



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Avaliação da Atividade Antibiofilme do Peptídeo
Pa-MAP 1.9 Frente a Cepas de *Klebsiella pneumoniae*
Resistentes a Carbapenem**

Esther Vilas Boas de Carvalho

Campo Grande – MS

Março de 2018

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Avaliação da Atividade Antibiofilme do Peptídeo
Pa-MAP 1.9 Frente a Cepas de *Klebsiella pneumoniae*
Resistentes a Carbapenem**

Autora: Esther Vilas Boas de Carvalho
Orientador: Octávio Luiz Franco
Coorientadora: Elizabete de Souza Cândido

**"Dissertação apresentada, como
parte das exigências para obtenção
do título de MESTRE EM
BIOTECNOLOGIA, no Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Católica Dom Bosco -
Área de concentração: Biotecnologia"**

Campo Grande – MS

Março de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS,
Brasil)

C331a Carvalho, Esther Vilas

Boas de

Avaliação da atividade antibiofilme do Peptídeo *Pa*-MAP 1.9
frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae* eesistentes a carbapenem. / Esther
Vilas Boas de Carvalho; orientador Octávio Luiz Franco; coorientadora
Elizabete de Souza Cândido. -- 2018

70 f. + anexos.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande , 2018.

Inclui bibliografias.

1. *Klebsiella pneumoniae* 2. Biofilme bacteriano 3. *Peptídeo*
polialanina

4. Biotecnologia I. Franco, Octávio Luiz II. Cândido, Elizabete de Souza
III. Título.

CDD: 579.3



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

Avaliação da Atividade Antibiofilme do Peptídeo Pa-MAP 1.9 frente a Cepas de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes a Carbapenem

Autora: Esther Vilas Boas de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Octavio Luiz Franco

Coorientadora: Profa. Dra. Elizabete de Souza Cândido

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 08 de março de 2018.

Prof. Dr. Octavio Luiz Franco - UCDB

Profa. Dra. Suzana Meira Ribeiro - UCDB

Prof. Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira - UFMS

*“Happiness can be found even in the darkest of times,
if one only remember to turn on the light”*

J.K. Rowling

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me lembrar que fé são coisas que se esperam mas não se vêem, afinal tudo da certo;

A meu pai, Paulo, pelas caronas nos horários mais loucos possíveis, nos finais de semana e feriados, pela infinita paciência me esperando no término dos experimentos, por me apoiar e compreender minhas escolhas;

Aos meus amigos, minhas bênçãos em forma de família, Elizabete Cândido, Marlon Henrique, Sílvia Rodrigues, Leonardo Miranda, Karen Oshiro e Samilla Rezende, por todo companheirismo, pela ajuda nos momentos de aprendizagem, por todos os momentos divertidos que compartilhamos e por me fazerem crescer e ser uma pessoa melhor e mais “de boa”;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Octávio Luiz Franco, por ser um exemplo de pesquisador, por acreditar no meu potencial como pesquisadora, por me incentivar a fazer o meu melhor, pelas oportunidades que tem me oferecido, e pelo presente que me deu em forma de coorientadora;

A minha coorientadora, Dra. Elizabete de Souza Cândido, por me ensinar grande parte do que sei, pelas horas de companhia nos experimentos, por me estimular a pesquisar minhas dúvidas falando, “eu não sou o Google e nem tenho cara de enciclopédia”. Pelos cafés mais do que necessários, pelas conversas, por me ensinar a ter uma ata decente e sua importância. Por sempre me incentivar a continuar apesar de todas as tentativas do meu plano A não funcionarem, pelas inúmeras correções de qualquer documento científico que escrevi, pela preocupação com minha saúde, pelas broncas por Skype,

pelas discussões de artigos, por me fazer crescer pessoalmente e profissionalmente e principalmente pela amizade que agora é para o resto da vida;

As mestrandas, Karen Oshiro e Elizângela Barros, por me auxiliarem no desenvolvimento de todo o mestrado, por me acompanharem e me ajudarem mesmo durante os feriados, pela paciência e respeito com o meu ritmo de fazer as coisas, pelos momentos de aprendizagem, diversão e pela amizade;

As alunas de iniciação científica Amanda Loren e Bruna Monges, por me ajudarem nos experimentos, por aguentarem minhas constantes brincadeiras, pelas risadas e pela amizade.

Aos amigos caninos e felinos da minha vida, Xena, Frida, Luna, Amora e Sunny, por aguentarem meu amor Felícia e por me fazerem ser mais humana;

Aos amigos do laboratório S-Inova, Beatriz Meneguetti, Nathalia Ataides pela ajuda e protocolos prestados durante os dois anos de mestrado;

A amiga, Dra. Suzana Meira Ribeiro, pela colaboração experimental, por me explicar protocolos, por ter me ensinado muitas coisas, pela alegria no dia a dia, pelas risadas e pela amizade.

A técnica e amiga, Dayane dos Santos, por me ajudar sempre que precisei e por me ensinar diversas coisas sobre o funcionamento do laboratório;

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro;

RESUMO

A bactéria *Klebsiella pneumoniae*, em especial as estirpes produtoras da enzima β -lactamase, tem sido responsável por grande parte das infecções nosocomiais, incluindo infecções associadas a biofilmes multirresistentes. Essa enzima pode hidrolisar o anel β -lactâmico presente em antibióticos, conferindo resistência à terapias antimicrobianas de última linha. Deste modo, duas cepas de *K. pneumoniae* KpC provenientes de casos clínicos de um hospital de Brasília (002210477 e 001450421) foram analisadas quanto ao crescimento de suas células planctônicas e formação de biofilme *in vitro*, como controle foi utilizada a cepa ATCC 13883, através de testes em placas de 96 poços. Após a padronização das condições ideais de crescimento, foram realizados ensaios de susceptibilidade ao peptídeo *Pa*-MAP 1.9 e aos antibióticos ciprofloxacino e meropenem. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) para os ensaios com *Pa*-MAP 1.9 obtidos para as cepas KpC 001450421 e 002210477 32 e 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, e para cepa ATCC 13883 foi $>64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em ambos os ensaios. Para ciprofloxacino, o melhor CIM/CIMB foi de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cepa ATCC 13883, e 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambas as cepas KpC, enquanto que para meropenem o melhor CIM/CIMB foram obtidos para ATCC 13883 a 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. No ensaio de concentração bactericida mínima (MBC) a 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a atividade apresentada por *Pa*-MAP 1.9 frente as cepas KpC foi bacteriostática, para a cepa ATCC não foi observada atividade. A concentração de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *Pa*-MAP 1.9 frente as cepas ATCC 13883 e KpC 002210477 apresentou atividade bactericida e para a cepa KpC 001450421 foi observada a atividade bacteriostática. Ensaios de sinergismo com meropenem apresentaram efeito indiferente contra a cepa ATCC 13883, enquanto que o tratamento demonstrou efeito antagonista frente a cepas KpC. Portanto é evidenciada a atividade de *Pa*-MAP 1.9 nos resultados obtidos no trabalho, em especial os resultados de atividade bactericida apresentada frente a estirpe KpC 002210477, o que não foi observado em nenhuma outra cepa. Contudo, apesar da inefetividade da combinação *Pa*-MAP 1.9 e meropenem, o uso deste peptídeo catiônico frente a *K. pneumoniae* KpC, foi eficiente no combate a biofilmes. Portanto *Pa*-MAP 1.9 pode ser considerado uma terapia alternativa no combate e controle de biofilmes.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae* KpC, Peptídeo polialanina, Biofilmes

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae bacteria, especially strains that produce the β -lactamase enzyme have been responsible for a large proportion of nosocomial infections, including the ones caused by multiresistant biofilms. This enzyme can hydrolyze the β -lactam ring present in all β -lactam antibiotics, conferring resistance to the last-line antimicrobial therapies. Strains of *K. pneumoniae* (KpC 002210477 and 001450421) from a clinical cases from a Brasília Hospital, were analyzed for growth of its planktonic cells and biofilm formation *in vitro* using 96-well plate tests, ATCC 13883 strain was used as control. After the standardization of the ideal growth conditions, the susceptibility assay to antimicrobial peptide *Pa*-MAP 1.9 and ciprofloxacin and meropenem were carried out. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal biofilm inhibitory concentration (MBIC) to the assays carried out with *Pa*-MAP 1.9 were obtained for KpC strains 00145021 and 002210477 at 32 and 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively and to ATCC strain 13883 was $>64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ on both assays. To ciprofloxacin, the best MIC/MBIC was 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to ATCC strain 13883, and 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to both KpC strains, whereas to meropenem the best MIC/MBIC were obtained for ATCC strain 13883 at 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. On minimal bactericidal concentration (MBC) assay, at 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ the activity of *Pa*-MAP 1.9 to KpC strains was bacteriostatic, to ATCC strain no activity was observed. Whereas the concentration of 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to *Pa*-MAP 1.9 for ATCC 13883 and KpC 002210477 strains showed bactericidal activity, and for KpC 001450421 the activity was bacteriostatic. Synergism assays with meropenem showed indifferent effect against ATCC 13883 strain, whereas the treatment showed an antagonist effect against both strains of KpC. Therefore the activity of *Pa*-MAP 1.9 is evidenced on the results obtained in this work, especially the result of bactericidal activity presented against KpC 002210477, which was not observed in any other strain. However, despite the combination of *Pa*-MAP 1.9 and meropenem ineffectiveness, the use of this cationic peptide against *K. pneumoniae* KpC was efficient against biofilms. Hence, *Pa*-MAP 1.9 can be considered an alternative therapy on combat and control of biofilms.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae* KpC, Polyalanine peptide, Biofilms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da penicilina com o anel β -lactâmico destacado em vermelho, sofrendo hidrólise através da enzima β -lactamase gerando metabólito inativo em azul . Fonte: Page (1992) adaptado.....18

Figura 2. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase positiva (KpC) (cor mostarda, em forma de bastonete) interagindo com neutrófilos humanos (verde). Fonte: *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), imagem colorida digitalmente de um microscópio eletrônico de varredura, imagem disponibilizada pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) (2014).....20

Figura 3. Mapa das características epidemiológicas e distribuição de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC). Fonte: Adaptado de Munoz-Price e colaboradores (2013).....21

Figura 4. Esquema do desenvolvimento de um biofilme, processo com cinco etapas. Etapa 1- Adesão das células planctônicas a uma superfície; etapa 2- crescimento sésil e quorum sensing; etapa 3- maturação da estrutura e produção de matriz extracelular; etapa 4- dispersão celular e indução de fatores de dissociação; 5- colonização de outras superfícies por células livres-nadantes. Fonte: (Ribeiro, 2014b).....25

Figura 5. Estrutura secundária tridimensional predita para o peptídeo Pa-MAP com a superfície eletrostática. Em azul: resíduos polares básicos; em vermelho: superfície com resíduos ácidos; em amarelo: resíduos possivelmente envolvidos na interação com múltiplos alvos na membrana. Fonte: (Migliolo et al., 2012).....33

Figura 6. Modelo teórico tridimensional da estrutura secundária com menor energia livre obtido para de Pa-MAP 1.9; em branco: resíduos apolares; em rosa: resíduos polares neutros; em ciano: resíduos básicos. Fonte: (Cardoso et al., 2016).....34

Figura 7. Análise de Pa-MAP 1.9 por espectrometria de massa revelando um íon de massa monoisotópica $[M+H]^+ = 2668,0 \text{ m/z}$43

Figura 8. Curvas de padronização do crescimento exponencial de células planctônicas (A) e biofilme (B) no meio de cultura BM2 durante 48 h na placa de 96 poços. Os símbolos correspondem a *P. aeruginosa* ATCC 27853 (-●-) em azul, (-■-) *K. pneumoniae* ATCC 1883 em vermelho e (-▲-) *K. pneumoniae* KpC 001825971 em verde.....45

Figura 9. Curvas de crescimento exponencial de células planctônicas (A) e biofilme (B) no meio de cultura BM2 durante 48 h na placa de 96 poços. Os símbolos correspondem a *K. pneumoniae* ATCC 13883 (-●-) em azul, (-■-) *K. pneumoniae* KpC 001825971 em vermelho, (-▲-) *K. pneumoniae* KpC 002219477 em verde e (-▼-) *K. pneumoniae* KpC 001450421 em roxo.....46

Figura 10. Determinação da concentração bactericida mínima para a confirmação do resultado obtido no ensaio de CIM com Pa-MAP 1.9 realizado com cepas de *Klebsiella pneumoniae*, as letras correspondem a *K. pneumoniae*

ATCC 13883 (A); *K. pneumoniae* KpC 002210477 (B); *K. pneumoniae* KpC 001450421 (C) Para todas as cepas as concentrações depositadas em placa foram 64 e 32 $\mu\text{g/mL}^{-1}$48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação do crescimento ótimo de células planctônicas e biofilme de estirpes de *K. pneumoniae* em meio BM2 em diferentes concentrações de glicose de 0,4-1%. Crescimento foi monitorado em placa de 96 poços com incubação por 24 h a 37 °C. O crescimento de células planctônicas foi mensurado através de espectrofotometria a 600nm, a formação de biofilme foi acessada através da coloração com cristal violeta 0,1% e mensurada por espectrofotometria a 595nm, foi utilizada a unidade de medida UA.....44

Tabela 2. Avaliação da atividade antibiofilme do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 e dos antibióticos ciprofloxacino e meropenem contra células planctônicas (CIM) em meio MHB e células de biofilme (CIMB) em meio BM2, em cepas de *K. pneumoniae* ATCC 13883, KpC 002210477 e KpC 001450421. Valores apresentados em $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 47

Tabela 3. Avaliação da atividade combinatória de *Pa*-MAP 1.9 em combinação com ciprofloxacino e meropenem contra as estirpes de *K. pneumoniae* ATCC 13883, KpC 002210477 e KpC 001450421, ensaio realizado em microplacas de 96 poços. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Valores expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 49

LISTA DE ABREVIATURAS

AmpC - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

PAM- Peptídeo antimicrobiano

AFP- Peptídeo anticongelante

BM2- *Basal Medium 2*

CDC- *Center for Disease Control and Prevention*

CIM- Concentração inibitória mínima

CBM- Concentração bactericida mínima

CIMB- Concentração inibitória mínima de biofilme

DNA- Ácido desoxirribonucleico

D.O.- Densidade óptica

EPS- Exopolissacarídeo

ESLBs- β -lactamases de espectro estendido

ESKAPE- *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*

HPLC- *High performance liquid chromatography*

IDSA- *Infectious Diseases Society of America*

KpC- *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase positiva

MDR- Organismos multirresistentes

MHB- Müller-Hinton caldo

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

m/z- Massa/carga

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

nm- Nanômetros

RNA- Ácido ribonucléico

UA- Unidade de absorvância

Sumário

1. REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1 Infecções nosocomiais e multirresistência bacteriana.....	17
1.2 Bactérias patogênicas responsáveis por infecções nosocomiais	19
1.2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
1.3 Biofilmes bacterianos	24
1.4 Antibióticos <i>versus</i> bactérias: a luta contra infecções adquiridas.....	27
1.5 Peptídeos antimicrobianos	29
1.6 Peptídeos derivados de <i>Pleuronectes americanus</i> e seus sintéticos	33
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3.OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Síntese, determinação de pureza e quantificação do peptídeo.....	38
4.2 Padronização da concentração de glicose adicionada ao meio de cultura para crescimento de células planctônicas e biofilmes de cepas de <i>K. pneumoniae</i> ATCC e KpC	38
4.3 Coloração de biofilme com cristal violeta	39
4.4 Curva de crescimento de biofilme de estirpes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC e KpC.....	39
4.5 Determinação da concentração inibitória mínima do peptídeo <i>Pa</i> -MAP 1.9 e dos antibióticos ciprofloxacino e meropenem contra estirpes de <i>K. pneumoniae</i>	40
4.6 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) contra estirpes de <i>K. pneumoniae</i>	41
4.7 Determinação da concentração inibitória mínima de biofilmes (CIMB) contra estirpes de <i>K. pneumoniae</i>	41
4.8 Ensaio de sinergismo de <i>Pa</i> -MAP 1.9 em combinação com meropenem.....	42

5. RESULTADOS.....	42
5.1 Síntese, determinação de pureza e quantificação do peptídeo.....	42
5.2 Determinação da concentração de glicose em meio BM2 para crescimento ótimo de células planctônicas e biofilmes de estirpes de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
5.3 Curva de crescimento exponencial de estirpes de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	46
5.4 Ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB)	47
5.5 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	48
5.5 Ensaio de sinergismo de Pa-MAP 1.9 em combinação com meropenem	49
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Infecções nosocomiais e multirresistência bacteriana

No mundo são encontrados diversos ecossistemas microbianos que coexistem, as interações realizadas por esses microrganismos incluem cenários competitivos e cooperativos em que os microrganismos competem ou proveem recursos influenciando no crescimento dos outros organismos coexistentes (Hays *et al.*, 2015). Sendo assim o ser humano vive em contato constante com o mundo microbiano (Von Mutius, 2016). Desta forma, como um mecanismo de defesa primário, o sistema imune inato ativa a defesa do hospedeiro impedindo a invasão de patógenos e promovendo o crescimento e reparo tecidual durante o desenvolvimento do dano. Contudo o sistema imune inato sozinho pode não conseguir realizar a defesa apropriada do hospedeiro para combater as doenças adquiridas (Bottazzi *et al.*, 2016). Neste contexto o aumento do número de casos de doenças infecciosas patogênicas tem sido relatado desde 1992 pelo Instituto de Medicina dos Estados Unidos (Taylor *et al.*, 2001). Doenças adquiridas por pacientes após cirurgias nos hospitais contemporâneos tem sido uma problemática desde o meio do século 18, e mesmo após a introdução das técnicas de assepsia por Joseph Lister as infecções hospitalares permanecem um problema alarmante (Mangram *et al.*, 1999).

Infecções nosocomiais ou adquiridas em hospitais podem ser definidas como uma infecção adquirida pelo paciente durante o tempo de permanência no hospital, após realização de procedimentos cirúrgicos ou após hospitalização. Essas infecções são causadas por agentes patogênicos e possuem um grande impacto na saúde pública já que estão associadas ao aumento do uso de antibióticos, e ao período prolongado de hospitalizações, gerando uma considerável taxa de mortalidade e morbidade e, custos extras a saúde pública (Rosenthal *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2015). Globalmente tem sido relatadas as taxas de infecções hospitalares, das quais as com baixa letalidade representam 9%, enquanto que infecções com letalidade elevada ficam em torno de 14% (Dos Santos *et al.*, 2005). No Brasil Magill e colaboradores (2014) realizaram uma pesquisa em hospitais dos Estados Unidos e relataram que em

2011 ocorreram cerca de 722 mil casos de infecções bacterianas adquiridas em hospitais, e destes, 75 mil pacientes foram a óbito.

Infecções adquiridas em ambiente hospitalar podem ser causadas por diversos microrganismos incluindo bactérias, fungos e vírus (Jamal, 1981; Khan *et al.*, 2017). Apesar desses diferentes agentes microbianos, a maior parte das infecções é causada por bactérias (Khan *et al.*, 2015). Desde a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, o tratamento de infecções bacterianas tem sido realizado com antibióticos, entretanto nas últimas décadas o uso indiscriminado desses medicamentos levou as bactérias a desenvolverem variados mecanismos de resistência (Liu e Pop, 2009).

Os mecanismos de resistência envolvem mutações nos genes e podem ser transmitidos entre bactérias por processos de transdução (bacteriófagos), conjugação (plasmídeos e transposons conjugativos) e transformação (incorporação de DNA cromossomal, compartilhamento de plasmídeos e DNA de outras bactérias no cromossomo bacteriano) (Levy e Marshall, 2004). Diversos mecanismos que tornam as bactérias resistentes a antibióticos têm sido caracterizados. Mecanismos como a produção de enzimas que metabolizam antibióticos, bombas de efluxo que atuam eliminando o composto da célula, modificações estruturais no alvo celular do antibiótico prevenindo sua ligação e eliminação das porinas transmembrana, através das quais os antibióticos entram na célula (Ferri *et al.*, 2017).

O mecanismo especializado de produção de enzimas possibilitou a algumas bactérias apresentarem enzimas conhecidas como β -lactamases, que são capazes de causar a hidrólise do anel β -lactâmico presente antibióticos β -lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenemas (Figura 1). Essas enzimas são capazes de romper a ligação β -lactâmica podendo causar mudanças na configuração dos elétrons da molécula (Richmond e Sykes, 1973). A resistência gerada pelas enzimas β -lactamases pode ser considerada uma das razões para o surgimento de bactérias multirresistentes (MDR). Esses organismos representam um desafio para os sistemas de saúde em relação ao diagnóstico, ao tratamento a ser aplicado e ao controle da infecção (Sader *et al.*, 2014). As chamadas β -lactamases de

espectro estendido (*extended spectrum beta-lactamases* ou ESBLs) são serino β -lactamases geralmente produzidas por enterobactérias, que conferem resistência à maioria dos antibióticos oximino- β -lactâmicos e monobactâmicos (Adler *et al.*, 2016). As ESBLs foram reconhecidas inicialmente em 1980, entretanto se tornaram mais comuns em 1990 com o estabelecimento dos antibióticos carbapenêmicos, destinados ao tratamento de infecções causadas por microrganismos portadores de ESBLs (Tugal *et al.*, 2015). Infecções com a presença de organismos produtores de ESBLs são associadas ao aumento de mortalidade e dos custos de hospitalização (Linkin *et al.*, 2004).

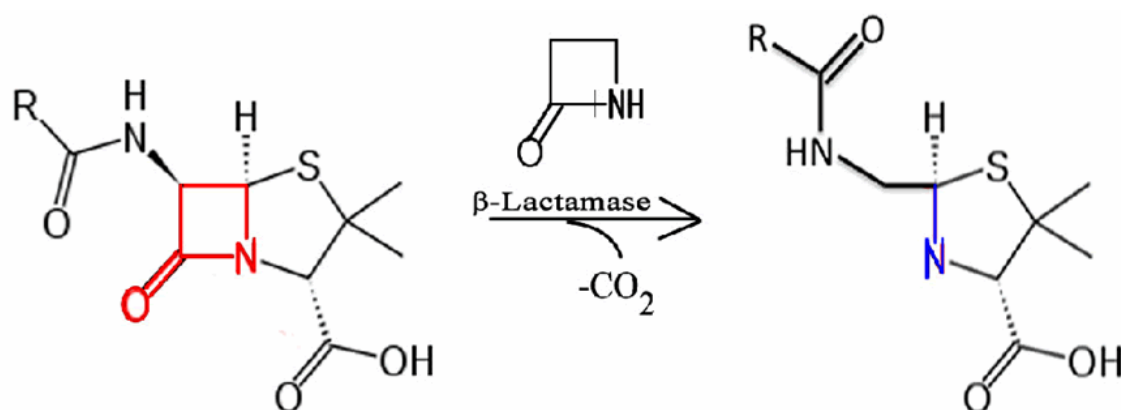


Figura 1. Estrutura molecular da penicilina com o anel β -lactâmico destacado em vermelho, sofrendo hidrólise através da enzima β -lactamase gerando metabólito inativo em azul. Fonte: Page (1992) adaptado.

1.2 Bactérias patogênicas responsáveis por infecções nosocomiais

Nas últimas décadas os relatos de bactérias resistentes a antibióticos têm aumentado significativamente. As bactérias Gram-negativas em especial causam grande preocupação devido ao aparecimento de cepas multirresistentes (Vardakas *et al.*, 2013). Essas bactérias podem causar infecções no trato respiratório, gastrointestinal e urinário, infecções sanguíneas, além de infecções intra-peritoneais (Khan *et al.*, 2015). A *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) tem expressado sua preocupação desde 2002 pela falta do desenvolvimento de novos compostos terapêuticos que tratem infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplas drogas (Boucher *et al.*, 2013). Foram relatadas bactérias de maior ocorrência nos hospitais brasileiros por Carneiro e colaboradores (2008) e, entre elas estão *Pseudomonas*

aeruginosa e *Klebsiella* sp, corroborando com as infecções mais comuns nos Estados Unidos, que são causadas em sua maioria por *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e outras bactérias como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e espécies de *Enterobacter*; conhecidas como o grupo de patógenos ESKAPE, que é um acrônimo do verbo escapar (Khan *et al.*, 2015). Entre os patógenos desse grupo o foco será dado a *K. pneumoniae*, que será descrita no próximo tópico.

1.2.3 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae (Figura 2) foi isolada pela primeira vez por Friendler em 1882, consistindo em uma bactéria saprófita encapsulada em forma de bastonete. Esta bactéria pertence a família Enterobacteriaceae e tem sido responsável por cerca de 70% das infecções humanas, responsável por pneumonia nosocomial, bacteremia e infecções no trato urinário (Podschun e Ullmann, 1998; Broberg *et al.*, 2014). *K. pneumoniae* geralmente coloniza o trato gastrointestinal, pele e nasofaringe (Podschun e Ullmann, 1998).

Cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase (*K. pneumoniae* KpC) foram inicialmente relatadas em 1996 na Carolina do Norte, contudo a resistência a carbapenêmicos foi detectada há cerca de duas décadas. Inicialmente a resistência foi atribuída a diversos mecanismos, entre eles a alta regulação dos sistemas de efluxo combinados com a hiperprodução de cefalosporinases (AmpC) β -lactamase; contudo outros mecanismos podem ser associados à resistência como alteração da permeabilidade da membrana externa devido à perda de porinas, ou a produção de β -lactamases que eficientemente hidrolizam antibióticos carbapenêmicos (Yigit *et al.*, 2001; Gasink *et al.*, 2009; Qureshi *et al.*, 2012).

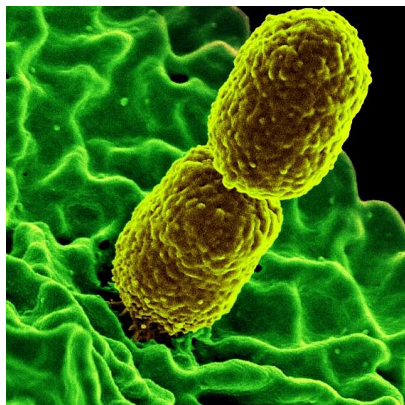


Figura 2. *K. pneumoniae* carbapenemase positiva (KpC) (cor mostarda, em forma de bastonete) interagindo com neutrófilos humanos (verde). Fonte: *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), imagem colorida digitalmente de um microscópio eletrônico de varredura, imagem disponibilizada pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) (2014).

Outros casos de cepas de KpC foram relatados nos Estados Unidos em 2005, no mesmo ano as cepas começaram a ser geograficamente distribuídas, o primeiro caso fora do país foi relatado na França, contudo a origem da cepa se deu na Carolina do Norte, como descrito anteriormente (Cuzon *et al.*, 2010). Leavitt e colaboradores (2007) relataram casos com a presença do gene de resistência KpC em um hospital em Israel, confirmando que as cepas *K. pneumoniae* KpC estavam gradualmente se disseminando. No ano de 2006 a ocorrência de bactérias produtoras de carbapenemases começou a ser relatada na América do Sul, primeiro na Colômbia, onde foi relatada uma cepa de *P. aeruginosa* produtora de KpC (Villegas *et al.*, 2006). Em 2008 casos de infecção com *K. pneumoniae* produtora de KpC foram relatados neste país (Munoz-Price *et al.*, 2013). Posteriormente outros casos de *K. pneumoniae* KpC foram relatados na Argentina (Pasteran *et al.*, 2008) e no Brasil no ano de 2006 (Monteiro *et al.*, 2009). Hoje as cepas KpC se dispersaram globalmente, passando de casos esporádicos nos Estados Unidos, para proporções endêmicas em países como Brasil, Grécia e Israel (Lee e Burgess, 2012).

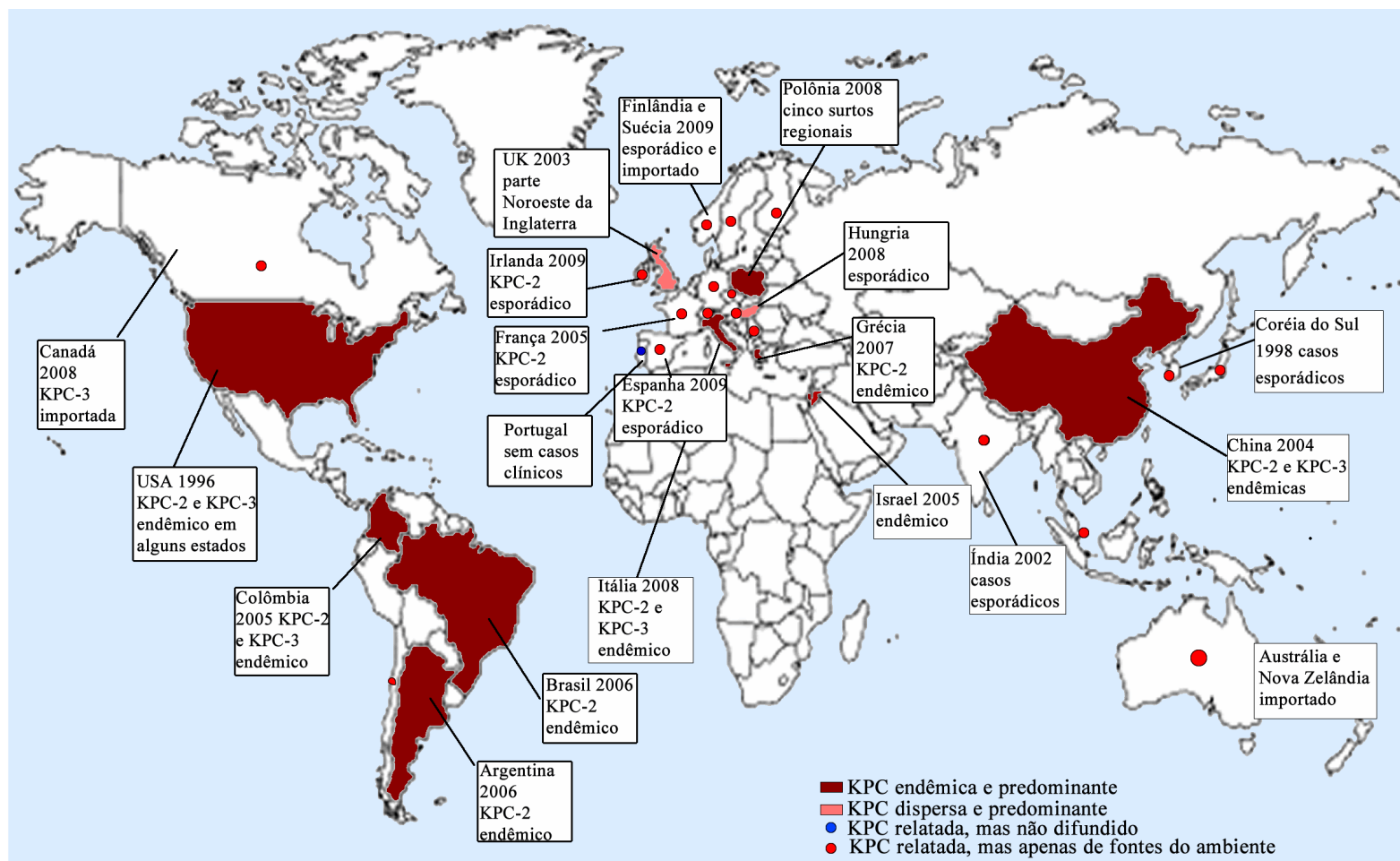


Figura 3. Mapa das características epidemiológicas e distribuição de *K. pneumoniae* KPC. Fonte: Adaptado de Munoz-Price e colaboradores (2013).

Munoz-Price e colaboradores (2013) descreveram a distribuição mundial das cepas (Figura 3) produtoras de KpC. Também foram descritos cinco casos de *K. pneumoniae* KpC no Canadá em 2008. Todos os pacientes eram idosos, dentre esses casos, três haviam visitados áreas em que as cepas produtoras de KpC são consideradas endêmicas, um havia ocupado um quarto hospitalar infectado e o último possuía um carcinoma e adquiriu a cepa, vindo a óbito devido a uma infecção pulmonar. Na Escócia ocorreu o primeiro caso de KpC em uma cepa de *Enterobacter* sp. em 2003, mas apenas em 2007 foi reportada em uma cepa de *K. pneumoniae* KpC neste país. O primeiro caso de *K. pneumoniae* KpC descrito na Espanha ocorreu em 2009, em um idoso e ele foi o primeiro de mais sete casos ocorridos no mesmo local e data (Curiao *et al.*, 2010). Outros casos foram descritos na Itália (Giani *et al.*, 2009), Suécia (Tegmark Wisell *et al.*, 2007), Índia (Jones *et al.*, 2009) e China (Wei *et al.*, 2007).

Desde a identificação e propagação da cepa produtora da enzima *bla*_{KPC-2}, diversas variantes foram identificadas. Em 2012 foi estabelecido um centro nacional de referência para resistência a antibióticos na França onde foram examinadas todas as Enterobacteriaceae carbapenemase-resistentes, a partir dos dados obtidos foram identificados 20 isolados produtores de KpC, e desses, 19 variantes eram *K. pneumoniae* com enzimas KpC-2 e KpC-3 (Munoz-Price *et al.*, 2013).

Cinco desses isolados foram ligados a casos em Israel, Itália, Kuwait e China (Munoz-Price *et al.*, 2013). A porcentagem para Enterobacteriaceae que apresenta enzimas KpC na Austrália e Nova Zelândia é muito baixa devido aos cuidados tomados pelos países como o monitoramento de bactérias resistentes a múltiplas drogas. Embora o risco de uma propagação intercontinental de bactérias resistentes seja reconhecido, devido a transferência de um grande número de pacientes após ataques terroristas em outros países próximos. Desde então diversos hospitais mantêm uma rotina de vigilância para Enterobacteriaceae carbapenemase-resistente em tais transferências (Munoz-Price *et al.*, 2013).

Na América do Norte cepas produtoras de KpC são endêmicas em algumas áreas, onde casos de ocorrência de *Pseudomonas putida* KpC foram

relatados no Texas, também foram relatados casos de *P. aeruginosa* KpC na América central, em Porto Rico. Já na Europa as cepas produtoras são encontradas em praticamente todas as áreas, a maioria relacionada a importação de áreas endêmicas, pouco é relatado sobre a China, apesar de ser considerado um país com áreas endêmicas (Nordmann e Poirel, 2014).

No Brasil *K. pneumoniae* KpC é relatada como a segunda bactéria mais frequente em infecções causadas em pacientes que se encontram unidades de tratamento intensivo (UTIs) destinadas a adultos, com uma taxa de 18,2% dos casos reportados nesta UTI. Já em UTIs destinadas a pediatria, *K. pneumoniae* é relatada como a terceira bactéria mais frequente, sendo responsável por 16,3% dos casos de infecções causadas em crianças. Nas UTIs destinadas a pacientes neonatos a taxa de infecções causadas por *K. pneumoniae* é de 16,2%, sendo a segunda bactéria com maior frequência em infecções em neonatos (Anvisa, 2016).

Apesar do número de infecções causadas por *K. pneumoniae* KpC ainda serem altos, uma redução no número de casos reportados foi relatada pela Anvisa, sendo assim os órgãos de saúde pública do Brasil buscam desenvolver ações para a melhoria da qualidade de diagnósticos realizados em hospitais (Anvisa, 2016).

1.3 Biofilmes bacterianos

Biofilmes são consórcios compostos por uma única ou por múltiplas espécies de bacterianas envoltas por uma matriz auto-produzida, hidratada de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que auxiliam na imobilização das células e as mantêm próximas, permitindo a comunicação química célula-célula (*quorum sensing*) e outras interações (Costerton *et al.*, 1999; Flemming e Wingender, 2010). Os biofilmes são considerados um problema para a saúde pública, já que podem ser responsáveis por mais de 80% das infecções humanas, desde infecções relacionadas a dispositivos médicos a infecções teciduais. A formação de biofilmes implica em infecções persistentes no tecido tais como infecções crônicas em ferimentos, otite média crônica, infecções

recorrentes do trato urinário, endocardite e outras doenças crônicas (Römling e Balsalobre, 2012; Beloin *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de biofilmes pode ocorrer em cinco etapas (Figura 4), que consistem em síntese, na adesão reversível da bactéria em forma planctônica (vida livre) a uma superfície sólida. Nas próximas horas de incubação após a adesão, a bactéria pode ser irreversivelmente ligada à superfície, as células podem se multiplicar, e formar microcolônias que produzem a matriz polimérica (Høiby *et al.*, 2010). Uma vez que a estrutura do biofilme foi desenvolvida, algumas células são liberadas no meio, permitindo a colonização de outras áreas da superfície (Lasa, 2006).

Biofilmes maduros possuem uma estrutura tridimensional com diversos microambientes que se diferenciam de acordo com a osmolaridade, o fornecimento de nutrientes e a densidade celular, essa heterogeneidade produz uma variedade de fenótipos dentro de um biofilme individual. Depois de estabelecido um biofilme bacteriano, sua erradicação com o uso de antibióticos é muito difícil pois estas comunidades bacterianas são naturalmente resistentes às concentrações de antibiótico suficiente para controle das bactérias planctônicas. É muito difícil as terapias antimicrobianas atuais atingirem a concentração mínima dos antibióticos para que não ocorra atividade citotóxica nos pacientes (Wu *et al.*, 2015).

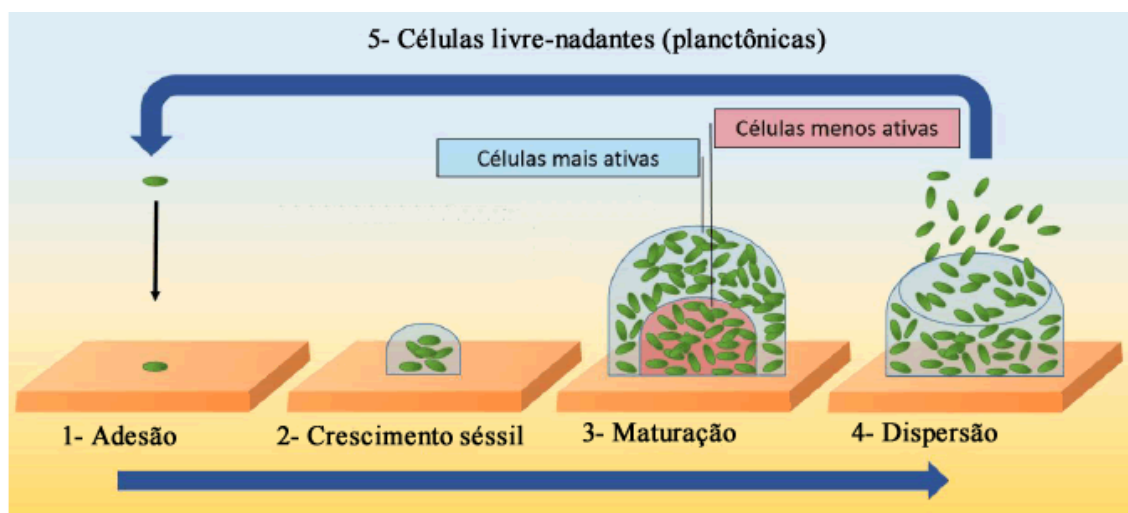


Figura 4. Esquema do desenvolvimento de um biofilme, processo com cinco etapas. Etapa 1- Adesão das células planctônicas a uma superfície; etapa 2- crescimento sésil e *quorum sensing*; etapa 3- maturação da estrutura e produção de matriz extracelular; etapa 4- dispersão celular e indução de fatores de dissociação; 5- colonização de outras superfícies por células livres-nadantes. Fonte: (Ribeiro, 2014b).

Biofilmes bacterianos apresentam alta resistência a respostas imunes e ao uso de antibióticos, pois apresentam diversos métodos de resistência como a restrição da penetração de antibióticos em biofilmes, em que a matriz exopolimérica que encapsula os biofilmes, podendo restringir a difusão de moléculas grandes como as lisozimas, e também de moléculas pequenas como as numerosas defensinas. Os polissacarídeos carregados negativamente se ligam aos aminoglicosídeos carregados positivamente restringindo sua permeação no biofilme (Lewis, 2001).

Outro mecanismo de resistência a ser citado consiste na mudança química no microambiente dentro do biofilme, onde as concentrações de nutrientes podem ser alteradas, levando a redução da taxa metabólica o que pode ocorrer devido ao consumo completo do oxigênio e glicose presentes nas camadas superficiais do biofilme, de forma a resultar em nichos nutricionais anaeróbicos nas camadas mais profundas, fazendo com que o biofilme apresente uma atividade metabólica restrita.

A concentração de produtos metabólicos espelha os produtos presentes no substrato, então a acumulação de ácido pode levar a uma alteração no pH

causando uma diferença entre o fluído da massa e o interior do biofilme o que pode antagonizar diretamente a ação do antibiótico. O metabolismo inativo pode atingir uma extensão do biofilme em que as células continuam viáveis porém perdem a culturabilidade (Lewis, 2001; Fux *et al.*, 2005). Em resposta a inatividade metabólica as bactérias se adaptam ativamente ao estresse, como por exemplo os biofilmes passam a estimular a produção de catalase ou induzem a expressão de β -lactamases cromossomais. As bactérias nos biofilmes podem ativar genes de resposta a estresse e mudar para fenótipos mais tolerantes aos estresses ambientais, como qualidade nutricional, densidade celular, temperatura, pH entre outros. Os genes de resposta a estresses podem antagonizar os efeitos deletérios de antibióticos (Fux *et al.*, 2005). As bactérias podem adquirir genes de resistência que codificam enzimas, como por exemplo as β -lactamases, sua expressão faz com que essa enzima possa hidrolizar o anel β -lactâmico dos antibióticos antes deles atingirem a bactéria (Olsen, 2015).

Lewis (2001) sugeriu que biofilmes podem ser mais resistentes devido a presença do pequeno grupo de células que sobrevivem ação dos antibióticos, as chamadas células persistentes, e são preservadas pela presença de qualquer antibiótico que inibe seu crescimento. Paradoxalmente, os antibióticos ajudam as células persistentes a perserverar já que elas entram em dormência sob a ação dos mesmos e sobrevive.

1.4 Antibióticos *versus* bactérias: a luta contra infecções adquiridas

A chamada era antibiótica moderna teve início com Paul Erlich em 1904, em busca de uma droga para tratamento da sífilis, uma doença sem cura para a época. Em 1909 que junto com Alfred Bertheim e Sahachiro Hata, os quais testaram 600 compostos, mas apenas seis deles os levaram a sintetizar uma droga com o nome de Salvarsan buscando a cura da sífilis. Este medicamento foi o prescrito com grande frequência até ser substituído pela penicilina em 1940 (Aminov, 2010).

O uso de antibióticos no tratamento de infecções teve seu início em 1930 inspirada pelo sucesso de Erlich e uso de arsênicos, a companhia Friederich

Bayer iniciou uma pesquisa buscando combater doenças infecciosas com químicos sintéticos, desta forma foi desenvolvido o antibiótico Sulfonamida, que foi testado *in vitro* em uma cepa de *Streptococcus hemolyticus* isolada de um caso de sepse bacteriana. Seguido pela descoberta (1928) e introdução de penicilina na medicina (1940), os antibióticos foram considerados como agentes que eventualmente controlariam as infecções, pois exerciam um efeito tanto no tratamento das doenças infecciosas, como na sociedade, mudando as taxas de morbidade e mortalidade (Coates *et al.*, 2002; Bentley, 2009).

Apesar da crença de os antibióticos serem os sanadores de doenças infecciosas, as infecções adquiridas continuam sendo de difícil tratamento. Diversos fatores contribuem para este fato, como a contínua alteração no espectro de patógenos que causam as infecções em humanos, fatores sociais como a falta de educação básica ou desinformação da população em geral, o uso descontrolado dos antibióticos e fatores ambientais que impactam propagação das infecções. A maioria dos casos de resistência a antibióticos são descritos em locais de cuidados a saúde, principalmente em hospitais e instituições de tratamento de longo termo, devido a reunião de indivíduos severamente doentes, que geralmente requerem uma terapia com antibióticos. A proximidade dos pacientes e de pessoas que trabalham neste ambiente ou que realizam visitas aos doentes, acaba resultando em um fator ambiental que auxilia no aumento do risco de uma emergente e subsequente transmissão de resistência dentre e entre os pacientes (Coates *et al.*, 2002; Larson, 2007; Ilić *et al.*, 2012).

Mesmo com a resistência presente, alguns antibióticos ainda são comumente utilizados na terapia clínica no combate a infecções. Alguns desses pertencem às classes das quinolonas e das carbapenemases, como por exemplo a ciprofloxacina, uma quinolona de ácido carboxílico derivada do ácido nalídixico. A ciprofloxacina pode ser classificada como uma fluoroquinolona de amplo espectro de ação, efetiva no tratamento de uma grande variedade de infecções, principalmente as causadas por patógenos Gram-negativos, disponível em formulações intravenosa e oral. Desta maneira, o antibiótico ciprofloxacino consiste na fluoroquinolona prescrita com maior frequência devido a sua boa absorção pelo trato gastrointestinal e ao seu amplo espectro

de atividade contra bactérias Gram-negativas (Davis *et al.*, 1996; Fasugba *et al.*, 2015).

Na classe dos carbapenens um antibiótico utilizado com frequência tem sido o meropenem, um carbapenem parental com um grande espectro de atividade clínica e bacteriológica contra uma variedade infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Como resultado dessa atividade o meropenem tem sido utilizado em terapia clínica para o tratamento de infecções intra-abdominais, neutropenia febril, meningite infecções do trato respiratório inferior, infecções na pele, entre outros (Wiseman *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2007). A resistência a ciprofloxacina surgiu ao mesmo tempo em que a resistência a β -lactâmicos se tornou proeminente, podendo levar a sérias consequências clínicas, por isso é indicado que o uso dos antibióticos seja controlado de maneira a evitar a resistência de bactérias (Paterson *et al.*, 2000; Aminov, 2010). Portanto como reação a crise causada na saúde pela resistência a antibióticos, diversos esforços tem sido realizados com o intuito de descobrir e desenvolver novos antimicrobianos naturais e sintéticos como os peptídeos antimicrobianos (Wenzel *et al.*, 2014).

1.5 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) podem ser descritos como oligopeptídeos com até 10 kDa, e são identificados e isolados de vertebrados, invertebrados, plantas e bactérias (Bahar e Ren, 2013; Bechinger e Gorr, 2017). Um dos primeiro PAMs descritos foi a magainina, um peptídeo linear isolado da pele do anfíbio *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987).

Os PAMs formam um grupo único e diverso, eles podem ser divididos em subgrupos com base em sua estrutura secundária e sua composição de aminoácidos. O primeiro subgrupo é composto por peptídeos aniônicos, sua linearidade depende de sua estrutura primária, então cada peptídeo desse subgrupo pode ou não apresentar linearidade. Os peptídeos aniônicos podem ser relacionados a sua extensão de atividade, como por exemplo o grupo de pequenos peptídeos de 7-8 kDa presentes em extratos surfactantes do sistema respiratório, fluído de lavagem broncoalveolar e células epiteliais das vias

respiratórias que se translocam através da membrana para utilizar sítios intracelulares de ação antimicrobiana (Brogden, 2005; Phoenix *et al.*, 2013).

O segundo subgrupo é composto por peptídeos catiônicos que possuem cerca de 40 resíduos de aminoácidos e não possuem resíduos de cisteína. São peptídeos que, quando em solução, não apresentam estrutura secundária definida. Ao interagir com membrana celular estas moléculas adquirem uma conformação secundária tipo α -hélice, de caráter anfipático. Um exemplo deste grupo é o peptídeo humano LL-37. O terceiro subgrupo é composto por peptídeos catiônicos ricos em certos resíduos de aminoácidos, como por exemplo o peptídeo PR-39 rico em resíduos de prolina e arginina, adotam a estrutura folha β ou β -hairpin em soluções aquosas (Brogden, 2005; Guilhelmelli *et al.*, 2013).

O quarto subgrupo é composto por peptídeos aniônicos e catiônicos que podem adotar a estrutura cíclica, contendo resíduos de cisteína, formando ligações dissulfeto e folhas β -estáveis. Esses peptídeos podem também apresentar uma conformação estendida, na qual possivelmente não se dobram em uma estrutura secundária regular e frequentemente exibem grande proporções de resíduos de arginina, triptofano e prolina (Nguyen *et al.*, 2011; Bahar e Ren, 2013). Dentro do quarto subgrupo também são descritas as α -defensinas que incluem peptídeos de neutrófilos humanos, as β -defensinas de ambos humanos e animais, defensinas derivadas de insetos e de plantas, todas com diversos resíduos de cisteína formando ligações dissulfeto. E por último o subgrupo com fragmentos de peptídeos aniônicos e catiônicos fragmentados de cadeias polipeptídicas maiores, eles possuem atividade antimicrobiana e são similares em composição e estrutura aos peptídeos exemplificados anteriormente (Brogden, 2005).

Apesar dos PAMs diferirem em sequência de resíduos de aminoácidos e estrutura, a maioria deles compartilham características comuns como sua carga catiônica, um número significativo de resíduos hidrofóbicos e uma característica anfipática (Nguyen *et al.*, 2011). Todas essas características contribuem para promover a interação entre PAM e membrana celular bacteriana visto que sua interação e ação depende da composição da superfície celular e dos resíduos de aminoácidos do peptídeo. Inicialmente os

PAMs podem interagir com os microrganismos através da ligação eletrostática entre seus aminoácidos positivos e componentes aniônicos expostos na membrana externa bacteriana, como por exemplo os ácidos lipoteicóicos da superfície de bactérias Gram-positivas e os grupos fosfato dos lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas. Entretanto, é difícil PAMs positivamente carregados se ligarem a células de mamíferos que são ricos em fosfolípidos zwitteriônicos neutros (Nguyen *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2012).

Mas o mecanismo de ação clássico dos peptídeos envolve sua habilidade de causar dano a membrana celular, entre eles é possível destacar a formação de poros e a lise da bicamada da membrana. PAMs catiônicos demonstram a tendência a possuir múltiplos alvos que podem incluir a perturbação e a lise da membrana citoplasmática, processos macromoleculares que dependem da membrana, incluindo biossíntese da parede celular e divisão celular, e outros alvos intracelulares como RNA e síntese proteica (Fjell *et al.*, 2012).

Alguns modelos que podem explicar a ação de ruptura membranar, como o modelo barril, modelo poro toroidal e modelo carpete. No primeiro mecanismo, o modelo barril, o PAM se liga a superfície da membrana como um monômero, seguido de sua oligomerização e formação do poro. Monômeros recrutados podem aumentar o tamanho do poro, permitindo o extravasamento do conteúdo citoplasmático e consequentemente causando a morte celular. Nesse mecanismo as estruturas secundárias do peptídeo, como as hidrofóbicas α -hélice ou folha β são essenciais para formação de poros (Guilhelmelli *et al.*, 2013). Em contraste ao mecanismo barril, no mecanismo de poro toroidal as hélices do peptídeo são inseridas dentro da membrana e induzem as monocamadas de lipídeos a dobrarem continuamente através do poro e como consequência a membrana de lipídeos se torna intercalada com peptídeos formando o poro (Brogden, 2005; Guilhelmelli *et al.*, 2013)

. Segundo o mecanismo carpete a acumulação de PAMs α na superfície da membrana, atinge um limite de concentração de maneira a se reorientar para a formação de poros torodais. Eventualmente esses poros se fundem formando “ilhas” na membrana, o que leva a fragmentação da membrana via desestabilização global e micelização da bicamada. O colapso da membrana

descrito acima também é conhecido como modelo detergente (Guilhelmelli *et al.*, 2013; Phoenix *et al.*, 2013). Esses peptídeos são rapidamente bactericidas, matando as bactérias dentro de minutos após contato (Hancock, 1998).

Em sua descoberta do peptídeo magainina, Zasloff (1987) realizou ensaios bactericidas testando a atividade antibacteriana do extrato da pele de *Xenopus laevis* contra a cepa de *E. coli* D31, e também estudou o espectro antimicrobiano do peptídeo utilizando as frações de HPLC purificadas. Como resultado o extrato da pele demonstrou atividade antibacteriana, as frações analisadas mostraram dois componentes, que foram denominados magaininas. Portanto, o componente magainina 2 mostrou atividade antibiótica contra um numeroso espectro de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Zasloff *et al.*, 1988), um espectro similar foi descrito para magainina 1, ou seja os peptídeos de magainina são bactericidas.

Shillaci e colaboradores (2014) utilizaram o peptídeo paracentrin 1 (SP1) para avaliar sua atividade antibacteriana e antibiofilme contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas diversas. Sendo observada atividade antibacteriana contra todas as cepas, em especial cepas de *Staphylococcus* e *P. aeruginosa*, a atividade antibiofilme foi detectada contra cepas de *Staphylococcus* e *P. aeruginosa*. Portanto, a partir de análises estruturais e de dinâmica molecular os autores sugeriram que a conformação assumida por SP1 pode ser responsável pela atividade antimicrobiana apesar da estrutura α -hélice ser a mais comum em apresentar atividade antimicrobiana. O peptídeo SP1 demonstrou uma amplo espectro de atividade antimicrobiana contra patógenos importantes como *S. aureus* e *P. aeruginosa*, contudo ele age em altas concentrações contra as formas planctônicas dessas bactérias, essa baixa atividade é comparável a de um equinoderma, *Holothuria tubulosa* (Schillaci *et al.*, 2013), e a algumas proteínas da defesa inata humana, como a lactoferrina. Desta maneira, resultados de dinâmica molecular sugerem que essa fraca atividade pode ser devido a baixa estabilidade de SP1. Os resultados observados levaram os autores a concluir que o peptídeo SP1 representa um bom candidato para o desenho de novos peptídeos sintéticos com propriedades físico-químicas melhoradas.

Frente a esse cenário, é notável que os PAMs representam um grupo de moléculas promissoras para o tratamento de infecções, e a abordagem de desenho racional de peptídeos naturais ou bioinspirados busca reduzir o tamanho dos peptídeos, as atividade hemolíticas e citotóxicas, e ainda conservar ou aumentar a atividade antimicrobiana de maneira a reduzir os custos de produção do peptídeo.

1.6 Peptídeos derivados de *Pleuronectes americanus* e seus sintéticos

Diversas espécies de peixes da Antártida e polares secretam peptídeos anticongelantes em seu plasma de maneira a evitar o congelamento. Esses peptídeos foram divididos em famílias: a glicoproteína anticongelante AFP tipo I, que é rica em resíduos de alanina, a glicoproteína AFP tipo II, que é enriquecida com meio resíduo de cistina, e a glicoproteína AFP tipo III, a qual consiste em proteínas globulares (Gong *et al.*, 1996). Embora essas glicoproteínas sejam estruturalmente distintas, elas possuem a habilidade de inibir o crescimento de cristais de gelo se ligando a superfície do gelo e consequentemente reduzindo a temperatura de congelamento. Em peixes polares marinhos proteínas anticongelantes (AFP) são secretadas no sangue e em diversos tecidos, a família AFP tipo I foi caracterizada no peixe polar *Pleuronectes americanus*, por dois peptídeos de baixa massa molecular HPLC-6 (4000 Da) e HPLC-8 (3300 Da), ricos em resíduos de alaninas, com estrutura secundária em α -hélice e onze resíduos de aminoácidos (Migliolo *et al.*, 2012).

Migliolo e colaboradores (2012) utilizaram a técnica de desenho racional para a obtenção de quatro peptídeos (*Pa*-MAP, *Pa*-MAP 1.2, *Pa*-MAP 1.3 e *Pa*-MAP 1.4) numa primeira geração baseados diretamente nos peptídeos anticongelantes HPLC-6 e HPLC-8. Esses peptídeos foram sintetizados com modificações como a ausência do primeiro resíduo de aminoácido, metionina (códon de iniciação), desnecessário já que foi utilizada a síntese química para produção do peptídeo e um C-terminal amidado para aumento da proteção contra degradação proteolítica. Dentre estes foi destacado e sintetizado o peptídeo nomeado *Pa*-MAP, o qual possui múltiplas atividades como bactericida, antifúngica, antiviral e antitumoral. O peptídeo *Pa*-MAP (Figura 5)

foi utilizado como modelo e redesenhado racionalmente originando uma segunda geração de peptídeos derivados de *P. americanus* (*Pa*-MAP 1.5, *Pa*-MAP 1.6, *Pa*-MAP 1.7, *Pa*-MAP 1.8, *Pa*-MAP 1.9 e *Pa*-MAP 2.0).

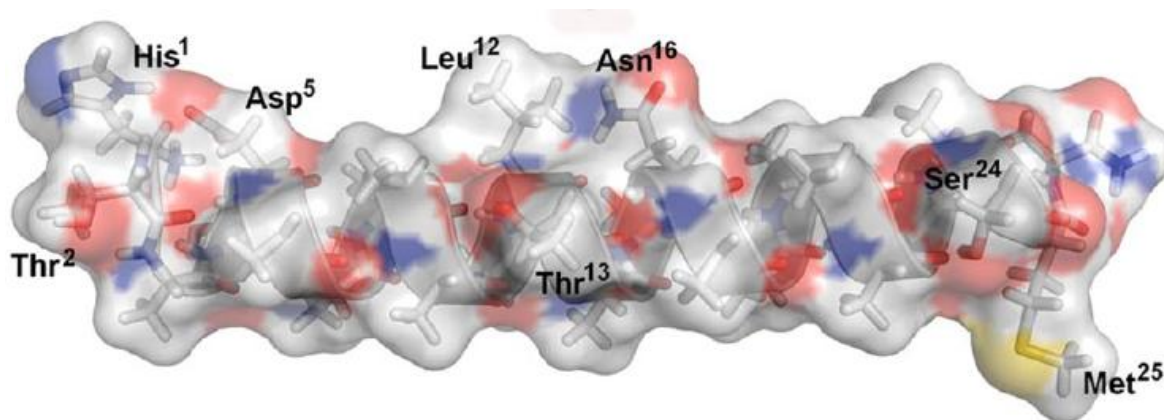


Figura 5. Estrutura secundária tridimensional predita para o peptídeo *Pa*-MAP com a superfície eletrostática. Em azul: resíduos polares básicos; em vermelho: superfície com resíduos ácidos; em amarelo: resíduos possivelmente envolvidos na interação com múltiplos alvos na membrana. Fonte: (Migliolo et al., 2012).

Dentre os peptídeos desenvolvidos por meio da abordagem de desenho racional, o peptídeo *Pa*-MAP 1.9 (NH₂-LAAKLTKAATKLTAALTKLAAALTAAT-COOH) (Figura 6) foi redesenhado e sintetizado através da estratégia F-moc e foi baseado na sequência do peptídeo multifuncional *Pa*-MAP, de modo a aumentar a carga e o momento hidrofóbico e reduzir a frequência de resíduos hidrofóbicos (desfavorecendo toxicidade) e distribuir resíduos de alanina para obtenção de um peptídeo catiônico linear com alongamentos helicoidais, favorecendo a anfipaticidade da molécula. O peptídeo foi analisado validado através de MALDI-ToF, com 95% de pureza e com íon de massa 2668.0 Da (Cardoso *et al.*, 2016).

Cardoso e colaboradores (2016) utilizaram cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas objetivando testar a habilidade de *Pa*-MAP 1.9 em inibir o crescimento de células planctônicas e de biofilme de diferentes bactérias. Os ensaios antibacterianos realizados demonstraram uma melhor atividade contra as cepas Gram-negativas *E. coli* (ATCC e KpC), *E. faecalis* (ATCC) e *K. pneumoniae* (ATCC e KpC), comparado com seu precursor *Pa*-MAP. Neste trabalho foi observado que a capacidade do peptídeo *Pa*-MAP 1.9

de causar alterações na membrana de bactérias Gram-negativas é dose dependente. Membranas biológicas foram mimetizadas através de vesículas lipídicas, para avaliação da interação peptídeo-membrana, onde *Pa*-MAP 1.9 demonstrou eficiência em romper vesículas com porções aniônicas. Desta maneira, o peptídeo *Pa*-MAP 1.9 demonstrou sua melhor atividade contra membranas de bactérias Gram-negativas que contenham uma superfície mais aniônica e baseada em uma composição lipídica. *Pa*-MAP 1.9 também não revelou atividade hemolítica contra eritrócitos humanos e nem atividade citotóxica contra células de monócito RAW 264.7. Em suma, *Pa*-MAP 1.9 demonstrou ser um candidato promissor para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas.

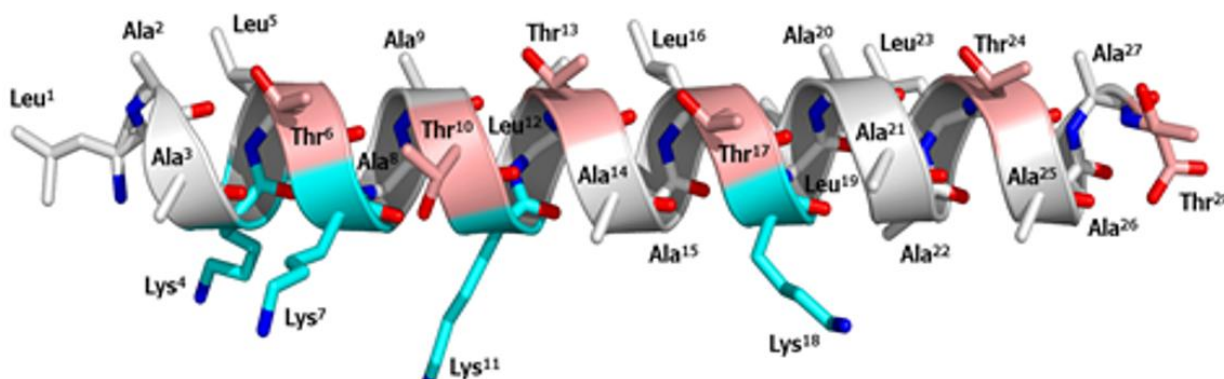


Figura 6. Modelo teórico tridimensional da estrutura secundária com menor energia livre obtido de *Pa*-MAP 1.9; em branco: resíduos apolares; em rosa: resíduos polares neutros; em ciano: resíduos básicos. Fonte: (Cardoso *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças infecciosas, em especial as infecções bacterianas, têm se apresentado como uma iminente ameaça à população, tendo em vista que as atuais terapias não conseguem se adequar ao rápido surgimento de organismos multirresistentes. As bactérias são frequentemente encontradas realizando associações resultantes em comunidades que se mantêm unidas por meio de uma matriz polissacarídica, determinado biofilme. Os biofilmes apresentam-se como uma forma ainda mais complexa de ser tratada quando comparados com a forma planctônica das bactérias e, têm sido motivo de preocupação em âmbito mundial. São usualmente associados a lesões graves e artefatos médicos implantados em pacientes, como cateteres. Em muitos casos, o crescimento bacteriano em forma de biofilmes pode reduzir drasticamente o potencial de antibióticos, devido à diversas modificações sofridas pelo microrganismo dentro do biofilme ou mesmo por uma dificuldade do antibiótico em ultrapassar a barreira de proteção da matriz do biofilme. Diante deste cenário torna-se de vital importância o estudo de PAMs e o estudo de sua atividade combinatória com antibióticos, uma vez que a ação antimicrobiana e antibiofilme e atividade combinatória podem ser novas alternativas de combater biofilmes bacterianos. Estudos recentes têm demonstrado eficácia na ação de PAMs. Dentro deste cenário, este trabalho buscou avaliar a ação do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 contra estirpes de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antibióticos carbapenems na forma de vida comunitária (biofilme) e em combinação com diferentes antibióticos utilizados na terapia clínica, visto que esta bactéria tem sido reconhecida como um patógeno nosocomial que afeta principalmente pacientes em unidades de tratamento intensivo.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a atividade antibacteriana e antibiofilme de um peptídeo antimicrobiano sintético redesenhado rico em alanina (*Pa*-MAP 1.9) derivado de *Pleuronectes americanus* e sua ação combinatória com o antibiótico de uso comercial meropenem, contra estirpes de *Klebsiella pneumoniae* KpC.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar a concentração de glicose e otimizar o crescimento *in vitro* de biofilmes de *K. pneumoniae* KpC
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 e dos antibióticos ciprofloxacino e meropenem contra estirpes de *K. pneumoniae* KpC.
- Determinar a concentração inibitória mínima de biofilmes (CIMB) do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 e dos antibióticos ciprofloxacino e meropenem contra estirpes de *K. pneumoniae* KpC.
- Determinar efeito sinérgico da combinação do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 e o antibiótico meropenem contra estirpes de *K. pneumoniae* KpC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese, determinação de pureza e quantificação do peptídeo

O peptídeo *Pa*-MAP 1.9 foi adquirido da empresa *Peptide 2.0 Uncorporated* (USA), responsável pela síntese do peptídeo com 95% de pureza por meio da técnica de síntese em fase sólida através da estratégia de F-moc (9-fluorenilmetoxycarbonila), a resina utilizada para o acoplamento dos resíduos de aminoácidos foi a *RINK amide*. Para análise de pureza, o peptídeo foi solubilizado em água ultrapura, misturada a uma solução saturada de matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (1:3), depositada em uma placa do tipo *MTP 384 massive*, e seca a temperatura ambiente. *Pa*-MAP 1.9 teve sua massa molecular exata determinada através de um espectrômetro de massa do tipo *MALDI-ToF/ToF Ultraflex III* (*Bruker Daltonics*). A calibração foi realizada utilizando *Peptide calibration standard II* (*Bruker Daltonics*) como padrão de massa molecular. Os valores teóricos obtidos pelo serviço online *Protein Prospector* foram comparados com os valores experimentais obtidos pelas análises do espectrômetro de massa.

4.2 Padronização da concentração de glicose adicionada ao meio de cultura para crescimento de células planctônicas e biofilmes de cepas de *K. pneumoniae* ATCC e KpC

Para a padronização da concentração de glicose no meio de cultura mínimo *Basal Medium 2* (BM2) [fosfato de potássio 62 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7 mM, MgSO_4 2 mM, FeSO_4 10 μM e 0,4% glicose], foram realizadas adições de diferentes concentrações de glicose (0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% e 1%). Foram utilizadas as cepas de *K. pneumoniae* ATCC 13883, adquirida do *American Type Culture Collection* (ATCC), e as estirpes de *K. pneumoniae* KpC 002210477 e 001450421 gentilmente cedidas por um hospital de Brasília, sendo provenientes de casos clínicos. As cepas foram semeadas em placas Petri contendo o meio de cultura Müller-Hinton ágar (MHA) (Kasvi), as quais foram incubadas a 37 °C por 12 h, a umidade foi mantida com papéis umedecidos com água destilada em placas Petri mantidas dentro da estufa.

Após crescimento, três colônias de cada cepa foram retiradas de cada placa e inoculadas em 5 mL de caldo Müller-Hinton (MHB) (Kasvi), sendo cultivadas por 16 h, incubadas em agitador (Novatecnica) a 37°C, 200 rpm. Após incubação *overnight*, foram transferidos 10 µL da suspensão para uma placa de 96 poços contendo 100 µL de meio BM2, foram transferidos para a placa 100 µL de meio BM2, utilizado como controle negativo. A placa de cultura foi incubada a 37° C durante 24 h. A densidade óptica (DO) das réplicas foi mensurada através de leitura em leitor de microplacas *Multiskan Go* (*Thermo Scientific*), onde foi utilizado para as células planctônicas o comprimento de onda de 600 nm. Após a remoção das células planctônicas, as placas foram tratadas como descrito posteriormente no tópico 4.3. Esse procedimento permitiu que os biofilmes formados fossem corados e mensurados.

4.3 Coloração de biofilme com cristal violeta

Para coloração do biofilme foram utilizados os protocolos adaptados de Christensen (1985) e Stepanović (2000). Brevemente, foi preparada uma solução estoque de cristal violeta a 2,3% (m:v), o qual foi diluído em etanol 20% (v:v) para a obtenção da solução de trabalho de 0,1% (v:v). Após 24 h de crescimento, as células planctônicas foram mensuradas e as mesmas descartadas. Em seguida, a placa foi lavada duas vezes com água destilada e foi deixada para secar a temperatura ambiente. Foi adicionado à placa, cristal violeta 0,1% no volume de 110 µL e incubada por 20 min. A placa foi lavada novamente com água destilada por duas vezes e deixada para secar a temperatura ambiente. As células aderidas foram coradas e ressuspensas em etanol 60% no volume de 120 µL, a DO foi mensurada em leitor de microplacas *Multiskan Go* (*Thermo Scientific*) no comprimento de onda de 595 nm.

4.4 Curva de crescimento de biofilme de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* ATCC e KpC

Para determinação do ponto ótimo de formação de biofilmes foram utilizadas cepas da bactéria *K. pneumoniae* ATCC 13883, KpC 002210477 e 001450421. As cepas foram semeadas em placa Petri com meio MHA e incubadas a 37°C, por 24 h. Após crescimento em placa, foram retiradas três

colônias e realizadas culturas *overnight* por 16 h em caldo MHB. Foram montadas sete microplacas de 96 poços com três réplicas biológicas e quatro réplicas técnicas de cada cepa, conforme apêndice 1. Foram depositados 100 µL de meio de cultura BM2 e 10 µL da cultura em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C por 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h e 48 h. Após o período de cada incubação, os biofilmes foram corados com 110 µL de cristal violeta 0,1% e ressuspensos em 120 µL de etanol 60%, a densidade óptica das culturas foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

4.5 Determinação da concentração inibitória mínima do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 e dos antibióticos fluoroquinolona ciprofloxacino e carbapenem meropenem contra estirpes de *K. pneumoniae*

Para o ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado o método de microdiluição em caldo de acordo com M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory* (Wayne, 2012) em microplacas de 96 poços, foram utilizadas as cepas da bactéria *K. pneumoniae* ATCC 13883, KpC 002210477 e 001450421. As estirpes foram semeadas em placa Petri com meio MHA e incubadas a 37°C, por 24 h. Após crescimento em placa, foram retiradas três colônias e realizadas culturas por 16 h em caldo MHB, foram monitoradas as densidades ópticas das cepas em espectrofotômetro (*Eppendorf Biophotometer*) na densidade de 600nm até que as cepas de *K. pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* KpC 002210477 e *K. pneumoniae* KpC 001450421 atingissem as DOs determinadas após as padronizações provenientes da curva de crescimento. Foram montadas três placas de 96 poços com três réplicas biológicas e duplicatas técnicas, conforme ilustrado no apêndice 2. O peptídeo *Pa*-MAP 1.9 foi diluído em meio MHB (v:v) nas concentrações de 2 µg.mL⁻¹ até 64 µg.mL⁻¹. O mesmo passo de diluição e as mesmas concentrações foram utilizados para os antibióticos ciprofloxacino e meropenem. As microdiluições foram realizadas em 50 µL de meio de cultura para cada agente antimicrobiano, em seguida foram adicionados aos poços da microplaca os 50 µL de peptídeo e 50 µL de antibióticos aos poços restantes, também foram adicionados 50 µL das suspensões bacterianas ajustadas (1x10⁶ ufc) nos poços contendo o peptídeo e os antibióticos. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h,

após incubação as densidades ópticas foram mensuradas em leitor de microplacas *Multiskan Go* (*Thermo Scientific*) na DO de 600nm.

4.6 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) contra estirpes de *K. pneumoniae*

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi utilizada a metodologia de microgota de acordo M26-A do *National Committee for Clinical Laboratory* (Wayne, 2012). Foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada réplica técnica dos poços da microplaca utilizada para o ensaio de determinação da CIM, em que nenhum crescimento bacteriano foi detectado. Cada gota foi depositada em meio MHA e incubada a 37° C por 24 h. Após incubação as placas foram visualizadas em um contador de colônias para a contagem do crescimento de colônias bacterianas e para a determinação da ação bactericida ou bacteriostática do agente antimicrobiano .

4.7 Determinação da concentração inibitória mínima de biofilmes (CIMB) contra estirpes de *K. pneumoniae*

No ensaio de concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) foram utilizadas as cepas da bactéria *K. pneumoniae* ATCC 13883, KpC 002210477 e 001450421. As estirpes foram semeadas em placas de Petri com meio MHA e incubadas a 37°C, por 24 h. Após crescimento em placa, foram retiradas três colônias e realizadas culturas por 16 h em caldo MHB, após crescimento a suspensão passou por uma diluição de 1:100 (v:v) em meio BM2. Foram montadas três microplacas de 96 poços com triplicatas biológicas e duplicatas técnicas conforme ilustrado no apêndice 3. O peptídeo *Pa*-MAP 1.9 foi diluído em meio BM2 (v:v) nas concentrações de 2 µg.mL⁻¹ a 64 µg.mL⁻¹. O mesmo passo de diluição foi realizado para os para os antibióticos ciprofloxacino e meropenem. As microdiluições foram realizadas em 50 µL de meio de cultura para cada agente antimicrobiano, em seguida foram adicionados aos poços da microplaca os 50 µL de peptídeo e 50 µL de antibióticos aos poços restantes da microplaca, também foram adicionados 50 µL das suspensões bacterianas. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h, após incubação as densidades

ópticas foram mensuradas em leitor de microplacas *Multiskan Go* (*Thermo Scientific*) a DO de 600nm para células planctônicas, as microplacas foram coradas com cristal violeta 0,1% como descrito no tópico 4.3, então as densidades ópticas dos biofilmes foram mensuradas em leitor de microplacas *Multiskan Go* (*Thermo Scientific*) na DO de 595nm.

4.8 Ensaio de sinergismo de *Pa*-MAP 1.9 em combinação com meropenem

Para o ensaio de sinergismo foram utilizadas combinações de *Pa*-MAP 1.9 com o antibiótico meropenem nas concentrações de 64-2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi realizado o método de tabuleiro de xadrez como descrito por Pillai (2005). Foram depositados em microplaca de 96 poços, 10 μL de peptídeo ao longo das colunas e foram depositados mais 10 μL do antibiótico ao longo das linhas, as microplacas estavam previamente preenchidas com 50 μL de meio BM2. Após microdiluição foi acrescentado a microplaca, 30 μL de cultura bacteriana das cepas *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *K. pneumoniae* KpC 002210477 e 001450421. As microplacas foram incubadas durante 24 h a 37°C, o crescimento planctônico e de biofilmes foi mensurado com leitor de microplacas *Multiskan Go* (*Thermo Scientific*), os comprimentos de onda utilizados foram 600nm e 595nm respectivamente. Os resultados foram relatados em forma de índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), determinado como: $\text{ICIF} = \frac{[A]}{\text{CIMA}} + \frac{[B]}{\text{CIMB}}$, onde CIMA e CIMB são as CIM dos compostos antimicrobianos sozinhos [A] e [B] são as CIMs de A e B quando combinados. ICIF foi interpretado como segue: $\text{ICIF} \leq 0.5$, efeito sinérgico; $0.5 < \text{ICIF} < 1$, efeito aditivo; $1 < \text{ICIF} \leq 2$, efeito indiferente; $\text{ICIF} > 2$ efeito antagonista.

5. RESULTADOS

5.1 Síntese, determinação de pureza e quantificação do peptídeo

Como descrito anteriormente por Cardoso e colaboradores (2016) o peptídeo *Pa*-MAP 1.9 foi sintetizado através da técnica de fase sólida F-moc. *Pa*-MAP 1.9 teve sua pureza analisada através de MALDI-ToF, onde foi detectado um íon de 2668,0 Da (Figura 7), e grau de pureza acima de 95%. A massa detectada está de acordo com a massa teórica esperada para o peptídeo, seu grau de pureza manteve-se dentro do desejado (acima de 95%) tornando-o viável para experimentos posteriores. Com o método de

quantificação de Murphy e Kies (1960) foi estimada uma concentração aproximada de $10,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ de *Pa*-MAP 1.9.

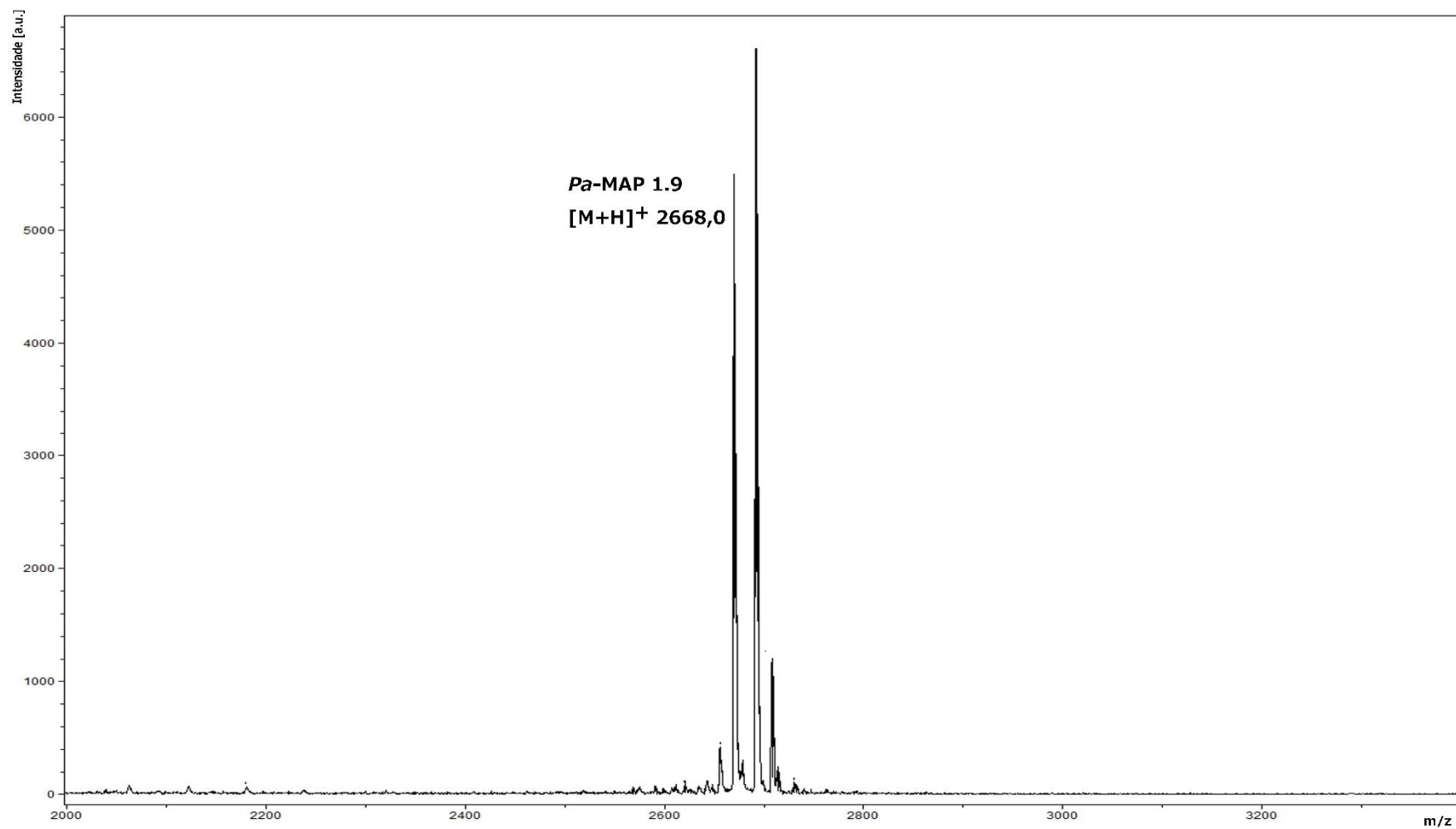


Figura 7. Análise de *Pa*-MAP 1.9 por espectrometria de massa revelando um íon de massa monoisotópica $[M+H]^+ = 2668,0$ m/z .

5.2 Determinação da concentração de glicose em meio BM2 para crescimento ótimo de células planctônicas e biofilmes de estirpes de *Klebsiella pneumoniae*

De acordo como os dados obtidos durante a avaliação da otimização do crescimento celular em placa de 96 poços com diferentes concentrações de glicose suplementadas ao meio BM2 (Tabela 1), não foi observada real diferença no crescimento das cepas sob influência da glicose, tanto para o crescimento planctônico como de biofilmes. Portanto, foi definido que a concentração de glicose determinada para experimentos posteriores seria a concentração padrão do meio BM2, de 0,4% como descrito por Hancock e Carey (1979).

Tabela 1. Determinação do crescimento ótimo de células planctônicas e biofilme de estirpes de *K. pneumoniae* em meio BM2 em diferentes concentrações de glicose de 0,4-1%. Crescimento foi monitorado em placa de 96 poços com incubação por 24 h a 37 °C. O crescimento de células planctônicas foi mensurado através de espectrofotometria a 600nm, a formação de biofilme foi acessada através da coloração com cristal violeta 0,1% e mensurada por espectrofotometria a 595nm, foi utilizada a unidade de medida unidade de absorbância (UA).

Cepas/formas de vida	Sem glicose	Concentrações de glicose (%)						
		0,4%	0,5%	0,6%	0,7%	0,8%	0,9%	1%
ATCC 13883 planctônica	0,89	1,08	1,11	1,16	1,15	1,03	1,15	1,07
ATCC 13883 biofilme	0,40	0,76	0,62	0,55	0,73	0,57	0,64	0,67
KpC 001825971 planctônica	**	0,72	0,65	0,85	1,08	1,05	1,05	0,73
KpC 001825971 biofilme	**	0,98	0,93	1,08	1,04	0,94	0,96	1,06
KpC 002210477 planctônica	1,04	1,21	1,25	1,26	1,27	1,29	1,28	1,28
KpC 002210477 biofilme	0,92	0,78	0,73	0,66	0,82	0,75	0,70	0,78
KpC 001450421 planctônica	1,14	1,35	1,40	1,38	1,45	1,48	1,41	1,47
KpC 001450421 biofilme	1,41	1,40	1,16	1,15	1,24	1,24	1,33	1,29

**Sem dado disponível

5.3 Curva de crescimento exponencial de estirpes de *K. pneumoniae*

Os crescimentos exponenciais das cepas *K. pneumoniae* ATCC 13883, KpC 002210477 e KpC 001450421 foram comparados ao crescimento da cepa KpC 001825971 pois o crescimento desta cepa já havia sido padronizada com a realização de uma curva de crescimento comparando a cepa ATCC 13883 e a cepa KpC 001825971 de *K. pneumoniae* com uma cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 8A e B). O crescimento de células planctônicas de todas as estirpes ATCC 13883 e KpC 002210477 e 001450421 em meio BM2 foi semelhante, elas atingiram um ponto de intersecção as 6 h e depois continuaram a crescer (Figura 9A), as cepas ATCC 13883 e KpC 001450421 apresentaram crescimentos planctônicos mais satisfatórios com 48 h atingindo a D.O de 0,73 UA e 0,76 UA respectivamente (Figura 9A). O crescimento de biofilme demonstrou que a cepa ATCC não teve uma boa formação de biofilme atingindo no máximo a D.O de 0,12 UA, as cepas KpC em contrapartida mostraram formação de biofilme satisfatória, dentre as quais a melhor formadora de biofilme foi a estirpe KpC 001450421 atingindo a D.O de 1.37 UA (Figura 9B).

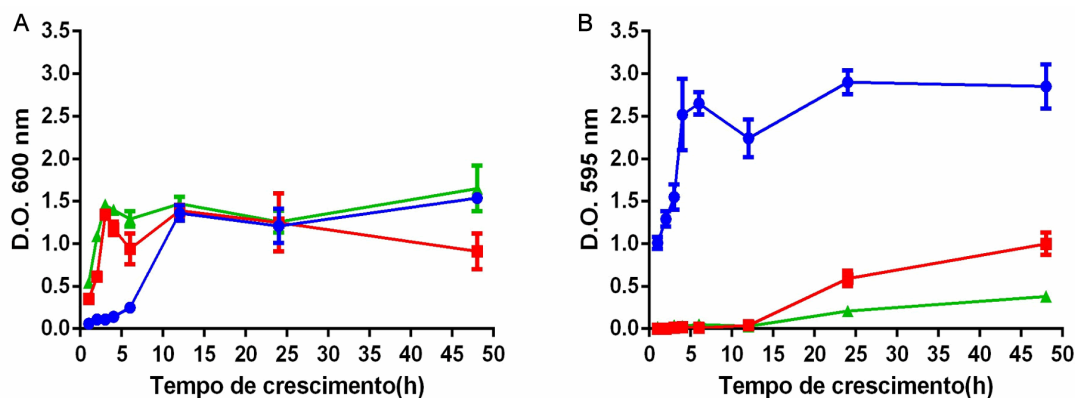


Figura 8. Curvas de padronização do crescimento exponencial de células planctônicas (A) e biofilme (B) no meio de cultura BM2 durante 48 h na placa de 96 poços. Os símbolos correspondem a *P. aeruginosa* ATCC 27853 (●) em azul, (■) *K. pneumoniae* ATCC 1883 em vermelho e (▲) *K. pneumoniae* KpC 001825971 em verde.

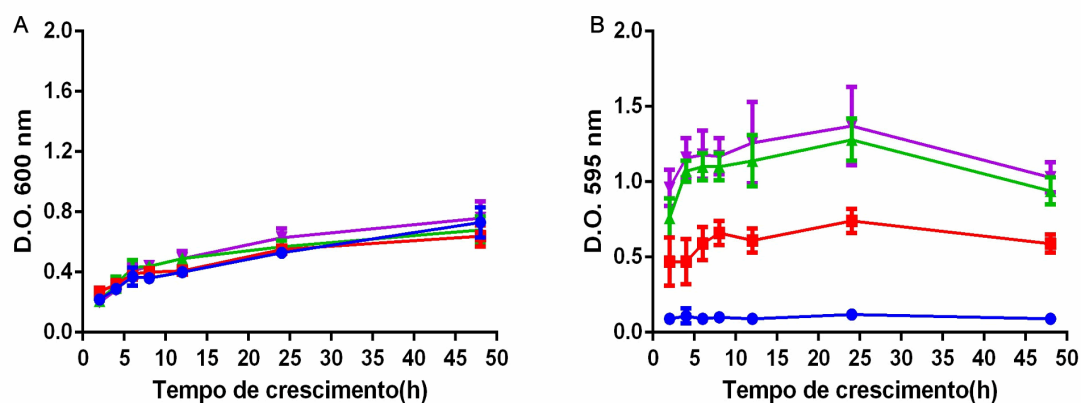


Figura 9. Curvas de crescimento exponencial de células planctônicas (A) e biofilme (B) no meio de cultura BM2 durante 48 h na placa de 96 poços. Os símbolos correspondem a *K. pneumoniae* ATCC 13883 (-●-) em azul, (-■-) *K. pneumoniae* KpC 001825971 em vermelho, (-▲-) *K. pneumoniae* KpC 002219477 em verde e (-▼-) *K. pneumoniae* KpC 001450421 em roxo.

5.4 Ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB)

A menor concentração inibitória mínima (CIM) observada para *Pa*-MAP 1.9 foi maior que as concentrações observadas para os antibióticos utilizados como controle desse experimentos. No ensaio de concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB), o peptídeo *Pa*-MAP 1.9 foi avaliado quanto a sua capacidade de inibir a formação de biofilmes de cepas de *K. pneumoniae*, e foi avaliada também a ação dos antibióticos ciprofloxacino e meropenem na inibição. A maior concentração utilizada foi 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para todos os agentes antimicrobianos nos ensaios de CIM e CIMB (Tabela 2).

O peptídeo *Pa*-MAP 1.9 foi mais eficiente frente a ambas as cepas KpC para biofilmes, o antibiótico ciprofloxacino foi eficiente biofilmes formados das cepas ATCC e ambas as KpC, mas a melhor atividade observada foi contra a cepa ATCC 13883 em ambos os ensaios. O antibiótico meropenem apresentou atividade similar em ambos os ensaios de CIM e CIMB frente as cepas ATCC e ambas KpC.

. Os resultados levam à conclusão de que *Pa*-MAP 1.9 apresenta atividade sutilmente melhor que o antibiótico meropenem, enquanto que

ciprofloxacino se apresentou como melhor antimicrobiano utilizado neste estudo tanto no combate a células planctônicas quanto biofilmes.

Tabela 2. Avaliação da atividade antibiofilme do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 e dos antibióticos ciprofloxacino e meropenem contra células planctônicas (CIM) em meio MHB e células de biofilme (CIMB) em meio BM2, em cepas de *K. pneumoniae* ATCC 13883, KpC 002210477 e KpC 001450421. Valores apresentados em μM .

Estirpes de <i>K. pneumoniae</i>	<i>Pa</i> -MAP 1.9		Ciprofloxacino		Meropenem	
	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB
ATCC 13883	>64	>64	2	2	32	32
KpC002210477	64	32	>64	4	>64	>64
KpC001450421	64	32	>64	4	>64	>64

5.5 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

No ensaio de concentração bactericida mínima foi realizada a confirmação do resultado obtido no ensaio de CIM, as concentrações de antimicrobianos utilizadas para determinação de CBM para todas as cepas foram de 32 e 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, onde para a cepa ATCC 13883 (Figura 10A) o peptídeo *Pa*-MAP 1.9 na concentração de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não demonstrou atividade. Já a concentração de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *Pa*-MAP 1.9 frente as cepas KpC 002210477 (Figura 10B) e KpC 001450421 (Figura 10C), demonstrou atividade bacteriostática. Frente as cepas ATCC 13883 (Figura 10A) e KpC 002210477 (Figura 10B) o peptídeo *Pa*-MAP 1.9 demonstrou atividade bactericida na concentração de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para a cepa KpC 001450421 (Figura 10C) a concentração de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 demonstrou atividade bacteriostática.

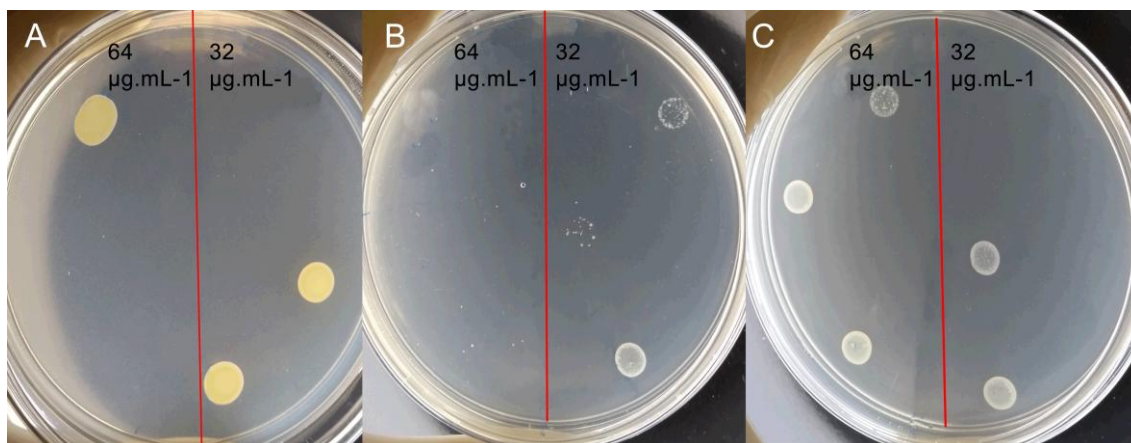


Figura 10. Determinação da concentração bactericida mínima para a confirmação do resultado obtido no ensaio de CIM com *Pa*-MAP 1.9 realizado com cepas de *Klebsiella pneumoniae*, as letras correspondem a *K. pneumoniae* ATCC 13883 (A); *K. pneumoniae* KpC 002210477 (B); *K. pneumoniae* KpC 001450421 (C) As placas foram divididas ao meio, para todas as cepas foram inoculadas as mesmas concentrações, do lado esquerdo 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, do lado direito 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.5 Ensaio de sinergismo de *Pa*-MAP 1.9 em combinação com meropenem

Na investigação de atividade combinatória através do método de tabuleiro de xadrez (do inglês, *checkerboard*) as concentrações utilizadas para todos os agentes antimicrobianos foram de 2 – 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra todas as cepas. No ensaio realizado frente à cepa ATCC 13883, o peptídeo *Pa*-MAP 1.9 quando combinado com meropenem o efeito obtido foi indiferente. Para ambas as cepas KpC 002210477 e 001450421 a combinação demonstrou efeito antagonista (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da atividade combinatória de *Pa*-MAP 1.9 em combinação com meropenem contra as estirpes de *K. pneumoniae* ATCC 13883, KpC 002210477 e KpC 001450421, ensaio realizado em microplacas de 96 poços. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Valores expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Estirpes de <i>K. pneumoniae</i>	CIMB de meropenem	CIMB de meropenem + <i>Pa</i> -MAP 1.9	CIMB de <i>Pa</i> -MAP 1.9 + meropenem	ICIF de <i>Pa</i> -MAP 1.9 + meropenem
ATCC 13883	32	64	2	1
KpC 002210477	64	64	64	3
KpC 001450421	64	64	64	3

*Interpretação das atividades combinatórias, efeito aditivo (Adt), efeito indiferente (Ind) e efeito antagonista (Ant), sinergismo (Sin).

**ICIF foi interpretado como segue: $\text{ICIF} \leq 0.5$, efeito sinérgico; $0.5 < \text{ICIF} < 1$, efeito aditivo; $1 < \text{ICIF} \leq 2$, efeito indiferente; $\text{ICIF} > 2$ efeito antagonista.

6. DISCUSSÃO

Fora de ambientes controlados como laboratórios, as bactérias raramente se encontram em espaços ricos em nutrientes como os meios de cultura (Jefferson, 2004). Desta forma, meios mínimos são frequentemente utilizados como alternativas em busca da similaridade ao número reduzido de nutrientes encontrados no nicho natural. Uma diversa gama de estudos relatam uma melhor formação de biofilmes em meios de cultura com limitação de nutrientes, podendo o sucesso de formação estar associado ao estresse causado pela limitação destes compostos, visto que é especulado que as células que crescem em biofilmes experimentem alguma forma de limitação de nutrientes (Mah e O'toole, 2001; Hindre *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitaram a observação da formação de biofilmes de cepas de *K. pneumoniae* em um meio de cultura pobre em nutrientes, aqui foi utilizado o meio de cultura BM2 como descrito anteriormente (Figura 9B). O resultado de formação de biofilme observado foi consistente com estudos realizados previamente, que confirmam a eficácia do meio BM2 para a formação de biofilmes de cepas de *P. aeruginosa* em testes de atividade antibiofilme do peptídeo 1037 (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2012). O meio BM2 também foi utilizado para formação de biofilmes de estirpes de *P. aeruginosa*, *S. aureus* MRSA, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *Burkholderia cenocepacia* para realizar testes com o peptídeo antibiofilme IDR-1018 (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2014). Ademais, visando a análise da atividade erradicatória de diversos peptídeos D-enantioméricos, foram formados biofilmes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* com a utilização do meio BM2 (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2015), confirmando mais uma vez sua eficiência como meio mimético de ambientes favoráveis à formação de biofilmes. Ainda tendo em mente a formação de biofilmes, foi realizado estudo comparativo entre o meio mínimo BM2, e os meios ricos em nutrientes Luria-Bertani (LB) e Todd Hewitt, para a formação de biofilmes de isolados clínicos de *K. pneumoniae*, sendo evidenciado a massa aumentada de biofilme quando formados no meio mínimo BM2 (Ribeiro, 2014a).

É descrito ainda, que a utilização de glicose como uma fonte de carbono em meios mínimos auxiliam no crescimento de biofilmes. Em seu trabalho, Shu e colaboradores (2000) utilizaram as bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus*

sobrinus, *Actinomyces naeslundii* e *Lactobacillus rhamnosus* e diversos meios de cultura para desenvolvimento de biofilmes. Os autores observaram que a glicose exerce influência na fisiologia do biofilme, visto que o metabolismo da mesma leva a acumulação de produtos ácidos de maneira a reduzir o pH do meio da cultura. Contudo, existe divergência quanto a concentração de glicose utilizada, variando entre 0,4% (Yeung *et al.*, 2011; De La Fuente-Núñez *et al.*, 2014; Guilhen *et al.*, 2016) e 1% (Cerca *et al.*, 2011; Carvalhais *et al.*, 2014) de glicose.

Os resultados obtidos neste trabalho para formação de biofilmes de *K. pneumoniae* em diferentes concentrações de glicose (Tabela 1) demonstram que, mesmo sem adição alguma de glicose (0%), células planctônicas conseguem se desenvolver normalmente e os biofilmes são capazes de se formar com sucesso. Estes dados sugerem que não há real diferença em relação a concentração de glicose utilizada para as cepas estudadas. Apesar destes resultados, tendo em vista a usual necessidade de fontes de carbono que os organismos vivos apresentam para sobreviver, foi definida a utilização de 0,4% de glicose, de modo a padronizar este trabalho conforme proposto previamente por de la Fuente-Núñez e colaboradores (2012) e Ribeiro (2014a).

As cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes representam um problema global, devido principalmente a emergência de isolados produtores de carbapenemase e sua habilidade na formação de biofilmes, fatores que frequentemente resultam em opções de terapia muito limitadas (Jayol *et al.*, 2014). Portanto, diversas alternativas tem sido propostas nos últimos anos na tentativa do desenvolvimento de um tratamento eficiente contra biofilmes bacterianos, como por exemplo o desenvolvimento de drogas mais versáteis e potentes (Bjarnsholt *et al.*, 2013). Além disso, moléculas recentemente caracterizadas tem inspirado o desenho molecular para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Essa abordagem é baseada em estratégias antimicrobianas que se provaram eficazes durante milênios (Zaslhoff, 2002).

Os resultados apresentados a seguir tiveram a unidade de medida convertida de $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para μM , devido aos dados apresentados por Cardoso e colaboradores (2016) estarem discriminados na unidade μM , de maneira a se tornarem dados comparativos. Uma vez estabelecida com sucesso a formação de biofilmes de *K.*

pneumoniae in vitro, a atividade antibiofilme do peptídeo polialanina bioinspirado *Pa*-MAP 1.9 foi avaliada frente à cepas de *K. pneumoniae* KpC, tendo como ponto de partida o estudo de Cardoso e colaboradores (2016), que previamente descreveram atividade antibiofilme promissora contra cepas ATCC 13883 e KpC 001825971. No presente estudo foi observado que frente a cepa ATCC 13883 (cepa controle) o resultado de CIM obtido foi 24 μM (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), corroborando com o resultado obtido por Cardoso e colaboradores (2016), a CIMB obtida também foi 24 μM (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Pensando na utilização de PAMs melhorados na terapia antimicrobiana, Jiang e colaboradores (2008) realizaram testes com alterações de carga no peptídeo em α -hélice L-V13K, objetivando a visualização dos efeitos das alterações na carga líquida nas atividades biológicas, os testes foram realizados com bactérias Gram-positivas e negativas. O aumento da carga líquida em +4 fez com que o peptídeo apresentasse atividade frente cepas suscetíveis de *Salmonella typhimurium* e *P. aeruginosa* com o resultado de CIM $>64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, semelhante ao obtido por *Pa*-MAP 1.9 neste trabalho, frente a cepa suscetível de *K. pneumoniae*. Em contrapartida, Zhang e colaboradores (2010) realizaram testes com o peptídeo isolado da secreção de *Phyllomedusa sauvagei*, PSN-1, de maneira a descrever sua atividade antibacteriana e antibiofilme contra cepas bacterianas Gram-positiva e negativas, demonstrando CIM $>128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (80 μM) contra cepa *E. coli* susceptível e apresentando o CIM $>8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (5 μM) contra cepa de *S. aureus* suscetível. Utilizando uma abordagem similar às já descritas aqui, Grassi e colaboradores (2017) utilizaram três peptídeos TB, TB_L1FK e TB_KKG6A, análogos ao peptídeo temporin 1Tb, obtendo valores de CIM $>64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra as bactérias Gram-negativas para todos os peptídeos, semelhante ao resultado obtido neste trabalho com *Pa*-MAP 1.9. Já contra biofilmes de *P. aeruginosa* o resultado de CIMB obtido foi $>128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para os três peptídeos testados, demonstrando divergência com o resultado obtido neste trabalho. Desta maneira, é possível inferir que os PAMs aqui comparados, apesar de serem de origens e estruturalmente diferentes, apresentaram atividade semelhante aos ensaios antimicrobianos, porém foram divergentes quanto os resultados dos ensaios antibiofilme contra diferentes bactérias Gram-negativas.

Frente a ambas as cepas KpC 002210477 e 001450421 *Pa*-MAP 1.9 apresentou resultados de CIM 24 μM (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e de CIMB 12 μM (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$),

comparados aos resultados obtidos por Cardoso e colaboradores (2016) frente a cepa KpC 001825971 houve divergência dos valores de CIM 96 μM e CIMB 1.1 μM . Os resultados obtidos por Cardoso e colaboradores (2016) evidenciaram a presença da atividade antibiofilme de *Pa*-MAP 1.9 contra a cepa de *K. pneumoniae* KpC testada em seu trabalho. Em contrapartida, Ribeiro (2014a) testou uma série de pequenos peptídeos catiônicos contra biofilme da cepa de *K. pneumoniae* KpC 001450421 realizando uma triagem de modo a selecionar aqueles com atividade mais promissora. A maioria dos peptídeos testados demonstraram valores de CIM e CIMB variando entre 32 e $>64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, desta forma comparando os resultados obtidos por Ribeiro (2014a) com os resultados obtidos neste trabalho é possível evidenciar a necessidade de uma alta concentração dos peptídeos testados e do *Pa*-MAP 1.9 para detectar atividade frente a diferentes cepas de *K. pneumoniae* KpC.

Também foi avaliada a atividade antibacteriana e antibiofilme do antibiótico meropenem frente a isolados clínicos de *K. pneumoniae* KpC. Os ensaios frente a cepa ATCC 13883 apresentaram resultados de CIM e CIMB iguais a $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$, corroborando com o resultado obtido por Tenover e colaboradores (2006), que ao testarem os antibióticos imipenem e meropenem contra isolados clínicos de *K. pneumoniae*, obtiveram valores de CIM descritos para ambos os antibióticos $>16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Frente as cepas KpC os valores de CIM encontrados neste trabalho foram $>64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, resultados similares foram reportados por Shields e colaboradores (2017) ao realizarem ensaios de CIM com meropenem e ceftazidima-avibactam frente cepas de *K. pneumoniae* KpC, de modo a avaliar as mutações apresentadas pelos genes de resistência. Ribeiro (2014a) também descreveu resultados de MIC $>64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o antibiótico meropenem testado contra cepas de *K. pneumoniae*. Os resultados obtidos não surpreendem, visto que a cepa ATCC utilizada neste trabalho é suscetível ao antibiótico β -lactâmico. Portanto meropenem exerce uma atividade inibitória sob esta cepa. O resultado frente as cepas resistentes também era esperado, devido a inativação do antibiótico por possível hidrólise do seu anel β -lactâmico.

Seguidamente, foi avaliada a concentração bactericida mínima de *Pa*-MAP 1.9 frente as cepas de *K. pneumoniae* utilizadas no presente trabalho. Foi observado que a concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou ação bactericida para as cepas ATCC 13883 e KpC 002210477 enquanto que a concentração de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstrou

atividade apenas para a cepa KpC 002210477, possuindo efeito bacteriostático. Para a cepa KpC 001450421 ambas as concentrações de 64 e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstraram atividade bacteriostática. Esses resultados sugerem que *Pa*-MAP 1.9 possui seletividade em sua atividade antibacteriana, visto que frente a cepa ATCC 13883 demonstrou atividade apenas na maior concentração utilizada, e frente as cepas KpC 002210477 e 001450421 a atividade de *Pa*-MAP 1.9 foi bactericida na maior concentração, e bacteriostática na concentração duas vezes mais baixa respectivamente, corroborando com o trabalho de Cardoso e colaboradores (2016).

Efetuados os ensaios de CIM e CIMB e estabelecidos seus valores, foi realizado ensaio de inibição em combinação de *Pa*-MAP 1.9 e meropenem utilizando a abordagem de tabuleiro de xadrez. Apesar de separadamente eles apresentarem atividades antimicrobianas detectáveis pelos métodos utilizados neste trabalho, sua combinação demonstrou efeito indiferente frente a cepa ATCC 13883 e frente as cepas KpC 002210477 e 001450421 o efeito apresentado foi antagonista. Este resultado diverge do obtido por Ribeiro (2014a), no qual foram combinados o peptídeo DJK-6 e seis antibióticos, os valores obtidos para a combinação de DJK-6 e meropenem foram de 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ indicando efeito sinérgico entre os agentes antimicrobianos. Nesse mesmo sentido, Gopal e colaboradores (2014) realizaram ensaios de sinérgismo testando quatro peptídeos em combinação com três antibióticos, obtendo resultado similar ao encontrado no presente trabalho com *Pa*-MAP 1.9. A combinação entre o peptídeo HPME e cefotaxime demonstrou efeito indiferente.

Os resultados aqui observados sugerem que não houve favorecimento da atividade de *Pa*-MAP 1.9 contra biofilmes de *K. pneumoniae* ATCC 13883 suscetível e KpC resistentes em combinação com meropenem, visto que efeitos detectados foram indiferentes e antagonista, respectivamente de modo a anular a atividade previamente descrita de *Pa*-MAP 1.9.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados reportados neste trabalho permitiram a caracterização da atividade antibacteriana e antibiofilme do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 frente a diferentes estirpes de *K. pneumoniae* KpC, complementando os dados previamente reportados no trabalho realizado por Cardoso e colaboradores (2016). Os dados de inibição de crescimento planctônico e inibição de biofilme comparados entre si demonstram que *Pa*-MAP 1.9 possui seletividade por cepas resistentes, visto que a concentração necessária para inibir o crescimento das cepas resistentes foi 64 e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e as concentrações inibitórias para as cepas suscetíveis foram $>64 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Interessantemente *Pa*-MAP 1.9 demonstrou atividade bactericida total na maior concentração testada frente a cepa KpC 002210477, não foi observada a mesma atividade em nenhuma outra cepa testada neste trabalho. O ensaio de MBC também apresentou a atividade bacteriostática apenas frente as cepas KpC, sugerindo a seletividade da atividade do peptídeo contra cepas resistentes KpC.

Em relação ao ensaio combinatório, *Pa*-MAP 1.9 não obteve efeito sinergístico quando associado ao antibiótico meropenem, seu efeito frente a cepa ATCC 13883 foi indiferente e frente as cepas KpC 002210477 e 001450421 foi antagonista. Sugerindo que o peptídeo *Pa*-MAP 1.9 frente as estirpes utilizadas neste trabalho não agiu em conjunto com meropenem de modo a reduzir o biofilme formado. Assim sendo, os resultados obtidos demonstram que *Pa*-MAP 1.9 possui atividade antibacteriana e antibiofilme contra estirpes de *K. pneumoniae* KpC de forma a indicar a necessidade de estudos aprofundados sobre os mecanismos expressos por biofilmes de *K. pneumoniae* KpC sob ação e estresse de *Pa*-MAP 1.9 em nível transcritômico e proteômico, por exemplo. Tais estudos possibilitariam a comparação das informações geradas, de forma a aumentar o conhecimento sobre como essa bactéria reage ao estresse causado por um peptídeo catiônico. Essas informações podem ser altamente atrativas para pesquisas com o desenvolvimento de fármacos com um alvo específico a nível celular.

APÊNDICES

Apêndice 2. Esquema da placa de 96 poços montada para o ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) com 50 μL de meio MHB e diluições do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (poços A-F de 1-6), diluições do antibiótico ciprofloxacino de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (poços A-C de 7-12) e diluições do antibiótico meropenem de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (poços D-F de 7-12) e 50 μL de triplicatas biológicas e duplicatas técnicas das estirpes de *K. pneumoniae* ATCC 13883, KpC 002210477 e KpC 001450421.

	Pa-MAP 1.9						Antibióticos					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
B	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
C	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
D	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
E	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
F	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
G	C+ RB 1	C+ RB 1	C+ RB 2	C+ RB 2	C+ RB 3	C+ RB 3	C-	C-	C-	C-	C-	C-
H	C+ RB 1	C+ RB 1	C+ RB 2	C+ RB 2	C+ RB 3	C+ RB 3	C-	C-	C-	C-	C-	C-

Apêndice 3. Esquema da placa de 96 poços montada para o ensaio de concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) com 50 μL de meio BM2 e diluições do peptídeo *Pa*-MAP 1.9 de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (poços A-F de 1-6), diluições do antibiótico ciprofloxacino de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (poços A-C de 7-12) e diluições do antibiótico meropenem de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (poços D-F de 7-12) e 50 μL de triplicatas biológicas e duplicatas técnicas das estirpes de *K. pneumoniae* ATCC 13883, KpC 002210477 e KpC 001450421.

	Pa-MAP 1.9						Antibióticos					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
B	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
C	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
D	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
E	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
F	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
G	C+ RB 1	C+ RB 1	C+ RB 2	C+ RB 2	C+ RB 3	C+ RB 3	C-	C-	C-	C-	C-	C-
H	C+ RB 1	C+ RB 1	C+ RB 2	C+ RB 2	C+ RB 3	C+ RB 3	C-	C-	C-	C-	C-	C-

. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, A.; KATZ, D. E.; MARCHAIM, D. The Continuing Plague of Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae Infections. **Infectious disease clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 347-375, 2016. ISSN 0891-5520.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in microbiology**, v. 1, 2010.

ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. 2016. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-16-avaliacao-dos-indicadores-nacionais-das-infeccoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-e-resistencia-microbiana-do-ano-de-2016> >.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543-1575, 2013.

BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 3, p. 254-260, Mar 2017. ISSN 0022-0345.

BELOIN, C. et al. Novel approaches to combat bacterial biofilms. **Current opinion in pharmacology**, v. 18, p. 61-68, 2014. ISSN 1471-4892.

BENTLEY, R. Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence β -lactams). **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 775-786, 2009. ISSN 1367-5435.

BJARNSHOLT, T. et al. Applying insights from biofilm biology to drug development—can a new approach be developed? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 10, p. 791, 2013. ISSN 1474-1784.

BOTTAZZI, B. et al. The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling. **Journal of hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1416-1427, 2016. ISSN 0168-8278.

BOUCHER, H. W. et al. 10x'20 progress—development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, p. cit152, 2013. ISSN 1058-4838.

BROBERG, C. A.; PALACIOS, M.; MILLER, V. L. Klebsiella: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 64, 2014. ISSN 2051-7599 (Print)

2051-7599.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005. ISSN 1740-1526.

CARDOSO, M. H. et al. A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

CARNEIRO, L. C. et al. Identificação de bactérias causadoras de infecção hospitalar e avaliação da tolerância a antibióticos. **NewsLab**, v. 86, n. 1, p. 106-14, 2008.

CARVALHAIS, V. et al. Dormancy within *Staphylococcus epidermidis* biofilms: a transcriptomic analysis by RNA-seq. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 6, p. 2585-2596, 2014. ISSN 0175-7598.

CERCA, F. et al. SYBR green as a fluorescent probe to evaluate the biofilm physiological state of *Staphylococcus epidermidis*, using flow cytometry. **Canadian journal of microbiology**, v. 57, n. 10, p. 850-856, 2011. ISSN 0008-4166.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of clinical microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985. ISSN 0095-1137.

COATES, A. et al. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 895-910, Nov 2002. ISSN 1474-1776 (Print)

1474-1776.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999. ISSN 0036-8075.

CURIAO, T. et al. Emergence of blaKPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1608-1614, 2010. ISSN 0305-7453.

CUZON, G. et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 9, p. 1349-56, Sep 2010. ISSN 1080-6040.

DAVIS, R.; MARKHAM, A.; BALFOUR, J. A. Ciprofloxacin. **Drugs**, v. 51, n. 6, p. 1019-1074, 1996. ISSN 0012-6667.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2696-2704, 2012. ISSN 0066-4804.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004152, 2014. ISSN 1553-7374.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Chemistry & biology**, v. 22, n. 2, p. 196-205, 2015. ISSN 1074-5521.

DOS SANTOS, A. A. M. et al. DIAGNÓSTICO DO CONTROLE DA INFECÇÃO HOSPITALAR NO BRASIL. 2005.

FASUGBA, O. et al. Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 15, p. 545, 2015. ISSN 1471-2334.

FERRI, M. et al. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2857-2876, 2017. ISSN 1040-8398.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 1, p. 37-51, 2012. ISSN 1474-1776.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010. ISSN 1740-1526.

FUX, C. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2005. ISSN 0966-842X.

GASINK, L. B. et al. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 12, p. 1180-1185, 2009. ISSN 1559-6834.

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. ISSN 0095-1137.

GONG, Z. et al. Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 8, p. 4106-4112, 1996. ISSN 0021-9258.

GOPAL, R. et al. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1622-1629, 2014. ISSN 0066-4804.

GRASSI, L. et al. Analogs of the frog-skin antimicrobial peptide temporin 1Tb exhibit a wider spectrum of activity and a stronger antibiofilm potential as compared to the parental peptide. **Frontiers in chemistry**, v. 5, p. 24, 2017. ISSN 2296-2646.

GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in microbiology**, v. 4, 2013.

GUILHEN, C. et al. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 237, 2016. ISSN 1471-2164.

HANCOCK, R. E. The therapeutic potential of cationic peptides. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 7, n. 2, p. 167-174, 1998. ISSN 1354-3784.

HANCOCK, R. E.; CAREY, A. M. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. **J Bacteriol**, v. 140, n. 3, p. 902-10, Dec 1979. ISSN 0021-9193 (Print)

0021-9193.

HAYS, S. G. et al. Better together: engineering and application of microbial symbioses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 36, p. 40-49, 2015/12/01/ 2015. ISSN 0958-1669. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095816691500107X> >.

HINDRE, T. et al. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. **Microbiology**, v. 154, n. 1, p. 30-41, 2008. ISSN 1465-2080.

HØIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010. ISSN 0924-8579.

ILIĆ, K.; JAKOVLJEVIĆ, E.; ŠKODRIĆ-TRIFUNOVIĆ, V. Social-economic factors and irrational antibiotic use as reasons for antibiotic resistance of bacteria causing common childhood infections in primary healthcare. **European journal of pediatrics**, v. 171, n. 5, p. 767-777, 2012. ISSN 0340-6199.

JAMAL, F. Hospital infection: sources and routes of transmission. **The Malaysian journal of pathology**, v. 4, p. 1, 1981. ISSN 0126-8635.

JAYOL, A. et al. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4762-4766, 2014. ISSN 0066-4804.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS microbiology letters**, v. 236, n. 2, p. 163-173, 2004. ISSN 1574-6968.

JIANG, Z. et al. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. **Peptide Science**, v. 90, n. 3, p. 369-383, 2008. ISSN 1097-0282.

JONES, C. H. et al. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- β -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 465-475, 2009. ISSN 0066-4804.

KANG, S.-J. et al. Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 3, p. 409-413, 2012. ISSN 0253-6269.

KHAN, H. A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian pacific journal of tropical biomedicine**, v. 5, n. 7, p. 509-514, 2015. ISSN 2221-1691.

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478-482, 2017. ISSN 2221-1691.

LARSON, E. Community factors in the development of antibiotic resistance. **Annu. Rev. Public Health**, v. 28, p. 435-447, 2007. ISSN 0163-7525.

LASA, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 21-28, 2006. ISSN 1139-6709.

LEAVITT, A. et al. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 3026-3029, 2007. ISSN 0066-4804.

LEE, G. C.; BURGESS, D. S. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 11, n. 1, p. 32, 2012. ISSN 1476-0711.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine**, v. 10, p. S122-S129, 2004.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001. ISSN 0066-4804.

LI, C. et al. Clinical pharmacodynamics of meropenem in patients with lower respiratory tract infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1725-1730, 2007. ISSN 0066-4804.

LINKIN, D. R. et al. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 09, p. 781-783, 2004. ISSN 1559-6834.

LIU, B.; POP, M. ARDB—antibiotic resistance genes database. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl 1, p. D443-D447, 2009. ISSN 0305-1048.

MAGILL, S. S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198-1208, 2014. ISSN 0028-4793.

MAH, T.-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001. ISSN 0966-842X.

MANGRAM, A. J. et al. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. **American journal of infection control**, v. 27, n. 2, p. 97-134, 1999. ISSN 0196-6553.

MIGLIOLO, L. et al. Structural and functional characterization of a multifunctional alanine-rich peptide analogue from *Pleuronectes americanus*. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47047, 2012. ISSN 1932-6203.

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009. ISSN 0066-4804.

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013. ISSN 1473-3099.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 45, p. 382-384, 1960.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biotechnol**, v. 29, n. 9, p. 464-72, Sep 2011. ISSN 0167-7799.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 821-830, 2014. ISSN 1469-0691.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 877-886, 2015. ISSN 0934-9723.

PASTERAN, F. G. et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 7, p. 1178-80, Jul 2008. ISSN 1080-6040 (Print).

PATERSON, D. L. et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 473-478, 2000. ISSN 1537-6591.

PHOENIX, D. A.; DENNISON, S. R.; HARRIS, F. Anionic antimicrobial peptides. **Antimicrobial Peptides**, p. 83-113, 2013. ISSN 352765285X.

PILLAI, S. K., MOELLERING, R.C. AND ELIOPOULOS, G.M. . Antimicrobial Combinations. In: LORIAN, V. (Ed.). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5th Edition. Philadelphia: the Lippincott Williams & Wilkins Co., 2005. p.365-440.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998. ISSN 0893-8512.

QURESHI, Z. A. et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing Klebsiella pneumoniae: superiority of combination antimicrobial regimens. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2108-2113, 2012. ISSN 0066-4804.

RIBEIRO, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de pequenos peptídeos catiônicos contra *Klebsiella pneumoniae***. 2014a. 94 f (Doutorado). Escola de Saúde e Medicina, Universidade Católica de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

_____. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de pequenos peptídeos catiônicos contra *Klebsiella pneumoniae***. 2014b. 94 (Doctor's degree). Escola de Saúde e Medicina, Universidade Católica de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

RICHMOND, M.; SYKES, R. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. **Advances in microbial physiology**, v. 9, p. 31-88, 1973. ISSN 0065-2911.

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of internal medicine**, v. 272, n. 6, p. 541-561, 2012. ISSN 1365-2796.

ROSENTHAL, V. D.; GUZMAN, S.; ORELLANO, P. W. Nosocomial infections in medical-surgical intensive care units in Argentina: attributable mortality and length of stay. **American journal of infection control**, v. 31, n. 5, p. 291-295, 2003. ISSN 0196-6553.

SADER, H. S. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009–2011). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 78, n. 4, p. 443-448, 2014. ISSN 0732-8893.

SCHILLACI, D. et al. Immune mediators of sea-cucumber *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) as source of novel antimicrobial and anti-staphylococcal biofilm agents. **AMB Express**, v. 3, p. 35-35, 2013. ISSN 2191-0855.

SCHILLACI, D. et al. Paracentrin 1, a synthetic antimicrobial peptide from the sea-urchin *Paracentrotus lividus*, interferes with Staphylococcal and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 78, 2014. ISSN 2191-0855.

SHIELDS, R. K. et al. In vitro selection of meropenem resistance among ceftazidime-avibactam-resistant, meropenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* isolates with variant KPC-3 carbapenemases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e00079-17, 2017. ISSN 0066-4804.

SHU, M. et al. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. **Arch Oral Biol**, v. 45, n. 1, p. 27-40, Jan 2000. ISSN 0003-9969 (Print)

0003-9969.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000. ISSN 0167-7012.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; MARK, E. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001. ISSN 0962-8436.

TEGMARK WISELL, K. et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Sweden. **Euro Surveill**, v. 12, n. 12, p. E071220.3, Dec 20 2007. ISSN 1025-496x.

TENOVER, F. C. et al. Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Not Detected by Automated Susceptibility Testing. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1209-1213, 2006. ISSN 1080-6040

1080-6059.

TUGAL, D. et al. Multi-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* pancreatitis: A new challenge in a serious surgical infection. **Surgical infections**, v. 16, n. 2, p. 188-193, 2015. ISSN 1096-2964.

VARDAKAS, K. Z. et al. Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant Gram negative bacteria: the study, the patient, the bug or the drug? **Journal of Infection**, v. 66, n. 5, p. 401-414, 2013. ISSN 0163-4453.

VILLEGAS, M. V. et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2880-2882, 2006. ISSN 0066-4804.

VON MUTIUS, E. The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 3, p. 680-689, 2016. ISSN 0091-6749.

WAYNE, P. USA: CLSI; 2012. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M100-S22**, 2012.

WEI, Z.-Q. et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 763-765, 2007. ISSN 0066-4804.

WENZEL, M. et al. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. E1409-E1418, 2014. ISSN 0027-8424.

WISEMAN, L. R. et al. Meropenem. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. **Drugs**, v. 50, n. 1, p. 73-101, Jul 1995. ISSN 0012-6667 (Print)

0012-6667.

WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International journal of oral science**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2015. ISSN 1674-2818.

YEUNG, A. T.; BAINS, M.; HANCOCK, R. E. The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 4, p. 918-931, 2011. ISSN 0021-9193.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001. ISSN 0066-4804.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 15, p. 5449-53, Aug 1987.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **nature**, v. 415, n. 6870, p. 389, 2002. ISSN 1476-4687.

ZASLOFF, M.; MARTIN, B.; CHEN, H.-C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 85, n. 3, p. 910-913, 1988. ISSN 0027-8424.

ZHANG, R. et al. Phylloseptin-1 (PSN-1) from *Phyllomedusa sauvagei* skin secretion: a novel broad-spectrum antimicrobial peptide with antibiofilm activity. **Molecular immunology**, v. 47, n. 11-12, p. 2030-2037, 2010. ISSN 0161-5890.

ANEXOS

Anexo 1. Artigo de revisão publicado na *Pharmacology & Therapeutics* (2016) sobre desenvolvimento de drogas anti-biofilmes.

Pharmacology & Therapeutics 160 (2016) 133–144



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology & Therapeutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmthera



Associate editor: B. Teicher

New frontiers for anti-biofilm drug development

Suzana M. Ribeiro^{a,b}, Mário R. Felício^c, Esther Vilas Boas^a, Sónia Gonçalves^c, Fabrício F. Costa^b,
Ramar Perumal Samy^d, Nuno C. Santos^c, Octávio L. Franco^{a,b,*}

^a S-Inova Biotech, Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil
^b Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil
^c Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal
^d Department of Microbiology and Immunology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore

ARTICLE INFO

Available online 17 February 2016

Keywords:
 Anti-biofilm peptides
 Biofilms
 Drug repurposing
 Nanotechnology
 Polymicrobial biofilm

ABSTRACT

Pathogenic microbial biofilm, a consortium of microbial cells protected by a self-produced polymer matrix, is considered a worldwide challenge due to the inherent antibiotic resistance conferred by its lifestyle. Living, as it does, in a community of microbial organisms in a clinical situation, makes it responsible for severe and dangerous cases of infection. Combating this organisation of cells usually requires high antibiotic doses for a prolonged time, and these approaches often fail, contributing to infection persistence. In addition to therapeutic limitations, biofilms can be a source of infections when they grow in medical devices. The challenge imposed by biofilms has mobilised researchers in the entire world to prospect or develop alternatives to control biofilms. In this context, this review summarises the new frontiers that could be used in clinical circumstances in order to prevent or eliminate pathogenic biofilms.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1.	Introduction	133
2.	The challenge of resistant bacterial biofilms	134
3.	Old drugs that could be useful to control biofilms	135
4.	Peptides and other designed compounds with anti-biofilm activities	136
5.	The potential of synergistic drugs	137
6.	Anti-biofilm nanotools	137
7.	Construction of novel biomedical devices	139
8.	Conclusion and prospects	141
	Conflict of interest statement	141
	Acknowledgments	141
	References	141

1. Introduction

Treatment of infections has become a worldwide challenge due to the development of antibiotic resistance among microorganisms, especially when resistance at cellular levels and at community level occur

Abbreviations: AMPs, antimicrobial peptide; FDA, United States Food and Drug Administration; NPs, nanoparticles.

* Corresponding author at: Universidade Católica de Brasília, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, SGAN 916, Av. W5, Módulo C, sala 219, Brasília, DF CEP 70790-160, Brazil. Tel.: +55 61 34487167, +55 61 34487220; fax: +55 61 33474797.
 E-mail address: ocfranco@gmail.com (O.L. Franco).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.006>
 0163-7258/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

together (Fig. 1). Cellular antibiotic resistance, also referred to as conventional resistance, may occur when antibiotic targets are modified, microbial enzymes inactivate antibiotics and microorganisms prevent or reduce the antibiotic accumulation in their cells (Blair et al., 2015). Resistance observed in a community of microorganisms, known as biofilms, takes place when microbial cells aggregate (Bjarnsholt et al., 2013; G. Zhou et al., 2015; L. Zhou et al., 2015). Resistance to antibiotics can be even higher when single cells that present conventional resistance form a biofilm.

Biofilms consist of one or more microbial species, which can be in different metabolic states, encased in a self-produced biopolymer matrix composed by proteins, polysaccharides and DNA (Bjarnsholt

Anexo 2. Artigo de revisão publicado na *Current Topics in Medicinal Chemistry* (2017) sobre mecanismos não usuais de ação e resistência a peptídeos antibacterianos.

FINAL

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2017, 17, 1-17

1

REVIEW ARTICLE

Elucidating Unusual Modes of Action and Resistance of Antibacterial Peptides

Leandro dos Santos Machado¹, Esther Vilas Boas de Carvalho¹, Flávia Varella de Affonseca e Silva¹, Pedro Vinícius Dos Santos Cabreira¹ and Octavio Luiz Franco^{1,2,*}

¹S-Inova Biotech, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil; ²Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: August 12, 2015
Revised: December 16, 2015
Accepted: December 30, 2015

DOI: 10.2174/1568026616666160713123203

Abstract: The emergence of bacterial resistance to conventional antibiotics has been become a major issue in the health system. Currently, studies are being performed to develop new drugs that can replace conventional antibiotics. These new drugs include the antimicrobial peptides (AMPs), a heterogeneous group of molecules produced in a variety of bacterial, invertebrate, plant and animal species, which can serve as a nonspecific defense system that complements the highly specific cell-mediated immune response. AMPs have antimicrobial activities against a wide range of microorganisms, including bacteria, fungi, and viruses, and they are effective against pathogenic organisms that are resistant to common drugs. The most common mechanism of action of antibacterial peptides on microbial cells has been characterized as an alteration in the cellular membrane permeability. In contrast, there are AMPs with unusual strategies associated with cell wall and protein synthesis inhibition, nucleic acid binding or inactivation of toxins that enable microbial infection. Many pathogens can develop resistance strategies, inactivating or repelling AMPs through modification of the surface expression of pumps or secretion of proteases. In summary, this review focus on AMPs with non-conventional modes of actions and the microbial counter measures to resist these peptides.



Octavio Luiz Franco

Keywords: Antimicrobial activity, toxin, disease control, mechanism of action, peptides, unusual activity.

1. INTRODUCTION

The increasing emergence of pathogenic organisms that are resistant to conventional antibiotics has generated an urgent need for the development of new compounds with different mechanisms of action. The widespread and inappropriate use of broad-spectrum antibiotics without clinical judgment and knowledge of pharmacological and microbiological factors has resulted in multi-drug resistant strains, arising from mutations in chromosomal genes and by horizontal gene transfer, besides evolutionary pressure. These new strains can be involved in the inefficacy of antimicrobial therapy and also in the reemergence of older diseases; they are certain to impose high costs on the health system [1].

The family of antimicrobial peptides (AMPs) is a unique group of molecules synthesized from the innate immune system of multiple organisms that prevent or resist microbial infection [2-5] and regulate the growth of other bacteria by bacterial competition [6]. The development of AMPs which

target the membrane and cellular processes, including nucleic acids, protein synthesis, protein folding, enzymatic activity and cell wall synthesis, can decrease the preservation of bacterial morphology and development of resistance [7]. This review aims to understand the unusual mode of action of these antimicrobial agents in contrast to common membrane disruptor effects and some mechanisms of resistance against these peptides.

1.1. Antimicrobial Peptides (AMPs)

Antimicrobial peptides (AMPs) are evolutionarily ancient molecules from the innate immune system produced by living organisms. These molecules are fewer than 100 amino acids and act before the adaptive response and non-adaptive components of acute inflammation, such as complement proteins, chemokines, cytokines and inflammatory cells [8, 9]. AMPs have been isolated from various species ranging from bacteria, plants and frogs to mammals, including humans [10] and exhibiting activity against a wide range of microorganisms including Gram-positive and Gram-negative bacteria, protozoa, yeast, fungi and viruses [9]. Normally, they act as a primary barrier of the organism, especially in skin and

*Address correspondence to this author at the S-Inova, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil; E-mails: ocfranco@pos.ucb.br; octavio@gmail.com