

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**  
**GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**JULIA PIMENTEL ARANTES**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NITRATO DE GÁLIO FRENTE À  
ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES À POLIMIXINA B.**

**DOURADOS-MS**

**2021**

**JULIA PIMENTEL ARANTES**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NITRATO DE GÁLIO FRENTE À  
ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES À POLIMIXINA B.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Luana Rossato. Tendo como área de concentração: Medicina II.

**DOURADOS-MS**

**2021**

**JULIA PIMENTEL ARANTES**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NITRATO DE GÁLIO FRENTE À  
ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES À POLIMIXINA B.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das  
exigências do curso de Bacharelado em Biotecnologia, da  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, sob a  
orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Luana Rossato. Tendo como área  
de concentração: Medicina II.

Aprovado em: 31 / 05 / 2021

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luana Rossato

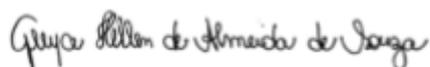
Presidente



---

Marcelo dos Santos Barbosa

Membro



---

Gleyce Hellen de Almeida de Souza

Membro

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A662a Arantes, Julia Pimentel

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NITRATO DE GÁLIO FRENTE À ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES À POLIMIXINA B. [recurso eletrônico] / Julia Pimentel Arantes. -- 2021.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Luana Rossato.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Nitrato de gálio. 2. *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B. 3. Reposicionamento farmacológico. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Atividade in vivo. I. Rossato, Luana. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Dedico este trabalho à Deus e a toda  
minha família, pelo apoio concedido  
durante todas as etapas da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois foi Ele que me concedeu forças e me guiou para chegar até onde me encontro, ao meu pai Audax Barbosa Arantes Junior, minha mãe Leidiane Rodrigues Pimentel e ao meu irmão Eduardo Pimentel Arantes, que são elementos essenciais em minha vida, sempre acreditaram no meu potencial, me apoiaram e fizeram sempre o possível e o impossível para que eu realizasse esse sonho.

À minha avó Maria Aparecida Rodrigues, que me deu todo o suporte quando ocorreu a minha mudança de cidade.

Ao meu namorado Bruno Lira de Arruda que sempre esteve ao meu lado durante esses anos com palavras de conforto e incentivo, e por sempre compreender os momentos que tive ausente para me dedicar a graduação.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luana Rossato que desde o começo teve paciência e dispôs do seu tempo e conhecimento para me auxiliar em todo o processo do trabalho realizado. À Profa. Dra. Simone Simionatto que permitiu minha entrada em seu grupo de pesquisa, e sempre me auxiliou quando preciso e aos alunos do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Microrganismo pelo auxílio durante os momentos de dúvida, especialmente à Andressa Leite Ferraz de Melo, Junio Eduvirgem e o Júlio Henrique Ferreira de Sá Queiroz.

As minhas companheiras de graduação da IX turma de Biotecnologia, pela amizade durante esses quatro anos e por sempre serem presentes e me incentivando cada dia mais.

Aos funcionários da Universidade Federal da Grande Dourados pela dedicação e alegria no atendimento.

Ao CNPq pelo apoio financeiro à pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram na minha jornada e no meu crescimento, seja de forma direta ou indireta, não permitindo que desistisse do que mais estimava.

**Obrigada!**

## RESUMO

Dada a importância do ferro na fisiologia bacteriana e na sua patogenicidade, a captação e o seu metabolismo tornaram-se alvos atraentes para o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos. Neste cenário, o metal gálio, que mimetiza o ferro, tem apresentado bons resultados em ensaios de atividade antimicrobiana. O gálio age interrompendo vias metabólicas dependentes de ferro inibindo assim o crescimento microbiano. O presente estudo objetivou o reposicionamento farmacológico de nitrato de gálio (GaN) frente a isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B. A atividade antimicrobiana do GaN foi testada frente a 20 isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B utilizando metodologia preconizada por diretrizes do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). A avaliação da atividade *in vivo* ocorreu utilizando nematoides sincronizados da linhagem AU37 (*glp-4; sek-1*) de *Caenorhabditis elegans* que foram infectados e monitorados por 6 dias. O GaN promoveu a inibição do crescimento dos 20 isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B em concentrações que variaram de 2 a 16 µg/mL. O GaN também protegeu o *C. elegans* da infecção letal por *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B, com taxas de sobrevivência >75%. GaN mostrou ser uma promissora terapia de último recurso para infecções causadas por isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B.

**Palavras-chaves:** Nitrato de Gálio; *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B; Reposicionamento farmacológico; Atividade antimicrobiana; Atividade *in vivo*.

## ABSTRACT

Assumed the importance of iron in bacterial physiology and pathogenicity, iron uptake and metabolism have become attractive targets for the development of new antibacterial drugs. In this scenario, the FDA-approved iron mimetic metal Gallium [Ga (III)] has been successfully repurposed as an antimicrobial drug. Ga (III) disrupts ferric iron-dependent metabolic pathways, thereby inhibiting microbial growth. In this study we found that gallium nitrate III (GaN), inhibits the growth of a collection of 20 polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains at concentrations ranging from 2 to 16 $\mu$ g/mL, using RPMI-HS, in which the low iron content and the presence of human serum better mimic the *in vivo* environment. GaN also protected *Caenorhabditis elegans* from polymyxin-resistant *K. pneumoniae* strains lethal infection, with survival rates of >75%. GaN also showed synergism with polymyxin B, suggesting that a polymyxin B-GaN combination holds promise as a last-resort therapy for infections caused by resistant polymyxin B *K. pneumoniae* strains.

**Keywords:** Gallium nitrate; Antibacterial activity; Polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*; Pharmacological repositioning; Antimicrobial activity; *In vivo* activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da organização da parede celular de uma bactéria Gram-negativa.....	16
Figura 2. Esquematização dos mecanismos de resistência bacteriana.....	18
Figura 3. Representação do mecanismo de resistência adquirido através da alteração da permeabilidade da parede celular. ....	20
Figura 4. Representação do mecanismo de resistência bacteriano adquirido através da existência de bombas de efluxo. ....	21
Figura 5. Representação de uma resistência bacteriana adquirida a partir da destruição enzimática do antibiótico em algumas bactérias. ....	22
Gráfico 1. Inibição de biofilme de isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes à polimixina B por GaN. ....	32
Gráfico 2. Efeito do GaN na sobrevivência de nematoides infectados com isolado clínico de <i>K. pneumoniae</i> resistentes à polimixina B.....	33

## LISTA DE TABELA

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de antibióticos frente a isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes à polimixina B (µg/mL).....	31
---	----

## INDICE DE ABREVEATURAS E SIGLAS

A. *baumanni* – *Acinetobacter baumannii*

ADMET – Propriedades de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade

BHI – Brain heart infusion

C – Controle não tratado

*C. elegans* - *Caenorhabditis elegans*

CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CV - Cristal violeta

CTX-M – Cefotaximase

DMSO – Dimetilsulfóxido

Dab - Ácido-2,4- diaminobutírico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ESBL –  $\beta$ -lactamase de espectro estendido

ROS– Espécies reativa de oxigênio

Fe<sup>3+</sup> - Férrico

Ga<sup>2+</sup> - Gálio

GPBMM – Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Microrganismos

HS – Soro humano

hvKP - *K. pneumoniae* hipervirulentas

I - Intermediário

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

L-Ara4N - Enzima L-4-aminoarabinose

LPS – Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF – *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*

*mcr-1*- Gene plasmidial

*mgrB* – Proteína transmembrana

MHT – Teste Modificado Hodge

NDM-1 – *New Delhi metalobetalactamase*

NGM – Meio de crescimento para nematóides

OMS – Organização mundial de saúde

OMP – Proteínas de membras externas

pEtN – fosfoetanolamina

*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

R - Resistente

RPMI 1640 – Instituto *Roswell Park Memorial*

RPMI-HS – Meio RPMI 1640 complementado com soro humano

RNA - Ácido ribonucleico

S – Susceptível

SP – sideróforos

## SUMÁRIO

RESUMO.....	2107
ABSTRACT .....	2208
1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	16
2.1 Resistência bacteriana como um dos grandes desafios atuais.....	16
2.2 Visão Geral dos principais mecanismos de resistência bacteriana.....	18
2.2.2 Mecanismos enzimáticos .....	21
2.3 Polimixina como um agente terapêutico .....	22
2.4 Resistência a polimixina.....	23
2.5 Emergência de isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistentes à polimixina e a busca por alternativas terapêuticas.....	24
2.6 Reposicionamento de fármacos como uma alternativa frente a microrganismos multirresistentes.....	25
2.7 Gálio como um promissor agente antibacteriano .....	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral .....	27
3.2 Objetivos específicos .....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	28
4.1 Isolados clínicos e identificação .....	28
4.2 Meios e Compostos .....	28
4.3 Teste de suscetibilidade do GaN .....	28
4.5 Atividade <i>in vivo</i> em um modelo de infecção <i>C. elegans</i> .....	30
4.6 Análise estatística .....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 GaN apresenta atividade <i>in vitro</i> frente à isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes à polimixina B.....	31
5.2 Atividade antibiofilme de GaN.....	32

5.3	GaN promove a sobrevivência de <i>C. elegans</i> infectados com isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes à polimixina B.....	33
6	DISCUSSÃO.....	33
7	CONCLUSÕES.....	38
	REFERÊNCIAS .....	38

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, observamos um rápido aumento no número de isolados clínicos resistentes a antibióticos, juntamente com a baixa taxa de desenvolvimento e introdução de novos antimicrobianos (FERNÁNDEZ e HANCOCK, 2012). Essa combinação representa uma séria ameaça à medicina humana, podendo resultar na escassez de recursos para o combate de bactérias multirresistentes. O resultado seria o aumento nas taxas de morbidade e mortalidade associadas a doenças infecciosas, que poderiam atingir níveis semelhantes aos observados antes da era dos antibióticos (FERNÁNDEZ e HANCOCK, 2012). A falta de novos antibióticos é um desafio, principalmente frente a bactérias Gram-negativas, visto que essas bactérias apresentam uma parede celular muito complexa separando o meio externo do espaço periplasmático da bactéria, com estruturas de fosfolipídios, proteínas, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPS), a presença dessas estruturas confere as bactérias patogênicas Gram-negativas resistentes às defesas do hospedeiro dificultando a entrada de agentes antimicrobianos na célula bacteriana (BARTOLETTI, 2016; WALSH e WENCEWICZ, 2014).

Uma alternativa para combater as infecções por microrganismo resistentes é reutilização de medicamentos já existentes no mercado farmacêutico, sendo eles antibiótico ou inibidores de virulência (RANGEL-VEGA *et al.* 2015). Atualmente, o interesse por fármacos que tem o potencial de atingir o metabolismo dos microrganismos vem ganhando um maior espaço na pesquisa (WALSH, 2014). Essa abordagem possui várias vantagens, incluindo diminuição dos altos custos e tempo despendido no processo de desenvolvimento, além da possibilidade de utilizar compostos com propriedades farmacológicas e toxicológicas já conhecidas (RANGEL-VEGA *et al.* 2015).

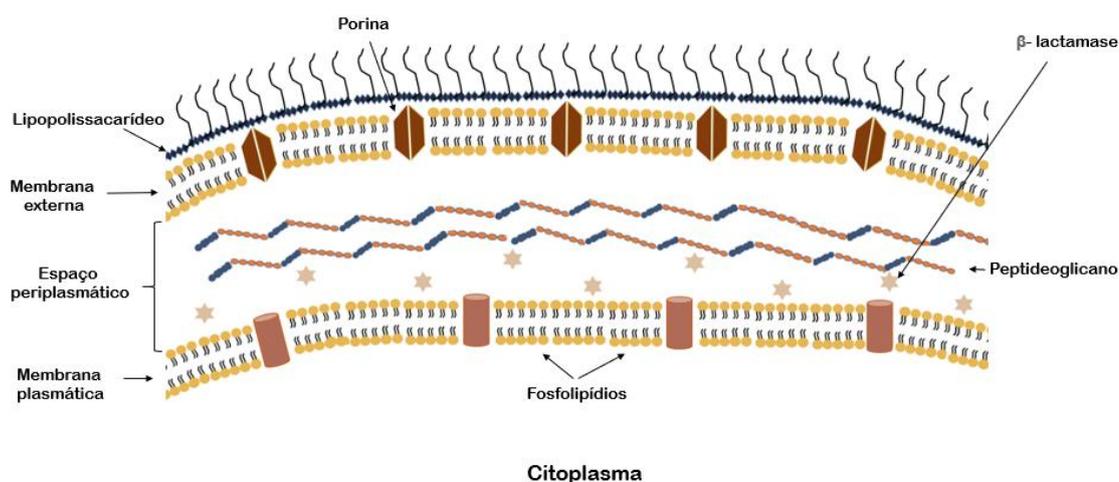
O gálio, é um metal que, apesar de não ter uma função essencial conhecida, apresenta diversas atividades biológicas como atividades antitumorais e anti-inflamatórias e, vem se destacando principalmente pelo seu efeito antibacteriano em isolados clínicos resistentes a vários fármacos. Muitas das atividades do gálio derivam de suas semelhanças químicas com o ferro, e isso permite que o gálio siga muitas vias importantes de captação e transporte no metabolismo microbiano. Porém são as diferenças entre gálio e ferro, no entanto, que são responsáveis pelos efeitos terapêuticos do gálio e sua baixa toxicidade, resultando assim em um agente promissor para o reposicionamento de fármacos no intuito de inibir a ação antimicrobiana (HEDLEY *et al.* 1988).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Resistência bacteriana como um dos grandes desafios atuais.

A introdução das sulfonamidas, em 1930, representou uma luz no tratamento das infecções bacterianas. E a partir de 1940 a 1960, a descoberta da ação antimicrobiana de produtos naturais, deu início a chamada “revolução dos antibióticos” (LIVERMORE, 2012). Posteriormente, o fluxo de descoberta de novos antibióticos passou a apresentar um declive devido a três principais fatores: I) dificuldade técnica de descobrir novos antibióticos, especialmente para bactérias gram-negativas, pois as mesmas apresentam uma parede celular espessa e que apresentam uma complexidade como demonstrado na Figura 1; II) complexidade nos processos regulatórios para novos antibióticos e III) o fato de que dos tratamentos de curta duração, são menos lucrativos para a indústria farmacêutica (apud LIVERMORE, 2012).

**Figura 1.** Representação da organização da parede celular de uma bactéria Gram-negativa.



Fonte: Figura autoral, 2021.

A demanda por novos tratamentos antibacterianos vem crescendo cada vez mais ao longo dos anos, principalmente por patógenos que fazem parte de um grupo denominado como ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.* (CHOI et al., 2019). Esses microrganismos apresentam habilidades intrínsecas para desenvolver novos mecanismos de resistência, permitindo que a próxima geração de bactérias exiba também a resistência

a medicamentos (CHOI et al., 2019). Com o surgimento da enzima metalobetalactamase “New Delhi” (NDM-1) e o padrão de propagação do gene *blaNDM-1* gerou uma grande preocupação na complexidade de resistência aos antimicrobianos (Da ROSA, 2017). Pois quando ocorre a associação das enterobactérias portadoras do gene *blaNDM-1* com outros mecanismos de resistência, faz com que a maioria dos isolados tornem-se extremamente resistentes aos antibióticos de amplo espectro (STRUELENS et al., 2010). A metalobetalactamase subtipo NDM-1 vem se espalhando para diferentes países, vinculados principalmente a membros da família das enterobactérias, como *Klebsiella pneumoniae*, um dos agentes etiológicos comumente relacionados às infecções nosocomiais em todo mundo (Organización Panamericana de La Salud, 2011). Novos antibióticos que visam diferentes caminhos de ação e, combinações de fármacos que resultam em sinergismo, são abordagens de grande importância que vem sendo empregadas para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes (CHOI et al., 2019).

O surgimento e a rápida disseminação do SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, tornou-se uma ameaça contínua para população global, e devido à alta infecciosidade da doença, foi promovido numerosas tentativas para identificar um tratamento potencial (SHARMA, 2020). Acredita-se que o uso de medicamentos individuais em combinação com agentes antivirais, podem diminuir o tempo necessário para a eliminação viral ou melhorar as condições de saúde dos pacientes (SHARMA, 2020). No entanto, entre os medicamentos utilizados o que mais chama a atenção, é o uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro com o intuito de prevenir de doenças secundárias (SHARMA, 2020; RAWSON, 2020). Portanto, essa ação gera um incremento na gravidade das infecções associadas à assistência à saúde, podendo levar ao surgimento e disseminação de resistência e microrganismos mais virulentos (ROSSATO et al., 2020).

A resistência antimicrobiana estava entre as principais prioridades para a saúde pública global no ano de 2020 (KNIGHT et al., 2021). Com a chegada da pandemia e a escassez de dados disponíveis para a resolução da situação, a propagação potencial de resistência antimicrobiana pode ocorrer de forma exacerbada devido ao aumento das taxas de prescrição de antimicrobianos, e tais ações podem gerar possíveis colapsos em programas de saúde (RAWSON, 2020).

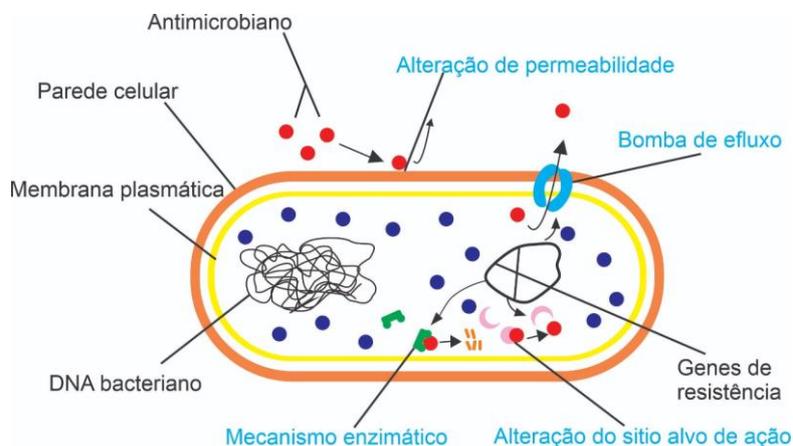
Há mais de uma década, não ocorre a produção de uma nova classe de antibióticos, e o aumento contínuo da resistência antimicrobiana é uma grande preocupação para os serviços de saúde, a Organização Mundial da Saúde (OMS) alertou que se não tomarmos ações urgentes a respeito da resistência antimicrobiana, podemos entrar em uma "era pós-antibiótico", uma era na qual não irá mais obter eficiência nos tratamentos de infecções promovidas por microrganismos resistentes. (ARYEE e PRICCE 2015; WALSH e WENCEWICZ. 2014).

## 2.2 Visão Geral dos principais mecanismos de resistência bacteriana

A aquisição de mecanismos de resistência geralmente ocorre devido ao surgimento de algumas alterações genéticas que se expressam bioquimicamente, (MULVEY e SIMOR, 2009). Onde a associação de mecanismos pode levar a multirresistência dos isolados, limitando de maneira drástica as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por patógenos multirresistentes (BAPTISTA, 2013).

A resistência bacteriana pode ocorrer pela presença de mecanismos intrínsecos, ou adquiridos (BAPTISTA, 2013). Os mecanismos intrínsecos, referem-se à existência de genes nos genomas bacterianos que podem gerar um fenótipo de resistência (DAVIES e DAVIES, 2010). Já os mecanismos adquiridos são aqueles que de alguma forma sofreram alterações em sua estrutura inicial, através de uma mutação no DNA cromossômico bacteriano ou aquisição de um novo material genético, essas alterações são divididas em quatro grandes grupos como: a alteração da permeabilidade ou do local de ação dos antibióticos, bombas de efluxo e o mecanismo enzimático da degradação ou inativação do antibiótico (Figura 2) (DAVIES e DAVIES, 2010; BAPTISTA, 2013).

**Figura 2.** Esquemática dos mecanismos de resistência bacteriana.



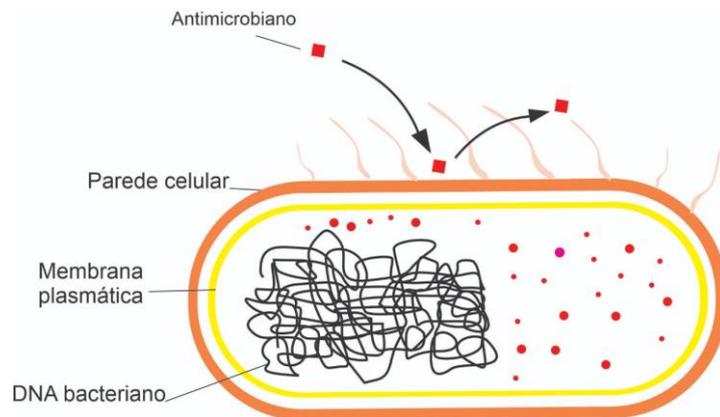
Fonte: Figura autoral, 2021.

### 2.2.1 Alteração de permeabilidade

A permeabilidade da membrana celular é essencial para que o antibiótico tenha o efeito desejado, quer seja bactericida quer bacteriostático (GOODMAN & GILMAN'S, 2008). A membrana externa das bactérias Gram-negativas constitui uma barreira de permeabilidade seletiva que efetivamente pode oferecer proteção à vários compostos nocivos presentes no ambiente extracelular (da SILVA, 2020). A membrana é constituída de fosfolipídios, lipopolissacarídeos (LPS) e por proteínas de membrana externa denominadas “*Outer membrane proteins*” (OMP), dentre as quais encontram-se as porinas. As porinas são proteínas capazes de formar canais constituídos de água no seu interior que permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa, e a expulsão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (FERNÁNDEZ e HANCOCK, 2012). Quando ocorre a perda ou a diminuição da expressão dos genes responsáveis pela expressão das porinas, pode haver redução da entrada de antimicrobianos na célula, diminuindo assim a concentração interna desse agente, e conseqüentemente, contribuindo para o mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos. Na maioria das vezes a perda e/ou a diminuição das porinas pode estar associada à produção de  $\beta$ -lactamases, como demonstrado na Figura 3 (NIKAIDO, 2003).

As mutações que afetam a expressão das porinas têm um impacto direto sobre a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos. Estas mutações geram vários efeitos na estrutura celular das bactérias, como a diminuição ou perda total da função da porina, por meio da modificação do tamanho ou a condutância do canal de porina ou menor nível da expressão da mesma (da SILVA, 2020). As principais mutações responsáveis por esses efeitos são as que resultam na exclusão ou inserção na sequência dos genes codificadores, parada na tradução, e mutações que afetam diretamente a regulação da expressão gênica (da SILVA, 2020). As mutações pontuais na região promotora podem causar redução da transcrição, resultando na perda da função das porinas. Estudos recentes, demonstram que alterações nas proteínas de membrana externa podem causar resistência aos antibióticos carbapenêmicos (HARDER et al., 1981; HANCOCK, 1984; FERNÁNDEZ e HANCOCK, 2012; WOZNIAK et al., 2012).

**Figura 3.** Representação do mecanismo de resistência adquirido através da alteração da permeabilidade da parede celular.

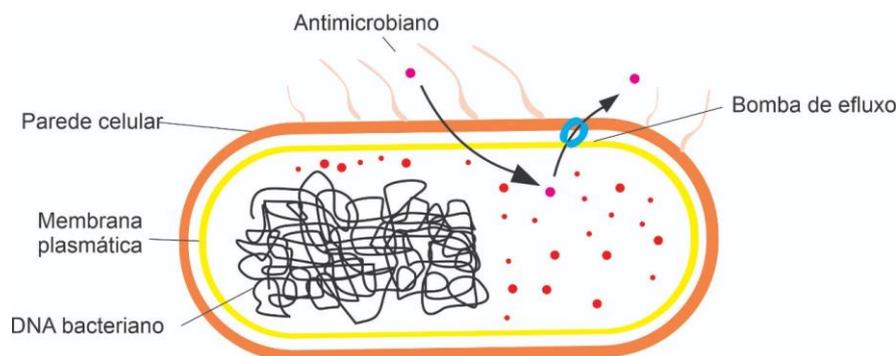


Fonte: Figura do autoral, 2021.

### 2.1.1. Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas. Neste tipo de resistência ocorre um efluxo, isto é, o transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular (DŽIDIĆ et al., 2007). Este sistema tem função de bombear moléculas tóxicas do conteúdo intracelular para o meio extracelular, em um processo que não envolve a alteração ou degradação dos fármacos (Figura 4) (LISTER et al., 2009; FERNÁNDEZ e HANCOCK, 2012). Geralmente mutações são responsáveis pelo aumento do nível de expressão da bomba de efluxo, resultando no aumento da resistência aos compostos. Em alguns casos, as mutações podem causar alterações de apenas um aminoácido, que tornam mais eficiente o bombeamento dos antibióticos para fora da célula. A grande maioria das mutações responsáveis pelas alterações no transporte de antimicrobianos por sistemas de efluxo, ocorrem nos genes que codificam proteínas com uma função reguladora (NILSEN et al., 1996; VETTORETTI et al., 2009; FERNÁNDEZ e HANCOCK, 2012). A presença desse mecanismo foi descrita inicialmente em 1978 e desde então, os sistemas de efluxo, sejam eles de codificação plasmidial ou cromossomal, vem sendo identificados com maior frequência (UGHACHUKWU e UNEKWE, 2012).

**Figura 4.** Representação do mecanismo de resistência bacteriano adquirido através da existência de bombas de efluxo.

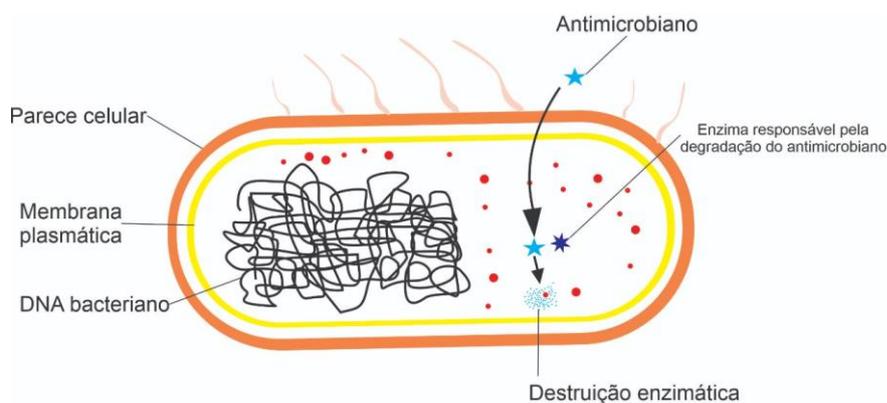


Fonte: Figura do autor, 2021.

### 2.2.2 Mecanismos enzimáticos

O mecanismo enzimático de resistência ocorre devido a produção de enzimas por bactérias que tem a capacidade de degradar ou inativar o antibiótico (BAPTISTA, 2013). Existem três grandes estratégias de mecanismos enzimáticos, tais como, hidrólise, que ocorre através das estruturas dos antibióticos que contém grupos ésteres e amidas, fazendo com que sejam susceptíveis às hidrolases. A quebra da ligação destes grupos é feita na presença destas enzimas, que podem ser excretadas pelas bactérias, atuando na inativação do antibiótico antes que este atinja o seu alvo (figura 5) (DŽIDIĆ et al., 2007). A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos ocorre devido ao uso indiscriminado do medicamento associado à exposição a outros antimicrobianos. Na ausência de protocolos de controle e prevenção de infecção hospitalar, essa ação contribuiu para o surgimento de  $\beta$ -lactamases, uma família de enzimas bacterianas capazes de hidrolisar medicamentos. (BLAIR et al., 2014; WATKINS, 2016; ASLAM et al., 2018). O mecanismo de ação dessas enzimas é mediado pela sua capacidade de quebrar a ligação amida no anel  $\beta$ -lactâmico presente na estrutura dos antibióticos. Os genes que codificam a produção dessas enzimas sofrem mutações constantemente em resposta à pressão exercida pelos antimicrobianos, contribuindo para o surgimento de novas classes de enzimas com espectro de atividade cada vez maior. A síntese das  $\beta$ -lactamases pode ser cromossômica ou mediada por plasmídeos e transposons (BLAIR et al., 2014; WATKINS, 2016; FRIERI et al., 2017; BUSH, 2018; MOREHEAD e SCARBROUGH, 2018). Outro mecanismo enzimático é a transferência de um grupo ou processo redox, onde a redução induzida ou a oxidação ocorre pela bactéria patogénica (DŽIDIĆ et al., 2007).

**Figura 5.** Representação de uma resistência bacteriana adquirida a partir da destruição enzimática do antibiótico em algumas bactérias.



Fonte: Figura do autor, 2021.

### 2.3 Polimixina como um agente terapêutico

A polimixina foi originalmente descoberta em 1947 e passou a ser utilizada no tratamento de infecções bacterianas, porém, na década de 1970 tornou-se restrito e praticamente abandonado na década de 1980, devido a sua nefrotoxicidade e neurotoxicidade (DIJKMANS et al., 2015). A resistência a polimixina aparece como um problema grave, pois as polimixinas são medicamentos da classe das colistinas, constituindo um dos últimos recursos para o tratamento de bactérias Gram-negativas multirresistentes.

Os mecanismos de ação da atividade antibacteriana das polimixinas não são completamente compreendidos, no entanto, a visão geral é que as polimixinas atuam interrompendo as membranas externas e internas bacterianas, através da "absorção autopromovida" (HANCOCK, 1997). O alvo principal de ação das polimixinas é a ligação do fármaco com os lipopolissacarídeos (LPS) presente na membrana externa das bactérias gram-negativas, pois essa ligação promove importantes interações eletrostáticas e hidrofóbicas (VELKOV et al., 2010).

As interações eletrostáticas, através da carga positiva de resíduos de ácido-2,4-diaminobutírico (Dab) da polimixina, reage negativamente com os grupos de fosfatos carregados por lipídios. Essa ação promove o deslocamento de cálcios divalentes ( $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) que permite a conexão dos fosfodiésteres com o lipídio A, desestabilizando assim a membrana externa (HANCOCK, 1999). Este evento permite que a polimixina insira sua

região hidrofóbica na membrana externa da bactéria, para interagir com as cadeias gordurosas do lipídio A.

A interação hidrofóbica tem a capacidade de gerar rupturas na membrana externa da bactéria, onde promove o contato do fármaco com a parte interna da membrana citoplasmática, no qual é induzido uma troca de fosfolipídios, tal ação promove um desequilíbrio osmótico na célula bacteriana resultando à lise celular (CAJAL, 1996). Além de seu efeito de interrupção da membrana em bactérias Gram-negativas, a ligação de polimixinas ao lipídio A também neutraliza a toxicidade das endotoxinas. Acredita-se que um mecanismo antibacteriano secundário de polimixina, seja através da inibição de nicotinamida adenina dinucleotídeo família enzimática oxidase. Essa atividade inibitória tem sido observada em *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, e *Mycobacterium smegmatis* (DERIS, 2013).

Desde a introdução das polimixinas, a atividade bactericida deste fármaco manteve-se sem grandes alterações ao decorrer dos anos (STORM et al., 1977; LANDMAN et al., 2007). No entanto, após sua reintrodução casos de resistência polimixina vem sendo relatados. É possível visualizar em alguns estudos a comprovação do que o uso de outros antibióticos em associação com a polimixina, pode potencializar o efeito bactericida do medicamento (FALAGAS et al., 2005; SOBIESZCZYK et al., 2004).

#### **2.4 Resistência a polimixina**

A resistência à polimixina se agrava pelo fato de que alguns países não possuem uma política eficiente sobre o uso de antibióticos em seres humanos e na produção animal. A resistência à polimixina é mediada principalmente pela modificação estrutural dos lipopolissacarídeos (LPSs) da membrana e, por meio de sistemas reguladores (BROWN e DAWSON, 2017). A célula bacteriana tem a capacidade de reduzir a atração eletrostática entre os grupos fosfato do Lipídio A e a molécula de polimixina, e essa mudança na carga da membrana via modificação lipídica impede que o fármaco se ligue e promova a lise celular, levando a resistência (TRIMBLE et al., 2016; WATKINS et al., 2016; BROWN e DAWSON, 2017).

O mecanismo mais comum é modificação da estrutura química do Lipídeo A através da biossíntese e adição de fosfoetanolamina (pEtN) e L-4-aminoarabinose (L-Ara4N). Alterações que ocorrem devido a ativação de sistemas, regulados de forma

negativa pelo gene *mgrB*. Os dois componentes Pho-PQ do sistema atuam como um regulador principal da resistência a polimixina. Em resposta a concentrações sub-letais de polimixina, o sensor de quinase PhoQ irá fosforilar o PhoP, levando à ativação do sistema PmrA-PmrB via proteína PmrD. Conseqüentemente, o sistema PmrA-PmrB ativa a expressão do operon *arnBCADTEF*, necessário para a modificação covalente de grupos fosfato no lípido A. Todas essas modificações estruturais diminuem a carga negativa da membrana, evitando a interação com a polimixina (OLAITAN et al., 2014; BARON et al., 2016; JEANNOT et al., 2017).

### **2.5 Emergência de isolados de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina e a busca por alternativas terapêuticas**

A polimixina é um medicamento de último recurso para tratar infecções causadas por microrganismos resistentes, porém a prescrição desse fármaco vem sendo realizada frequentemente em hospitais brasileiros, pelo aumento de aparecimentos de infecções agudas geradas por microrganismos Gram-negativos que apresenta resistência a vários antimicrobianos (BARTOLLETTI et al., 2016). As taxas de isolados de *K. pneumoniae* resistente à polimixina B apresentou um aumento de 24,1%, comparando o período no início da pandemia do COVID-19 (2019) com o período pandêmico (GASPAR, 2021). Um estudo realizado em São Paulo em isolados de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), demonstrou que o índice de resistência a polimixina variou de 0% em 2011 para 27% em 2015 (BARTOLLETTI et al., 2016; SAMPAIO e GALES, 2016; ROSSI et al., 2017). E de acordo com Da Silva, *et al.*, o desfecho dos pacientes com infecções de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina no ano de 2020 revelou um aumento de 60% na taxa de mortalidade. A exposição prolongada a vários antimicrobianos pode ter sido um fator determinante para o desenvolvimento e disseminação dessa resistência (TRIMBLE et al., 2016; WATKINS et al., 2016; BROWN e DAWSON, 2017; AIRES et al., 2016).

Devido a situação de escassez de terapias no combate a isolados bacterianos multirresistentes, o grupo de pesquisa em biologia molecular e microrganismos (GPBMM) vem se importando com a causa e tem como uma de suas principais linhas de pesquisas, a caracterização dos mecanismos de resistência antimicrobiana e desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o controle de bactérias multirresistentes. Essa situação gera uma grande preocupação na saúde em todo o mundo, pois infecções causadas por microrganismos multirresistentes apresentam altas taxas de

morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados (da SILVA, 2020). Além disso, diversos compostos estão sendo testados e estão apresentando um alto potencial de atividade antimicrobiana frente a isolados de *K. pneumoniae* resistente a polimixina, dentre eles óleos essenciais, tais como o de *Cinammomum cassia* (L.) sozinho ou em combinação com a polimixina (VASCONCELOS, 2020a).

## **2.6 Reposicionamento de fármacos como uma alternativa frente a microrganismos multirresistentes**

O processo de descoberta e desenvolvimento de um novo medicamento passa por um longo e caro processo de regulamentação, pois os medicamentos além de apresentar segurança, necessitam também da comprovação de sua eficácia em todas as faixas etárias e em todos os grupos raciais e étnicos (EICHBORN et al., 2011). O caminho ligado a criação e formulação de um fármaco inédito, leva de 2 a 3 anos para a descoberta e validação da finalidade, 5 meses a 1 ano para selecionar os protótipos com atividade biológica, e mais 1 a 3 anos para otimizá-los. Os ensaios para a determinação das propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade) usando modelos animais demoram em média de 1 a 2 anos, para a avaliação de segurança e eficácia em ensaios clínicos. Para a aprovação dos órgãos regulamentadores e a chegada no mercado, varia de um intervalo de 1 a 2 anos (LI e JONES, 2012).

Recentemente, o termo de reposicionamento ou reaproveitamento de fármacos são utilizados para novos usos de antigos fármacos, ou ainda, refere-se ao processo de encontrar novos usos fora do escopo da indicação médica original para fármacos já existentes (ASHBURN & THOR, 2004). Essa técnica é utilizada há muito tempo, havendo registro de seu uso desde meados do século passado (ARONSON, 2007). As pesquisas utilizando a abordagem de reposicionamento de fármacos vêm ganhando força no âmbito da pesquisa, principalmente em medicamentos que conseguem atuar diretamente em vias metabólicas.

## **2.7 Gálio como um promissor agente antibacteriano**

O Gálio, foi descoberto em 1875 pelo químico francês Paul Emile Lecoq de Boisbaudran e é um elemento pertencente ao grupo 3A da tabela periódica, que pode facilmente ser encontrado na crosta terrestre como subproduto da exploração de alumínio a partir da bauxita (CHITAMBAR, 2016; LU et al., 2017). O Gálio é conhecido por ação de agente de diagnóstico e agentes terapêutico no câncer, e em distúrbios de metabolismo

ósseo (BERNSTEIN et al., 2011). Seu estado de oxidação mais abundante é o  $Ga^{2+}$ , que vem sendo bastante utilizado para a produção do composto nitrato de gálio (GaN) (MACÍAS-MACÍAS et al., 2019). Clinicamente, o GaN para injeção intravenosa (Ganite®) é aprovado para uso no tratamento de hipercalcemia de malignidade. O GaN demonstrou eficácia clínica em mieloma múltiplo, câncer de bexiga, linfoma, câncer de ovário e carcinoma hepatocelular (BERNSTEIN, 1998; BERNSTEIN et al., 2011).

Gálio apresenta propriedades semelhantes com o ferro, como potencial de ionização e afinidade eletrônica. Sabendo que o ferro é um elemento primordial no metabolismo de vários organismos, sendo adquirido do ambiente na forma de íons  $Fe^{3+}$ , muito se explora o uso de combinações com esse composto para uma nova alternativa de tratamento frente a infecções. São as diferenças entre gálio e ferro, no entanto, que são responsáveis pelos efeitos terapêuticos do gálio e sua baixa toxicidade (HEDLEY et al. 1988). Os sistemas biológicos muitas vezes são incapazes de distinguir gálio de ferro. Entretanto, diferentemente do ferro, o gálio não pode ser reduzido em meio fisiológico para  $Ga^{2+}$ , o que ocasiona a destruição do ciclo biológico das células e deterioração da parede celular das bactérias, com conseqüentemente a morte celular (MINANDRI et al., 2014). Quando presente no metabolismo de bactérias, os íons  $Ga^{3+}$  agem impedindo a expressão de genes dependentes de ferro e a síntese e reparo do DNA, além de favorecer o aparecimento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHITAMBAR, 2016; MINANDRI et al., 2014).

A atividade antibacteriana dos compostos gálio tanto *in vitro* quanto *in vivo* tem sido mostrada frente à vários patógenos bacterianos importantes, dentre eles: *Mycobacterium tuberculosis*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (ANTUNES et al., 2012; ARNOLD et al., 2012; HIJAZI et al. 2018a; KANEKO et al., 2007). O gálio juntamente com a proteína lactoferrina apresentou resultados significativos frente isolados de *P. aeruginosa*, obtendo ações eficientes de diminuição de ferro no organismo bacteriano possibilitando que o mecanismo de ação de gálio seja eficiente. Tal ação resultou em aumento da taxa de separação das bactérias da superfície de crescimento e desacelerou o crescimento das células aderidas (KANEKO et al. 2007). Em testes com isolados de *A. baumannii* o gálio demonstrou ser muito eficiente na inibição do crescimento bacteriano *in vitro*, como também apresentou ser ativo na prevenção de infecção letal por diferentes isolados de *A. baumannii* (ANTUNES et al. 2012; de LÉSÉLEUC et al. 2012). Estudos realizados com gálio frente isolados de *S. aureus*,

indicam que o composto pode ser útil no tratamento de infecções de *S. aureus* na área veterinária em espécies infectadas com o microrganismo, particularmente quando usado como uma terapia atual ou local (ARNOLD et al. 2012). Trabalhos envolvendo os três compostos de gálio frente a isolados de bactérias ESKAPE, demonstram um comparativo das propriedades antibacterianas, em meios de teste de suscetibilidade convencionais caracterizados por diferentes concentrações de ferro, e composições de nutrientes. Onde os compostos foram oralmente eficazes sob condições que imitam o ambiente *in vivo*. Notavelmente, foi descoberto que em meio pobre em ferro necessita de baixas concentrações de GaN para inibir o crescimento de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e algumas Enterobacteriaceae (HIJAZI et al. 2018a) e isolados clínicos de *K. pneumoniae* (THOMPSON et al. 2015).

Como as outras espécies bacterianas patogênicas mencionadas anteriormente, os isolados de *K. pneumoniae* têm uma alta demanda por ferro, especialmente no ambiente hospedeiro. Recentemente um estudo comprovou que um isolado clínico hiper virulento mostrou-se ter uma propensão aumentada para a aquisição de ferro. Demonstrando, a comprovação de que os isolados de *K. pneumoniae* hipervirulentas (hvKP) produzem mais sideróforos (SP) do que as isolados de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), tal característica apresenta um mecanismo importante de contribuição para a hiper virulência. Os dados apresentados demonstram que todas de hvKP testadas produziram mais SP do que isolados de (KPC) obtidos de sangue em condições pobres em Fe, como ocorre no hospedeiro humano (RUSSO et al., 2014). Neste estudo, foi testado a hipótese de que as cepas de hvKP produzem mais SP do que as cepas de KPC e, que essa característica é um mecanismo importante que contribui para a hipervirulência de *K. pneumoniae*. Tal informação é de total relevância para que seja possível o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico e estratégias preventivas e terapêuticas no manejo da infecção por hvKP.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente estudo tem como objetivo explorar a atividade antimicrobiana de GaN frente a isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B.

### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar as concentrações inibitórias mínimas de GaN capazes de inibir o crescimento de isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B;
- Relatar as concentrações de GaN capazes de inibir a formação de biofilme de isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B;
- Avaliar a atividade *in vivo* de GaN no tratamento de infecção por *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B utilizando o modelo alternativo *C. elegans*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Isolados clínicos e identificação

Os isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B foram obtidos de pacientes internados em um hospital terciário na região Centro-Oeste do Brasil. (número 877.292 / 2014) (da SILVA et al. 2020). Os isolados clínicos foram armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  e realizadas culturas no meio ágar Mueller-Hinton fresco por 24 horas antes de qualquer teste. Os isolados clínicos foram identificados por Vitek® 2 (bioMérieux, Hazelwood, MO) e confirmadas por tempo de ionização de desorção a laser assistida por matriz de espectrometria de massa de voo (MALDI-TOF MS), utilizando um espectrômetro Microflex LT (Bruker Daltonics, MA, EUA) (FEHLBERG et al. 2013). Todos os isolados foram previamente caracterizados em testes moleculares quanto à presença de genes de resistência (da SILVA et al., 2020).

### 4.2 Meios e Compostos

O RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) foi utilizado nos testes. O meio foi complementado com soro humano 10% livre de complemento (RPMI-HS), e utilizado neste estudo de acordo com descrito anteriormente por Hijazi em 2018. O GaN e os fármacos sistêmicos antibacterianos foram obtidos da Sigma-Aldrich. O GaN foi dissolvido em água, e os outros fármacos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

### 4.3 Teste de suscetibilidade do GaN

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antimicrobianos foram determinadas por meio da microdiluição em caldo de acordo com as diretrizes do Instituto

de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute 2020). A suscetibilidade antimicrobiana foi determinada utilizando-se os pontos de referência aprovados pelo CLSI (Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais 2020) para os fármacos: amicacina, ampicilina, aztreonam, cefoxitine, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacina, ertapenem, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, nitrofurantoina, piperaciclina/tazobactam, e sulfametoxazol/trimetropim sendo meropenem e imipenem ( $\leq 1$  mg/L, suscetíveis; 2 mg/L, intermediários; e  $\geq 4$  mg/L, resistentes) e ertapenem ( $\leq 0,5$  mg/L, suscetíveis; 1 mg/L, intermediários; e  $\geq 2$  mg/L, resistentes). Para colistina foi utilizada a Comissão Europeia de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (2020), que propõe pontos de corte de concentração menor ou igual à 2  $\mu\text{g/ml}$  até maior que 2  $\mu\text{g/ml}$  ( $\leq 2 / > 2$   $\mu\text{g/ml}$ ) (CARVALHAES et al., 2013).

A atividade inibitória do GaN em isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B foi avaliada pelo método de microdiluição (Clinical Laboratory Standards Institute, 2015), com pequenas modificações. As bactérias foram cultivadas por 24 h em RPMI-HS, e depois diluídas para se obter  $5 \times 10^8$  UFC/mL em 200  $\mu\text{L}$  de RPMI-HS, na presença de concentrações crescentes (0,5 a 256  $\mu\text{g/mL}$ ) de composto de GaN usando microplacas de poliestireno de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C com agitação orbital (110 rpm), e posteriormente foram submetidas a leitura. A CIM de GaN foi determinada como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano detectado pela turvação ou não turvação do meio, a qual foi observada visualmente (Clinical Laboratory Standards Institute, 2015).

#### 4.4 Biofilme

Para avaliar a atividade antibiofilme de GaN, selecionamos 2 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B que apresentavam uma grande produção de biofilme. A inibição da formação de biofilme foi avaliada utilizando-se métodos descritos anteriormente por Haney et al. em 2015, com modificações. Utilizamos uma suspensão bacteriana, preparada pela diluição de uma cultura *overnight* cultivada em RPMI-HS. Foi adicionado aos poços de uma microplaca de poliestireno de 96 poços com fundo em U, 50  $\mu\text{L}$  de meio RPMI-HS em todos os poços e 100  $\mu\text{L}$  na primeira fileira de GaN, e então foi realizado o método de microdiluição do fármaco, posteriormente foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de inóculo. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em condições estáticas

para permitir o crescimento bacteriano e a maturação do biofilme. No dia seguinte, o crescimento bacteriano foi quantificado registrando em uma densidade óptica de 600 (OD<sub>600</sub>) em cada poço usando um espectrofotômetro de microplacas em um comprimento de onda de 595nm. A densidade óptica das células planctônicas e o meio foram lidos e posteriormente descartados, e a biomassa aderida foi enxaguada três vezes com água destilada. Posteriormente as células aderidas na placa foram coradas com solução de cristal violeta (CV) 0,1% por 20 minutos e depois enxaguada três vezes com água destilada para remover o excesso de corante. As células foram ressuspensas em etanol 70% e foi realizado a leitura dos resultados em uma absorbância de 595 nm. A quantidade de inibição de biofilme foi calculada em relação à quantidade de biofilme cultivada na ausência de gálio (definido como 100% biofilme) e ao controle de esterilidade do meio (definido como 0% biofilme). Os resultados foram mediados por duas réplicas biológicas separadas.

#### **4.5 Atividade *in vivo* em um modelo de infecção *C. Elegans***

Nematoides sincronizados, *C. elegans* AU37 (*glp-4; sek-1*), foram cultivados para a fase L4, suspensos em meio NGM (95% tampão M9, caldo BHI (Brain heart infusion) de 5%, 10 µg/ml colesterol) e adicionado em placas de 6 poços com pelo menos 20 vermes por poço (BRACKMAN et al., 2011). Os nematoides foram infectados com 25 µL de uma cultura *overnight* ajustada a  $5 \times 10^8$  UFC/mL em meio ágar NGM no período de duas horas, logo em seguida os vermes foram lavados e expostos a 25 µL de tratamento (256 µg/mL GaN). Nematoides não infectados no meio NGM, bem como nematoides infectados, mas não tratados, foram usados como controles. O número de nematoides viáveis e mortos foi avaliado a cada 24 h ao longo de 6 dias de incubação a 25°C.

#### **4.6 Análise estatística**

As curvas de sobrevivência foram traçadas e a estimativa de diferenças na sobrevivência (testes de log-rank e Wilcoxon) foi realizada pelo método Kaplan-Meier usando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Um valor p de <0,05 foi considerado significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 GaN apresenta atividade *in vitro* frente à isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B

A atividade de GaN e diferentes antibióticos que ainda são frequentemente utilizados para o tratamento de infecções causadas por isolados de *K. pneumoniae* como polimixina B, amicacina, cefalotina, ceftazidime e cefepime foram testados frente a um total de vinte isolados clínicos *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B (Tabela 1). A concentração inibitória mínima (CIM) de GaN variou de 2-32 µg/mL. O tratamento com GaN exibiu valores de CIM significativamente mais baixos do que o cefalotina (>256 µg/mL) ou cefepime (CIM, 32 a >64 µg/mL). Todos os isolados foram resistentes à polimixina B (CIM, 8-32 µg/mL).

Os dados genômicos mostraram que o gene *blaKPC-2*, conferindo resistência aos carbapenêmicos, estava presente em todos os isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B, e os mesmos carregavam mais de um gene ESBL, incluindo *blaCTX-M*, *blaSHV* e *blaTEM*. O gene de resistência à colistina mediado por plasmídeos *mcr-1* não foi detectado. Avaliamos a atividade bactericida do GaN no RPMI-HS, ou seja, em condições que tendem a imitar fluidos biológicos.

**Tabela 1.** Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de seis fármacos com potencial de ação antimicrobiana frente a isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B.

Isolados clínicos de <i>K.pneumoniae</i>	Antibióticos CIMs (µg/ml)					
	GaN	Polimixina B	Amicacina	Cefalotina	Ceftazidime	Cefepime
1	4	8(R)	16(S)	>256(R)	8(I)	32(R)
2	8	8(R)	8(S)	>256(R)	8(I)	>64(R)
3	16	8(R)	16(S)	>256(R)	8(I)	16(R)
4	8	8(R)	4(S)	>256(R)	8(I)	64(R)
5	8	8(R)	16(S)	>256(R)	8(I)	32(R)
6	4	32(R)	2(S)	>256(R)	32(R)	>64(R)
7	4	16(R)	8(S)	>256(R)	32(R)	>64(R)
8	4	16(R)	16(S)	>256(R)	8(I)	>64(R)
9	8	4 (R)	4(S)	>256(R)	8(I)	32(R)
10	8	16(R)	2(S)	>256(R)	64(R)	>64(R)
11	16	16(R)	16(S)	>256(R)	32(R)	>64(R)
12	8	8 (R)	>64(S)	>256(R)	32(R)	>64(R)
15	32	32(R)	16(S)	>256(R)	16(R)	32(R)

18	8	16(R)	16(S)	>256(R)	16(R)	32(R)
19	2	16(R)	16(S)	>256(R)	8(I)	32(R)
20	8	8 (R)	16(S)	>256(R)	32(R)	64(R)
22	8	16(R)	64 (R)	>256(R)	>256(R)	>256(R)
23	4	8 (R)	8(S)	>256(R)	16(R)	64(R)
25	2	8 (R)	8(S)	>256(R)	8(I)	64(R)
29	4	8 (R)	16(S)	>256(R)	16(R)	32(R)

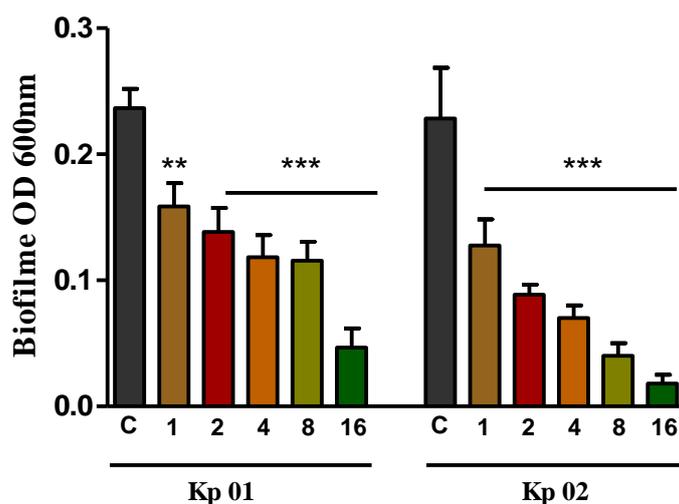
Efeitos antimicrobianos de seis fármacos (GaN, polimixina B, amicacina, cefalotina, ceftazidime e cefepime) frente a isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B, apresentando resultados: Susceptível (S); Resistente (R) e Intermediário (I).

Fonte: Tabela autoral, 2021.

## 5.2 Atividade antibiofilme de GaN

Para avaliar a atividade antibiofilme de GaN, selecionamos 2 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B que apresentavam uma grande produção de biofilme. O gráfico 1 demonstra os efeitos que o GaN apresenta na formação de biofilme por isolados de *K. pneumoniae* resistente a polimixina B, em um intervalo de concentrações que variavam de 1 à 16 µg/mL. Revelando uma boa ação antibiofilme na concentração de 16 µg/mL. Os resultados foram comparados com os controles positivos e negativos.

**Gráfico 1.** Inibição de biofilme de isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B por GaN.



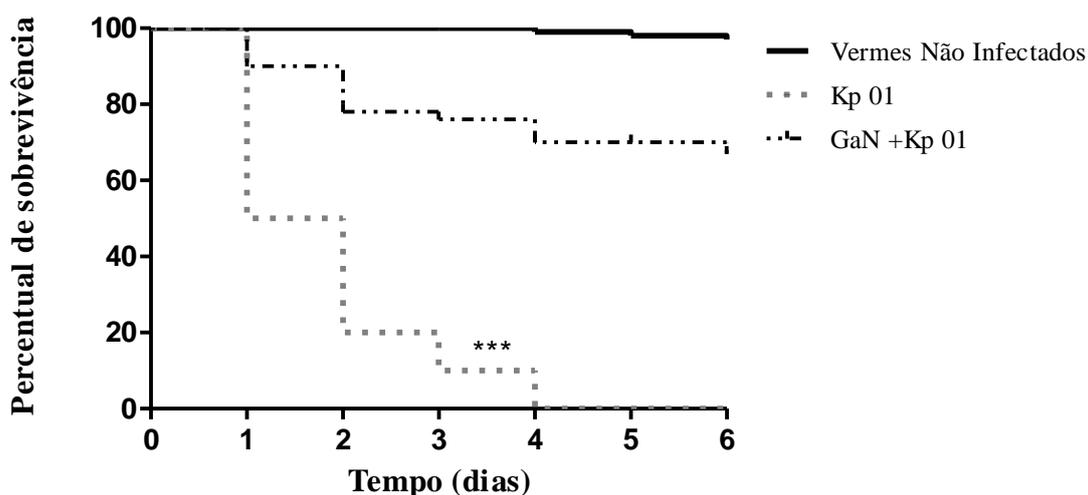
Efeitos de GaN na formação de biofilme frente a isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B (*Kp*) versus controles não tratados (C). Diferentes concentrações de GaN expressos em µg/mL. \* p < 0,05.

Fonte: Figura autoral, 2021.

### 5.3 GaN promove a sobrevivência de *C. elegans* infectados com isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B

Os resultados promissores obtidos *in vitro* levaram a uma investigação da capacidade do GaN de inibir a patogenicidade *K. pneumoniae* resistente à polimixina B *in vivo*. Para este objetivo foi utilizado um modelo de infecção baseado nos *C. elegans*. Este modelo já foi usado com sucesso no estudo da patogênese e terapêutica *K. pneumoniae* (KAMALADEVI e BALAMURUGAN, 2017; KONG et al. 2016). Nematoides foram infectados por bactérias e sua taxa de sobrevivência foi determinada com e sem tratamento por GaN. A sobrevivência dos vermes foi significativamente aumentada na presença de 16 µg/mL de GaN, quando comparado com vermes infectados sem tratamento (Gráfico 2).

**Gráfico 2.** Efeito do GaN na sobrevivência de nematoides infectados com isolado clínico de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B



Controle: vermes não infectados. \* $p < 0,05$  ( $n=25$  vermes por poço). GaN testado a 16µg/mL. Fonte: Figura autoral, 2021.

## 6 DISCUSSÃO

A alta propagação de uma série de microrganismos resistentes fora dos ambientes hospitalares vem gerando uma grande preocupação ao redor de todo o mundo, pois tal evento vem resultando uma grande limitação da eficácia de várias classes de antibióticos disponíveis para o tratamento das infecções causadas por patógenos resistentes (CHOI, 2019). Sabendo disso, a ciência vem travando uma longa corrida em busca de tratamentos alternativos. Portanto estão sendo abordadas várias estratégias para impedir e combater a disseminação desses microrganismos, sendo que uma dessa abordagens é o uso de substâncias com alto poder antimicrobiano que apresentam a capacidade de atingir a

nutrição e o metabolismo bacteriano (GOSS, 2018). Além de realizar combinações de fármacos que já obtêm suas propriedades conhecidas e estão presentes no mercado farmacêutico que resultam em sinergismo (CHOI, 2019; GOSS, 2018).

A captação de ferro e o seu metabolismo são considerados alvos importantes na busca de novos fármacos antibacterianos para novas estratégias antibacterianas (BALLOUCHE et al., 2009; CHENG et al. 2016). Neste estudo, investigou-se as propriedades antibacterianas do GaN frente a isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B em experimentos *in vitro* e *in vivo*.

O gálio e ferro são competidores metabólicos, portanto, para gálio ter sua eficiência na atividade antibacteriana é necessário que o meio apresente condições relativas à escassez de ferro (MINANDRI et al., 2014). Estudos prévios relatam de que o complemento presente no soro humano, quando adicionado ao meio RPMI apresenta um baixo teor de ferro induzindo uma resposta de privação de ferro, devido à presença de transferina (HIJAZI et al., 2018b). A presença de soro em meio RPMI, mimetiza o que ocorre *in vivo*, proporcionando um ambiente mais adequado para testes de atividade antibacteriana de gálio (HIJAZI et al., 2018b).

Foram realizados três tipos de testes para explorar o uso de GaN como um agente antimicrobiano, sendo eles: Testes de atividade antimicrobiana para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), teste de atividade antibiofilme e teste *in vivo* utilizando modelo alternativo *C. elegans*.

Testes de atividade antimicrobiana para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi realizado com GaN e com fármacos que são atualmente utilizados no tratamento de infecções com isolados clínicos resistentes, como: a polimixina B, amicacina, cefalotina, ceftazidime e cefepime. No estudo que realizamos foi possível visualizar as variações de concentrações inibitórias mínimas, de cada um dos medicamentos frente a isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B. Os fármacos já utilizados atualmente nos tratamentos apresentaram concentrações inibitórias mínimas altas com uma média de variação das concentrações entre 32- >256 µg/mL. O uso de GaN frente a isolados clínicos resistentes, apresentou a inibição em um intervalo de concentração de 2-32 µg/mL, resultando em uma ação eficaz aos isolados em uma concentração baixa. A partir desses dados é possível observar que conseguimos obter resultados promissores de GaN em ensaios antimicrobianos, onde futuramente o mesmo

podem-se tornar um fármaco promissor para o tratamento das infecções por microrganismos resistentes. A eficiência de GaN em baixa concentração frente a microrganismos, também foi comprovada em estudos de Xu *et al.*, em 2017, onde as bactérias comumente encontradas em infecções de queimaduras, como: *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*, *S. aureus* e *S. epidermidis* foram sensíveis ao tratamento com GaN. Os resultados obtidos mostram que o intervalo de concentrações de 16 a 64 µg/mL foram os mais efetivos na inibição do crescimento bacteriano. A atividade de GaN foi confirmada pelas alterações micromorfológicas que foram encontradas em isolados de *E. coli* após o tratamento com GaN. A membrana celular de *E. coli* se apresentou áspera, com encolhimento, e também com danos na parede celular. Em isolados de *S. aureus* tratados com GaN, não foi diferente, exceto pelas bordas lisas que foram mantidas após o tratamento (XU et al., 2017).

Os testes utilizando GaN também foi estendido para teste de atividade antibiofilme. As bactérias formadoras de biofilmes geram uma grande preocupação, pois apresentam a capacidade produzir uma espessa camada extracelular que resulta em uma proteção dos microrganismos aos efeitos dos agentes antimicrobianos (HANEY, 2015). Essas bactérias são consideravelmente mais resistentes a antibióticos do que células planctônicas, portanto, o tratamento de uma infecção após a formação de um biofilme é frequentemente malsucedido com os antimicrobianos atuais (LOCK, 2015; HANEY, 2015). No presente estudo, conseguimos observar que o GaN possuiu uma atividade antibiofilme promissora, inibindo os biofilmes produzidos por isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B, em uma concentração de 16 µg/mL. Esses dados se alinham com estudos realizados anteriormente que utilizam o GaN como um contribuinte na inibição de biofilmes. De acordo com Kaneko *et al.*, o GaN teve a capacidade de inibir o crescimento de biofilme de isolados de *P. aeruginosa* em uma faixa de concentração de 0,5 à 10 µg/mL, havendo inibição já em uma concentração de 0,5 µg/mL (KANEKO et al., 2007a; CHOI et al., 2019). Experimentalmente, GaN na concentração de 64 µM atuou reduzindo drasticamente tanto o crescimento planctônico, quanto o biofilme maduro de isolados de *A. baumannii* (RUNCI et al., 2016). Como também tem a capacidade de interromper significativamente os biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* em superfícies revestidas com plasma, e aumentou a

sobrevivência de *C. elegans* infectados com isolados de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (CHOI et al., 2019).

Além da boa performance do GaN em testes *in vitro*, o mesmo se mostrou eficiente em testes *in vivo* em modelo alternativo *C. elegans*. Foi possível visualizar a partir dos resultados que os nematoides sem infecção em condições favoráveis de desenvolvimento, mantiveram-se com um percentual de sobrevivência absoluto (100%). Quando os nematoides foram expostos a uma infecção por um isolado clínico de *K. pneumoniae* resistente a polimixina B, esse percentual de sobrevivência decaiu drasticamente em um curto período de tempo, demonstrando assim que a *K. pneumoniae* é um agente letal aos nematoides. Quando os nematoides são expostos a uma infecção por um *isolado clínico de K. pneumoniae* resistente a polimixina B, juntamente com um tratamento de GaN em uma concentração de 16 µg/mL, foi possível visualizar um aumento significativo na sobrevivência dos nematoides.

Todos os dados obtidos ao decorrer deste trabalho, corroboram com vários trabalhos já realizados anteriormente por vários pesquisadores que obtiveram resultados promissores em ensaios com formulações de gálio em modelos *in vitro* e *in vivo* frente a isolados resistentes. Choi *et al.*, em 2019 avaliaram compostos de gálio, como Ga protoporfirina e Ga mesoporfirina de forma isolada e em combinação com GaN frente a isolados de *P. aeruginosa* resistente a colistina, *K. pneumoniae* resistente a carbapenemicos (KPC), *A. baumannii* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em condições limitadas em ferro. Os resultados encontrados mostraram-se promissores, sendo observado sinergismo entre os compostos de gálio (Protoporfirina de gálio e GaN) frente aos isolados de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e MRSA. Os resultados encontrados foram confirmados utilizando o ensaio *in vivo* em modelo *C. elegans*. O ensaio de *Time Kill* revelou que a combinação sinérgica de dois compostos de gálio apresentou ação bacteriostática frente a isolado de *K. pneumoniae* resistente a carbapenemicos e MRSA e bactericida frente ao isolado de *P. aeruginosa* resistente a colistina (CHOI et al.,2019).

O composto citrato de gálio (GaCi) também apresentou resultados promissores frente a isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemicos. O resultado foi confirmado em testes *in vivo* utilizando o modelo de infecção de ferida murina (THOMPSON et al., 2015). Os resultados encontrados demonstraram que quando as feridas eram tratadas com GaCi, o processo de cicatrização dos ferimentos ocorria de forma mais rápida

e com redução da inflamação, quando comparado com os controles não tratados. Além disso, o tratamento com citrato de gálio conseguiu prevenir a formação de biofilme bacteriano em curativos, reduzindo significativamente a carga bacteriana, quando em comparação com os controles não tratados (THOMPSON et al., 2015).

Uma nova formulação de gálio denominada meltolato de gálio (GaM) foi utilizada em modelo murino de feridas de queimaduras que foram infectadas por *P. aeruginosa*. Os camundongos foram observados após a queimadura / infecção por 7 dias, e a porcentagem de sobrevivência foi registrada para cada grupo. Todos os camundongos tratados com placebo morreram dentro de 48 h após a infecção. No entanto, foi observado um aumento da sobrevivência dos camundongos tratados com GaM, revelando ser eficaz no tratamento de feridas infectadas por *P. aeruginosa*. Além dos efeitos locais, o GaM também foi terapêuticamente eficaz na prevenção da disseminação sistêmica de infecções preestabelecidas por *P. aeruginosa* no local da lesão. Somado a isso, foi bem tolerado em todas as doses administradas, não apresentando sinais clínicos de toxicidade (DELEON et al., 2009).

O efeito de GaN no crescimento bacteriano no modelo de infecção intranasal de camundongos por *A. baumannii*, mostrou que essa formulação conseguiu prevenir o crescimento bacteriano, e acelerou a eliminação de resquícios bacterianos dos pulmões de camundongos infectados (LÉSÉLEUC et al., 2012).

O gálio possui alvos terapêuticos diferentes dos antibióticos convencionais, sendo promissor, principalmente no tratamento de isolados clínicos multirresistentes. A resistência pré-existente a múltiplos antibióticos não compromete a atividade do gálio. Com base nisso, formulações com gálio podem representar escolhas de último recurso no combate a infecções por bactérias pan-resistentes (HIJAZI et al., 2018b).

Há, portanto, evidências substanciais demonstrando que os compostos de gálio têm um amplo espectro de atividade antibacteriana, e seus mecanismos de ação estão bem definidos. Este estudo reforça que estudos futuros são necessários para avaliar os efeitos do GaN sozinho ou em combinações com antibióticos usando modelos *in vivo*, especialmente camundongos para validar a atividade sinérgica.

## 7 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluir que:

- O GaN apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana *in vitro* frente à isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B, apresentando valores de CIMs que variam de 2 a 32µg/mL;
- O GaN possui a capacidade de interromper crescimento de biofilmes, demonstrando ação na concentração de 16µg/mL frente ao biofilme de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B;
- O GaN promove o aumento de sobrevivência de *C. elegans* infectados com isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B, quando comparado com vermes infectados sem tratamento;
- O GaN poderia representar um fármaco de último recurso para combater infecções por bactérias multirresistentes, porém é necessário estudos aprofundados para a confirmação dessa atividade.

## REFERÊNCIAS

AIRES, C. A. M.; PEREIRA, P. S.; ASENSI, M. D.; ASSEF, A. P. D. C. *mgrB* Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil. v. 61, n.3. American Society for Microbiology, p. 15, 2016.

ANTUNES, L. C. S.; IMPERI, F.; MINANDRI, F.; VISCA, P. 'In vitro and in vivo antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. v. 56, n. 11. American Society for Microbiology Journals, p. 5961–5970, 2012.

ARNOLD, C. E.; BORDIN, A.; LAWHON, S. D.; LIBAL, M. C.; BERNSTEIN, L. R.; COHEN, N. D. “Antimicrobial activity of gallium maltolate against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*: An *in vitro* study”. v. 155, n. 2-4. *Veterinary Microbiology*, p. 389–394, 2012.

ARONSON. An agenda for research on adverse drug reactions. v. 64, n. 2. *British Journal of Clinical Pharmacology*, p. 119–121, 2007.

ASLAM, B.; WANG, W.; ARSHAD, M. I.; KHURSHID, M.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M. H.; NISAR, M. A.; ALVI, R. F.; ASLAM, M. A.; QAMAR, M. U.; SALAMAT, M. K. F.; BALOCH, Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. v. 11. *Infect Drug Resist*, p. 1645–1658, 2018.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. v. 3, n. 8. *Nature Reviews Drug Discovery*, p. 673–683, 2004.

ARYEE, A.; PRICE, N. Antimicrobial stewardship – can we afford to do without it? v. 79, n. 2. *British Journal of Clinical Pharmacology*, p. 173–181, 2015.

BAPTISTA, M. G. de F. M. *Mecanismos de Resistência aos Antibióticos*. 2013. 51 f. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BALLOUCHE, M.; CORNELIS, P.; BAYSSE, C. Iron metabolism: a promising target for antibacterial strategies. v. 4, n. 3. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, p. 190–205, 2009.

BARON, S.; HADJADJ, L.; ROLAIN, J.-M.; OLAITAN, A. O. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. v. 48, n. 6. *International Journal of Antimicrobial Agents*, p. 583–591, 2016.

BARTOLLETTI, F.; SECO, B. M. S.; DOS SANTOS, C. C.; FELIPE, C. B.; LEMO, M. E. B.; ALVES, T. da S.; PASSADORE, L. F.; MIMICA, M. J.; SAMPAIO, S. C. F.; ZAVASCKI, A. P.; SAMPAIO, J. L. M. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-

Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. v. 22, n. 10. Emerging Infectious Diseases, p. 1849–1851, 2016.

BERNSTEIN, L. Mechanisms of therapeutic activity for Gallium. v. 50, n. 4. Pharmacological Reviews, p. 665–82, 1999.

BERNSTEIN, L. R.; VAN DER HOEVEN, J. J.; BOER, R. O. Hepatocellular carcinoma detection by gallium scan and subsequent treatment by gallium maltolate: rationale and case study. v. 11, n. 6. Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry, p. 585–90, 2011.

BIALVAEI, A. Z.; KAFIL, H. S. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. v. 31, n. 4. Current Medical Research and Opinion, p. 707–21, 2015.

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D.; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. v. 13, n. 1. Nature Reviews. Microbiology, p. 42–51, 2015.

BRACKMAN, G.; COS, P.; MAES, L.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. v. 55, n. 6. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 2655–2661, 2011.

BROWN, P.; DAWSON, M. J. Development of new polymyxin derivatives for multi-drug resistant Gram-negative infections. J Antibiot (Tokyo). v. 70, n. 4. The Journal of Antibiotics, p. 386–394, 2017.

BUSH, K. Past and Present Perspectives on beta-Lactamases. v. 62, n. 10. Antimicrobial agents and Chemotherapy, p. 1076–18, 2018.

CAJAL, Y.; ROGERS, J.; BERG, O. G.; JAIN, M. K. Intermembrane molecular contacts by polymyxin B mediate exchange of phospholipids. v. 35, n. 1. Biochemistry, p. 299–308, 1996.

CARVALHAES, C. G.; CAYÔ, R.; ASSIS, D. M.; MARTINS, E. R.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; GALES, A. C. Detection of SPM-1-producing *Pseudomonas*

*aeruginosa* and class D  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. v. 51, n. 1. Journal of Clinical Microbiology, p. 287–90, 2013.

CHENG, G.; DAI, M.; AHMED, S.; HAO, H.; WANG, X.; YUAN, Z. Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. v. 7. Frontiers in Microbiology, p. 470, 2016.

CHITAMBAR, C. R. The therapeutic potential of iron-targeting gallium compounds in human disease: From basic research to clinical application. v. 115. Pharmacological Research, p. 56–64, 2017.

CHOI, S.-R.; BRITIGAN, B. E.; NARAYANASAMY, P. Dual Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* Iron Metabolism Using Gallium Porphyrin and Gallium Nitrate. v. 13, n. 9. ACS Infectious Diseases, p. 1559–1569, 2019.

Da SILVA, K. E.; BOINETT, C. J.; BAKER, S.; NGUYEN, P. Molecular and epidemiological surveillance of polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Brazil with multiple *mgrB* gene mutations. v. 310, n. 7. International Journal of Medical Microbiology, p. 151448, 2020.

Da ROSA, T. J.; BIEGELMEYER, S.; LANGE, T. S.; BITTENCOURT, S. E. B.; PICOLI, S. U. Metallobetalactamase New Delhi: a review. v. 49, n. 1. Revista Brasileira de Análises Clínicas, p. 36–40, 2017.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. v. 74, n. 3. Microbiology and Molecular Biology Reviews, p. 417–433, 2010.

DERIS, Z. Z.; AKTER, J.; SIVANESAN, S.; ROBERTS, K. D.; THOMPSON, P. E.; NATION, R. L.; LI, J.; VELKOV, T. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. v. 67, n. 2. The Journal of Antibiotics. p. 147–51, 2014.

DELEON, K.; BALLDIN, F.; WATTER, C.; HAMOOD, A.; GRISWOLD, J.; SREEDHARAN, S.; RUMBAUGH, K. P. Gallium maltolate treatment eradicates *Pseudomonas aeruginosa* infection in thermally injured mice. v. 53, n. 4. Antimicrobial agent and chemotherapy, p. 1331–7, 2009.

DIJKMANS, A. C.; WILMS, E. B.; KAMERLING, I. M. C.; BIRKHOFF, W.; ORTIZ-ZACARÍAS, N. V.; NIEUWKOOP, C. van; VERBRUGH, H. A.; TOUW, D. J. Colistin: Revival of an Old Polymyxin Antibiotic. v. 37, n. 4. Therapeutic drug monitoring, p. 419–27, 2015.

De LÉSÉLEUC, L.; HARRIS, G.; KUOLEE, R.; CHEN, W. *In vitro* and *in vivo* biological activities of iron chelators and gallium nitrate against *Acinetobacter baumannii*. v. 56, n. 10. Antimicrobial Agents and Chermotherapy, p. 5397–5400, 2012.

DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. v. 46, n. 1. Food Tecnology and Biotechnology, p. 11–21, 2008.

FALAGAS, M. E.; BLIZIOTIS, I. A.; KASIAKOU, S. K.; SAMONIS, G.; ATHANASSOPOULOU, P.; MICHALOPOULOS, A. Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria. v. 24, n. BMC Infectious Diseases, p. 5–24, 2005.

FEHLBERG, L. C. C.; ANDRADE, L. H. S.; ASSIS, D. M.; PEREIRA, R. H.; GALES, A. C.; MARQUES, E. A. Performance of MALDI-ToF MS for species identification of Burkholderia cepacia complex clinical isolates. v. 77, n. 2. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, p. 126–8, 2013.

EICHBORN, J. von; MURGUEITIO, M. S.; DUNKEL, M.; KOERNER, S.; BOURNE, P. E.; PREISSNER, R. PROMISCUOUS: a database for network-based drug-repositioning. v. 39. Nucleic Acids Research, 2011.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. v. 25, n. 4. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 661–81, 2012.

FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. v. 22, n. 5. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, p. 416–22, 2016.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. v. 10, n. 4. *Journal of Infection and Public Health*, p. 369–378, 2017.

GARG, S. K.; SINGH, O.; JUNEJA, D.; TYAGI, N.; KHURANA, A. S.; QAMRA, A.; MOTLEKAR, S.; BARKATE, H. Resurgence of Polymyxin B for MDR/XDR Gram-Negative Infections: An Overview of Current Evidence'. *Critical Care Research and Practice*, 2017.

GASPAR, G. G.; BOLLELA, V. R.; MARTINEZ, R. Incidence of health-related infections and sensitivity profile staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii in the pre and during COVID-19 apandemia in an additional unit. v. 25, n. S1. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, p. 101045, 2021.

GOODMAN & GILMAN'S. *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. 12. ed. Nova Iorque: Laurence L. Brunton, PhD, [s. d.].

GOSS, C. H.; KANEKO, Y.; KHUU, L.; ANDERSON, G. D.; RAVISHANKAR, S.; AITKEN, M. L.; LECHTZIN, N.; ZHOU, G.; CZYZ, D. M.; MCLEAN, K.; OLAKANMI, O.; SHUMAN, H. A.; TERESI, M.; WILHELM, E.; CALDWELL, E.; SALIPANTE, S. J.; HORNICK, D. B.; SIEHNEL, R. J.; BECKER, L.; ... SINGH, P. Gallium disrupts bacterial iron metabolism and has therapeutic effects in mice and humans with lung infections. v. 26, n. 10. *Science Translation Medicine*, p. 460, 2018.

HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HALCHIE, A. L.; FUENTE-NÚÑEZ, C. de la; HANCOCK, R. E. W. High throughput screening methods for assessing antibiofilm and immunomodulatory activities of synthetic peptides. v. 71. *Peptides*, p. 276–85, 2015.

HANCOCK, R E. Alterations in outer membrane permeability. v. 38. Annual Review of Microbiology, p. 237–64, 1984.

HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. v. 349, n. 9049. Lancet (London, England), p. 418–22, 1997.

HANCOCK, R. E.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. v. 43, n. 6. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 1317–23, 1999.

HARDER, K. J.; NIKAIDE, H.; MATUHASHI, M. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the *ompF* porin. v. 20, n. 4. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 549–552, 1981.

HEDLEY, D. W.; TRIPP, E. H.; SLOWIACZEK, P.; MANN, G. J. Effect of gallium on DNA synthesis by human T-cell lymphoblasts. v. 48, n. 11. Cancer Research, p. 3014–8, 1988.

HIJAZI, S.; VISAGGIO, D.; PIROLO, M.; FRANGIPANI, E.; BERNSTEIN, L.; VISCA, P. Antimicrobial Activity of Gallium Compounds on ESKAPE Pathogens. v. 8. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, p. 316, 2018.

HSU, J. How covid-19 is accelerating the threat of antimicrobial resistance. v. 369. BMJ (Clinical Research ed), 2020.

JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. v. 49, n. 5. International Journal of Antimicrobial Agents, p. 526–535, 2017.

KAMALADEVI, A.; BALAMURUGAN, K. Global Proteo3 Revealed *Klebsiella pneumoniae* Induced Autophagy and Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans* by Inhibiting PI3K/AKT/mTOR Pathway during Infection. v. 7. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, p. 393-93, 2017.

KANEKO, Y.; THOENDEL, M.; OLAKANMI, O.; BRITIGAN, B. E.; SINGH, P. K. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has

antimicrobial and antibiofilm activity. v. 117, n. 4. JCI-The Journal of Clinical Investigation, p. 877–888, 2007.

KNIGHT, G. M.; GLOVER, R. E.; MCQUAID, C. F.; OLARU, I. D.; GALLANDAT, K.; LECLERC, Q. J.; FULLER, N. M.; WILLCOCKS, S. J.; HASAN, R.; KLEEF, E. van; CHANDLER, C. I. Antimicrobial resistance and COVID-19: Intersections and implications. n. 6. Epidemiology and Global Health, p. 427, 2021.

KONG, C.; ENG, S.-A.; LIM, M.-P.; NATHAN, S. Beyond Traditional Antimicrobials: A *Caenorhabditis elegans* Model for Discovery of Novel Anti-infectives. v. 7. Frontiers in Microbiology, p. 1956, 2016.

LANDMAN, D.; BRATU, S.; KOCHAR, S.; PANWAR, M.; TREHAN, M.; DOYMAZ, M.; QUALE, J. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn. v. 60, n. 1. The Journal of Antiicrobial Chemotherapy, p. 78–82, 2007.

LI, Y. Y.; JONES, S. J. M. Drug repositioning for personalized medicine. v. 4, n. Genome Medicine, p. 27, 2012.

LIPINSKI, C. A. Drug repurposing Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies. v. 8, n. 3-4, Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies, p. 57–144, 2011.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. v. 22, n. 4. Clinical Microbiology Reviews, p. 582–610, 2009.

LIVERMORE, D. M. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. v. 27, n. 2. KJIM-The Korean Journals of Internal Medicine, p. 128–142, 2012.

LOCK, G. de A. **Infecção bacterianas associadas a biofilmes em superfícies bióticas: Critérios diagnósticos, tratamento e perspectivas.** 2015. 74 f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

LU, F.; XIAO, T.; LIN, J.; NING, Q.; XIAO, L.; HUANG, F.; WANG, W.; XIAO, Q.; LAN, X.; CHEN, H. Resources and extraction of gallium: a review. v. 174. *Hydrometallurgy*, p. 105–115, 2017.

MACIAS-MACIAS, K.; CENICEROS-GÓMEZ, A.; RUIZ, M. E. G. Extraction and recovery of the strategic element gallium from an iron mine tailing. v. 7, n. 2. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, p. 102964, 2019.

MARUSINA, K.; WELSCH, D. J.; ROSE, L.; BROCK, D.; BAHR, N. The CTSA Pharmaceutical Assets Portal - a public-private partnership model for drug repositioning. v. 8, n. 3-4. *Drug Discovery Today. Therapeutic Strategies*, p. 77–83, 2011.

MINANDRI, F.; BONCHI, C.; FRANGIPANI, E.; IMPERI, F.; VISCA, P. Promises and failures of gallium as an antibacterial agent. v. 9, n. 3. *Future Microbiology*, p. 379–97, 2014.

MOREHEAD, M. S.; SCARBROUGH, C. Emergence of Global Antibiotic Resistance. v. 45, n. 3. *Primary Care*, p. 467–484, 2018.

MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? v. 180, n. 4. *CMAJ-JAMC-Medical Knowledge that Matters*, p. 408–415, 2009.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. v. 67, n. 4. *MMBR-Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 593–656, 2003.

NILSEN, I. W.; BAKKE, I.; VADER, A.; OLSVIK, O.; EL-GEWELY, M. R. Isolation of *cmr*, a novel *Escherichia coli* chloramphenicol resistance gene encoding a putative efflux pump. v. 178, n. 11. *Journal of Bacteriology*, p. 3188–3193, 1996.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. v. 5. *Frontiers in Microbiology*, p. 643, [s. d.].

Organización Panamericana de La Salud. Alerta epidemiológica: Primer hallazgo de carbapenemasas de tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM) en Latinoamérica. 2011.

PELFRENE, E.; BOTGROS, R.; CAVALERI, M. Antimicrobial multidrug resistance in the era of COVID-19: a forgotten plight? v. 10, n. 1. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2021.

RANGEL-VEGA, A.; BERNSTEIN, L. R.; MANDUJANO-TINOCO, E. A.; GARCÍA-CONTRERAS, S. J.; GARCIA-CONTRERAS, R. Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. v. 6. *Frontiers in Microbiology*, p. 282, 2015.

RICHTER, K.; THOMAS, N.; ZHANG, G.; PRESTIDGE, C. A.; COENYE, T.; WORMALD, P.-J.; VREUGDE, S. Deferiprone and Gallium-Protoporphyrin Have the Capacity to Potentiate the Activity of Antibiotics in *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants. v. 7. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, p. 280, 2017.

RAWSON, T. M.; MOORE, L. S. P.; CASTRO-SANCHEZ, E.; CHARANI, E.; DAVIES, F.; SATTA, G.; ELLINGTON, M. J.; HOLMES, A. H. COVID-19 and the potential long-term impact on antimicrobial resistance. v. 75, n. 7. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, p. 1681–1684, 2020.

ROSSATO, L.; SIMIONATTO, S.; NEGRÃO, F. J. Bacterial and fungal colonization of the respiratory tract in COVID-19 patients should not be neglected. v. 48. *American Journal of Infection Control*, p. 1127–1131, 2020.

ROSSI, F.; GIRARDELLO, R.; CURY, A. P.; GIOIA, T. D. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of Sao Paulo, Brazil, over five years. v. 21, n. 1. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, p. 98–101, 2016.

STRUELENS, M. J.; MONNET, D. L.; MAGIORAKOS, A. P.; O'CONNOR, F. S.; GIESECKE, J. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. v. 15, n. 46. Euro Surveill, p.19716, 2010.

RUSSO, T. A.; OLSON, R.; MACDONALD, U.; METZGER, D.; MALTESE, L. M.; DRAKE, E. J.; GULICK, A. M. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. v. 82, n. 6. Infection and immunity, p. 2356–67, 2014.

RUNCI, F.; BONCHI, C.; FRANGIPANI, E.; VISAGGIO, D.; VISCA, P. *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation in Human Serum and Disruption by Gallium. v. 61, n. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 1563–16, 2017.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus 426 on  $\beta$ -lactams and polymyxins. v. 47, n. 1. Brazilian Journal of Microbiology, p. 31–37, 2016.

SHARMA, A.; TIWARI, S.; DEB, M. K.; MARTY, J. L. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. v. 56, n. 2. Elsevier Public Health Emergency Collection, p. 106054, 2020.

STORM, D. R.; ROSENTHAL, K. S.; SWANSON, P. E. Polymyxin and related peptide antibiotics. v. 46. Annual Review of Biochemistry, p. 723–63, 1977.

SOBIESZCZYK, M. E.; FURUYA, E. Y.; HAY, C. M.; PANCHOLI, P.; DELLALATTA, P.; HAMMER, S. M.; KUBIN, C. J. Combination therapy with polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative respiratory tract infections. v. 54, n. 2. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, p. 566–9, 2004.

THOMPSON, M. G.; COREY, B. W.; SI, Y.; CRAFT, D. W.; ZURAWSKI. Antibacterial activities of iron chelators against common nosocomial pathogens. v. 56. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 5419–21, 2012.

THOMPSON, M. G.; TRUONG-LE, V.; ALAMNEH, Y. A.; BLACK, C. C.; ANDERL, J.; HONNOLD, C. L.; PAVLICEK, R.; ABU-TALEB, R.; WISE, M. C.; HALL, E. R.; WAGAR, E. J.; PATZER, E.; ZURAWSKI, D. V. Evaluation of Gallium Citrate Formulations against a Multidrug-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Wound Model of Infection. v. 59, n. 10. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 6484–93, 2015.

TRIMBLE, M. J.; MLYNÁRČIK, P.; KOLÁŘ, M.; HANCOCK, R. E. W. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. v. 6, n. 10. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, p. 25288, 2016.

UGHACHUKWU, P. O.; UNEKWE, P. C. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. v. 2, n. 1. *Annals of Medical&Health Sciences Research*, p. 191–198, 2012.

VASCONCELOS, N. G.; SILVA, K. E.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. Antibacterial activity of *Cinnamomum cassia L.* essential oil in a carbapenem- and polymyxin-resistant *Klebsiella aerogenes* strain. v. 53. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2020.

VASCONCELOS, N. G.; QUEIROZ, J. H. F. de S.; SILVA, K. E.; VASCONCELOS, P. C. de P.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. Synergistic effects of *Cinnamomum cassia L.* essential oil in combination with polymyxin B against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. v. 15, n. 7. *Plos one*, p. 236505, 2020.

VETTORETTI, L.; PLÉSIAT, P.; MULLER, C.; GARCH, F. E.; PHAN, G.; ATTRÉE, I.; DUCRUIX, A.; LLANES, C. Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob.* v. 53, n. 5. *Antimicrobial Agents and Chermotherapy*, p. 1987–97, 2009.

VERRON, E.; BOULER, J. M.; SCIMECA, J. C. Gallium as a potential candidate for treatment of osteoporosis. v. 17, n. 19-20. *Drug Discovery Today*, p. 1127–32, 2012.

VELKOV, T.; THOMPSON, P. E.; NATION, R. L.; LI, J. Structure–activity relationships of polymyxin antibiotics. v. 53, n. 5. HHS Public Access. Author manuscript, p. 2010, [s. d.].

WALSH, C. T.; WENCEWICZ, T. A. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. v. 67, n. 1. The Journal of Antibiotics, p. 7–22, 2014.

WATKINS, R. R.; SMITH, T. C.; BONOMO, R. A. On the path to untreatable infections: colistin use in agriculture and the end of “last resort” antibiotics. v. 14, n. 9. Expert Review of Anti-Infective Therapy, p. 785–8, 2016.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. v. 57, n. 10. Advanced Drug Delivery Reviews, p. 1451–70, 2005.

WOZNIAK, A.; VILLAGRA, N. A.; UNDABARRENA, A.; GALLARDO, N.; KELLER, N.; MORAGA, M.; ROMÁN, J. C.; MORA, G. C.; GARCÍA, P. Porin alterations present in non carbapenemase producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. v. 61, n. 9. Journal of Medical Microbiology, p. 1270–1279, 2012.

XU, Z.; ZHAO, X.; CHEN, X.; CHEN, Z.; XIA, Z. Antimicrobial effect of gallium nitrate against bacteria encountered in burn wound infections. v. 7, n. 82. Royal Society of Chemistry, p. 52266–52273, 2017.

THOMPSON, M. G.; TRUONG-LE, V.; ALAMNEH, Y. A.; BLACK, C. C.; ANDERL, J.; HONNOLD, C. L.; PAVLICEK, R.; ABU-TALEB, R.; WISE, M. C.; HALL, E. R.; WAGAR, E. J.; PATZER, E.; ZURAWSKI, D. V. Evaluation of Gallium Citrate Formulations against a Multidrug-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Wound Model of Infection. v. 59, n. 10. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 6484–93, 2015.