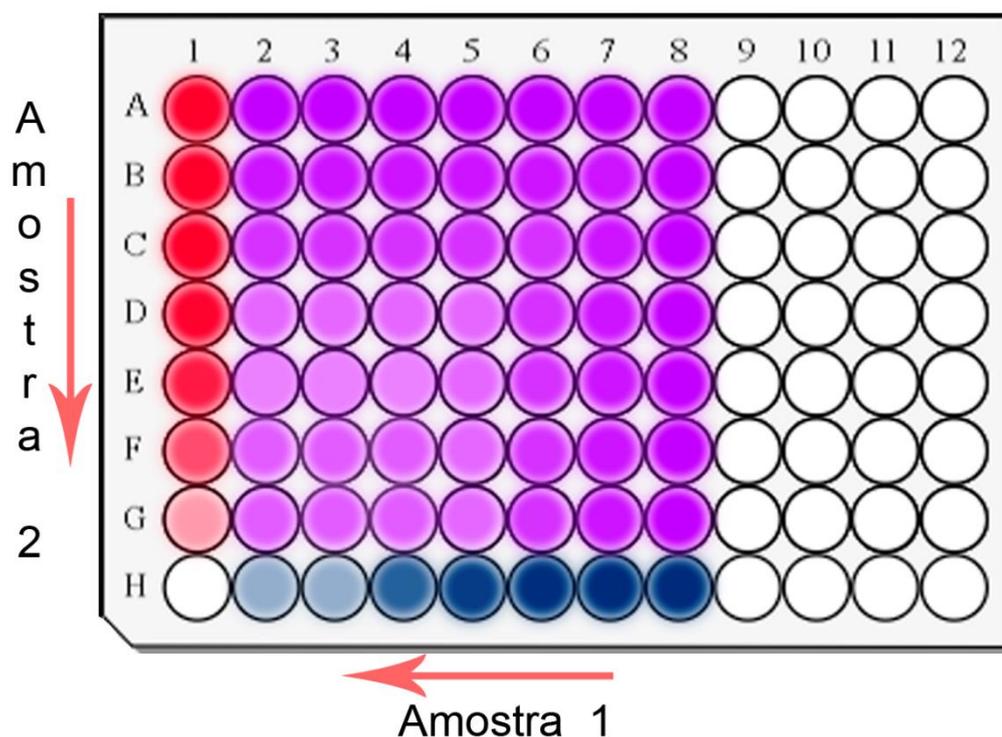
na probabilidade dos microrganismos desenvolverem resistência (ALMAAYTAH *et al.*, 2018; CONGREVE; MARSHALL, 2010; O'BRIEN; RESTREPO; MARTIN-LOECHES, 2015).

O sinergismo pode ser avaliado *in vitro* por diferentes técnicas como *time-kill*, *checkerboard* e *E-test* (KROGSTAD, 1986; LANGEVELD *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2011). O *checkerboard* e o *time-kill* são metodologias desenvolvidas para quantificar o efeito das combinações de agentes antimicrobianos ante o crescimento bacteriano *in vitro* (JACKSON; AGBOKE; NWOKE, 2009). O método de *checkerboard* avalia o efeito da substância-teste em combinação com um antimicrobiano em diferentes concentrações. A metodologia de *checkerboard* pode ser decorrente da microdiluição em caldo semelhante ao utilizado para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) padrão (MITCHELL *et al.*, 2012; PILLAI; MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005).

Após aplicação do método, as interações são calculadas a partir de uma equação e então definidas como sinérgicas, indiferentes ou antagonistas. As concentrações inibitórias fracionais (CIF), obtidas por meio da associação, devem ser comparadas com os valores de CIM da substância-teste e do antimicrobiano, isoladamente, na tentativa de avaliar se determinada combinação pode ser viável ou não para uso terapêutico (BARRY, 1999; PILLAI; MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005). Uma das vantagens dessa metodologia se dá pela possibilidade de testar diversas concentrações frente ao mesmo microrganismo ou célula utilizando volumes baixos (VASUDEVAN; SWAMY; KAUR, 2018).

O termo *checkerboard* descreve a forma que os antimicrobianos são dispostos na placa, como um tabuleiro de xadrez. No eixo das abscissas, horizontal, cada poço contém uma concentração diferente, da amostra de interesse diluída, de forma decrescente da direita para esquerda. Enquanto na vertical, ordenadas, o segundo composto tem suas diluições adicionadas na microplaca em concentrações decrescentes de cima para baixo. Tendo assim em cada poço uma concentração diferente das duas amostras de interesse em um mesmo volume (Figura 5) (DOERN, 2014; LORIAN, 2005).

Figura 7. Microplaca de 96 poços pela metodologia de *checkerboard*. Os poços nos tons de azul, representam a diluição seriada da amostra 1 no eixo das abcissas (da direita para esquerda). Em vermelho, a diluição seriada da amostra 2 no eixo das ordenadas (de cima para baixo). Os poços de cor violeta correspondem a combinação das duas amostras em diferentes concentrações. Os poços em branco são destinados aos controles negativos, positivos e brancos.



A estratégia da combinação de compostos e moléculas vem sendo amplamente estudada não apenas na associação par-a-par entre fármacos convencionais. Um estudo de Belio e colaboradores (2018) demonstraram progresso durante avaliação de permeabilidade da membrana bacteriana externa de *E. coli*, assim como a potencialização dos antibióticos contra cepa de *K. pneumoniae* multirresistente, por meio da associação de antibióticos com nanopartículas metálicas de óxido de cério (CeO_2NPs) (BELLIO *et al.*, 2018). Uma atividade sinérgica promissora, frente cepas Gram-positivas e Gram-negativas, foi observada na associação de peptídeos derivados de veneno com antimicrobianos convencionais, partindo do mesmo princípio da combinação de antimicrobianos com outros compostos (ALMAAYTAH *et al.*, 2018).

Estudos como de Bush *et al.* (2011), Ejim (2011), Langeveld *et al.* (2014) e Mazumdar (2009) demonstram que a associação de antibióticos juntamente com compostos não antimicrobianos, como anti-inflamatórios, antipsicóticos, bioativos da natureza e óleos essenciais, são capazes de aumentarem e melhorarem a eficiência desses fármacos na prática clínica por meio da terapia combinatória, uma vez obtido sua atividade sinérgica confirmada *in vitro*. Estudo sobre biofilmes apresentaram uma atividade sinérgica significativa com a associação de fagos com fármacos como ceftazidima e ciprofloxacina contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (CHAUDHRY *et al.*, 2017).

Em contraste, em 1992, o sinergismo *in vivo* era ainda um termo indefinido e geralmente evitado na literatura sendo preferível referir-se a esse conceito como uma “maior atividade antibacteriana da combinação *in vivo*” quando comparada com a de qualquer agente isolado (FANTIN; CARBON, 1992). Devido a ausência de uma recomendação da dosagem ideal, principalmente na associação de fármacos, proveniente da relação *in vitro-in vivo*, geralmente as metodologias adotadas são de extrapolação das concentrações obtidas *in vitro*. Na prática, a maioria das investigações para avaliação da eficácia do uso *in vivo* proveniente de combinações de compostos, se dá pela verificação e comparação dos resultados obtidos *in vitro* (FANTIN; CARBON, 1992).

As terapias de combinações antimicrobianas, além de melhorarem a efetividade, proporcionam uma terapia de amplo espectro e previnem o aparecimento de microrganismos resistentes (DRAGO *et al.*, 2007). Casos na clínica são relatados como bem-sucedidos proveniente da associação de fármacos. Um estudo recente sobre uma criança prematura com um quadro de bacteremia foi registrado no Canadá. Após o nascimento, a criança recebeu tratamento com ampicilina e tobramicina resultando em uma hemocultura negativa, porém após 48h quadros de hemorragia pulmonar, anemia, trombocitopenia, e hemorragia intraventricular foram desencadeados por *E. faecalis*, resistente a aminoglicosídeos em alta concentração. Mesmo com o uso de outros medicamentos associados, como vancomicina e ampicilina, a

bacteremia só foi contida quando doses de dois β -lactâmicos (cefotaxima e ampicilina) foram administradas em combinação (TAM *et al.*, 2018).

1.3. Antibióticos utilizados no presente estudo

1.3.1. Penicilina G

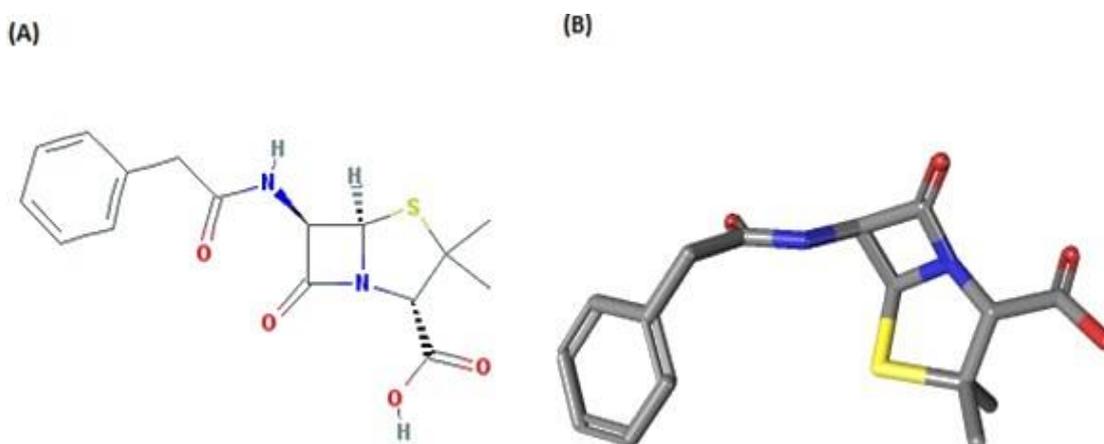
A penicilina foi descoberta em 1928, quando Alexander Fleming observou que suas culturas bacterianas haviam sido contaminadas pelo fungo *Penicillium notatum*, atualmente conhecido por *P. chrysogenum*, e que o mesmo possuía particularidades bactericidas (FLEMING, 1929). Em 1942, após comprovação da eficiência do antibiótico *in vivo*, a penicilina foi o primeiro antibiótico efetivo contra infecções bacterianas sendo produzida e utilizada em larga escala até os dias atuais (GAYNES, 2017; JW, 1996; MILLER, 2002a).

Apesar de possuir um anel tiazolidínico em sua composição, as penicilinas fazem parte do grupo de antimicrobianos denominados como β -lactâmicos devido à presença de um anel β -lactâmico no núcleo de sua estrutura, cujo anel lhe confere sua característica de atividade bactericida. Apesar de possuírem uma estrutura chave para sua atividade, anel β -lactâmico, as penicilinas apresentam atualmente variações estruturais, sendo essas variações proporcionadas pelas alterações em suas cadeias laterais (BUSH *et al.*, 2007). Tais modificações estruturais das penicilinas podem alterar e modular suas propriedades frente a uma característica específica auxiliando na sua atividade, como por exemplo adquirir estabilidade em pH ácido, aspecto fundamental e necessário para um fármaco administrado por via oral; apresentar estabilidade frente às β -lactamases, enzimas bacterianas relacionadas aos mecanismos de resistência capazes de hidrolisar antimicrobianos; e conferir ao fármaco um espectro de ação frente a determinada cepa de microrganismo (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Por ser uma classe que abrange muitos compostos de mesma estrutura básica, variando apenas sua cadeia R, as penicilinas podem ser divididas em naturais e semi-sintéticas. As penicilinas naturais atualmente são constituídas por duas moléculas, a benzilpenicilina (penicilina G) e a fenoximetilpenicilina

(penicilina V) (LOBANOVSKA; PILLA, 2017). Dentre as penicilinas naturais, a benzilpenicilina (penicilina G) tem sido a mais utilizada na clínica ao longo dos anos, uma vez que a adesão da penicilina V tem se distanciado do uso clínico devido sua absorção imprevisível e seu regime posológico (quatro vezes ao dia) (Figura 6) (BARKER; GERMOVSEK; SHARLAND, 2017).

Figura 8. Estrutura da penicilina G. (A) Estrutura química bidimensional da penicilina G; (B) Estrutura tridimensional da penicilina G. As cores azul, vermelho e amarelo correspondem aos átomos de Nitrogênio, Oxigênio e Enxofre, respectivamente. Adaptado do site *PubChemCompound*.



A penicilina G (PNG) apresenta uma baixa solubilidade e lenta liberação no organismo, essa absorção vagarosa implica diretamente em níveis séricos baixos, porém permite que o fármaco seja disponibilizado por um tempo mais prolongado que as demais penicilinas nas vias parenterais (MANTESE, 1999). Após uma aplicação intramuscular de 120000 UI, a penicilina G apresenta uma meia-vida de aproximadamente 336 horas no organismo, mantendo níveis séricos $\geq 0,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$ durante os próximos 28 dias. Devido ao fato da PNG ser facilmente hidrolisada em pH ácido, como suco gástrico, sua administração deve ser realizada por via endovenosa ou por via intramuscular (MORAES, 2012; SAÚDE, 2015).

A PNG apresenta um mecanismo de ação bactericida que age inibindo a síntese da parede celular. As bactérias produzem e remodelam sua parede

celular constantemente, o processo para formação dessa parede depende de uma enzima denominada transpeptidase sendo ela responsável pela constituição dos peptidoglicanos, esses peptídeos ligam-se entre si e estabelecem a forma e a rigidez da parede celular bacteriana (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). A ação bactericida da PNG ocorre devido à inibição das PBPs, essas proteínas desenvolvem uma função similar as enzimas transpeptidases na biossíntese dos peptidoglicanos (SILVEIRA *et al.*, 2006). Tendo as PBPs inibidas, o microrganismo se torna incapaz de formar sua parede celular e um desequilíbrio simultâneo entre a produção e a degradação dessa parede se desenvolve causando um extravasamento citoplasmático e uma morte celular rápida.

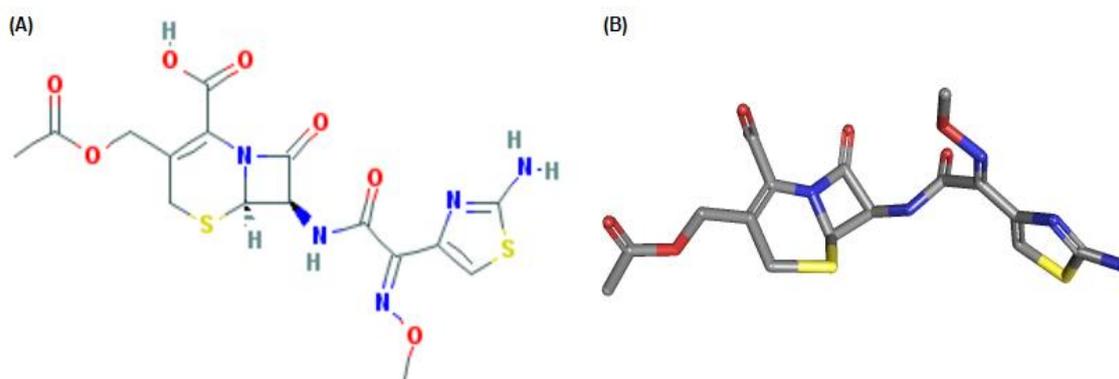
A benzilpenicilina possui um espectro efetivo contra Gram-positivos não produtores de β -lactamases, incluindo *S. aureus*, *S. viridians*, *S. pneumoniae*, estreptococos anaeróbios e algumas cepas de *Enterococcus spp.* (MILLER, 2002). O espectro da PNG tende a se estender contra alguns microrganismos Gram-negativos quando associada a outros fármacos.

1.3.2. Cefotaxima

A cefotaxima consiste em um antimicrobiano derivado de um composto produzido pelo fungo *Cephalosporum acremonium*, recentemente renomeado para *Acremonium chrysogenum*, pertencente a classe das cefalosporinas. As cefalosporinas, por sua vez, são substâncias semissintéticas cuja toxicidade e mecanismo de ação são similares aos β -lactâmicos, porém essas moléculas apresentam uma maior resistência frente as enzimas β -lactamases do que as penicilinas naturais (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

A busca por melhorias na atividade dos antimicrobianos assim como sua resistência frente as β -lactamases resultou no desenvolvimento de várias cefalosporinas, sendo estas então agrupadas em gerações como cefalosporinas de 1a, 2a, 3a, 4a e 5a geração (HARRIS, 2015). Por sua vez, a cefotaxima (CFT) integra o grupo de cefalosporinas da terceira geração que apresenta um mecanismo de ação similar as penicilinas por ser constituído, também, de um anel β -lactâmico (Figura 7).

Figura 9. Estrutura da cefotaxima. (A) Estrutura química bidimensional da cefotaxima; (B) Estrutura tridimensional da cefotaxima. As cores azul, vermelho e amarelo correspondem aos átomos de Nitrogênio, Oxigênio e Enxofre, respectivamente. Adaptado do site *PubChemCompound*.



Ao interagir com os peptidoglicanos presentes na parede celular dos microrganismos, esse anel causa a inibição das enzimas de transpeptidases impedindo a formação da parede, porém cada fármaco dessa classe pode mostrar uma afinidade flexível por diferentes PBPs (FREITAS *et al.*, 2014). Sendo a resistência bacteriana aos β -lactâmicos extensivamente atribuída a produção das β -lactamases, a cefotaxima encontra-se como o composto que não apresenta um perfil susceptível a essas enzimas (LEFROCK; PRINCE; RICHARD, 1982; RICHMOND; SYKES, 1973).

A cefotaxima foi desenvolvida em 1976 e introduzida no mercado no final de 1980 sendo uma das primeiras cefalosporinas de terceira geração. Este composto foi o primeiro de sua classe, a se tornar disponível nos Estados Unidos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000). Segundo a lista de medicamentos essenciais da OMS, a cefotaxima está entre os medicamentos mais importantes e necessários em um sistema básico de saúde neonatal (WHO, 2015), por apresentar uma maior resistência as β -lactamases e menos efeitos adversos dentre as demais cefalosporinas. A concentração de CFT

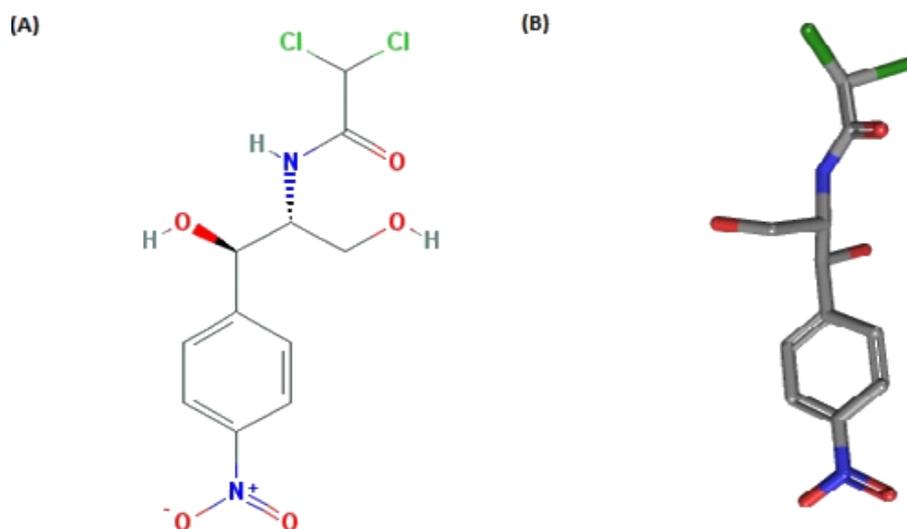
usualmente administrada, em adultos e crianças, em quadros de infecções conhecidas pode variar entre 1 a 2g a cada 12h. Porém quando não há conhecimento do quadro infeccioso e há implacções, como risco de vida, essas doses podem chegar até 12g a cada 6 - 8 horas (JUNIOR, 2015).

Assim como outras cefalosporinas de terceira geração, a CFT possui um largo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Comumente a cefotaxima tem sido comparada a ceftriaxona, uma cefalosporina de terceira geração, nos critérios de segurança e eficácia durante tratamentos neonatais, meningite bacteriana, infecções no trato respiratório, pele e infecções da corrente sanguínea (PACIFICI; MARCHINI, 2017; ROBERTSON *et al.*, 2002).

1.3.3. Cloranfenicol

O cloranfenicol (CAP) foi descoberto e isolado a partir do microrganismo de solo *Streptomyces venezuelae* em 1947 por Ehrlich e colaboradores (WARNER, 1950). Após elucidação da sua estrutura em 1949, na década de 1950, o cloranfenicol começou a ser produzido em escala industrial seguido pela sua ampla utilização na saúde em ambientes hospitalares, sendo o primeiro antibiótico sintético utilizado na clínica (KASTEN, 1999). Este antimicrobiano pertencia anteriormente à classe dos macrolídeos, os quais apresentam um anel macrocíclico que se ligam em um ou mais açúcares (Figura 8).

Figura 10. Estrutura do cloranfenicol. (A) Estrutura química bidimensional do cloranfenicol; (B) Estrutura tridimensional do cloranfenicol. As cores azul, vermelho e verde correspondem aos átomos de Nitrogênio, Oxigênio e Cloro, respectivamente. Adaptado do site *PubChemCompound*.



Após anos de estudos, por não possuir o mesmo mecanismo de ação que os macrolídeos, o cloranfenicol passou a ser classificado posteriormente no grupo dos anfenicóis que compõem uma classe de antimicrobianos bacteriostáticos responsáveis por inibir a síntese dos polipeptídeos bacterianos (BAPTISTA, 2013; KASTEN, 1999; TENSON; LOVMAR; EHRENBORG, 2003).

O CAP consiste em um composto lipossolúvel capaz de penetrar fluídos como líquido peritoneal, sinovial e pleural. Atualmente existem diversas disposições para o uso desse fármaco na forma tópica, oral (palmitato de cloranfenicol) e intravenosa, podendo assim atingir uma concentração no parênquima cerebral de até 9 vezes mais que no plasma (ANVISA, 2007). Sua posologia deve ser, usualmente, por via endovenosa nas concentrações de 75 a 100 mg.Kg⁻¹ por dia a cada 6 horas, sendo utilizado principalmente em indivíduos alérgicos aos β-lactâmicos (ANVISA, 2007).

Além de apresentar uma característica lipofílica, o CAP possui uma atividade antimicrobiana bacteriostática agindo sobre os ribossomos microbianos, inibindo ou alterando, o processo da tradução dos ácidos nucléicos em proteínas. A passagem do cloranfenicol pela membrana do microrganismo ocorre por difusão da membrana celular e, posteriormente, o mesmo se liga de forma reversível na subunidade 50S dos ribossomos de células procariontes. Essa ligação ribossomal do fármaco impede a fixação do mRNA na subunidade bacteriana, causando um bloqueio das ligações peptídicas entre as extremidades do grupo carboxila e grupo amina dos aminoácidos, inibindo a formação de proteínas (SCHIFANO *et al.*, 2013). As diferenças estruturais entre os ribossomos das células eucarióticas e procarióticas, em termos de subunidades como o complexo de iniciação da síntese, permitem que os antimicrobianos tenham uma atividade mais seletiva contra as bactérias (OLIVIER, 2014).

Proveniente dessa característica funcional, o CAP possui um amplo espectro de atividade contra Gram-positivas, Gram-negativas, Rickettsias, e micoplasmas, apresentando uma boa atividade em tratamentos de infecções oculares como blefarite e conjuntivite (KASTEN, 1999; MARTINS *et al.*, 2006; YUNIS, 1988). Porém possui usual utilidade em casos de infecções por *Haemophilus influenzae*, principalmente do tipo B, meningites, septicemia e febre tifóide. A crescente disponibilidade de novos antimicrobianos efetivos diminuiu consideravelmente as indicações clínicas para o CAP, principalmente pelos efeitos adversos apresentados por esse antimicrobiano.

Os efeitos comumente associados ao CAP incluem a anemia aplástica e a síndrome do bebê cinzento. A anemia aplástica, efeito adverso raro, ocorre devido a diminuição dos glóbulos vermelhos por toxicidade na medula óssea, porém pacientes que fazem uso desse fármaco devem manter uma rotina de exames hematológicos, onde o mesmo deve ser suspenso ao apresentar qualquer atividade fora do padrão (HAMMETT-STABLER; JOHNS, 1998).

O fenômeno da síndrome denominada “bebê cinza” pode ser observado em recém-nascidos provenientes de uma administração de CAP por via intravenosa em gestantes. A “coloração cinza”, adquirida pelos recém-nascidos, ocorre pelos mesmos não possuírem ainda enzimas hepáticas completamente funcionais, mantendo dessa forma, o CAP não metabolizado no organismo (CUMMINGS, 2017). Por este motivo, atualmente, o uso do CAP tem sido indicado como última opção terapêutica, como por exemplo em casos de resistência.

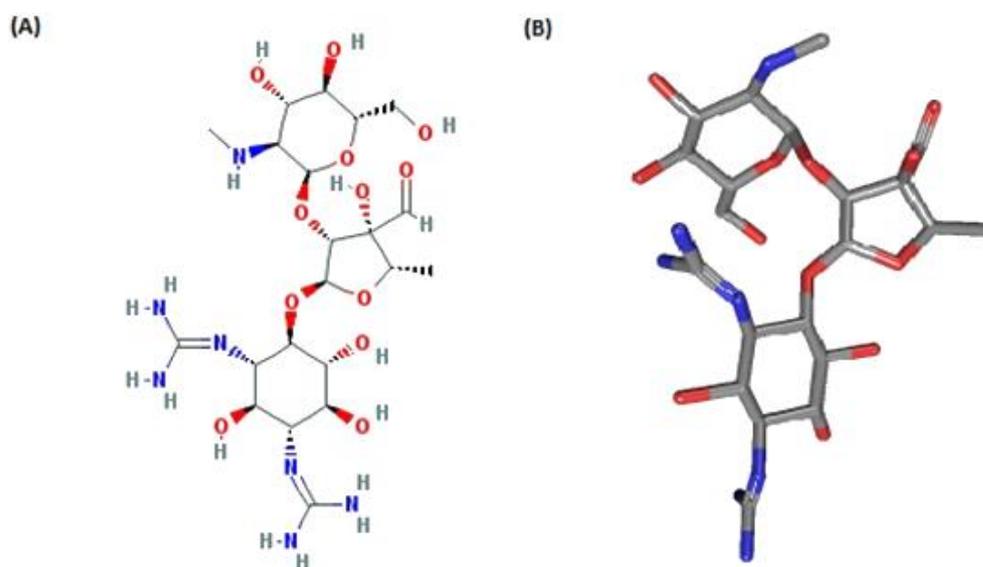
1.3.4. Estreptomicina

Os aminoglicosídeos, assim como as penicilinas, são uma das classes mais antigas de antimicrobianos que compõem um conjunto de opções terapêuticas disponíveis desde a década de 1940, sendo estreptomicina a primeira a ser introduzida no mercado (BAKER; SCHLOSSER; WHITE, 1949). A molécula da estreptomicina (SMA) foi descoberta pelo bioquímico norte-americano Selman Abraham Waksman em 1943, a partir da actinobactéria *S. griseus*, tendo uma grande repercussão na época por ser o primeiro agente

específico efetivo no tratamento da tuberculose (KINGSTON, 2004). Posteriormente uma gama de antimicrobianos foi sendo descoberto e sintetizado tendo a estrutura da SMA como base, alguns exemplos são as tobramicinas, amicacinas e neomicinas (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2009; EDSON; TERRELL, 1999; LORTHOLARY *et al.*, 1995).

O nome aminoglicosídeo se deve ao fato da molécula ser constituída por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligações glicosídicas à hexose ou aminociclitol em posição central (Figura 9) (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

Figura 11. Estrutura da estreptomicina. (A) Estrutura química bidimensional da estreptomicina; (B) Estrutura tridimensional da estreptomicina. As cores azul e vermelho correspondem aos átomos de Nitrogênio e Oxigênio, respectivamente. Adaptado do site *PubChemCompound*.



Os aminoglicosídeos, em seu geral, demonstram uma atividade antimicrobiana frente microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos, micobactérias e protozoários (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2009). Na clínica, as moléculas mais prescritas atualmente são gentamicina e tobramicina, enquanto a estreptomicina vem sendo utilizada apenas no tratamento da tuberculose, brucelose, tularemia e meningoencefalite como um recurso terapêutico chave para infecções mais graves (GRIFFITH, 2007). Devido sua

natureza polar, os aminoglicosídeos possuem baixa absorção gastrointestinal, sendo que menos de 1% da dose pode ser absorvida após administração oral ou retal. Dessa forma, a principal via de administração adotada tem sido a parenteral, especialmente pela SMA apresentar uma característica lipofóbica que permite que sua concentração em secreções e nos tecidos seja reduzida (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

Os antimicrobianos dessa classe, de cargas positivas, se ligam nas estruturas carregadas negativamente da parede celular competindo e deslocando moléculas de Ca^{2+} e Mg^{2+} , formando “poros” na parede celular alterando a permeabilidade da mesma (GOMES; TAVARES, 2012). A atividade da SMA ocorre de forma bifásica, primeiramente o fármaco inicia uma interação iônica com a superfície da célula bacteriana seguida pela sua captação, posteriormente o fármaco realiza uma ligação no ribossomo da bactéria.

A SMA se liga de forma irreversível a subunidade ribossomal bacteriana 30s interferindo e induzindo uma leitura equivocada do código-molde do RNA mensageiro, ocasionando assim a tradução errônea seguida pela introdução de aminoácidos incorretos na cadeia peptídica crescente, consequentemente, originando uma proteína não funcional (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Um fator importante para essa ligação ribossômica se dá pelo mecanismo de transporte dependente de energia e oxigênio, podendo ser inibido por anaerobiose e baixo pH (EDSON; TERRELL, 1999).

2. JUSTIFICATIVA

A resistência antimicrobiana consiste em uma das principais causas de mortalidade e aumento dos custos hospitalares em países desenvolvidos e em desenvolvimento dificultando cada vez mais o tratamento por infecções bacterianas. Cepas de *S. aureus* MRSA e *K. pneumoniae* KPC+ estão comumente relacionadas aos quadros infecciosos de difícil tratamento, apesar da busca por novas moléculas para uso em tratamentos convencionais de quadros clínicos acometidos por esses patógenos. O número de antimicrobianos descobertos e lançados no mercado nos últimos anos vem sendo baixo, não acompanhando dessa forma o aumento da incidência de infecções resistentes, tornando-se necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas. Considerando as poucas alternativas de tratamento desses patógenos, a associação de antimicrobianos pode ser uma alternativa terapêutica para o combate e controle de microrganismos resistentes. A associação de medicamentos em baixas concentrações pode elevar a efetividade dos compostos bem como reduzir possíveis efeitos adversos, uma vez que os antimicrobianos convencionais ainda continuam se mostrando bons candidatos para tratamentos alternativos, principalmente por já possuir uma aplicação clínica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a atividade antibacteriana dos antimicrobianos (penicilina G, cloranfenicol, estreptomicina e cefotaxima) livres e em associação contra cepas bacterianas resistentes *in vitro* e *in vivo*, e *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a atividade antibacteriana *in vitro* dos antimicrobianos frente isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *S. aureus* pelo método de microdiluição em caldo;
- ✓ Determinar a eficiência da associação dos antimicrobianos com atividade antibacteriana pelo ensaio *checkerboard*;
- ✓ Determinar atividade hemolítica dos antimicrobianos associados;
- ✓ Determinar a citotoxicidade dos antimicrobianos livres e das associações frente células RAW 264.7 e células VERO;
- ✓ Determinar a efetividade *in vivo* da associação de antimicrobianos em modelo murino.

Capítulo I

Original article

***In vitro* combined activity of conventional antibiotics against *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* multiresistant**

Rayssa A. Porcino,^{1,2} Isabel C. M. Fensterseifer,^{1,2} Osmar N. Silva,³

Octavio Luiz Franco^{1,2,3*}

¹Molecular Pathology Post-graduate Program, University of Brasília, Brasília, 70910900, Brazil.

²Centro de Análises, Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, 70990-160, Brazil.

³S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil.

***Corresponding author:** Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília SGAN, Quadra 916, Módulo B, Av. W5 Norte, CEP 70.790-160 Brasília-DF, Brazil Fax: +55-61-3347-4797; Phone Number: +55-61-3448-7220. E-mail: ocfranco@gmail.com.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the activity of conventional antimicrobials (penicillin G, cefotaxime, chloramphenicol and streptomycin), alone and associated, against resistant bacterial pathogens of *Staphylococcus aureus* MRSA and *Klebsiella pneumoniae* KPC +.

Methods: First, the minimum inhibitory concentrations of each antibiotic were performed. After MIC the checkerboard methodology was established from a fixed MIC value. The combined interactions of penicillin G, cefotaxime, chloramphenicol, and streptomycin against these pathogens were observed. Synergistic and additive activity was confirmed with the fractional inhibitory concentration index values. After this, cell viability tests were performed to verify possible cytotoxic and hemolytic effects from the combination of drugs.

Results: In the present study, the *in vitro* minimum inhibitory concentrations against strains of *K. pneumoniae* and *S. aureus* were tested with penicillin G, cefotaxime, chloramphenicol and streptomycin ranging from > 1436 μ M to 7 μ M. The β -lactams in the study had a high MIC value, among other drugs, and they evidenced the microorganisms has resistant profile against drugs. Streptomycin, in turn, was the only one that pathogens were sensitive (7 μ M). The potent association between the drugs resulted in positive synergistic effects, with penicillin G + streptomycin and cefotaxime + streptomycin showing itself to be more effective in fighting *S. aureus* MRSA and *K. pneumoniae* KPC, with a synergistic IFIC of 0.18. The combinations did not present cytotoxic and/or hemolytic activity, and thus allowed the combined use of antibiotics.

Conclusions: This study suggests that the antibacterial activity from a combination of antimicrobials differs significantly from when they are tested alone. Therefore, the use of these drugs as monotherapy against resistant strains may result in their inactivity as well as the reduction in efficacy of the antibiotic when used alone. A combination of drugs may be an alternative therapeutic treatment for infections caused by multi-resistant pathogens.

Keywords: antibiotic resistance, synergy, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, aminoglycoside, β -lactams

Introduction

The health system has entered a period of infection outbreaks unlike anything that has been reported in more than three-quarters of a century. Since they were discovered, antibiotics have played an important role in the fight against infectious diseases, but the long-term uncontrolled and inappropriate use of these drugs has led to the emergence of strains that are tolerant to many of the drugs currently on the market. Antimicrobial resistance (AMR) occurs when the pathogens responsible for the infection survive exposure to a drug concentration that should be harmful to the microorganism and not to the host, and thus prevent the effectiveness of the therapeutic treatment ^[1]. AMR is a natural process that has been observed since the launch of the first antibiotics. However, due to the overuse of antimicrobials, the AMR rate continues to rise, and it has become a global health problem, worsened by the scarcity of new drugs to challenge these superbugs ^[2].

In the past, resistant infections were mainly associated with hospital facilities, but in the last decade, resistant infections have also been detected in communities. Approximately 200,000 people die each year from infections caused by multi-resistant pathogens ^[3]. As an example, in India alone, 60,000 new-borns die each year from antimicrobial-resistant infections ^[4]. In addition to the impact of mortality and morbidity, superbugs cause heavy economic losses. In developed countries like the USA, more than two million infections per year are caused by antibiotic-resistant bacteria, costing the healthcare system \$ 20 billion each year, which means that the impact of costs on underdeveloped countries is even higher and more worrying ^[5].

The WHO has recently published a list of bacteria resistant to most antibiotics, which should be a priority in research on the development of new drugs. Among them are *Klebsiella pneumoniae*, resistant to carbapenems, and *Staphylococcus aureus*, resistant to methicillin, classified as critical and high priority, respectively ^[6]. The most relevant criteria used in the choice of pathogens include: lethality rate, treatment with long duration of hospitalization, frequency of antimicrobial resistance, capacity for wide direct and indirect

dispersion among people and animals, treatment options, and the development of new drugs in the treatment of infections ^[6].

One of the most worrying Gram-negative pathogens worldwide is *K. pneumoniae*, which can express resistance to 95% antimicrobial in the pharmaceutical market due to its ability to produce extended spectrum β -lactamase (ESBL) and carbapenemase (CPE) enzymes ^[7]. Because it has a high index of resistance to antimicrobials, this microorganism can cause invasive infections and widespread dissemination, from extra-gastrointestinal infections to septicemia ^[8,9]. In contrast, when it comes to Gram-positive bacteria, the main concern is *S. aureus*, which is especially resistant to methicillin (MRSA). This is the bacterium commonly associated with multi-resistance to the most widely used antibiotics in clinical practice, making it difficult to treat infections by this microorganism because the spectrum of treatment is small, and limited to commercially available antimicrobials ^[10]. According to the WHO, it is estimated that patients with methicillin-resistant infections are more likely to die in 64% of cases than patients with non-resistant *S. aureus* infections ^[11].

The number of antibiotics discovered and released on the market in recent years is low and has not kept up with the increase in the incidences of resistant infections, making it necessary to develop alternative strategies. A combination of antibiotics has now become an important approach for the efficacy of antimicrobial drugs and in the attempt to overcome resistance. Synergism is a pharmacological response to the positive interaction created by two or more compounds which, when associated, exert a greater inhibitory effect than the sum of their individual effects ^[12]. The association of drugs can be an alternative in the treatment of bacterial infections caused by *K. pneumoniae* and *S. aureus*, increasing the effectiveness of antibiotics at low concentrations, reducing the concentration of these drugs aims to boost therapeutic efficiency by increasing the spectrum of action of antibiotics and reducing side effects. This in turn improves the quality of life of the population and allows conventional antibiotics to remain good candidates for the treatment of infectious diseases ^[13].

For the association of antibiotics, the drugs (penicillin G, chloramphenicol, cefotaxime and streptomycin) were chosen based on their clinical use and their activity spectrum. Class of penicillin and cephalosporins, especially third generation, are the most commonly used antibiotics in hospitals and medical prescriptions, and it is because of exaggerated use of these drugs that they regularly lose their active potential due to acquired resistance in microorganisms^[14]. In contrast, streptomycin and chloramphenicol do not have such a recurrent presence in therapeutic treatments against infections as they did in the past, but they still have a broad spectrum of activity at low concentrations^[15]. Besides being cost-effective antibiotics, their combination with other agents has been successful in treating some infection cases^[15-17]. The aim of this study was to evaluate the efficacy of the combination of penicillin G (PNG), cefotaxime (CFT), chloramphenicol (CAP), and streptomycin (SMA) *in vitro* against strains of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*.

Material and Methods:

Antibiotics

Antibiotics were obtained commercially. Penicillin G (PNG), cefotaxime (CFT); chloramphenicol (CAP) was bought from *Sigma Aldrich* and streptomycin (SMA) from Gibco, *Thermo Fisher*. All antimicrobials used had \geq 95% purity. CFT and PNG antibiotics were selected based on the current therapeutic use, and CAP and SMA were chosen because of their broad spectrum of activities as well as their possible reuse in clinical practice.

Microorganisms

The bacterial isolates used were obtained by the Central Public Health Laboratory of the Federal District (LACEN-DF) with data of antibiogram corroborating the resistant profile of each microorganism.

Determination of the minimum inhibitory concentrations (MIC)

The MICs of antibiotics against *S. aureus* and *K. pneumoniae* were determined using the broth microdilution method in a 96-well microplate according to the NCSLA guidelines^[18]. The sterile culture of Muller-Hinton broth

(Himedia, India) was inoculated with a single colony of *S. aureus* or *K. pneumoniae* from a culture of isolated LB solid medium and maintained on a shaker at 220 rpm at 37 ° C for 12 h (overnight). After this, the overnight-cultured *S. aureus* or *K. pneumoniae* were transferred to MH medium, and cultured to exponential phase (OD₅₉₅ of ~0.6). The culture was adjusted to a final amount of 1×10^5 CFU.mL⁻¹. For the assays, the antibiotics were diluted in several concentrations ranging from 512 to 1 µg.mL⁻¹ from stock dilution. Ten microliters of each concentration of antibiotic solution were added to each corresponding well of a 96-well plate (Becton & Dickinson, USA) and 90 µL of bacteria (1×10^5) in MH medium was added. Milli Q water was used as a negative control. As a positive control, SMA was used in high concentration, 10 mg.mL⁻¹. The 96-well plates were incubated in the *BioTek PowerWave HT Microplate Spectrophotometer* reader at 37 °C under constant stirring and monitoring every 30 minutes at a wavelength of 595 nm. The MICs were determined as the lowest tested concentration leading to complete inhibition (100%), as compared to the negative control group ^[19].

Combination assays

Checkerboard

The Minimum inhibitory concentration (MIC) range of isolates antibiotics was used to initial values for synergistic checkerboard methodology ^[20]. The checkerboard assay was performed in an 8x8 well configuration and was done in triplicate with 96 wells in three different plates. Negative control was performed in wells not containing antibiotics (0 µg.mL⁻¹ from both drugs), just water, and positive controls were performed in separate wells in the same plate for each association with SMA in high concentration, 10 mg.mL⁻¹. The combinations were tested for PNG + SMA, PNG + CFT, PNG + CAP, CFT + CAP, CFT + SMA and CAP + SMA. The concentrations tested ranged from 0 µg.mL⁻¹ x MIC value to 2 x MIC value, and each respective antibiotic was tested with the inoculum 1×10^5 CFU.mL⁻¹. The plates were incubated in the *BioTek PowerWave HT Microplate Spectrophotometer* reader at 37 °C under constant stirring and monitoring every 30 minutes at a wavelength of 595 nm.

The index fractional inhibitory concentration (IFIC) was thereafter derived from the least concentration of antibiotic combination allowing no growth of the test bacteria on the plates in triplicate. Each drug was estimated for their FIC value using the standard formula:

$$\begin{aligned} \text{IFIC} &= \Sigma \text{FIC} = \text{FIC1} + \text{FIC2} \\ \text{FIC1 (antibiotic 1)} &= \frac{\text{MIC combined}}{\text{MIC isolated}} \\ \text{FIC2 (antibiotic 2)} &= \frac{\text{MIC combined}}{\text{MIC isolated}} \end{aligned}$$

Synergy was defined as $\Sigma \text{FIC} \leq 0.5$, additivity was $\Sigma \text{FIC} > 0.5$ to 1, indifference was $\Sigma \text{FIC} > 1$ to 4, and antagonism was defined as $\Sigma \text{FIC} > 4$ [20,21].

Cell viability assays

Among associations between antimicrobials, the most effective combinations against *S. aureus* and *K. pneumoniae*, PNG + SMA and CFT + SMA, respectively, were submitted for cytotoxic tests with cell line RAW 264.7 and VERO cells. MTT assays were performed to determine if the associations have cytotoxic activity *in vitro* [22]. Cells from mouse (RAW 264.7 macrophage cells) and monkey (VERO kidney cells) were used in 96-well microtiter plates at a concentration of 1.0×10^5 cells per well, in DMEM medium, with different concentrations of antibiotic combinations arranged like a checkerboard plate, but cells were used instead of bacteria as inoculum. After 24 to 48 hours of incubation, the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was performed to quantify mitochondrial activity [23]. Thus, 155 μL of DMEM medium was removed from each well and 10 μL of MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added without the presence of light due to its photosensitivity. The plates were incubated for 4 hours, at 37° C in 5% of CO_2 . For dilution, the formazan crystals were added to 100 μL of DMSO (100%). The absorbance was determined on a microplate reader (BioTek) at 575 nm. Cell viability was expressed as a percentage compared to the control groups (Control negative cells without treatment, positive control lysis solution composed of 10mM Tris-HCl pH 7.4; 1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100).

Hemolytic assay

The hemolytic activity with the best associations was performed by using fresh mouse red blood cells (mRBCs) [24]. Mice were housed and used according to guidelines established by the Ethics Committee on Animal Use of the Catholic University of Brasilia (Brasília / DF), registered under the protocol number UCB DOC: 0004/2017, and all efforts were made to minimize animal suffering. The absorbance was measured at 415 nm with a microplate reader (BioTek). Triton X-100 (0.1%) and PBS were used as positive and negative controls, respectively. Candidate associations PNG + SMA and CFT + SMA were tested at their highest associated concentrations ($64 \mu\text{g.mL}^{-1} + 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, for both combinations) and at their two synergistic doses PNG ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + SMA ($0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$); PNG ($0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + SMA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and CFT ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + SMA ($0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$); CFT ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + SMA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Statistical analysis

Data were presented as mean \pm SD for all samples. The data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. GraphPad Prism software v5.0 (GraphPad Software, USA) was used for all statistical analyses.

Results

Antibacterial activity

The antimicrobial activity of CFT, PNG, CAP and SMA antibiotics was determined by the microdilution method for 24 h (Table 2). CFT, PNG, CAP and SMA showed MICs of 256, 32, 34 and $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively, against *S. aureus*. In contrast, the MICs obtained against *K. pneumoniae* for CFT ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CAP ($8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and SMA ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) were lower, with PNG being the only non-active antibiotic against *K. pneumoniae*, growing at high concentrations, $> 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

After analyzing and determining MIC values for each antibiotic, a synergistic test was performed by checkerboard methodology standards. This method is based on the principle of combining drugs in different concentrations

in a 96-well microplate by serially diluting the antibiotics under study from two MICs with a given microorganism. The results of the checkerboard trial, the associations between the antibiotics against the strains of *S. aureus* and *K. pneumoniae*, together with the Σ FIC values, were shown in Table 3. *S. aureus* against the CFT + SMA combination demonstrated two synergistic combinations, CFT ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + SMA ($0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), reducing the MIC value for both drugs eightfold, and CFT ($8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + SMA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) decreasing the MIC 32-fold, and fourfold, respectively. The same behavior was observed in the combination of PNG + SMA antimicrobials at concentrations of PNG ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + SMA ($0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and PNG ($0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + SMA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) with a reduction in MIC of up to 16 and 64 times, respectively.

Although the CFT + SMA and CFT + PNG combinations have synergistic activities, they are above the resistance breakpoint, according to the EUCAST list [25]. Thus, the most promising association against the *S. aureus* strain was PNG + SMA, which also presented the lowest value of IFIC. In order to determine activities between associations of compounds, whether synergistic or antagonistic, it is necessary to know the MIC value of the compounds [26]. It was not possible to determine the activity of the associations of the other drugs with PNG due to the absence of a fixed MIC of PNG against *K. pneumoniae*. When combined, CFT and SMA demonstrated a synergistic combination with CFT of $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and streptomycin at $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Cell viability

In order to determine whether antimicrobial associations have cytotoxic activity *in vitro*, MTT assays were performed [22]. The evaluation of these associations did not present significant cytotoxic activity in any of the associated concentrations when compared to the control for both cells.

According to the data obtained (Figure 1), there was no hemolytic activity for any of the samples tested. These data demonstrate that the combined use of these drugs shows no evidence of cytotoxicity related to hemolysis of human blood cells and may be feasible for pharmacological use [27].

Discussion

Given the context of antimicrobial resistance worldwide, it is necessary to develop therapeutic alternatives to fight these constant bacterial battles. Combinatory therapies have gained attention because of their multiple targeted actions. Currently, the combination of antibiotics has become an important approach in improving the effectiveness of antibacterial therapy and overcoming resistance to an antibacterial agent [28].

This study was carried out to evaluate and establish the potential combinations of conventional antimicrobials against pathogenic bacteria, namely *S. aureus* and *K. pneumoniae*. The isolates tested were unsusceptible to three antimicrobial agents of the four described in the proposal. A high frequency of resistance was found in the classes of β -lactam and chloramphenicol against *K. pneumoniae* KPC+ and *S. aureus* MRSA isolates, when tested alone. Other studies performed by HU *et al.* [15], Harada *et al.* [29] and Zavascki *et al.* [30] found the same resistance profile for these antibiotics. Data from EUCAST antibiograms confirm the information on the resistance profile of the strains obtained in the current research, using the minimum inhibitory concentration (MIC) values of PNG, CFT and CAP drugs presented in the results of Table 1 [28].

To evaluate possible synergistic or antagonistic activity among samples of interest using checkerboard methodology, it is necessary to have their MIC values, since it is from these values that the drugs under study are analyzed and interpreted as synergistic, additive or antagonistic [31-34]. The antimicrobial activity of antibiotics against bacterial pathogens MRSA and KPC + was confirmed in the present study, and mutual activity was observed between the associations, resulting in synergistic effects. No antagonism was observed; however, CAP showed additive results when associated with other antimicrobials (PNG + CAP, CFT + SMA and CAP + SMA). When a combination assumes an additive activity, it is assumed that the drugs have linear dose-effect curves with no intercept in the activity of the other [35].

When the antibiotics were arranged in combinations against *S. aureus* strain MRSA, three distinct combinations showed synergistic effects; these were

CFT + SMA (0.25), CFT + PNG (0.375) and PNG + SMA (0.18). However, the only effective association against MRSA that falls within the susceptibility breaking point is PNG + SMA (Table 2). The same combination with β -lactams and aminoglycoside can be found in similar studies against Gram-positive bacteria. Durack *et al.* [36] ratified the efficiency of the association of PNG + SMA by *in vivo* assays with rabbits infected with *Streptococcus*, where the animals were treated with the drugs alone and in combination. At the end of the combined therapy ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of PNG and $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SMA), it was demonstrated that the bacterial killing rate of the microorganism was faster and more effective than when the drugs were used alone. In agreement with our results, Cates *et al.* [37] reported that patients hospitalized with resistant bacterial endocarditis treated with both PNG and SMA had a shorter and more effective treatment and apparently no bacterial recurrence. The same combination of β -lactam with aminoglycoside was used in the agricultural field by Oplinger *et al.* [38] to combat strains of *Flavobacterium psychrophilum*, using PNG $1.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and SMA $2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

In contrast, only one association was effective against *K. pneumoniae* KPC + strain, which was PNG + SMA (0.18). Other investigations by Portier *et al.* [39] reported a synergistic effect between CFT and other compounds such as aminoglycosides. The phosphorus group and fluoroquinolones showed greater effectiveness against resistant strains of *S. aureus*, mainly cefotaxime with Fosfomicin, at the maximum concentrations for the association of 8 and $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, as a therapeutic resource. But reports from the *Food and Drug Administration* (FDA) on the combinations of compounds with Fosfomicin have provided evidence that these treatments produced higher than expected agranulocytosis, in addition to liver damage, severe cutaneous reactions and pseudomembranous colitis [40].

When a β -lactam is associated with streptomycin, the synergistic activity may be due, in part, to the inhibitory effect of PBPs on the cell wall, forming a deformed and poorly structured wall. A weak wall may be sufficient to make aminoglycoside (streptomycin) absorption easier, and once in the cytoplasm the aminoglycoside interferes with the mRNA reading by inducing an erroneous

synthesis of proteins essential to the microorganism, such as cell membrane constituent proteins. The absence of these proteins may become a precursor for increased uptake of streptomycin. There is evidence where the penicillin increases the permeability in the wall of the microorganisms to the aminoglycosides^[38,41,42]. The activity of penicillin affects the linear absorption of aminoglycosides.

This research, as well as suggesting strategies for bacterial control, is vital in increasing knowledge of the factors that lead to the problem of bacterial resistance in society. It provides a possible alternative in the control of these pathogens, and supports the use of combined therapy, which offers a new alternative in combating resistant bacterial strains. The *in vitro* results in the present study suggest that the best combined therapy for treating *S. aureus* MRSA is the association between PNG and SMA, whereas for treatment of *K. pneumoniae* KPC + the ideal would be the association between CFT and SMA.

To further elucidate the synergistic effect of antibiotics in therapeutic treatments, it is essential that after determining *in vitro* synergistic combinations and Σ FIC values, proving synergistic action, the most favorable combination should be selected to proceed with the evaluation of synergism *in vivo*.

Conflict of interest statement

We have no conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank the University of Brasilia and the Catholic University of Brasilia for providing the infrastructure and resources to conduct the tests; the National Council for Scientific and Technological Development, the Research Support Foundation of the Federal District and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel for providing financial support.

References

¹CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic Resistant threats in the United States, US Department of Health and Human Services, 2013.

²Review on AMR, Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, 2014.

³WHO, Tuberculosis Factsheet, Online, Available at: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>>.

⁴Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, *et al.* Antibiotic resistance – the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases* 2013; **13**: 1057-98.

⁵Smith R, Coast J. The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ* 2013; **346**, f1493.

⁶WHO. List of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available at: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>.

⁷Bradford PA, Bratus S, Urbano C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular E, Qualse J. Surgimento de carbapenem resistentes *Klebsiella* espécies que possuem a classe A carbapenem-hidrólise KPC-2 e inibidor resistente β -lactamases em Nova York. *Clinical Infectious Diseases* 2004; **39**: 55-60.

⁸Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews* 2017; **41**(3): 252-275.

⁹Otter JA, *et al.* Emergence and clonal spread of colistin resistance due to multiple mutational mechanisms in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in London. *Scientific reports* 2017; **7**(1): 12711.

¹⁰Oliveira KS, Queiroz PRM, Fensterseifer ICM, Migliolo L, Oliveira AL, Franco OL. Purified citritin in combination with vancomycin inhibits VRE *in vitro* and *in vivo*. *Microbiology* 2017; **163**(11): 1525-1531.

¹¹WHO, Antimicrobial resistance, 2018. Available at: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>.

¹²Shi CE, *et al.* Synergistic antimicrobial effects of nisin and p-Anisaldehyde on *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *LWT-Food Science and Technology* 2017; **84**: 222-230.

¹³Schneider EK, *et al.* Antibiotic–non-antibiotic combinations for combating extremely drug-resistant Gram-negative ‘superbugs’. *Essays in biochemistry* 2017; **61**(1): 115-125.

¹⁴Barker CI, Germovsek E, Sharland M. What do I need to know about penicillin antibiotics?. *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice* 2017; **102**(1): 44-50.

¹⁵Hu Y, *et al.* *In Vitro* Activity of Neomycin, Streptomycin, Paromomycin and Apramycin against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Clinical Strains. *Frontiers in microbiology* 2017; **8**: 2275.

¹⁶Falagas ME, *et al.* Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013; p. AAC. 01222-13.

¹⁷Shields RK, *et al.* Aminoglycosides for treatment of bacteremia due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2016; p. AAC. 02638-15.

¹⁸Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008; **3**: 163-175.

¹⁹Silva, ON, *et al.* Cn-AMP1: A new promiscuous peptide with potential for microbial infections treatment. *Peptide Science* 2012; **48**: 322–331.

²⁰Bonapace CR, *et al.* Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2002; **44**(4): 363-366.

²¹Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations, In V. *Antibiotics in laboratory medicine* 1996; **4**: 330–396.

- ²²Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 1983; **65**(1-2): 55-63.
- ²³Bignami GS. A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon* 1993; **31**(6): 817-820.
- ²⁴Mandal SM, Migliolo L., Silva, ON, Fensterseifer, IC, Faria-Junior C, Dias SC, Franco OL, *et al.* Controlling resistant bacteria with a novel class of β -lactamase inhibitor peptides: from rational design to *in vivo* analyses. *Scientific reports* 2014; **4**: 6015.
- ²⁵EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. Available at: <<http://www.eucast.org>>.
- ²⁶Chase P, *et al.* An Automated miniaturized method to perform and analyze antimicrobial drug synergy assays. *ASSAY and Drug Development Technologies* 2016.
- ²⁷Dresch RR, *et al.* Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porífera) nativas da costa atlântica do Brasil. *Revista brasileira de farmacognosia* 2005; **15**(1): 16-22.
- ²⁸Tong Y, *et al.* Association of decreased expression of long non-coding RNA LOC285194 with chemoradiotherapy resistance and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of translational medicine* 2014; **12**(1): 233.
- ²⁹Harada D, *et al.* Change in genotype of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) affects the antibiogram of hospital-acquired MRSA. *Journal of infection and chemotherapy* 2018; **24**(7): 563-569.
- ³⁰Zavascki AP, *et al.* Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2018; **90**(2): 134-138.

- ³¹Vasudevan S, *et al.* Synergism Between Quorum Sensing Inhibitors and Antibiotics: Combating the Antibiotic Resistance Crisis. In: Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors. *Springer* 2018: 209-225.
- ³²Orhan G, *et al.* Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of clinical microbiology* 2005; **43**(1): 140-143.
- ³³Doern CD. When does 2 plus 2 equals 5? A review of antimicrobial synergy testing. *Journal of clinical microbiology* 2014; **52**(12): 4124-4128.
- ³⁴Stein C, *et al.* Three-dimensional checkerboard synergy analysis of colistin, meropenem, tigecycline against multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *PLoS One* 2015; **10**(6): e0126479.
- ³⁵Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology research & perspectives* 2015; **3**(3).
- ³⁶Durack DT, Pelletier LL, Petersdorf RG. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis: II. Synergism between penicillin and streptomycin against penicillin-sensitive streptococci. *The Journal of clinical investigation* 1974; **53**(3): 829-833.
- ³⁷Cates JE, Christie E, Ronald V, Garrod LP. Penicillin-resistant Bacterial Endocarditis Treated by Penicillin and Streptomycin. *British Medical Journal* 1951; **1**(4): 653.
- ³⁸Oplinger RW, Wagner EJ, Cavender W. Use of penicillin and streptomycin to reduce spread of bacterial coldwater disease II: efficacy of using antibiotics in diluents and during water hardening. *Journal of aquatic animal health* 2015; **27**(1): 32-37.
- ³⁹Portier H, Kazmierczak A, Lucht F, Tremeaux JC, Chavanet P, Duez JM. Cefotaxime in combination with other antibiotics for the treatment of severe methicillin-resistant staphylococcal infections. *Infection* 1985; **13**(1): 123–8.
- ⁴⁰Iarikov, D, *et al.* Adverse events associated with fosfomycin use: review of the literature and analyses of the FDA adverse event reporting system database. *Infectious diseases and therapy* 2015; **4**(4): 433-458.

⁴¹Winstanley TG, Hastings JG. M. Penicillin-aminoglycoside synergy and postantibiotic effect for enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1989; **23**: 189-99.

⁴²Le T, Bayer AS. Combination antibiotic therapy for infective endocarditis. *Clinical Infectious Diseases* 2003; **36**(5): 615-621.

FIGURE

Figure 1.

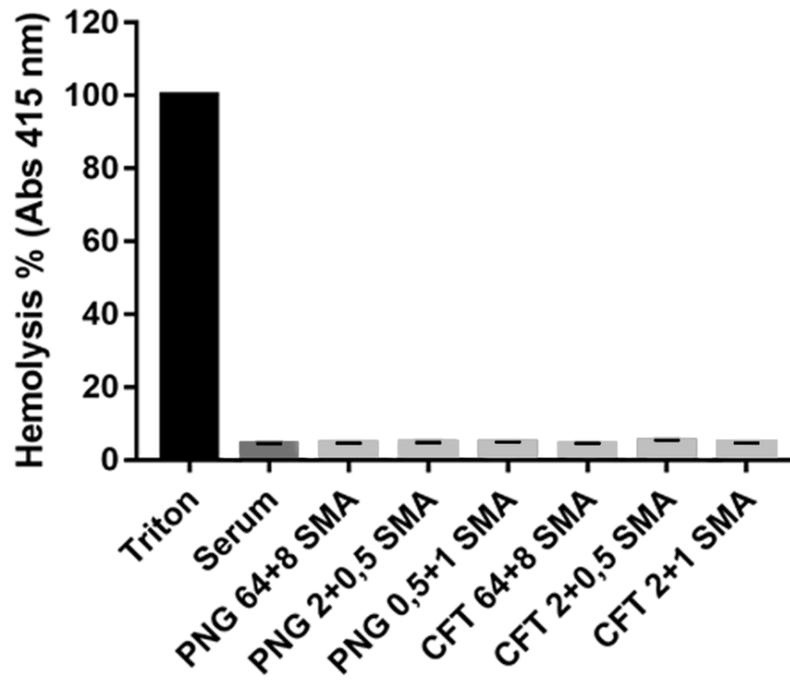


FIGURE LEGEND

Figure 1. Hemolytic activity of the associations between penicillin G, cefotaxime and streptomycin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Evaluation of the hemolytic action among the best synergistic associations against the pathogens under study. In black, the positive control used for hemolysis activity was 0.1% Triton X-100. The dark gray represents the negative control serum. Light gray data represent the associations of antimicrobials tested ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). The combinations were tested at their highest concentrations and at the points that showed synergism.

TABLES

Table 1. Antibacterial activity of penicilin G, cefotaxime and streptomycin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Bacteria was cultured in presence of different antibiotics concentrations described CLSI methodology.

Microorganism	Strains	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
		CFT	PNG	CAP	SMA
<i>S. aureus</i>	3730529	256	32	64	4
<i>K. pneumoniae</i>	3259271	32	>512	8	4

Table 2. Antibacterial activity of standard antibiotic combinations by

Microorganism	Strains	Drug	<u>MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</u>	ΣFIC^*	Effect
---------------	---------	------	---	----------------------	--------

checkerboard method.

			<i>Free</i>	<i>Associate</i>		
<i>K. pneumoniae</i>	3259271	CFT	32	2	0,56	Addition
		CAP	8	4		
		CFT	32	2	0,18	Synergism
		SMA	4	0,5		
		CAP	8	2	0,51	Addition
		SMA	4	1		
		CFT	32	32	-	-
		PNG	>512	>512		
		PNG	>512	>512	-	-
		CAP	8	8		
		PNG	>512	>512	-	-
		SMA	4	4		
<i>S. aureus</i>	3730529	CFT	256	128	1	Addition
		CAP	64	32		
		CFT	256	32	0,25	Synergism
		SMA	4	0,5		
		CFT	256	32	0,37	Synergism
		PNG	32	8		
		PNG	32	16	0,51	Addition
		CAP	64	1		
		PNG	32	2	0,18	Synergism
		SMA	4	0,5		
*ΣFIC – CIM associate/CIM isolated						

Capítulo II

1. INTRODUÇÃO

1.1 Extrapolando os dados *in vitro* de análise combinatória para testes *in vivo*

Bactérias resistentes a múltiplas drogas têm se espalhado rapidamente ameaçando a saúde humana (BOUCHER, 2009; KUROSU; SIRICILLA; MITACHI, 2013). Diferentes estratégias, dentre elas o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, o reavivamento de antibióticos antigos e o uso combinado de agentes antimicrobianos têm sido utilizado para combater ou retardar a resistência bacteriana (BUSH, 2012; CASSIR; ROLAIN; BROUQUI, 2014; XU *et al.*, 2018), considerando que muitos microrganismos são resistentes a um novo agente antimicrobiano logo após serem introduzidos na prática clínica (LUEPKE, 2017). Sendo assim, a terapia combinada ressurgiu como uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por bactérias MDR. No entanto, o número de estudos onde se extrapola os dados *in vitro* para ensaios *in vivo* e uso clínico são limitados.

Tendo em vista o exposto anteriormente, um dos passos para o desenvolvimento de novas terapias se dá pela verificação da atividade das moléculas *in vitro* e *in vivo*, sendo a extrapolação dos dados obtidos em testes *in vitro* para ensaios com animais um dos percalços para a utilização clínica da terapia combinada. Dessa forma, este capítulo tem como objetivo demonstrar como foi realizada a extrapolação dos dados *in vitro* para os ensaios *in vivo*, utilizando camundongos como cobaias, e assim verificar se a combinação dos antimicrobianos que apresentaram atividade sinérgica nos ensaios *in vitro* (PNG + SMA) apresentam um potencial antibacteriano *in vivo* em um modelo de infecção sistêmica causada por *S. aureus* MRSA.

2. METODOLOGIA

2.1 Considerações éticas

Os experimentos utilizando animais foram realizados no laboratório de Bioensaios da Universidade Católica de Brasília, após aprovação dos procedimentos experimentais pelo Comitê de Ética sob o número 004/2017 CEUA/UCB. Foram adotados os Princípios Éticos em Experimentação Animal, recomendados pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA), instituição filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*, e respeitados os preceitos estabelecidos pela Legislação Brasileira de Animais de Experimentação, Lei nº 11.794, de 09 de outubro de 2008.

2.2 Animais

Para realização dos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas com 6 a 8 semanas. Para o experimento de sepse foram utilizados animais adquiridos do biotério central de camundongos da Universidade Católica de Brasília, Campus Águas Claras – UCB/DF. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, alimentação e água disponíveis durante todo o procedimento e os ciclos de claro e escuro de 12 h cada. A troca da maravalha, da água e da comida foram realizadas 2 vezes por semana.

2.3 Modelo de infecção sistêmica

2.3.1 Indução da septicemia e tratamento

O inóculo para os experimentos foi preparado imediatamente antes da inoculação, suspendendo uma colônia devidamente isolada em caldo BHI (*Brain heart infusion*) estéril. Para preparação da cultura do isolado de *S.*

aureus MRSA, as bactérias obtidas foram deixadas sob agitação durante 24 h a 37° C. Após esse período, foi determinada a concentração bacteriana pela leitura da D.O. e todo o conteúdo foi centrifugado a 3800 x g, por 8 min. O sedimento foi ressuspenso em PBS de forma a obter uma concentração de 2×10^9 células a cada 20 μL e a suspensão deixada no gelo até a hora da utilização. O inóculo de todos os animais ($n=5$) foram administrados, por via intraperitoneal, com 100 μL de solução fisiológica com 1×10^9 UFC de *S. aureus*. Após, aproximadamente 1 hora do desafio com bactérias, os animais receberam, intraperitonealmente, o tratamento dos antimicrobianos PNG e SMA nas concentrações de 6000 a 12000 UI.Kg^{-1} e 3.75 a 7.5 mg.Kg^{-1} , respectivamente, dispondo os animais nos seguintes grupos de tratamento: PNG (12000 UI.Kg^{-1}) + SMA (0 mg.mL^{-1}); PNG (6000 UI.Kg^{-1}) + SMA (0 mg.mL^{-1}); PNG (0 UI.Kg^{-1}) + SMA (7.5 mg.mL^{-1}); PNG (0 UI.Kg^{-1}) + SMA (3.75 mg.mL^{-1}); PNG (12000 UI.Kg^{-1}) + SMA (7.5 mg.mL^{-1}); PNG (12000 UI.Kg^{-1}) + SMA (3.75 mg.mL^{-1}); PNG (6000 UI.Kg^{-1}) + SMA (7.5 mg.mL^{-1}); PNG (6000 UI.Kg^{-1}) + SMA (3.75 mg.mL^{-1}). Como controle positivo e negativo foi utilizado gentamicina (10 mg.Kg^{-1}) e PBS, respectivamente.

2.3.2 Eutanásia e coleta

Após o quarto dia de tratamento, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 10% (80 mg.Kg^{-1}) (Agener União – Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg.Kg^{-1}) (Agener União – Brasil), administrados via intraperitoneal seguido de eutanásia por deslocamento da cervical. O peritônio dos camundongos foi lavado com PBS e posteriormente coletado para plaqueamento de recuperação da carga bacteriana.

2.3.3 Análise estatística

Foi utilizado *one-way* ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para a análise da recuperação bacteriana. As análises foram realizadas utilizando o

software Bioestat versão 5.0 e o GraphPad PRISMA® versão 5.0. Os resultados foram considerados significativos, quando $p < 0,05$.

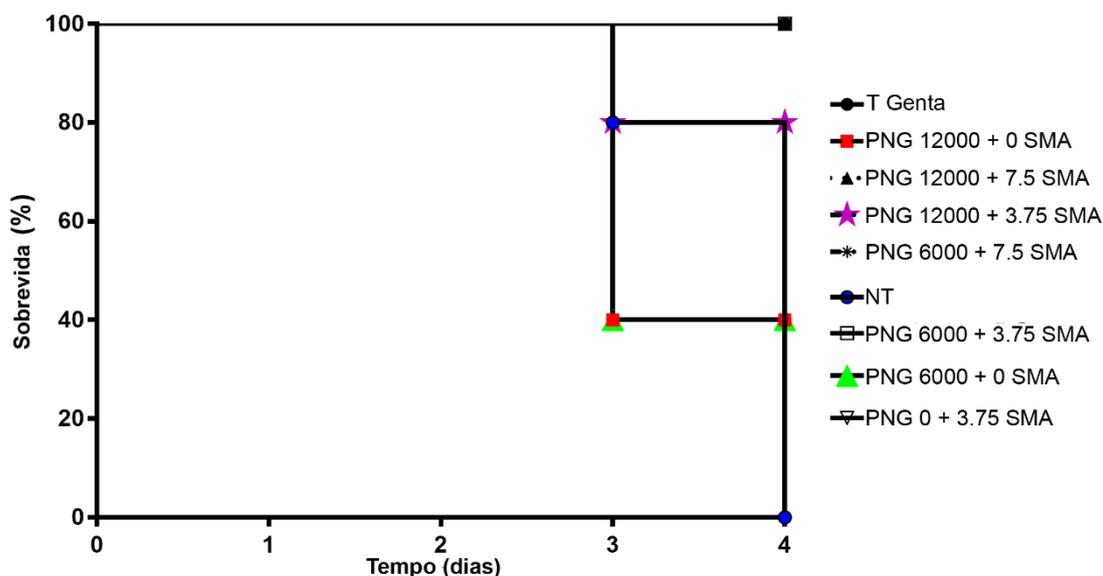
3. RESULTADOS

3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo*

Tendo em vista a atividade antimicrobiana *in vitro* dos fármacos PNG e SMA, os mesmos foram desafiados frente a *S. aureus* MRSA em um modelo de infecção de septicemia *in vivo*. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com 1×10^9 CFU de *S. aureus*. Após 1 h iniciou-se o tratamento 2 vezes ao dia por via intraperitoneal dos antimicrobianos de acordo com o grupo de tratamento por 3 dias. Após o período de tratamento os animais foram eutanasiados e o lavado do peritônio foi plaqueado para recuperação da carga bacteriana.

Durante a experimentação 3 animais que mantinham o tratamento apenas com PNG (12000 e 6000 UI.Kg⁻¹) morreram no terceiro dia juntamente com 1 animal do grupo não tratado e 1 animal tratado com PNG + SMA nas concentrações de 12000 UI e 3.75 mg.Kg⁻¹, respectivamente, tendo sua sobrevivência reduzida para 40% (Figura 10). Os demais grupos observados durante a investigação científica experimental apresentaram uma sobrevivência até o final do experimento com uma redução de carga bacteriana de $\sim 10^8$ para $< 10^3$ (Figura 11).

Figura 12. Atividade antibacteriana *in vivo* de PNG e SMA associados. Os animais foram inoculados com *S. aureus* (1×10^9) seguido por injeções intraperitoneal de PNG (UI.Kg^{-1}) e SMA (mg.mL^{-1}) associados, gentamicina (10 mg.mL^{-1}) ou PBS. Com exceção da gentamicina e do PBS os tratamentos foram administrados 2 vezes ao dia durante 3 dias. Tratamento com a associação de fármacos aumentou o tempo de sobrevida dos animais quando comparado com o controle negativo e o tratamento com a PNG sozinha.



Os camundongos tratados apenas com o controle negativo obtiveram uma carga bacteriana final de $\sim 10^8$. Quando tratados com 12000 UI.Kg^{-1} de PNG + 3.75 mg.Kg^{-1} de SMA e 6000 UI.Kg^{-1} de PNG + 7.5 mg.mL^{-1} de SMA apresentaram uma diminuição da carga bacteriana para $\sim 10^1$ e 10^2 ,

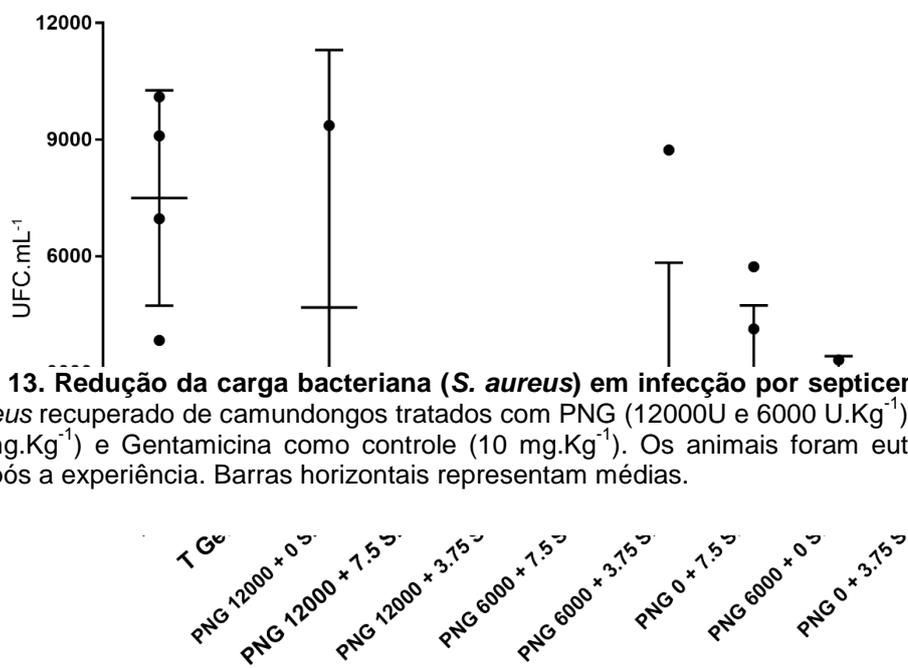


Figura 13. Redução da carga bacteriana (*S. aureus*) em infecção por septicemia. UFC de *S. aureus* recuperado de camundongos tratados com PNG (12000 U e 6000 U.Kg^{-1}), SMA (7.5 e 3.75 mg.Kg^{-1}) e Gentamicina como controle (10 mg.Kg^{-1}). Os animais foram eutanasiados 4 dias após a experiência. Barras horizontais representam médias.

respectivamente. Quando tratados apenas com PNG (6000 UI.Kg⁻¹ e 12000 UI.Kg⁻¹) a carga bacteriana mostrou-se maior do que os outros grupos de tratamento com uma contagem >10³. Contudo, a associação de PNG e SMA em suas maiores doses, 12000 U.Kg⁻¹ + 7.5 mg.Kg⁻¹, foi capaz de eliminar as colônias de *S.aureus*.

4. DISCUSSÃO

Os relatos de resistência aos antimicrobianos vêm aumentando em uma taxa alarmante nas últimas duas décadas. Desse modo, muitos dos medicamentos utilizados atualmente não têm sido eficazes e o tratamento desses quadros clínicos cada vez mais difíceis. Sendo assim, pacientes que apresentam infecções de caráter resistente necessitam de um tempo maior de internação hospitalar, acarretado o uso de antimicrobianos mais caros e mais tóxicos (BLOT, 2007; KRAKER; STEWARDSON; HARBARTH, 2016; LEWIS, 2013; O'NEILL, 2018; ZILBERBERG *et al.*, 2014). A WHO alertou as indústrias farmacêuticas e agências reguladoras sobre a necessidade urgente de novas alternativas para o combate desses patógenos (WHO, 2017).

Tendo em vista a busca por novos tratamentos frente a crescente incidência de infecções por microrganismos resistentes, foi avaliado no presente trabalho a atividade de PNG, CFT, CAP e SMA, sozinhos e em combinação contra cepas de *K. pneumoniae* KPC+ e *S. aureus* MRSA. Dentre os antimicrobianos testados sozinhos, a SMA foi a única que não apresentou um perfil de resistência, inibindo o crescimento de *K. pneumoniae* e MRSA com CIM de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Hu *et al.* (2017) avaliaram o efeito da SMA sobre 62 cepas de *K. pneumoniae* KPC+, onde 98,4% apresentaram sensibilidade a SMA, com CIM variando entre 0,5 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A mesma sensibilidade à SMA foi relatada por Morris *et al.* (2011) em cepas de *K. pneumoniae* KPC+. No trabalho desenvolvido por Noriega *et al.* (1975), os pesquisadores observaram que dentre 17 cepas de *Klebsiella spp.* resistentes a gentamicina, isoladas de pacientes, 70% era sensível a SMA apresentando CIM de 6,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em contraste com a SMA, os microrganismos em estudo mostram-se resistente aos outros antibióticos PNG, CFT e CAP. Naas *et al.* (2008) encontraram um perfil de resistência para CFT com base em testes com 4 cepas de *K. pneumoniae* KPC+, todas elas apresentando CIM $\geq 32 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Um levantamento de estudo realizado por Nordmann e colaboradores (2009), em diversos países com cepas KPC+ de *K. pneumoniae*, apontam que o *range* inicial de resistência desses microrganismos quando desafiados com CFT foi

de $\geq 32 \mu\text{g.mL}^{-1}$, solidificando os dados descritos por Naas, EUCAST e o presente estudo (EUCAST, 2018).

Apesar do CAP ter apresentado um valor de CIM reduzido ($8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), quando comparado com a CFT ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o mesmo encontra-se fora dos parâmetros de sensibilidade quando desafiado contra cepas de *K. pneumoniae* KPC+. Humphries *et al.* (2015) e CLSI M100-S25 (2015), descrevem que cepas de KPC+ devem ser consideradas susceptíveis ao CAP quando a concentração necessária para inibir crescimento bacteriano for de $\leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. No entanto, o valor de CIM encontrado para esse fármaco foi inferior ao observado por Zavascki *et al.* (2018) que, ao avaliarem a atividade do CAP sobre 8 cepas de *K. pneumoniae* KPC+ isoladas de pacientes neutropênicos, evidenciaram que todas elas apresentam uma variação de CIM entre 16 e $>256 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em outro estudo, Livermore *et al.* (2011) também evidencia a resistência de CAP por *K. pneumoniae* KPC+, onde das 52 cepas avaliadas na pesquisa, 43 (83%) apresentaram aspecto resistente ao CAP, CIM $\geq 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A mesma capacidade de resistência ao CAP foi descrita em cepas de MRSA. Silvester *et al.* (2016) demonstram que ao longo de um período de 12 anos (2001 e 2012), a resistência ao CAP por MRSA, presente em quadros de conjuntivite, se manteve estável. Porém tal estabilidade não diminui a preocupação da resistência referente ao CAP, uma vez que uma pesquisa realizada por Zuo *et al.* (2016) detectaram 100% de resistência em todas as cepas de MRSA testadas (n=10) contra o mesmo antimicrobiano, exibindo CIM $> 32 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Estudos de Chan *et al.* (2017) apresentam as mesmas concentrações de CIM para CAP que o presente estudo frente isolados clínicos de MRSA ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$), uma que os valores de *breakpoint* para CAP da EUCAST e do CLSI consideram patógenos susceptíveis aqueles que são inibidos em concentrações $\leq 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CLSI, 2015; EUCAST, 2018).

Durante o desenvolvimento do estudo, ficou explícito a alta resistência de *K. pneumoniae* frente a PNG ($> 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A resistência desse patógeno aos β -lactâmicos, são observados desde o final da década de 1940 (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). Um estudo epidemiológico realizado por Stachyra *et al.* (2009) com 3 cepas de *K. pneumoniae* KCP+, demonstrou valores significativos de

concentração de penicilinas, como amoxicilina e piperacilina, contra o microrganismo reportado, sendo o CIM de ambos os fármacos $\geq 2.048 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Apesar do presente estudo apresentar um CIM 4x menor que a pesquisa evidenciada por Stachyra, o mesmo corrobora com o perfil de resistência de KPC+ quando desafiadas com penicilinas. Sendo a concentração de PNG $> 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ante *K. pneumoniae* KPC+, uma dose elevada que inviabiliza o extrapolação para o uso terapêutico do medicamento, o mesmo foi descontinuado na realização de ensaios posteriores. Papp-Wallace *et al.* (2010) reportaram uma alta concentração de ampicilina, CIM de $8192 \mu\text{g.mL}^{-1}$, quando testadas contra *K. pneumoniae* KPC+.

A alta taxa de resistência de KPC+ as penicilinas também vêm sendo observada em *S. aureus* MRSA. Hu *et al.* (2001) relataram que 93% das cepas de MRSA testadas (n=28) contra oxacilina, antibiótico pertencente ao grupo das penicilinas, apresentaram um CIM variante entre 256 a $1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em contra partida, Yu *et al.* (2005) encontraram valores de CIM inferiores ao desafiar a ampicilina contra 13 linhagens de *S. aureus* MRSA, onde 85% das cepas foram resistentes a ampicilina com concentrações entre 32 a $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Apesar da oxacilina e da ampicilina serem pertencentes ao mesmo grupo de antibióticos (penicilinas), e da variação entre seus valores de CIM relatados, todas elas encontram-se fora do *breakpoint* de susceptibilidade para cepas MRSA ($< 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), incluindo o atual trabalho, cujo CIM da PNG ante isolado clínico de MRSA foi de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (EUCAST, 2018).

Collins e colaboradores (1983) relataram uma variação de CIM, entre 2 e $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de CFT frente as 70 cepas de MRSA testadas. Dois anos após os estudos de Collins, Goldstein e Citron (1985), ao realizarem novos ensaios de CFT contra estirpes de *S. aureus* MRSA, constataram uma concentração de CIM de $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo CIM₉₀ $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em um trabalho realizado por Harada *et al.* (2018), mediante uma experimentação com 182 cepas MRSA durante 6 anos, apresentaram valores de CIM para CFT entre 64 a $\geq 256 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As concentrações de CIM para CFT relatadas nos achados literários mencionados acima, corroboram com valores encontrado neste estudo ($256 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

A necessidade de altas concentrações para o tratamento desses microrganismos e a constante evidência da eminente resistência aos antimicrobianos, desestimula cada vez mais o uso de monoterapias como recurso terapêutico dessas infecções. Devido as limitações no tratamento de infecções causados por esses patógenos, a estratégia em questão do atual trabalho consistiu em avaliar o uso combinado de antimicrobianos.

Ao avaliarmos as combinações propostas (PNG + SMA, PNG + CFT, PNG + CAP, CFT + SMA, CFT + CAP e CAP + SMA), a PNG associada com a SMA ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PNG + $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ SMA) mostrou melhor atividade antibacteriana e sinérgica contra *S. aureus* do que todas as demais amostras combinadas. Em contrapartida, o uso da CFT juntamente com SMA ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CFT + $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ SMA) resultou em uma interação de sinergia frente a cepa de *K. pneumoniae*. O sinergismo entre aminoglicosídeos e β -lactâmicos já haviam sido reportados anteriormente. Wolfe e Johnson (1974) relatam a atividade bactericida, *in vitro* e na clínica, contra isolados de *S. viridans* proveniente da associação entre penicilina e estreptomicina, além da efetividade da combinação houve redução da concentração dos fármacos de 1,6 para $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina e de 200 para $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da estreptomicina (WOLFE; JOHNSON, 1974).

Apesar de ser possível observar outras interações sinérgicas contra *S. aureus*, nenhuma das demais tiveram uma redução significativa da concentração inibitória bem como baixo valor de ICIF. Jawetz e colaboradores, Durack *et al.* e Oplinger e colaboradores evidenciaram em seus estudos que esta mesma combinação, PNG + SMA, foi sinérgica para alguns isolados (DURACK; PELLETIER; PETERSDORF, 1974; JAWETZ, 1950; OPLINGER; WAGNER; CAVENDER, 2015). Jawetz *et al.* (1950) avaliaram, *in vitro*, o potencial de associações entre PNG, SMA e CAP frente nove cepas de enterococos, ao manter as concentrações constantes dos antimicrobianos testados sozinhos e em associação a combinação entre PNG e SMA foi a única capaz de eliminar completamente todas as colônias, com CIF de $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para PNG e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de SMA.

Oplinger *et al.* (2015), por sua vez mostram que PNG + SMA foram altamente eficaz, no âmbito agropecuário, contra cepas de *Flavobacterium*

psychrophilum. Durante o tratamento com PNG e SMA, sozinhos e em combinação, Oplinger *et al.* (2015) evidenciam a capacidade de esterilização completa de *F. psychrophilum* por meio da associação proposta, tendo ainda uma queda nos valores de CIM da PNG ($>6,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ para $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$) e da SMA ($>5000 \text{ mg.mL}^{-1}$ para $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$). Durack e colaboradores (1947) ratificam a eficiência da associação desses fármacos mediante ensaios *in vivo* cujos os quais foram infectados com estreptococos e tratados com os medicamentos sozinhos e em combinação, ao final a terapia combinada ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de PNG e $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ SMA) comprovou que a taxa de morte bacteriana do microrganismo foi mais rápida e eficaz do que os fármacos sozinhos. *In vitro* o tempo necessário para eliminação do patógeno reduziu de 9h para 6h e *in vivo*, seguido um período de 30h após a injeção dos fármacos, foi constatado a erradicação das colônias, enquanto os fármacos sozinhos não obtiveram mesma eficiência.

Corroborando com a sinergia *in vitro* entre β -lactâmicos e aminoglicosídeos, estudos anteriores sobre quadros clínicos de endocardite tratados pela combinação de penicilina e SMA foram relatados em 1950. Em um dos casos, um paciente admitido no hospital com gripe, posteriormente confirmado como endocardite bacteriana por *S. viridans*, recebeu doses monoterápicas de penicilina maiores do que habituais (165,6 milhões UI), devido um erro de prescrição médica, porém dentro de 48h a hemocultura acusava um forte crescimento da bactéria com resistência ao β -lactâmico em uso. Na tentativa de controlar a infecção, a SMA foi dosada e administrada juntamente com a penicilina durante 12 semanas tendo um resultado satisfatório, uma vez que após 20 dias o paciente começou a se recuperar e não apresentou danos labirínticos proveniente da SMA (CATES; CHRISTIE; GARROD, 1951).

Outros casos clínicos também foram referidos quanto ao sucesso da associação entre SMA e penicilina, porém com um tratamento de período menor e maiores doses. Apesar da efetividade da combinação em eliminar o patógeno o paciente sofreu danos no labirinto, provavelmente essa complicação pode ser evitada por meio de doses menores de SMA e um tratamento mais prolongado (CATES; CHRISTIE; GARROD, 1951).

Hunter (1947) descreveu que tratamentos que necessitem de concentrações $> 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, *in vitro*, de SMA não tendem a ser bem sucedidos e que somente a SMA, por casualmente ter atividade frente microrganismos resistentes a penicilina, poderia ter um impacto maior nas infecções. Contudo, estudos realizados posteriormente refutaram esse conceito. Naegele (1949) e Cates *et al.* (1951) demonstraram que um tratamento bem sucedido frente cepas de *S. viridans* e *E. faecalis* só pode ser tornar efetivo quando concentrações de SMA, a $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, foram administradas.

No estudo realizado por Cates *et al.* descrito anteriormente, a inibição do crescimento bacteriano só foi possível a partir da associação com 2g de SMA e 12.000.000 UI de penicilina, por tanto a efetividade do tratamento dificilmente pode ser atribuída apenas à SMA, uma vez que o mesmo medicamento testado sozinho, não foi capaz de conter os microrganismos, reforçando ainda mais a importância da terapia combinatória (CATES *et al.*, 1951). A mesma combinação também foi descrita por Almquist *et al.* (1949) em estudos com animais. A junção do β -lactâmico e do aminoglicosídeo demonstrou atividade significativa no controle bacteriano presente em sêmen bovino sem alterar a motilidade e viabilidade dos espermatozóide mesmo tendo testado em concentrações elevadas de 1000UI.mL^{-1} de cada fármaco.

No presente trabalho, mostramos que a inibição do crescimento de *K. pneumoniae* KPC +, foi possível quando associado CFT e SMA ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CFT + $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ SMA), resultando em concentrações de CIM clinicamente alcançável por dosagem convencional. A atividade sinérgica proveniente da combinação da CFT, assim como no presente estudo, com outros antimicrobianos foi evidenciada em outros trabalhos, como por exemplo Mainardi e colaboradores (1995), que relataram uma redução no *range* de CFT, entre 8 e $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para $0,5$ a $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$, quando associada com $0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de amoxicilina, frente a cepas de *E. faecalis*. Estudos de Hasan (2013) apresentaram resultados sinérgicos similares, porém a cefalosporina utilizada durante a pesquisa em associação com a estreptomicina, frente cepas Gram-negativas, foi a cefoxitina.

Portier e colaboradores (1985) desenvolveram um trabalho com cefalosporinas associadas a aminoglicosídeos (vancomicina, amicacina e netilmicina) e moléculas fosforadas em tratamentos terapêuticos. Uma maior efetividade contra cepas de *S. aureus* MDR foi evidenciada quando uma combinação entre cefoperazona e amicacina ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ambos os fármacos) e cefotaxima com fosfomicina, nas concentrações máximas para associação de 8 e $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, foram administradas como recurso terapêutico. Porém uma das grandes vertentes do uso da cefoperazona vem sendo a capacidade da mesma induzir possível hemorragias gastrointestinal (KATUKURI *et al.*, 2016). Outros estudos como Klein (1947) e Michel (1977) também evidenciaram uma atividade sinérgica positiva frente cepas de estafilococos proveniente da associação de β -lactâmicos (penicilina) com antibióticos como cloranfenicol, aminoglicosídeos e sulfadiazina. Porém foi observado no presente estudo, por meio da associação entre cloranfenicol e penicilina, uma atividade aditiva cujo efeito inibitório dos fármacos sozinhos não se altera ou potencializa quando associados. Este resultado obtido entra em discordância com o estudo realizado por Michel e colaboradores do qual a mesma combinação apresentou um potencial sinérgico contra *S. aureus*.

Contudo, relatos da FDA sobre associações de compostos com a fosfomicina, evidência que a mesma produziu agranulocitose maior que a frequência esperada quando utilizada, além de lesões hepáticas, reações cutâneas graves e colite pseudomembranosa (IARIKOV *et al.*, 2015). Estudos sobre mecanismo de resistência à fosfomicina contribuem para seu desuso (TRUONG-BOLDUC; WANG; HOOPER, 2018).

Ensaio *in vitro* são úteis e imprescindíveis na identificação de interações entre compostos, consolidando a atividade dos fármacos utilizados em combinação. Tais experimentações *in vitro* permitem a extrapolação dessas descobertas para situações *in vivo*. Porém previsões quantitativas precisas na correlação de *in vitro-in vivo* são difíceis de serem estabelecidas (WAHLSTROM; WIENKERS, 2018).

Na tentativa de avaliar o potencial *in vivo* da associação entre PNG + SMA ante cepa de *S. aureus* MRSA do presente estudo, foi realizado ensaios

em animais de modelo murino Balb/C. Devido a dificuldade de extrapolar as concentrações *in vitro* para *in vivo*, principalmente relacionados a sua administração mútua, as concentrações utilizadas foram baseadas na dosagem utilizada na clínica. O tratamento combinado com PNG e SMA, PNG 12000 U.Kg⁻¹ + SMA 3,5 mg.Kg⁻¹ e PNG 6000 U.Kg⁻¹ + SMA 3,5 mg.Kg⁻¹, proporcionou redução nas cargas bacterianas de aproximadamente 10⁸ para 10¹ e 10², respectivamente, de *S. aureus*.

Uma metodologia similar, em uma experimentação combinatória *in vivo*, foi realizada por Otvos *et al* (2018), onde peptídeos ricos em prolinas associados a antibióticos apresentam uma atividade sinérgica promissora *in vitro* e *in vivo* frente *Acinetobacter baumannii*. A estratégia utilizada *in vivo*, no estudo mencionado, se deu por meio da variação da concentração do peptídeo em sua dose máxima e sua dose reduzida pela metade, cuja combinação mais efetiva foi o peptídeo em metade da sua dose máxima com o antibiótico (OTVOS *et al.*, 2018).

Os critérios utilizados em estudos na relação entre *in vitro* e *in vivo* ainda se encontram equidistantes sobre o entendimento de preditores dos efeitos *in vivo*, uma vez que condições como stress bem como células em sua atividade funcional dentro de um organismo complexo, não podem ser aplicadas em uma metodologia *in vitro*.

Apesar do crescente interesse científico pela metodologia de terapias combinatórias no combate de cepas bacterianas, como associação de peptídeos e antimicrobianos), o número de trabalhos que promovem um padrão para associação de drogas para modelos *in vivo* são escassos (OTVOS *et al.*, 2018; PLETZER; MANSOUR; HANCOCK, 2018). Como consequência, estudos que visam essa vertente experimental desenvolvem suas pesquisas com poucos fundamentos literários.

Bruhn *et al.* (2015) apontam as dificuldades de estabelecer uma relação da atividade combinatória, *in vitro-in vivo*, de espetinamidas associadas a antibióticos não usuais contra *Mycobacterium tuberculosis* em um modelo murino. Outros estudos como Stenger *et al.* (2017) não conseguiram reproduzir a atividade sinérgica, entre tioridazina e dicloxacilina, obtida *in vitro* em um modelo animal contra cepa de *S. aureus*. Estes trabalhos

corroboram e destacam os desafios de transferir uma combinação sinérgica *in vitro* para um modelo *in vivo* devido diferentes perfis farmacocinéticos e esquemas de dosagem em um organismo complexo.

Um estudo recente realizado por Pletzer *et al* (2018), evidenciou uma atividade sinérgica *in vitro* entre antibióticos e peptídeos anti-biofilmes frente cepas ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*). Apesar do estudo em questão ter apresentado uma boa atividade *in vivo*, proveniente da associação, o mesmo evidenciou que os testes de sensibilidade *in vitro* subestimam criticamente o impacto na suscetibilidade de bactérias aos antimicrobianos *in vivo*.

Assim, metodologias *in vitro*, como MIC, são indicadores úteis sobre o potencial de um determinado composto, porém nem sempre são preditivos da sua eficácia *in vivo*, principalmente em quadros de resistência bacteriana (PLETZER; MANSOUR; HANCOCK, 2018). Dessa forma, continua a ser um grande desafio traduzir a efetividade dos resultados *in vitro* para *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram utilizados os antimicrobianos PNG, CAP, CFT e SMA, com o objetivo de avaliar sua atividade isolada e em combinação *in vitro* e *in vivo* frente cepas de *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Os dados apresentados no decorrer do trabalho possibilitaram observar que as cepas testadas contra os antimicrobianos, sozinhos, em questão corroboram com o perfil de resistência relatado na literatura. E a SMA, por sua vez, foi o único composto cujo os microrganismos (KPC+ e MRSA) não apresentaram resistência frente ao fármaco, provavelmente devido a redução na frequência de uso da SMA na prática clínica.

Dentre as seis combinações entre os antimicrobianos propostos no estudo, evidenciou-se que a associação de PNG e SMA foi a que demonstrou um potencial de atividade antimicrobiana sinérgico com menor valor de IFIC (0,18), dentre as demais, obtido frente *S. aureus* MRSA. A mesma combinação também evidenciou um potencial favorável no tratamento *in vivo* de modelo murino ante infecção sistêmica por MRSA por meio da análise da curva de sobrevivência e a contagem da carga bacteriana realizada.

Os resultados encontrados com a fração de CFT e SMA, administradas em conjunto, fornecem perspectivas encorajadoras sobre o potencial efeito sinérgico antibacteriano em bactéria Gram-negativa. Esta combinação foi capaz de inibir colônias de *K. pneumoniae* KPC+ com uma concentração inibitória fracional potencialmente positiva, frente as demais associações, com um baixo valor de ICIF (0,18). É importante ressaltar que nenhuma das associações destaque, PNG + SMA e CFT + SMA, apresentaram capacidade de hemólise e de alterar a atividade metabólica das células RAW e Vero, medidas pela método de MTT. Viabilizando dessa forma testes posteriores *in vivo*. Com base nos resultados obtidos, a terapia combinatória, proveniente da associação de PNG e CFT juntamente com a SMA, pode constituir uma alternativa terapêutica eficaz de tratamento frente patógenos resistentes, reduzindo as doses administradas e potencializando os compostos em questão.

6. REFERÊNCIAS

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037–1050, 2007.

ALMAAYTAH, A. et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of UP-5, an ultrashort antimicrobial peptide designed using only arginine and biphenylalanine. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2018.

ALMQUIST, J. O.; GLANTZ, P. J.; SHAFFERS, H. E. The Effect of a Combination of Penicillin and Streptomycin upon the Livability and Bacterial Content of Bovine Semen. **Journal of Dairy Science**, v. 32, n. 2, p. 183–190, 1949.

ANDREI, S. et al. New FDA approved antibacterial drugs: 2015-2017. **Discoveries**, v. 6, n. 1, p. e81, 2018.

ANVISA, A. N. DE V. S.-. Comunicado de risco no. 01/2016 – GVIMS/GGTES/ANVISA. Detecção do gene responsável pela resistência à polimixina mediada por plasmídeos (mcr1) no Brasil. 2016.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Antimicrobianos - Bases Teóricas e Uso Clínico**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/pas_web/modulo1/cloranfenicol4.htm>.

ANVISA, A. N. DE V. S. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. 2017.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 5, p. 439–443, 2009.

ATIF, M. et al. Investigation of antimicrobial use at a tertiary care hospital in Southern Punjab, Pakistan using WHO methodology. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 1, 2017.

AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos**. [s.l: s.n.].

BAGLEYT, S. T.; SEIDLER, R. J. Primary Klebsiella Identification with MacConkey-Inositol- Carbenicillin Agart. **Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 536–538, 1978.

BAKER, M. J.; SCHLOSSER, M. E.; WHITE, H. J. A METHOD FOR EVALUATING ANTITUBERCULAR ACTIVITY IN MICE. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 52, n. 5, p. 678–691, dez. 1949.

BALSALOBRE, L. C.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H. An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. **Brazilian journal of**

microbiology: [publication of the **Brazilian Society for Microbiology**], v. 45, n. 1, p. 1–5, 2014.

BAPTISTA, M. G. D. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. **Dissertação de Mestrado, Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde**, p. 51, 2013.

BARBER, M.; ROZWADOWSKA-DOWZENKO, M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. **The Lancet**, v. 252, n. 6530, p. 641–644, 1948.

BARKER, C. I.; GERMOVSEK, E.; SHARLAND, M. What do I need to know about penicillin antibiotics? **Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition**, v. 102, n. 1, p. 44–50, 2017.

BARNHILL, A. E. et al. Identification of multiresistant salmonella isolates capable of subsisting on antibiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2678–2680, 2010.

BARRIERE, S. L. Clinical , economic and societal impact of antibiotic resistance. p. 1–3, 2015.

BARROS, L. L. DOS S.; MAIA, C. DO S. F.; MONTEIRO, M. C. Fatores de risco associados ao agravamento de sepse em pacientes em Unidade de Terapia Intensiva. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, n. 4, p. 388–396, 2016.

BARRY, A. L. ET AL. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline. **NCCLS document M26-A**, v. 19, n. 18, 1999.

BARTLETT, J. G.; GILBERT, D. N.; SPELLBERG, B. Seven ways to preserve the Miracle of antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 10, p. 1445–1450, 2013.

BASSETTI, M. et al. Clinical and pharmacokinetic drug evaluation of delafloxacin for the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 11, p. 1193–1200, 2017.

BATISTA, T. F.; RODRIGUES, M. C. S. Vigilância de infecção de sítio cirúrgico pós-alta hospitalar em hospital de ensino do Distrito Federal, Brasil: estudo descritivo retrospectivo no período 2005-2010. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 2, p. 253–264, 2012.

BELLIO, P. et al. Cerium oxide nanoparticles as potential antibiotic adjuvant. Effects of CeO₂ nanoparticles on bacterial outer membrane permeability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, n. July, p. 0–1, 2018.

BLANCHARD, A. C.; QUACH, C.; AUTMIZGUINE, J. Staphylococcal infections in infants: Updates and current challenges. **Clinics in Perinatology**, v. 42, n. 1, p. 119–132, 2015.

BLOT, S. Limiting the attributable mortality of nosocomial infection and multidrug resistance in intensive care units. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 5–13, 2007.

BOGAERTS, P. ET AL. Evaluation of the BYG Carba test, a new electrochemical assay for rapid laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 2, p. 349–358, 2016.

BOUCHER, H. W. ET AL. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2009.

BOYLE, F. et al. Inter-hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 carbapenemase in Ireland. 2012.

BRASIL, M. S. L. ET AL. Atividade antimicrobiana da combinação de nanopartículas de prata, quitosana e antibióticos avaliada por ensaios de concentração inibitória mínima e espectroscopia SERS. 2017.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336–343, 2016.

BRUHN, D. F. et al. In vitro and in vivo evaluation of synergism between anti-tubercular spectinamides and non-classical tuberculosis antibiotics. **Scientific Reports**, v. 5, n. August, p. 1–10, 2015.

BUSH, K. et al. Anti-MRSA β -lactams in development, with a focus on ceftobiprole: the first anti-MRSA β -lactam to demonstrate clinical efficacy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, n. 4, p. 419–429, 2007.

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894–896, 2011.

BUSH, K. Improving known classes of antibiotics: An optimistic approach for the future. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 5, p. 527–534, 2012.

CANTÓN, R.; MOROSINI, M. I. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 977–991, 2011.

CARDINAL, L. DOS S. M. et al. Caracterização das prescrições medicamentosas em unidade de terapia intensiva adulto. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 2, p. 151–156, 2012.

CARTER, A. P. et al. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics [see comments]. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 340–348, 2000.

CARVALHO, M. A. N. DE. UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR

DE Staphylococcus aureus ISOLADO EM MANAUS-AMAZONAS MARIA AUXILIADORA NEVES DE CARVALHO MANAUS 2016. p. 1–142, 2016.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 70–76, 2005.

CASSIR, N.; ROLAIN, J. M.; BROUQUI, P. A new strategy to fight antimicrobial resistance: The revival of old antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. OCT, p. 1–16, 2014.

CASTRO, M. S. DE et al. Tendências na utilização de antimicrobianos em um hospital universitário , 1990-1996 Trends in antimicrobial utilization in a university hospital , 1990-1996. **Methods**, v. 36, n. 5, p. 553–558, 2002.

CATES, J.; CHRISTIE, R.; GARROD, L. Penicillin-resistant Bacterial Endocarditis Treated by Penicillin and Streptomycin. **British Medical Journal**, v. 1, n. 4708, p. 656–656, 1951.

CDC, C. FOR D. C. AND P.-. **Antibiotic resistance threats in the United States**.

CHAN, E. W. L. et al. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, n. 2010, p. 70–74, 2017.

CHAUDHRY, W. N. et al. Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing pseudomonas aeruginosa biofilms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2017.

CLSI, C. AND L. S. I.-. M100-S25. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. 2015.

COLLINS, JAMES K.; MADER, JON T.; KELLY, M. T. Resistance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to third-generation cephalosporins. **Journal of Infectious Diseases**, v. 147, n. 3, p. 591–591, 1983.

CONGREVE, M.; MARSHALL, F. The impact of GPCR structures on pharmacology and structure-based drug design. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 5, p. 986–996, 2010.

CUMMINGS, E. D. ET AL. Baby, Gray Syndrome. 2017.

DANTAS, G. et al. Bacteria subsisting on antibiotics. **Science**, v. 320, n. 5872, p. 100–103, 2008.

DAVIS, M. et al. Understanding media publics and the antimicrobial resistance crisis. **Global Public Health**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2017.

DIENSTMANN, R. ET AL. carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23–27, 2010.

DOERN, C. D. When does 2+ 2= 5?: a review of antimicrobial synergy testing. **Journal of clinical microbiology**, 2014.

DRAGO, L. et al. In vitro evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, p. 1–7, 2007.

DU, D.; KAN, X. W.-; NEUBERGER, A. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, 2018.

DURACK, D. T.; PELLETIER, L. L.; PETERSDORF, R. G. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. II. Synergism between penicillin and streptomycin against penicillin sensitive streptococci. **Journal of Clinical Investigation**, v. 53, n. 3, p. 829–833, 1974.

DURANTE-MANGONI, E. et al. Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 3, p. 201–205, 2009.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

EDSON, R. S.; TERRELL, C. L. The Aminoglycosides. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 5, p. 519–528, 1999.

EJIM, L. et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 6, p. 348–350, 2011.

EUCAST, T. E. C. ON A. S. T.-. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0**. Disponível em: <<http://www.eucast.org>>.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Perspectives in Medicinal Chemistry Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in medicinal chemistry**, v. 6, p. 25–64, 2014.

FANTIN, B.; CARBON, C. In vivo antibiotic synergism: Contribution of animal models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 5, p. 907–912, 1992.

FDA, F. AND D. A.-. **2018 FDA Approved Drugs**. Disponível em: <<https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/>>.

FDA, F. AND D. A. **Ozenoxacin. FDA Highlights of prescribing information**.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B.influenzae*. **British journal of**

experimental pathology, v. 10, n. 1923, p. 226–236, 1929.

FREEMAN, J. T. et al. Differences in risk-factor profiles between patients with ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: A multicentre case-case comparison study. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2014.

FREITAS, J. S. et al. Qualidade dos cuidados de enfermagem e satisfação do paciente atendido em um hospital de ensino. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 454–460, 2014.

GAYNES, R. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849–853, 2017.

GIANI, T. ET AL. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 carbapenemase. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3793–3794, 2009.

GIRARDELLO, R.; GALES, A. C. Resistência às Polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas Polymyxins resistance: old antimicrobials, last therapeutic options. **Rev Epidemiol Control Infect**, v. 2, n. 2, p. 66–69, 2012.

GOLDSTEIN, E. J. C.; CITRON, D. M. Comparative in vitro inhibitory and killing activity of ceftazidime, ceftazidime, and cefotaxime against *Pseudomonas aeruginosa*, enterococci, *Staphylococcus epidermidis*, and methicillin-susceptible and -resistant and tolerant and nontolerant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 1, p. 160–162, 1985.

GOLKAR, Z.; BAGASRA, O.; GENE PACE, D. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 2, p. 129–136, 2014.

GOMES, G.; TAVARES, R. UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA AUREUS EM CRIANÇAS DE UM HOSPITAL Ficha Catalográfica. 2012.

GOODMAN, L. S. ET AL. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. [s.l: s.n.].

GOULD, I. M.; BAL, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 185–191, 2013.

GOULD, K. Antibiotics: From prehistory to the present day. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, p. 572–575, 2016.

GRIFFITH, D. E. Therapy of nontuberculous mycobacterial disease. **Curr.Opin.Infect.Dis.**, v. 20, n. 0951–7375 (Print), p. 198–203, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUNN, J. S. et al. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 1171–1182, 1998.

HAMMETT-STABLER, C. A.; JOHNS, T. Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs. National Academy of Clinical Biochemistry. **Clin.Chem.**, v. 44, n. 0009–9147 (Print), p. 1129–1140, 1998.

HARADA, D. et al. Change in genotype of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) affects the antibiogram of hospital-acquired MRSA. **Journal of Infection and Chemotherapy**, p. 1–7, 2018.

HARRIS, P. N. Clinical management of infections caused by Enterobacteriaceae that express extended-spectrum beta-lactamase and AmpC enzymes. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 36, n. 1, p. 56–73, 2015.

HINCHLIFFE, P. et al. Insights into the Mechanistic Basis of Plasmid-Mediated Colistin Resistance from Crystal Structures of the Catalytic Domain of MCR-1. **Scientific Reports**, v. 7, n. September 2016, p. 1–10, 2017.

HOLMAN, D. B. et al. Injectable antimicrobials in commercial feedlot cattle and their effect on the nasopharyngeal microbiota and antimicrobial resistance. **Veterinary Microbiology**, v. 214, n. November 2017, p. 140–147, 2018.

HOLT, K. E. et al. Genomic analysis of diversity , population structure , virulence , and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* , an urgent threat to public health. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 27, p. E3574–E3581, 2015.

HU, Y. et al. In vitro activity of neomycin, streptomycin, paromomycin and apramycin against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae clinical strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, p. 1–7, 2017.

HU, Z. et al. Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 361–364, 2001.

HUMPHRIES, R. M. et al. First report of ceftazidime-avibactam resistance in a KPC-3-expressing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6605–6607, 2015.

IARIKOV, D. et al. Adverse Events Associated with Fosfomycin Use: Review of the Literature and Analyses of the FDA Adverse Event Reporting System Database. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 4, n. 4, p. 433–458, 2015.

ILAS. **Relatório Nacional Protocolos gerenciados de sepse e choque séptico.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/relatorio-nacional/relatorio-nacional-final.pdf>>.

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; NWOKE, V. In vitro evaluation of

antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 9, p. 666–669, 2009.

JAWETZ, J. B. G. AND V. R. C. The Combined Action of Penicillin with Streptomycin or Chloromycetin on Enterococci in vitro. **American Association for the Advancement of Science**, v. 111, n. 2880, p. 254–256, 1950.

JUNIOR, W. F. DA S. **Cefotaxima sódica Cetazima**.

JW, B. A review of the rationale and advantages of various mixtures of benzathine penicillin G. **Pediatrics**, v. 97, n. supplement, p. 960–963, 1996.

KANERVA, M. ET AL. Coincidental detection of the first outbreak of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* colonisation in a primary care hospital, Finland, 2013. **Eurosurveillance**, 2015.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300, 2017.

KASTEN, M. J. Clindamycin, Metronidazole, and Chloramphenicol. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, p. 825–833, 1999.

KATUKURI, G. R. et al. Cefoperazone induced gastrointestinal bleeding. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 8, p. OD10-OD11, 2016.

KEHRENBURG, C. et al. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: Methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1064–1073, 2005.

KEYNAN, Y.; RUBINSTEIN, E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 5, p. 385–389, 2007.

KINGSTON, W. Streptomycin, Schatz v. Waksman, and the balance of credit for discovery. **Journal of the history of medicine and allied sciences**, v. 59, n. 3, p. 441–462, 2004.

KIRVESKARI, J.; HAKANEN, A. J.; MONICA, O. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008 – 11). 2012.

KONEMAN, ELMER W.; ALLEN, S. **Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas**. [s.l: s.n.].

KRAKER, M. E. A.; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? **PLoS Medicine**, v. 13, n. 11, p. 1–6, 2016.

KROGSTAD, D. J. Antimicrobial combinations. In: **Antibiotics in laboratory medicine**. [s.l: s.n.].

KUROSU, M.; SIRICILLA, S.; MITACHI, K. Advances in MRSA drug discovery: where are we and where do we need to be? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 8, n. 9, p. 1095–1116, 2013.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76–94, 2014.

LEAVITT, A. et al. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains in an Israeli Hospital Emergence of KPC-2 and KPC-3 in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains in an Israeli Hospital □. 2007.

LEFROCK, J. L.; PRINCE, R. A.; RICHARD D. LEFT, P. D. Mechanism of Action , Antimicrobial Activity , Pharmacology , Adverse Effects , and Clinical Efficacy of Cefotaxime Evaluations of New Drugs Mechanism of Action , Antimicrobial Activity , Clinical Efficacy of Cefotaxime. **Pharmacotherapy**, v. 2, n. 4, p. 174–184, 1982.

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 371–387, 2013.

LINDSAY, J. A.; HOLDEN, M. T. G. *Staphylococcus aureus*: Superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 378–385, 2004.

LIVERMORE, D. M. et al. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 5, p. 415–419, 2011.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 1, p. 135–145, 2017.

LOPES, S.; MAGALHÃES, A.; PEREIRA, M. O. Impact of variable oxygen environments on resistance to acute antibiotherapy by cystic fibrosis related bacteria. v. 3, p. 21, 2016.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. [s.l: s.n.].

LORTHOLARY, O. et al. Aminoglycosides. **Medical Clinics of North America**, v. 79, n. 4, p. 761–787, 1995.

LUEPKE, K. H. ET AL. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 37, n. 1, p. 71–84, 2017.

MACIEL, CARLA DO COUTO SOARES; CÂNDIDO, H. R. L. F. Infecção Hospitalar: Principais agentes e drogas administradas. **Veredas Favip-Revista Eletrônica de Ciências**, v. 3, n. 1, 2013.

MAINARDI, J. L. et al. Synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime

against *Enterococcus faecalis* [published erratum appears in *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Dec;39(12):2835]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 1984–1987, 1995.

MANTESE, O. C. Pneumococo resistente à penicilina: implicações práticas Penicillin-resistant pneumococcus : Practical implications. v. 75, p. 74–90, 1999.

MARTENS, E.; DEMAIN, A. L. **An Overview of the Industrial Aspects of Antibiotic Discovery**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

MARTÍNEZ, J. et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 261–268, 2004.

MARTINS, H. A. et al. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “tandem” (CLAE-EM/EM). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 586–592, 2006.

MATTOS, K. P. H. et al. Brazil’s resolutions to regulate the sale of antibiotics: Impact on consumption and *Escherichia coli* resistance rates. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 195–199, 2017.

MAZUMDAR, A. ET AL. AURORA KINASE A INHIBITION AND PACLITAXEL AS TARGETED COMBINATION THERAPY FOR HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA. **Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, v. 21, n. 5, p. 625–634, 2009.

MAZZARIOL, A. et al. First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. p. 237–239, 2012.

MCPHEE, J. B.; LEWENZA, S.; HANCOCK, R. E. W. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 205–217, 2003.

MEJÍA, CARLOS; ZURITA, JEANNETE; GUZMÁN-BLANCO, M. Epidemiology and surveillance of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 79–86, 2010.

MELNYK, A. H.; WONG, A.; KASSEN, R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 3, p. 273–283, 2015.

MENDES, J. J. Resistência Antibiótica no *Staphylococcus aureus*; da investigação básica à prática clínica. **Rev. Port. Med. Int.**, v. 17, n. 1, p. 11–15, 2010.

MICHAELIDIS, C. I. et al. The hidden societal cost of antibiotic resistance

per antibiotic prescribed in the United States: An exploratory analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, 2016.

MILLER, E. L. THE PENICILLINS: A REVIEW AND UPDATE. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 47, n. 6, p. 426–434, 2002a.

MILLER, E. L. THE PENICILLINS: A REVIEW AND UPDATE. **Journal of Midwifery & Women's Health**, p. 426–434, 2002b.

MITCHELL, G. et al. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 559–568, 2012.

MORAES, B. A. Antibioticoterapia para infecções respiratórias em equinos. **Tcc**, v. 1, 2012.

MORGAN, D. J. et al. Non-prescription antimicrobial use worldwide: A systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 692–701, 2011.

MORRIS, D. et al. Production of KPC-2 carbapenemase by an *Escherichia coli* clinical isolate belonging to the international ST131 clone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4935–4936, 2011.

MUNSON, E. et al. Determination of MIC and disk diffusion quality control guidelines for meropenem–vaborbactam, a novel carbapenem/boronic acid β -lactamase inhibitor combination. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 4, p. 324–328, 2017.

NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.

NAAS, T. et al. Beta-lactamase database (BLDB)–structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 917–919, 2017.

NAAS, T.; NORDMANN, P.; VEDEL, G. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from France Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from France. p. 4423–4425, 2005.

NAEGELE, C. F. Streptomycin treatment of bacterial endocarditis due to *Streptococcus viridans*; report of two cases. **Annals of internal medicine**, v. 30, n. 5, p. 1049–1053, 1949.

NAPOLITANO, L. M. Definitions and Guideline Changes. v. 19, n. 2, p. 117–125, 2018.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252–275, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215–234, 2000.

NORBERG, N. et al. RESEARCH ARTICLE SECRETION OF UNDERGRADUATE STUDENTS OF HEALTH SCIENCES AREA WHO DO NOT ATTEND THE HOSPITAL ENVIRONMENT IN THE CITY OF BELFORD ROXO , PROVINCE OF RIO DE. v. 04, n. 03, p. 2456–2459, 2017.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228–236, 2009.

NORIEGA, E. R. et al. Nosocomial infection caused by gentamicin-resistant, streptomycin-sensitive *Klebsiella*. **The Journal of infectious diseases**, v. 131 Suppl, n. May, p. S45-50, 1975.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016. **HM Government and Wellcome Trust: UK**, 2016.

OLIVEIRA, F. P.; CIPULLO, P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Braz J Cardiovasc Surg**, v. 21, n. 4, p. 444–452, 2006.

OLIVIER, N. B. Structural biology: Ribosome revelations. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 491–492, 2014.

OPLINGER, R. W.; WAGNER, E. J.; CAVENDER, W. Use of penicillin and streptomycin to reduce spread of bacterial coldwater disease II: Efficacy of using antibiotics in diluents and during water hardening. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 27, n. 1, p. 32–37, 2015.

OTVOS JR., L. et al. Synergy Between Proline-Rich Antimicrobial Peptides and Small Molecule Antibiotics Against Selected Gram-Negative Pathogens in vitro and in vivo. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. August, p. 1–12, 2018.

PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Medicine**, v. 2, p. 323–334, 2007.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Inhibitor resistance in the KPC-2 β -lactamase, a preeminent property of this class β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 890–897, 2010.

PESSOA-SILVA, C. L. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: Risk factors for infection and colonization. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 3, p. 198–206, 2003.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 6, p. 371–379, 2010.

PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps — not just for

resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 629–636, 2006.

PIDDOCK, L. J. V. **The crisis of no new antibiotics-what is the way forward?***The Lancet Infectious Diseases*, 2012.

PILLAI, S. K.; MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M. No TitleAntimicrobial Combinations. In: V, L. (Ed.). . **Antibiotics in Laboratory Medicine**. [s.l: s.n.].

PINSETTA, F. R. Universidade de são paulo. 2010.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873–5884, 2015.

PLETZER, D.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. W. Synergy between conventional antibiotics and anti-biofilm peptides in a murine , sub- cutaneous abscess model caused by recalcitrant ESKAPE pathogens. p. 1–14, 2018.

PORTIER, H. et al. Cefotaxime in combination with other antibiotics for the treatment of severe methicillin-resistant staphylococcal infections. **Infection**, v. 13, n. 1 Supplement, p. 123–128, 1985.

RATHER, I. A. et al. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 4, p. 808–812, 2017.

REMONATTO, G. ET AL. CA-MRSA: um patógeno emergente. **NewsLab**, v. 80, p. 92–96, 2007.

RENEE S. LEVINGS, SALLY R. PARTRIDGE, DIANE LIGHTFOOT, RUTH M. HALL, S. P. D. New Integron-Associated Gene Cassette Encoding a 3-N-Aminoglycoside Acetyltransferase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 1238–1241, 2005.

ROBERTSON, M. B. et al. Ceftriaxone and cefotaxime use in Victorian hospitals. **Medical Journal of Australia**, v. 176, n. 11, p. 524–529, 2002.

ROCHE, C. ET AL. First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland. **Eurosurveillance**, v. 14, n. 13, p. 19163, 2009.

RODELA, A. R. ET AL. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. **Eurosurveillance**, v. 17, n. 7, p. 20086, 2012.

RØNNING, H. T.; EINARSEN, K.; ASP, T. N. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1118, n. 2, p. 226–233, 2006.

ROSSI, F. et al. Rates of Antimicrobial Resistance in Latin America (2004-2007) and in vitro Activity of the Glycylcycline Tigecycline and of Other Antibiotics. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, p. 405–415, 2008.

ROSSOLINI, G. M. et al. Update on the antibiotic resistance crisis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 18, p. 56–60, 2014a.

ROSSOLINI, G. M. et al. Update on the antibiotic resistance crisis. **Current Opinion in Pharmacology**, Anti-infectives • New technologies. v. 18, p. 56–60, out. 2014b.

RUPPÉ, É.; WOERTHER, P.-L.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**, v. 5, n. 1, p. 21, 2015.

SAÚDE, M. DA. **O uso da penicilina na Atenção Básica para a prevenção da Sífilis Congênita no Brasil**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/penicilina_para_prevencao_sifilis_congenita_brasil.pdf>.

SCHIFANO, J. M. et al. Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 21, p. 8501–8506, 2013.

SILVA, A. C. P.; VELASQUEZ, P. A. G. NO SUDOESTE DO PARANÁ 1 RESISTANCE PROFILE OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLATED FROM PATIENTS AT INTENSIVE CARE UNIT IN A HOSPITAL OF SOUTHWESTERN REGION OF PARANÁ STATE. **Disciplinarum Scientia Saúde**, v. 18, n. 2, p. 259–270, 2017.

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

SILVESTER, A. et al. Adult bacterial conjunctivitis: resistance patterns over 12 years in patients attending a large primary eye care centre in the UK. **BMJ open ophthalmology**, v. 1, n. 1, p. e000006–e000006, 2016.

SINGER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016.

SINGH, V. et al. In vitro efficacy of 21 dual antimicrobial combinations comprising novel and currently recommended combinations for treatment of drug resistant gonorrhoea in future era. p. 1–12, 2018.

SKUTLABERG, D. H. et al. Emergence of clonally related Klebsiella pneumoniae isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. n. February, p. 654–658, 2009.

STACHYRA, T. et al. In vitro activity of the β -lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and Enterobacteriaceae expressing KPC

carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 326–329, 2009.

STEINMANN, J. ET AL. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. **Eurosurveillance**, v. 16, n. 33, p. 19944, 2011.

STENGER, M. et al. Systemic thioridazine in combination with dicloxacillin against early aortic graft infections caused by *Staphylococcus aureus* in a porcine model: In vivo results do not reproduce the in vitro synergistic activity. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2017.

STEWART, P. S.; WILLIAM COSTERTON, J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135–138, 2001.

TAM, J. et al. Case Report Successful Treatment of High-Level Aminoglycoside-Resistant *Enterococcus faecalis* Bacteremia in a Preterm Infant with Ampicillin and Cefotaxime. v. 2018, p. 3–5, 2018.

TAN, T. Y. et al. In Vitro Antibiotic Synergy in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: the Effect of Testing by Time-Kill, Checkerboard, and Etest Methods In Vitro Antibiotic Synergy in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: the Effect of Tes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 436–438, 2011.

TENSON, T.; LOVMAR, M.; EHRENBERG, M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. **Journal of Molecular Biology**, v. 330, n. 5, p. 1005–1014, 2003.

THEURETZBACHER, U. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 4, p. 295–299, 2012.

THOMAS H. HUNTER. Use of Streptomycin in the Treatment of Bacterial Endocarditis*. **AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE**, v. 2, n. 5, p. 436–442, 1947.

TRABULSI, LUIZ R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo, Brasil.: [s.n.].

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; WANG, Y.; HOOPER, D. C. Tet38 Efflux Pump Contributes to Fosfomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, n. June, p. AAC.00927-18, 2018.

TSAKRIS, A. et al. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. n. September 2008, p. 1257–1260, 2011.

VASUDEVAN, S.; SWAMY, S. S.; KAUR, G. Synergism Between Quorum Sensing Inhibitors and Antibiotics: Combating the Antibiotic Resistance Crisis. p. 209–225, 2018.

VELKOV T.; ROBERTS, K. D.; THOMPSON P. E.; LI, J. Polymyxins: a new hope in combating Gram-negative superbugs? **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 1017–1025, 2016.

VELKOV, T. et al. Teaching ‘ Old ’ Polymyxins New Tricks: New-Generation Lipopeptides Targeting Gram-Negative ‘ Superbugs ’. **ACS Chem. Biol.**, v. 16, p. 1172, 2014.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.

VIRGINCAR, N. et al. Klebsiella pneumoniae producing KPC carbapenemase in a district general hospital in the UK q. **Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 4, p. 293–296, 2011.

WAHLSTROM, J.; WIENKERS, L. In vitro - In vivo Correlation. **Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology**, p. 1–20, 2018.

WALSH, C. T.; WENCEWICZ, T. A. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. **The Journal of antibiotics**, v. 67, n. 1, p. 7, 2014.

WARNER, W. C. S. R. F. Placental transfer of chloramphenicol (Chloromycetin). **American Medical Associations**, v. 142, n. 17, p. 1331–1332, 1950.

WENDT, C. et al. First outbreak of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) -producing K . pneumoniae in Germany. p. 563–570, 2010.

WHO. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. **World Health Organization**, v. 61, n. 3, p. 383–394, 2014.

WHO, W. H. O.-. **The Selection and Use of Essential Medicines: Report of the WHO Expert Committee.**

WHO, W. H. O.-. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.** Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>.

WHO, W. H. O.-. **Antimicrobial resistance.** Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>.

WOAPPI, Y. et al. Antibiotrophs: The complexity of antibiotic-subsisting and antibiotic-resistant microorganisms. v. 7828, p. 1–14, 2014.

WOLFE, JOHN C.; JOHNSON, W. D. Penicillin-sensitive streptococcal endocarditis: in-vitro and clinical observations on penicillin-streptomycin therapy. **Annals of internal medicine**, v. 81, n. 2, p. 178–181, 1974.

WOODFORD, N. et al. Outbreak of Klebsiella pneumoniae Producing a New Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase , KPC-3 , in a New York

Medical Center Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing a New Carbapenem- Hydrolyzing Class A β -Lactamase , KPC-3 , in a New York Medical Center. 2004.

WOODFORD, N. et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. n. September, p. 1261–1264, 2008.

WRIGHT, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. **Canadian journal of microbiology**, v. 60, n. 3, p. 147–54, 2014.

XU, X. et al. Synergistic combination of two antimicrobial agents closing each other's mutant selection windows to prevent antimicrobial resistance. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2018.

YU, H.-H. et al. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Food**, v. 8, n. 4, p. 254–461, 2005.

YUNIS, A. A. Chloramphenicol: Relation of Structure to Activity and Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 83–100, 1988.

ZAMAN, S. BIN et al. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**, 2017.

ZAVASCKI, A. P. et al. Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 2, p. 134–138, 2018.

ZIENKIEWICZ, M. et al. Chloramphenicol acetyltransferase—a new selectable marker in stable nuclear transformation of the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. **Protoplasma**, v. 254, n. 1, p. 587–596, 2017.

ZILBERBERG, M. D. et al. Multi-drug resistance, inappropriate initial antibiotic therapy and mortality in Gram-negative severe sepsis and septic shock: A retrospective cohort study. **Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 1–13, 2014.

ZUO, G. Y. et al. Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1814–1820, 2016.

7. ANEXOS

Figura suplementar 1. Avaliação da atividade citotóxica das associações entre PNG + SMA e CFT + SMA. As associações com as melhores atividades sinérgicas foram avaliadas quanto à viabilidade celular contra células RAW 264.7 e VERO. Gráficos (A) e (B) correspondem aos fármacos testados sozinhos, em concentrações altas e de atividade sinérgica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) frente células RAW 264.7 e Vero, respectivamente; (C) corresponde a atividade citotóxica das combinações sinérgicas dos fármaco contra células RAW 264.7 (cinza claro) e VERO (cinza escuro).

