



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARINA LUIZY DA ROCHA NEVES

EFEITO SINÉRGICO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ALENDRONATO DE SÓDIO EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS FRENTE A CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTES

Recife
2021

MARINA LUIZY DA ROCHA NEVES

EFEITO SINÉRGICO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ALENDRONATO DE SÓDIO EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS FRENTE A CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Coorientadora: Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

Recife
2021

Catálogo na fonte
Bibliotecário: Mônica Uchôa, CRB4 1010

N518e Neves, Marina Luizy da Rocha.
Efeito sinérgico e atividade antibiofilme do alendronato de sódio em associação com antimicrobianos frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes / Marina Luizy da Rocha Neves. – 2021.
152 f.; il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Mônica Camelo Pêsoa de Azevedo Albuquerque.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Fatores de virulência. 2. Biofilme. 3. Sinergismo farmacológico. 4. Resistência bacteriana a antibióticos. 5. Bactérias aeróbias gram-negativas.
I. Albuquerque, Mônica Camelo Pêsoa de Azevedo (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2021-127)

MARINA LUIZY DA ROCHA NEVES

EFEITO SINÉRGICO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ALENDRONATO DE SÓDIO EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS FRENTE A CEPAS DE

Pseudomonas aeruginosa **MULTIRRESISTENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 24/02/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. André de Lima Aires
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Kleodoaldo Oliveira de Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, Sandra e Inaldo.

AGRADECIMENTOS

À Deus misericordioso, por tudo, com Ele meu caminho foi sempre protegido e abençoado.

Aos meus pais, Sandra e Inaldo, por acreditarem em mim, por toda compreensão, apoio e amor. Vocês que não mediram esforços para educar eu e meu irmão e que prezaram sempre por nossos estudos.

Ao meu esposo que esteve comigo desde a primeira etapa e que sempre estimulou meu crescimento profissional, por toda paciência e incentivo que foram tão necessários durante esses anos. Que por muitas vezes abdicou de momentos de lazer para ser companheiro dos meus momentos de estudo, meu muito obrigada.

Ao meu irmão, Felipe Rocha, meus sobrinhos Guilherme e Olívia e a minha cunhada Tayanne que em meio a tudo conseguiram deixar meus dias mais felizes.

A minha avó Luiza, minha mãe duas vezes, pessoa amável. Que sempre rezou com toda sua fé, por mim, que prazer poder vivenciar esse momento de conquista ao seu lado. A todos os meus tios que sempre acreditaram e me incentivaram. A toda minha família.

A minha orientadora, prof. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes, pelos incansáveis ensinamentos que se fazem presente na nossa rotina diária. Não menos importante, a gratidão pelo seu jeito singular de acolher nós alunos, com carinho, conselhos e paciência. Meu muito obrigada. A professora Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque pela orientação e pela presteza durante o doutorado.

As minhas companheiras que o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismo me proporcionou, Wilma Raianny e Raíssa Ximenes, com elas os dias foram mais leves, amizade que levarei comigo; Luanne Eugênia que me acompanhou por mais tempo e foi uma companheira de laboratório fundamental durante todo meu doutorado, sem ela o caminho teria sido mais árduo. Minha eterna gratidão.

A todos que fazem o Departamento de Antibióticos e que contribuíram para construção desse trabalho. As professoras Dra. Ana Maria Souto Maior e Dra. Norma Buarque de Gusmão por disponibilizarem a infraestrutura dos seus laboratórios. Ao professor Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro, meu orientador de mestrado e um incentivador durante o doutorado.

Ao doutorando Jailton Lobo e a prof. Dra. Maria Amélia pela colaboração para realização deste trabalho.

A CAPES.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial Nerilin e Sr. Rilvan, sempre tão dispostos a nos orientar em todos os aspectos administrativos que o doutorando necessita.

Aos amigos que mesmo distante torceram por esse momento singular que vivo.

A todos... toda minha gratidão!

Como aceitara ir no meu destino de mar,
preferi essa estrada,
para lá chegar,
que dizem da ribeira
e à costa vai dar,
que deste mar de cinza
vai a um mar de mar;
preferi essa estrada
de muito dobrar,
estrada bem segura
que não tem errar
pois é a que toda a gente
costuma tomar
(na gente que regressa
sente-se cheiro de mar).

(MELO NETO, 1986, p. 274).

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um bastonete Gram-negativo não fermentador, considerada uma bactéria oportunista. As infecções causadas por esse microorganismo representam um problema de saúde pública no Brasil e no mundo, sendo responsáveis pelas altas taxas de mortalidade e morbidade relacionadas a infecções hospitalares. Essas bactérias, em sua maioria, são resistentes aos antimicrobianos atuais, devido a formação de biofilme, que impede a penetração dos antimicrobianos, e, a outros mecanismos de resistência, relacionados aos fatores de virulência dessa bactéria, mediados pelo *quorum sensing*. A Organização Mundial de Saúde designa esta espécie como prioridade para o desenvolvimento de novas terapias. Desta maneira, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana do alendronato de sódio e dos agentes antimicrobianos: amicacina, cefepima, ceftriaxona, ceftazidima, meropenem, levofloxacino e polimixina B, frente a cepas *Pseudomonas aeruginosa* (n=12) oriundos de isolados clínicos e duas cepas controle *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1. Inicialmente foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) seguida da Concentração Bactericida Mínima (CBM). A partir do método *Checkboard* foi avaliada *in vitro* a associação desses antimicrobianos com o alendronato de sódio. A interpretação da atividade de interação foi realizada com base na determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (Índice CIF). Por fim, foi avaliada a atividade antibiofilme do Alendronato de sódio (AS), isolado, frente as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (n=12) e sua atividade antibiofilme quando nas seguintes associações: AS/cepepima, AS/ceftazidima e AS/meropenem. Além disso, foi avaliada a atividade do AS por microscopia óptica para visualizar a alteração na morfologia do biofilme. Todas as cepas apresentaram perfil de resistência aos antimicrobianos testados, com exceção da polimixina B. O valor CIM variou de 32 a 1024µg/mL para amicacina, 64 a 1024µg/mL para cefepima, 512 a 1024µg/mL para ceftriaxona, 16 a 1024µg/mL para ceftazidima e levofloxacino, 8 a 1024µg/mL para meropenem, e 2 a 4µg/mL para polimixina B. O valor da CIM do AS foi de 1024µg/mL para todas as cepas avaliadas. O efeito sinérgico foi observado entre todas as associações de antimicrobianos e AS, com os valores do Índice de Concentração Inibitória Fracionada variando de 0,75 a 0,16. A redução da CIM dos antimicrobianos foi igual ou superior a 75% para todas as cepas. A associação do AS com antimicrobianos de diferentes classes atuou

sinergicamente, inibindo cepas de *P. aeruginosa* resistentes a múltiplos fármacos. O estudo das concentrações do índice CIF frente as cepas de *P. aeruginosa* apresentou efeito de redução do biofilme estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,0001$), com redução de até 85,4% da formação do biofilme. Além disso, foi observada a atividade antibiofilme do AS em até 87,1%. Corroborando com o efeito visualizado por microscopia óptica em relação a inibição da formação do biofilme. O alendronato de sódio parece aumentar a sensibilidade das cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes e diminuir satisfatoriamente a produção do biofilme, revelando ser um tratamento promissor para infecções causadas por estas espécies bacterianas multirresistentes.

Palavras-chave: Fatores de Virulência. Biofilme. Sinergismo Farmacológico. Resistência Bacteriana a Antibióticos. Bactérias Aeróbias Gram-Negativas.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a non-fermenting Gram-negative rod, considered an opportunistic bacterium. The infections caused by this microorganism represent a public health problem in Brazil and in the world, being responsible for the high rates of mortality and morbidity related to hospital infections. Most of these bacteria are resistant to current antimicrobials, due to the formation of biofilm, which prevents the penetration of antimicrobials, and to other resistance mechanisms, related to virulence factors of this bacterium, mediated by quorum sensing. The World Health Organization designates this species as a priority for the development of new therapies. Thus, the present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of sodium alendronate and antimicrobial agents: amikacin, cefepime, ceftriaxone, ceftazidime, meropenem, levofloxacin and polymyxin B, against strains *Pseudomonas aeruginosa* (n=12) from clinical isolates and two control strains *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1. Initially, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined followed by the Minimum Bactericidal Concentration (CBM). Using the Checkboard method, the association of these antimicrobials with sodium alendronate was evaluated in vitro. Interaction activity was interpreted based on the determination of the Fractional Inhibitory Concentration Index (CIF Index). Finally, the antibiofilm activity of sodium Alendronate (AS), isolated, was evaluated against the strains of *Pseudomonas aeruginosa* (n=12) and its antibiofilm activity when in the following associations: AS/cepepima, AS/eftazidime and AS/meropenem. In addition, the AS activity was evaluated by optical microscopy to visualize the change in the biofilm morphology. All strains showed a resistance profile to the tested antimicrobials, except for polymyxin B. The MIC value ranged from 32 to 1024µg/mL for amikacin, 64 to 1024µg/mL for cefepime, 512 to 1024µg/mL for ceftriaxone, 16 to 1024µg/mL mL for ceftazidime and levofloxacin, 8 to 1024 µg/mL for meropenem, and 2 to 4 µg/mL for polymyxin B. The MIC value for AS was 1024 µg/mL for all strains evaluated. The synergistic effect was observed between all associations of antimicrobials and AS, with the values of the Fractional Inhibitory Concentration Index ranging from 0.75 to 0.16. The MIC reduction of antimicrobials was 75% or more for all strains. The association of AS with antimicrobials of different classes acted synergistically, inhibiting strains of *P. aeruginosa* resistant to multiple drugs. The study of the concentrations of the CIF index against the strains of *P. aeruginosa* showed a statistically significant reduction

effect on the biofilm compared to the control ($p < 0.0001$), with a reduction of up to 85.4% of the biofilm formation. In addition, AS antibiofilm activity was observed in up to 87.1%. Corroborating the effect visualized by optical microscopy in relation to inhibition of biofilm formation. Sodium alendronate seems to increase the sensitivity of multidrug-resistant *P. aeruginosa* strains and satisfactorily decrease biofilm production, revealing to be a promising treatment for infections caused by these multidrug-resistant bacterial species.

Keywords: Virulence factors. Biofilm. Pharmacological synergism. Bacterial resistance to antibiotics. Gram-Negative Aerobic Bacteria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Quadro de classificação do gênero <i>Pseudomonas</i> .	26
Figura 2 –	Estrutura química de moléculas autoindutoras presentes em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	28
Figura 3 –	Vias de ativação do <i>quorum sensing</i> em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	30
Figura 4 –	Estágios referente as etapas de formação do biofilme.	32
Figura 5 –	Estrutura do <i>pili</i> tipo IV.	34
Figura 6 –	Adesão através do flagelo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 a superfície hidrofóbica.	36
Figura 7 –	Ilustração do mecanismo de defesa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	53
Figura 8 –	Quadro classificatório dos diferentes tipos de resistência bacteriana por <i>P. aeruginosa</i> .	55
Figura 9 –	Mecanismo de ação dos β -lactâmicos.	57
Figura 10 –	Estrutura química da polimixina B e sua interação com a membrana da célula bacteriana.	61
Figura 11 –	Estrutura química dos bifosfonatos.	62
Figura 12 –	Estrutura química do ácido alendronico e do alendronato de sódio.	63
Figura 13 –	Esquema do teste fenotípico para determinação da formação da MBL.	70
Figura 14 –	Esquema da técnica de extração de DNA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	71
Figura 15 –	Esquema de distribuição dos antimicrobianos pelo método do tabuleiro xadrez.	76
Figura 16 –	Perfil dos isobogramas com os possíveis efeitos entre as associações de fármacos: A (Aditivo), B (Sinérgico) e C (Antagônico).	77
Figura 17 –	Diagrama dos fármacos utilizados para determinação da atividade antibiofilme.	78

Figura 18 – Esquema da biossíntese e avaliação da atividade antibiofilme em microplacas.	79
Figura 19 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pelo método de Gram.	84
Figura 20 – Expressão fenotípica dos pigmentos hidrossolúveis das 12 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> estudadas.	85
Figura 21 – Produção de protease alcalina por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	86
Figura 22 – Perfil de susceptibilidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a antimicrobianos.	87
Figura 23 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Amicacina frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14, LFBM-H15 e LFBM-H16.	95
Figura 24 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Amicacina frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H21, LFBM-C03.	96
Figura 25 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Cefepima frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H14, LFBM-H15 e LFBM-H16.	97
Figura 26 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Cefepima frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03 e SPM-1.	98
Figura 27 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Ceftazidima frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14 e LFBM-H15.	99
Figura 28 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Ceftazidima frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03 e SPM-1.	100

Figura 29 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Ceftriaxona frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H06, LFBM-H15, LFBM-H16 e SPM-1.	101
Figura 30 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Levofloxacino frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14 e LFBM-H15.	102
Figura 31 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Levofloxacino frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03 e SPM-1.	103
Figura 32 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Meropenem frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H09, LFBM-H15, LFBM-H16 e LFBM-H17.	104
Figura 33 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Meropenem frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H21, LFBM-C03, SPM-1.	105
Figura 34 – Avaliação da produção de biofilme em microplaca.	106
Figura 35 – Percentual de redução da formação do biofilme das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14 e LFBM H15, após tratamento com Alendronato de sódio (8192, 4096, 2048 e 1024 µg/mL).	108
Figura 36 – Percentual de redução da formação do biofilme das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03, SPM-1 e PAO1, após tratamento com Alendronato de sódio (8192, 4096, 2048 e 1024 µg/mL).	109
Figura 37 – Gráfico representativo da redução da produção de biofilme entre as associações cefepima e alendronato de sódio.	112
Figura 38 – Gráfico representativo da redução da produção de biofilme entre as associações ceftazidima e alendronato de sódio.	112
Figura 39 – Gráfico representativo da redução da produção de biofilme entre as associações meropenem e alendronato de sódio.	113

- Figura 40 – Microplaca corada após etapa de fixação do biofilme, criando uma comparação entre o controle de crescimento e o tratamento com Alendronato de sódio (8192, 4096, 2048 e 1024 µg/mL). 114
- Figura 41 – Microscopia óptica do biofilme. 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sítio de origem dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizados no estudo.	65
Tabela 2 –	Antimicrobianos e critérios de classificação da resistência.	69
Tabela 3 –	<i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	72
Tabela 4 –	Critérios de interpretação da resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos antimicrobianos, com base nos valores de concentração inibitória mínima (CIM).	74
Tabela 5 –	Identificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por reações bioquímicas.	84
Tabela 6 –	Detecção dos genes de resistências aos β -lactâmicos e teste fenotípico da MBL.	87
Tabela 7 –	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do alendronato de sódio e dos antimicrobianos frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multidroga resistentes.	89
Tabela 8 –	Associação do Alendronato de Sódio com agentes antimicrobianos frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multidroga resistentes.	92
Tabela 9 –	Percentual de redução da produção de biofilme frente ao tratamento com AS.	110

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBÓLOS

AMH	Ágar Mueller-Hinton
3-oxo-C12-HSL	N-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona
AHL	Acil-homoserina lactone
algL	Alginato liase
AMI	Amicacina
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BF	Bifosfonatos
C4-HSL	N-butanoil-homoserina lactona
Ca ²⁺	Cálcio
CAZ	Ceftazidima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
c-di-GMP	Diguanilato cíclico ou bis-(3'-5')-cíclico-dimérico-guanosina-monofosfato
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Mueller Hinton
CMP	Cefepima
CRO	Ceftriaxona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eDNA	DNA extracelular
EPS	Matriz exopolissacarídea
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ S	Gás sulfídrico
HHQ	2-hepitol-4-hepitolquinolona
KIA	<i>Kligler Iron Agar</i>
LFBM	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos
LVX	Levofloxacina
MER	Meropenem
NET	Neutrófilos

NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO ₃	Nitrato
PMN	Polimorfonucleados
POL	Polimixina B
psII	Locus de síntese de polissacarídeo
QS	<i>Quorum sensing</i>
RNA _r	RNA ribossomal
ROS	Espécie reativa a oxigênio
TP4	<i>Pili</i> tipo IV
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WHO	<i>World Health Organization</i>
°C	Graus Celsius
A	Alfa
B	Beta
%	Porcentagem
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
v/v	volume/volume
Log ₁₀	Logaritmo decimal
AS	Alendronato de Sódio
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
LB	Lurian Bertani
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
3.2	QUORUM SENSING	27
3.3	BIOFILME	31
3.4	ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DO BIOFILME	33
3.4.1	Adesinas	33
3.4.2	Pili	33
3.4.3	Flagelo	34
3.4.4	Segundo mensageiro di-GMP	36
3.5	LIPOPOLISSACARÍDEO	37
3.6	MATRIZ DO BIOFILME	38
3.6.1	Exopolissacarídeos	38
3.6.1.1	Alginato	38
3.6.1.2	Psl	39
3.6.1.3	Pel	40
3.6.2	DNA Extracelular	40
3.7	INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS NO METABOLISMO DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
3.7.1	Função do Magnésio no metabolismo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
3.7.2	Função do Zinco no metabolismo bacteriano especialmente em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
3.7.3	Função do Cobre no Metabolismo Bacteriano	45
3.7.4	Metabolismo do Cobalto em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
3.7.5	Influência do Molibdênio no metabolismo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47

3.7.6	Funções do Manganês do Metabolismo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
3.7.7	Influência do Níquel no metabolismo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
3.7.8	Metabolismo do Ferro em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
3.8	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANO	52
3.9	ANTIMICROBIANOS	55
3.9.1	Aminoglicosídeos	55
3.9.2	B-lactâmicos	56
3.9.2.1	Metallo- β -lactamases	59
3.9.3	Fluoroquinolonas	60
3.9.4	Polimixinas	60
3.10	BIFOSFONATOS COMO AGENTE QUELANTE	62
4	MÉTODOS	65
4.1	MICRO-ORGANISMOS	65
4.1.1	Isolamento	65
4.1.2	Preservação e conservação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
4.2	IDENTIFICAÇÃO BACTERIOLÓGICA DO MICRO-ORGANISMO	66
4.2.1	Produção de pigmentos	66
4.2.2	Provas preliminares para identificação bioquímica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
4.2.2.1	Semeio em Ágar tríplice açúcar-ferro (tsi)	67
4.2.2.2	Atividade da citocromo oxidase	67
4.2.2.3	Utilização do citrato	67
4.2.2.4	Atividade da uréase	67
4.2.2.5	Produção de hemolisinas	68
4.2.2.6	Produção de protease alcalina	68
4.3	DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA	68
4.4	DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE METALO-B-LACTAMASE	69
4.5	ANÁLISE MOLECULAR DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
4.5.1	Extração e quantificação de DNA	70

4.5.2	Detecção dos genes de Metallo-β-Lactamase (bla_{SPM-1}, bla_{IMP}, bla_{VIM}) e o bla_{KPC}	71
4.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA	72
4.6.1	Preparação e padronização do inóculo	72
4.6.2	Drogas	72
4.6.3	Determinação da atividade antimicrobiana	73
4.6.4	Critérios de interpretação	73
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPSEUDOMONAS DO ALENDRONATO DE SÓDIO ASSOCIADO A ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS	74
4.7.1	Micro-organismos	74
4.7.2	Agentes antimicrobianos	74
4.7.3	Preparação e padronização do inóculo	75
4.7.4	Avaliação do efeito das associações entre alendronato de sódio e antimicrobianos – método do tabuleiro xadrez	75
4.7.5	Critérios de interpretação	76
4.8	BIOSSÍNTESE DO BIOFILME POR CEPAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> E A ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ALENDRONATO DE SÓDIO ISOLADO E ASSOCIADO COM ANTIMICROBIANOS	77
4.8.1	Micro-organismos	77
4.8.2	Meio de cultura	77
4.8.3	Agentes antimicrobianos	78
4.8.4	Preparação do inóculo	78
4.8.5	Avaliação da formação do biofilme <i>in vitro</i>	78
4.8.6	Critérios de interpretação e classificação do biofilme	80
4.8.7	Determinação da atividade antibiofilme frente as associações de antimicrobianos e alendronato de sódio	80
4.8.8	Determinação da atividade antibiofilme frente ao alendronato de sódio	81
4.8.9	Análise estatística	81

4.9	AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓPTICA DA PRODUÇÃO DO BIOFILME E DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ALENDRONATO DE SÓDIO EM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82
4.9.1	Micro-organismos	82
4.9.2	Meio de cultura	82
4.9.3	Droga	82
4.9.4	Preparação do inóculo	82
4.9.5	Avaliação da formação do biofilme em placa de poliestireno para análise microscópica	83
5	RESULTADOS	84
5.1	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS CLÍNICAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
5.2	DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA	86
5.3	DETECÇÃO DOS GENES DE Metabo- β -Lactamase (BLA _{SPM-1} , BLA _{IMP} , BLA _{VIM}) E O BLA _{KPC}	87
5.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	88
5.5	EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO COM ANTIMICROBIANOS – TABULEIRO XADREZ	90
5.6	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME PELO MÉTODO DE MICROPLACA	106
5.7	ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ALENDRONATO DE SÓDIO	106
5.8	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME ENTRE AS ASSOCIAÇÕES DE ALENDRONATO DE SÓDIO E AS CEFALOSPORINAS	111
5.9	ANÁLISE DESCRITIVA DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME POR MICROSCOPIA ÓPTICA	113
6	DISCUSSÃO	116
7	CONCLUSÃO	127
	REFERÊNCIAS	129
	APÊNDICE A – PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO BR 102020009449 1	151
	APÊNDICE B - CARTA DE ACEITE DE ARTIGO REVISTA RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT	152

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou a primeira lista com os patógenos resistentes a antibióticos que devem ser prioridade para desenvolvimento de antimicrobianos, nessa lista está inserida a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (WHO, 2017). Caracterizado por ser um bacilo, Gram-negativo, ubíquo e oportunista, *Pseudomonas aeruginosa* está frequentemente associado a infecções nosocomiais graves em pacientes imunocomprometidos e portadores de patologias como fibrose cística (CIOFU *et al*, 2015; PANG *et al*, 2019).

Para infectar o hospedeiro esse micro-organismo é capaz de biossintetizar uma variedade de moléculas autoindutoras, as quais estão associadas à virulência da cepa e são moduladas através do *quorum sensing* (QS) (KARIMINIK; BASERI-SALEHI; KHEIRKHAH, 2017). Esse mecanismo permite a comunicação entre as células, em períodos de alta densidade celular e está relacionado ao controle da população microbiana, otimizando a adaptação do micro-organismo ao meio (MOGHADDAM *et al*, 2014). Dentre os fatores de virulência modulados pelo QS, o biofilme é um dos principais (O'LOUGHLIN *et al*, 2013).

Pseudomonas aeruginosa apresenta a capacidade de se aderir e colonizar diversas superfícies bióticas e abióticas, sendo a adesão a etapa anterior a formação do biofilme. Esta organização microbiana atua oferecendo proteção contra ação de antibióticos e o ataque do sistema imunológico do hospedeiro, aumentando a sobrevivência no sítio infeccioso (TAYLOR; YEUNG; HANCOCK, 2014; BRINDHADEVI *et al*, 2020).

A homeostase dos metais biológicos, como cobalto, cobre, ferro, magnésio, manganês, molibdênio e níquel, são essenciais para os processos metabólicos da bactéria, embora ainda sejam pouco elucidados (SCHALK; CUNRATH, 2016). Esses metais podem atuar no metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa*, principalmente nas funções enzimáticas, na estruturação da proteína e como cofatores (HALL *et al*, 2016; NOVOA-APONTE; RAMÍREZ; ARGÜELLO, 2017; CRESPO; BLANCO-CABRA; TORRENTS, 2018; JU *et al*, 2018). Estando também relacionados aos fatores de virulência bem como na estruturação e produção do biofilme (D'ORAZIO *et al*, 2015; GONZALEZ *et al*, 2018; MARGUERETTAZ *et al*, 2014).

Considerando que inviabilizar a ação desses íons nas células bacterianas possa comprometer seu metabolismo e sua atividade bacteriana, sabendo que o alendronato de sódio é um composto quelante, utilizado na clínica para outras terapias

farmacológicas. Suas propriedades físico-químicas de ser caracterizado por ser um bisfosfonato e possuir ação quelante devido aos grupos fosfatos carregados negativamente (LONG; FILMS, 2006; ALI *et al*, 2015), despertou o interesse para avaliação da sua atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Diante da problemática mundial da resistência bacteriana de *Pseudomona aeruginosa*, este trabalho objetivou avaliar o alendronato de sódio como agente quelante dos íons metálicos, visando a reversão da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos tradicionais e relacionar a atividade do alendronato de sódio frente ao biofilme.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade do Alendronato de sódio associado a antimicrobianos convencionais frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes e correlacionar essa atividade com a formação do biofilme.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

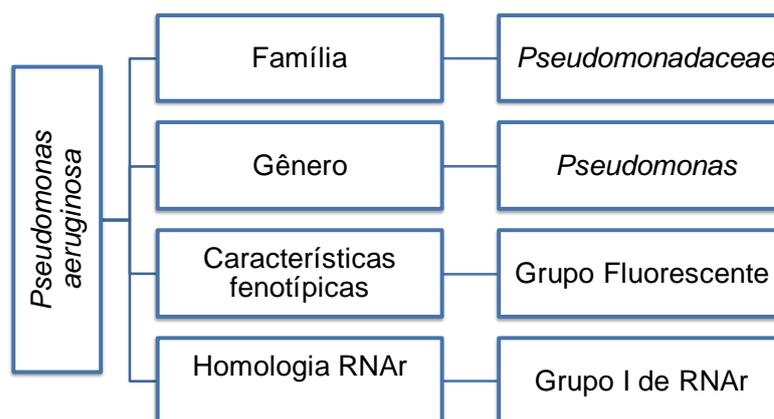
- a) Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do Alendronato de Sódio frente as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- b) Determinar, *in vitro*, o efeito das associações do Alendronato de Sódio com os agentes antimicrobianos (amicacina, cefepima, ceftazidima, ceftriaxona, levofloxacino e polimixina B), sobre *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.
- c) Evidenciar fenotipicamente a presença da metalo- β -lactamase nas culturas de onze cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- d) Pesquisar a presença dos genes de virulência *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e o *bla_{KPC}* nas culturas de *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar.
- e) Avaliar a atividade antibiofilme das associações do Alendronato de Sódio isolado e em associação com agentes antimicrobianos.
- f) Verificar por microscopia óptica o efeito do Alendronato de Sódio sobre o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa foi isolada pela primeira vez em 1882 de atadura e esse isolamento foi publicado por Gessard em 1984. A taxonomia para o gênero *Pseudomonas* foi proposta em 1895 e agrupadas em Gram-negativos aeróbios móveis (MIGULA, 1895). Este gênero e outros bacilos Gram-negativos não-fermentadores que inicialmente eram classificados como *Pseudomonas*, atualmente, formam o grupo pseudomonâdas (KONEMAN *et al*, 2018). *Pseudomonas aeruginosa* é uma espécie bacteriana pertencente à família *Pseudomonadaceae* e recebe classificação com base nas suas características fenotípicas e na homologia do RNAr, se inserido respectivamente, no grupo florescente e grupo I de RNAr (Figura 1) (GILLARDI, 1991; PALLERONI, 2010; KONEMAN *et al*, 2018).

Figura 1 – Classificação da espécie *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: O autor.

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos que mede 0,5-0,8 μm de largura, 1,5-3,0 μm de comprimento, apresenta flagelo polar (WU *et al*, 2015). Esta bactéria ocorre amplamente na natureza e cresce nos mais distintos ambientes, como água, solo, plantas e tecidos animais. *P. aeruginosa* é um micro-organismo oportunista e com essa característica causa vários tipos de infecções em pacientes imunocomprometidos ou em pacientes portadores de

alguma doença de base como fibrose cística (DAVIES, 2002; JOHANSEN *et al*, 1998; NEVES *et al*, 2014).

Esta espécie bacteriana é não fermentadora de carboidratos, possui a capacidade de oxidar glicose e cresce em temperaturas variadas (entre 5 – 42 °C), sendo a temperatura ótima para crescimento 37 °C (WU *et al*, 2015). São microorganismos aeróbios, capazes de crescer na ausência ou com pouca difusão de oxigênio, podem utilizar o óxido nítrico (NO₃) como receptor final de elétrons. São produtores de várias enzimas as quais servem para a sua classificação, como citocromo-oxidase, catalase, nitrato redutase, DNase, arginina dihidrolase. Esse bacilo é capaz de metabolizar quaternários de amônio como acetamida e ceftriaxona (PALLERONI, 2015; KONEMAN *et al*, 2018).

Quanto as características morfológicas de *P. aeruginosa* pode se apresentar de diferentes maneiras, a maioria das colônias é plana, borda rugosa, mucoide, cresce de forma espalhada na superfície do ágar. Produzem pigmentos hidrossolúveis que lhe confere colorações peculiares, dentre elas: piocianina (coloração azul) e pioverdina (pigmento verde-amarelado fluorescente). Algumas cepas desta espécie produzem também, a piorrubina (coloração vermelha) e, a piomelanina (coloração marrom) (HOSSAIN, 2014; WU *et al*, 2015).

O genoma de *P. aeruginosa* (5,5–7,5 Mbp) é formado por um único cromossomo circular de DNA e um número variável de plasmídeos, possui um genoma grande, comparados a outros genomas bacterianos, como o do *Bacillus subtilis* (4.2 Mbp), *Escherichia coli* (4.6 Mbp) e *Mycobacterium tuberculosis* (4.4 Mbp). Desta forma, *P. aeruginosa* é capaz de biossintetizar várias enzimas implicadas no seu metabolismo e com isso aumenta sua capacidade de adaptação (KLOCKGETHER *et al*, 2011; PANG *et al*, 2019).

3.2 Quorum sensing

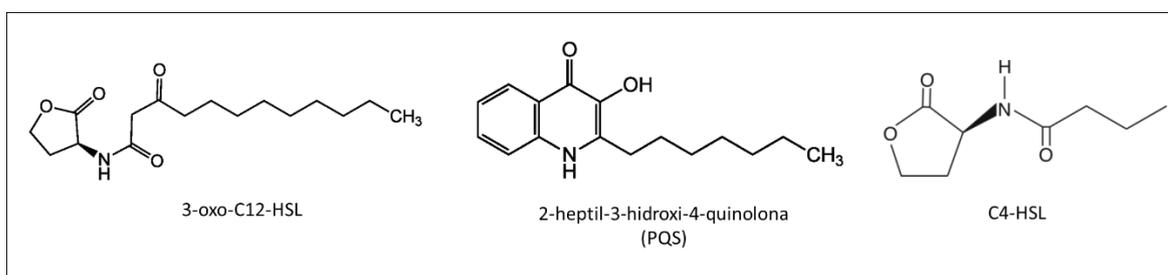
Pseudomonas aeruginosa utiliza um sistema chamado *quorum sensing* (QS) para coordenar várias funções dentre elas, aquelas relacionadas aos fatores de virulência responsáveis por sua patogenicidade (KLOCKGETHER *et al*, 2011). Este sistema é responsável por 10% da regulação dos seus genes (SCHUSTER; GREENBERG, 2006; KARIMINIK; BASERI-SALEHI; KHEIRKHAH, 2017).

Durante o processo infeccioso, *P. aeruginosa* libera uma variedade de fatores de virulência, como: elastase, ramnolipídeos, piocianina, protease, para bloquear a resposta imunológica e destruir o tecido do hospedeiro (JIMENEZ *et al*, 2012; MOGHADDAM *et al*, 2014). Apresenta ainda, três sistemas que regulam a expressão dos genes dos fatores de virulência, os sistemas *las*, *rhl* e *pqs*. estes sistemas são controlados por moléculas autoindutoras (KARIMINIK; BASERI-SALEHI; KHEIRKHAH, 2017).

As moléculas autoindutoras são constantemente biossintetizadas pelas bactérias e exportadas para o meio extracelular. Desta forma, sua concentração aumenta conforme a densidade populacional. A bactéria detecta a concentração das moléculas autoindutoras através de um receptor transmembranar que ativa a cascata de estímulos e respostas do QS (HAWVER; JUNG; NG, 2016).

As moléculas autoindutoras responsáveis pelos sistemas *las* e *rhl*, são estruturas de acil-homoserina lactona (AHL) (Figura 2). Quimicamente, apresenta uma porção homosserina lactona ionizada e outra porção de um grupamento acil. O comprimento do grupo acila pode variar entre 4-18 carbonos. Um radical metílico terminal pode ser substituído por 3-oxo ou 3-hidroxi, podendo conter vários graus de saturação. A característica hidrofóbica das moléculas de AHLs, atingem um equilíbrio a partir da sua cadeia lateral hidrofóbica e a porção parcialmente hidrofílica de homosserina lactonona ionizada. Desta forma, possuem a capacidade se difundir através das membranas celulares e apresentam estabilidade em ambiente aquoso (FUQUA; GREENBERGL, 1998; CHURCHILL; CHEN, 2011; HUANG *et al*, 2016). As moléculas resultantes do sistema *las* e *rhl* de *P. aeruginosa*, são N-3-oxo-dodecanoil homosserina lactona e N-butanoil-homosserina lactona, respectivamente (PEARSON *et al*, 1994; PEARSON *et al*, 1995; HAWVER; JUNG; NG, 2016).

Figura 2 – Estrutura química de moléculas autoindutoras presentes em *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: O autor.

O sistema *las* é composto de dois pares de genes *lasI* e *lasR*, é responsável por produzir e gerar resposta pela molécula indutora N-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL), esta é produzida por LasI sintetase e reconhecida por um regulador transcricional, nomeado de LasR. O sistema *rhl*, é controlado a partir da molécula N-butanoil-homoserina lactona (C4-HSL) (PASSADOR *et al*, 1993; JIMENEZ *et al*, 2012). Esta molécula é produzida por RhII sintetase e sua detecção é feita pelo regulador transcricional RhIR.

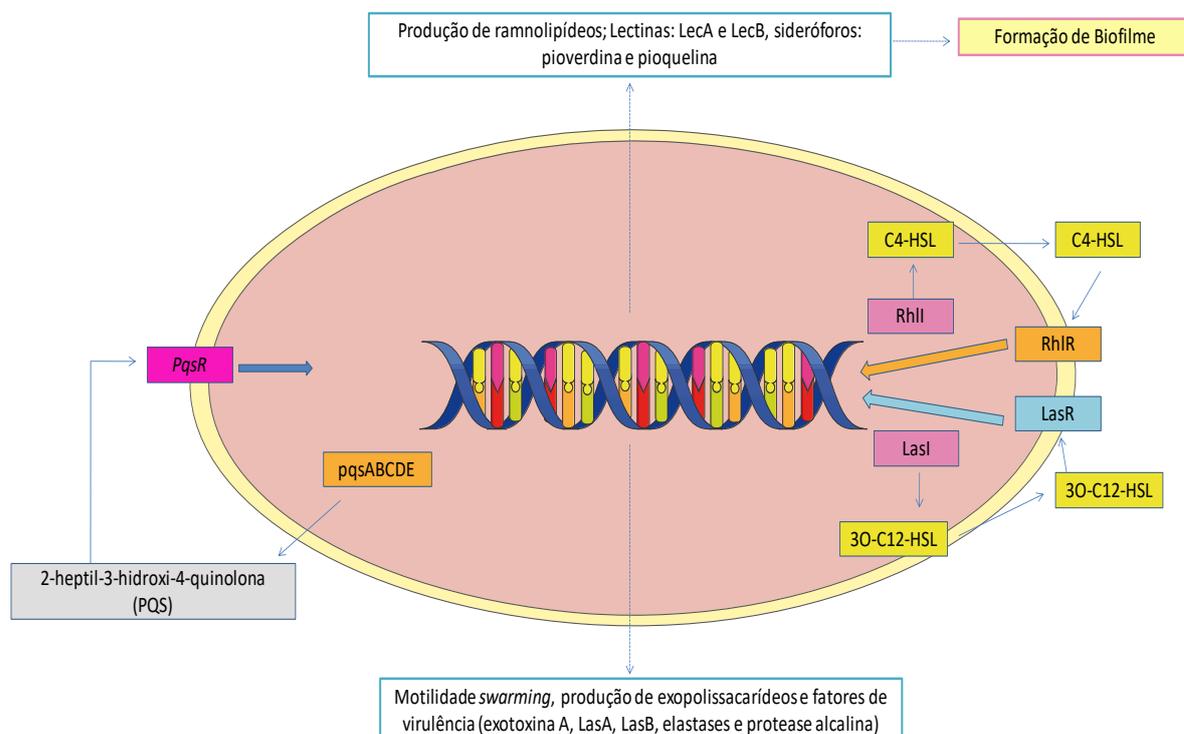
O sistema *pqs* (Sinal de quinolona de *Pseudomonas*) funciona a partir de dois autoindutores, a molécula de PQS é uma alqui quinolona, com nomenclatura química 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (Figura 2), é exclusiva de *Pseudomonas aeruginosa*, e é obtida a partir da sua molécula precursora 2-heptil-4-quinolona (HHQ) (GALLAGHER *et al*, 2002).

O sistema *pqs* é ativado quando o sistema transcricional PqsR é estimulado por HHQ ou PQS, amplificando a expressão do operon *pqsABCDE*. O *pqsE* é o quinto gene deste operon e tem como resultado a enzima PqsE, uma metalo- β -hidrolase, que tem a função de estimular a produção de elastase, piocianina e ramnolipídeo (MCGRATH, WADE; PESCI, 2004; RAMPIONI *et al*, 2010; MUKHERJEE *et al*, 2018). Estudos relevaram que a molécula PQS estimula os genes envolvidos na regulação do ferro e na biossíntese de sideróforos, resultando na quelação de ferro (DIGGLE *et al*, 2007).

O sistema *pqs*, pode ser ativado também a partir da interação da molécula 3-oxo-C12-HSL com o PqsR, este estimula a biossíntese do operon *pqsABCDE*, ativando a síntese do composto intermediário HHQ, sendo este convertido em PQS por PqsH, ou seja, estimulando e aumentando ainda mais a produção da sua molécula autoindutora (SOHEILI *et al*, 2019).

O sistema *pqs* é capaz de otimizar a transcrição do gene *rhlI*, induzindo também a produção de C4-HSL e a expressão do sistema *rhl* (MCKNIGHT; IGLEWSKI; PESCI, 2000). A expressão de *pqsR* e *pqsABCDE* é inibida por C4-HSL. Pode-se dizer que o sistema *las* é o topo da hierarquia dos sistemas de regulação do *quorum sensing*, por outro ângulo, o sistema *rhl* é controlado pelos sistemas *las* e *pqs*, porém grande parte dos fatores de virulência são ativados por *rhl*. No geral, a união dos sistemas forma uma cascata de ativação e gera várias reações que serão desencadeadas surgindo um verdadeiro quórum de células (LEE *et al*, 2013).

Figura 3 – Vias de ativação do *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Reprodução baseada em KARIMINIK; BASERI-SALEHI; KHEIRKHAH (2017).

Os sistemas *las*, *rhl* e *pqs* são interconectados (Figura 3), no entanto, o sistema *las* está no topo da hierarquia em relação a regulação dos demais sistemas do *quorum sensing*. A multimerização de *lasR* com 3-oxo-C12-HSL, forma o complexo inicial para ativação da transcrição de *rhlI*, *rhlI*, *lasI* e dos genes de virulência os quais são mediados pelo seu regulon, caracterizando o *feedback* positivo. O complexo *LasR*-3-oxo-C12-HSL provoca também ativação do *PqsR*. O *PQS* atua também estimulando o sistema *rhl*. Por outro lado, a expressão de *PqsR* e *pqsABCDE* é desestimulada por *RhIR*-*C4*-HSL. Evidenciando a dominância das homoserinas lactonas no controle do sistema *pqs* (PEARSON *et al*, 1995; BLEVES *et al*, 2005; KARIMINIK; BASERI-SALEHI; KHEIRKHAH, 2017).

Pseudomonas aeruginosa produz variados fatores de virulência durante infecção aguda, através da ativação dos seus genes-alvos a partir de seus autoindutores 3-oxo-C12-HSL, C4-HSL, PQS. A 3-oxo-C12-HSL estimula a biossíntese da exotoxina A, catalase, pilus, formação do biofilme, motilidade por flagelos ou motilidade *twitching* (KIEVIT *et al*, 2001). A molécula C4-HSL estimula a produção de ramnolipídeo, tanto C4-HSL quanto PQS estimulam ramnolipídeo, piocianina, lectina A e B, além desses a molécula PQS estimula também a produção

do cianeto de hidrogênio (JIMENEZ *et al*, 2012; NAKAGAMI *et al*, 2015). Dentre outros fatores de virulência que são produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* estão alginato, lipopolissacarídeos, proteases e fenazinas. Todos esses compostos estão envolvidos com a patogenicidade deste micro-organismo (ALBUQUERQUE *et al*, 2016).

3.3 BIOFILME

O biofilme é um fator de virulência importante de *Pseudomonas aeruginosa*, pois durante a infecção ele protege a célula ou população bacteriana contra os ataques das células fagocitárias do hospedeiro e da ação dos antibióticos (TAYLOR; YEUNG; HANCOCK, 2014; BRINDHADEVI *et al*, 2020).

Estruturalmente, o biofilme consiste em comunidades bacterianas inserida numa matriz exopolissacarídea (EPS) (FRIEDMAN; KOLTER, 2004), que podem se formar em superfícies bióticas (cáries dentárias, periodontite, otite média, fibrose cística, pneumonia, sinusite crônica, infecções crônicas de feridas, infecção do trato biliar, prostatite bacteriana, endocardite, infecção do trato urinário) e abióticas a uma variedade de infecções relacionadas a dispositivos médicos (RYBTKE *et al*, 2015).

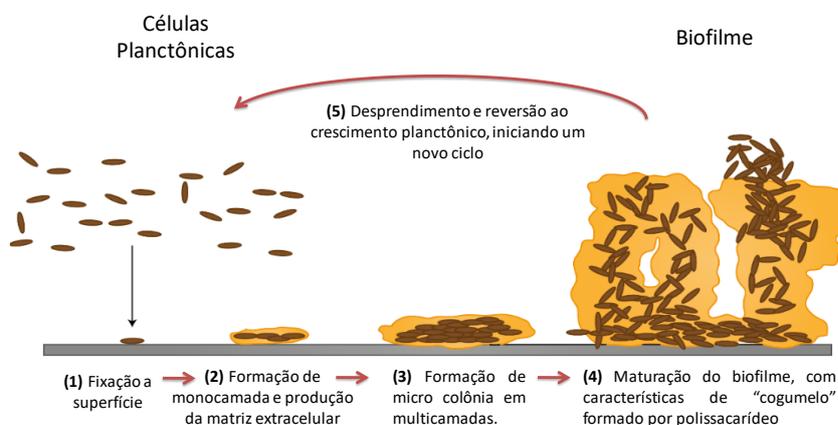
A estrutura tridimensional do biofilme fornece à célula bacteriana substrato para seu crescimento e homeostase para sua sobrevivência, protegendo as células das condições ambientais adversas, mantendo as células unidas e permitindo a comunicação entre elas (SHARMA *et al*, 2014). A comunicação entre as células ocorre através do *quorum sensing* (QS) (LEE; ZHANG, 2014), este tem papel fundamental na formação do biofilme e devido a esse mecanismo tem sido alvo terapêutico contra infecções causadas por *P. aeruginosa* (SHARMA *et al*, 2014; PATTNAIK *et al*, 2018).

No caso de infecções por *P. aeruginosa* as células fagocitárias como polimorfonucleares, se tornam incapazes de desempenhar sua função, por não conseguirem se mover no biofilme e substâncias são liberadas no tecido do hospedeiro causando danos locais. Outras evidências também demonstram que os neutrófilos são capazes de estimular a produção do biofilme (RADA, 2017).

No processo de formação de biofilme, estágio I, inicia-se pela adesão reversível das células planctônicas a uma superfície de crescimento. No estágio II, as bactérias se ligam de maneira irreversível à superfície, formando microcolônias com a matriz exopolissacarídea. O crescimento dessas microcolônias constantes resulta em sua expansão e estruturação fenotípica, caracterizando o estágio III. No estágio IV, ocorre

a colonização dos espaços adjacentes, não colonizados, são ocupados por bactérias. Por último, as bactérias que estão no estado sésil se desprendem para colonizar outros locais, chegando ao estágio V, conforme demonstração da Figura 4 (RASAMIRAVAKA *et al*, 2015).

Figura 4 – Estágios referente as etapas de formação do biofilme.



Fonte: VASUDEVAN, 2014.

A produção da matriz exopolissacarídica (EPS) ocorre durante as últimas etapas da formação do biofilme, na fase em que as células bacterianas apresentam alto grau de agregação. Essa matriz é composta de polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e biossurfactantes, este último auxiliando na aderência das células e na estruturação do biofilme (FRIEDMAN; KOLTER, 2004). Os exopolissacarídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e que estão presentes no biofilme são denominados: Pel, Psl e alginato (RYDER; BYRD; WOZNIAK, 2007). Cada um destes apresenta sua função no desenvolvimento do biofilme e na sobrevivência da bactéria.

A produção de EPS é regulada pelo di-GMP cíclico uma molécula de sinalização nucleotídica. O EPS tem a função de transformar as células bacterianas de estados planctônicos para sésseis e auxiliar na aderência das células ao biofilme (JENAL; MALONE, 2006).

Devido as características de proteção as células bacterianas, o biofilme tem sido um problema em ambientes hospitalares, onde é a causa crônica de infecções de difícil tratamento (TAYLOR, YEUNG; HANCOCK, 2014).

3.4 ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DO BIOFILME

3.4.1 Adesinas

As adesinas provenientes de organelas bacterianas como *pili* e flagelo são essenciais para auxiliar à formação do biofilme. As adesinas se ligam as moléculas receptoras glicosiladas no epitélio da célula do hospedeiro e as bactérias entre elas. Para se movimentar nas superfícies, *Pseudomonas aeruginosa* utiliza o seu único flagelo polar e os *pili* do tipo IV (O'TOOLE; KOLTER, 1998; BRUZAUD *et al*, 2015).

3.4.2 Pili

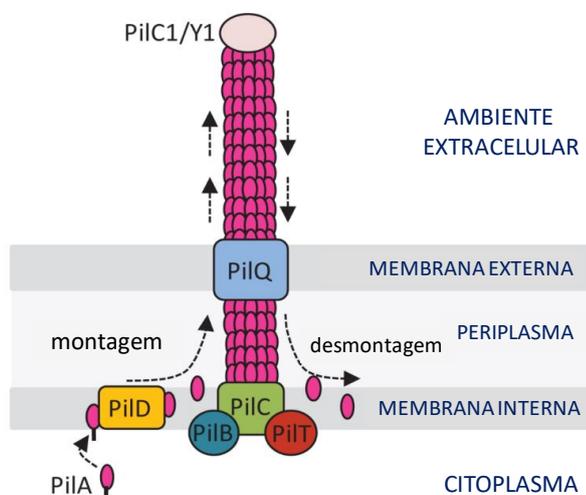
Muitas espécies de bactérias possuem estruturas filamentosas, que se assemelham a pelos, são conhecidas por *pili* ou fimbrias e estão localizadas na superfície da bactéria. Nos micro-organismos patogênicos, o *pili* constitui um importante fator de virulência, com a capacidade de reconhecer as células do tecido do hospedeiro bem como as células do sistema imunológico (VAN GERVEN; WAKSMAN; REMAUT, 2011).

Os *pili* do tipo IV (PT4), estão presentes em uma ampla variedade de bactérias Gram-negativas, dentre elas *Pseudomonas aeruginosa*. As funções inerentes a esse tipo de *pili* é importante para a virulência do patógeno e destacam-se, como: aderência a superfícies bióticas e abióticas, formação do biofilme, invasão celular, captação do DNA, motilidade, infecção por bacteriófago (VAN GERVEN; WAKSMAN; REMAUT, 2011). O *pili* tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa* tem a capacidade de aderir a superfície e de mover-se através da ampliação e retração de suas estruturas (MARKO *et al*, 2018).

Os *pili* tipo IV são extremamente finos (50-80 Å, com vários microns de comprimento (~4 µm). Ainda assim, são extremamente fortes e capazes de suportar altas tensões (CRAIG; PIQUE; TAINER, 2004). Sendo formados principalmente por subunidades estruturais de *pilina* (produto do gene *pilA*), estas são clivadas pela *prepilina* peptidase de PilD, são liberadas para o espaço periplasmático para formar uma estrutura de pilus multimérica, sendo então secretada pelo PilQ, um poro existente na membrana externa e por onde o pilus gerado pode sair da célula,

conforme Figura 5 (STROM; NUNN; LORY, 1993; GILTNER; HABASH; BURROWS, 2010; CRAIG; LI, 2008).

Figura 5 – Estrutura do *pili* tipo IV.



Fonte: BURDMAN *et al*, 2011.

A estrutura do TP4 de *Pseudomonas aeruginosa* que se inicia na membrana interna é formada pelo subcomplexo motor a proteína PilC. No citoplasma bacteriano estão as ATPases, PilB e PilT, sendo estas responsáveis por conduzir a sua extensão e retração, respectivamente (CHANG *et al*, 2016; MCCALLUM *et al*, 2017).

3.4.3 Flagelo

O flagelo é um filamento longo e fino que confere motilidade aos microorganismos que o contém. O flagelo é composto por três estruturas: corpo basal, gancho e filamento. O corpo basal está inserido na membrana citoplasmática, esse complexo é formado pelo rotor, pelo estator e por anéis, esse conjunto atravessa o espaço periplasmático até chegar a membrana externa. O gancho então se conecta a esta porção e oferece flexibilidade ao filamento através da sua rotação angular. Por último o filamento que é formado por até 20.000 subunidades de monômeros de flagelina, se apresenta de forma helicoidal e é protegida por uma capa flagelar, que é uma mucina com função de adesina (CHEVANCE; HUGHES, 2008; AIZAWA, 2015).

Os flagelos apresentam importante papel na virulência das bactérias como quimiotaxia, adesão, colonização e invasão das superfícies bióticas (RAMOS;

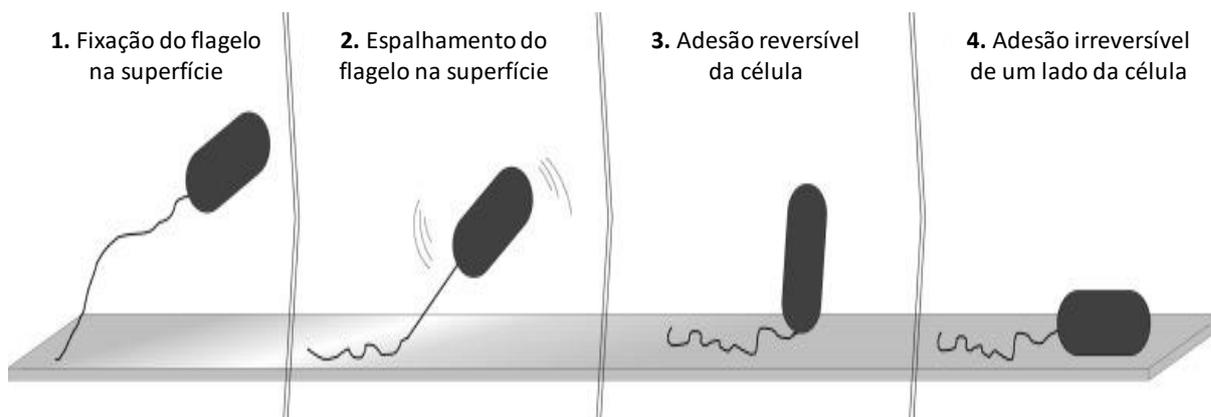
RUMBO; SIRARD, 2004). A motilidade de *P. aeruginosa* é essencial para formação do biofilme e os flagelos estão diretamente relacionados com a aderência da célula bacteriana a uma superfície e maturação desse biofilme (O'TOOLE; KOLTER, 1998).

Ao que concerne, a resposta do hospedeiro a infecção bacteriana a flagelina atua como uma molécula pró-inflamatória, ela se liga ao receptor *Toll-like 5* e ativa a liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6, interleucina-8 e óxido nítrico, por monócitos, macrófagos e neutrófilos (RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004). Apesar de ativar a resposta imune inata, gerando assim uma forte resposta imunológica. Em infecções provocadas por *P. aeruginosa* há um drible desse sistema através da regulação atenuada da liberação de flagelina, a célula bacteriana pode até perder flagelos através de mutações durante sua sobrevivência no muco purulento. Dessa forma, se protege da morte celular bacteriana ou fagocitose pelo sistema imunológico do hospedeiro (JYOT *et al*, 2007).

Um estudo realizado por Bruzaud e colaboradores (2015) para avaliação da adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em superfícies abióticas com diferentes características físico-químicas e com cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 tipo selvagem e mutantes estruturais destes apêndices, com diferentes combinações de flagelo e *pili* tipo IV. Esse estudo demonstrou a partir da cinética que as cepas que apresentaram flagelos aumentam a adesão da bactéria em superfícies com alta hidrofobicidade, nenhuma alteração foi observada em superfícies hidrofílicas. Dessa forma, concluíram que os flagelos expressaram alta afinidade a superfícies hidrofóbicas.

Pseudomonas aeruginosa parece seguir as seguintes etapas para adesão numa superfície hidrofóbica: 1) O flagelo fixa-se a superfície antes da célula bacteriana através do seu movimento rápido de rotação, atuando como uma âncora. A rotação do flagelo continua ativa, se movimentando a partir do ponto que está ancorado. 2) o flagelo se adere a superfície de forma irregular. 3) A célula bacteriana começa a se ligar a superfície ainda caracterizada por ser uma ligação reversível e finalmente 4) Ela liga a maior parte da sua superfície por ligação irreversível (BRUZAUD *et al*, 2015) (Figura 6).

Figura 6 – Adesão através do flagelo de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a superfície hidrofóbica. Seguem as seguintes etapas.



Fonte: BRUZAUD *et al*, 2015.

3.4.4 Segundo mensageiro di-GMP

As bactérias utilizam moléculas sinalizadoras para direcionar as condições fisiológicas internas em resposta aos estímulos ambientais controlando a motilidade. O c-di-GMP é uma molécula de sinalização intracelular com a função de controlar a motilidade da bactéria através da ligação com os seus receptores (WU; CHENG; CHENG, 2018). O bis-(3'-5')-cíclico-dimérico-guanosina-monofosfato ou diguanilato cíclico (c-di-GMP) é um segundo mensageiro intracelular que atua na regulação de diversos processos bacterianos. O di-GMP cíclico controla processos celulares nas bactérias, dentre elas, produção de exopolissacarídeos (EPS), fixação e motilidade (D'ARGENIO; MILLER, 2004).

As vias de sinalização dependentes de c-di-GMP (ou di-GMP cíclico) administram a interação das bactérias com as superfícies bióticas e abióticas (ROMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013). Do ponto de vista sensorial bacteriano, quando as concentrações de c-di-GMP estão baixas significa que as células estão se movendo pelo efeito do flagelo e do *pili* retrátil. Quando estão em concentrações crescentes promovem a expressão da matriz adesiva, comportamento multicelular e formação de biofilme (JENAL; MALONE, 2006; MANN; WOZNIK, 2012).

Estudo realizado por Laventie e colaboradores (2019) demonstram que o encontro de *Pseudomonas aeruginosa* com uma superfície estimula a produção de c-di-GMP, que irá estimular o receptor FimW de c-di-GMP, ativando a montagem do *pili*. Ao se aderirem a superfície, as bactérias aderidas a superfície geram a progênie através de divisão assimétrica. A prole gerada poderá se mover e colonizar locais

distantes. A fosfodiesterase é liberada estimulando a diferenciação celular e reduzindo os níveis de c-di-GMP da prole móvel.

3.5 LIPOPOLISSACARÍDEO

A membrana externa (ME) é exclusiva das bactérias Gram-negativas e, é formada por uma bicamada assimétrica de fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS), este último presente apenas externamente. O lipopolissacarídeo é composto de três unidades formadoras, o Lipídeo A (endotoxina) – composto de um fosfolipídeo a base de glucosamina, um núcleo intermediário oligossacarídeo de cadeia curta, e um núcleo distal, o Antígeno O – quimicamente trata-se de polissacarídeos (RIETSCHEL *et al*, 1994; RAETZ; WHITFIELD, 2002). Internamente, a ME apresenta a mesma composição da membrana citoplasmática, sendo 80 % de fosfatidiletanolamina, 14 % de fosfatidilglicerol e 5 % de cardiolipina. O LPS ocupa desde a membrana interna até o folheto externo da ME, passando pelo periplasma aquoso e da bicamada lipídica da membrana externa. Nessas camadas, altamente hidrofóbicas, também há presença de proteínas formadoras de poros, as chamadas porinas, que oferecem a possibilidade da passagem de substâncias hidrofílicas (DELCOUR, 2009; BOTOS *et al*, 2016).

O antígeno-O é constituído de polímeros de oligossacarídeo, as unidades podem variar entre uma e oito unidades de repetição. A estrutura de repetição difere entre uma bactéria e outra, levando a uma grande variabilidade estrutural, determinando a especificidade sorológica dos LPS e das bactérias que os contêm, funcionando como um antígeno de superfície (RIETSCHEL *et al*, 1994). A ME tem o papel de fornecer uma proteção extra ao micro-organismo, sem afetar a troca de material essencial a sua vitalidade. O LPS protege as bactérias do estresse químico, físico, ambiental e de substâncias nocivas, como antibióticos. A bicamada lipídica impossibilita a entrada de moléculas polares enquanto, os domínios de polissacarídeos excluem as moléculas apolares, devido a sua estrutura anfipática. (VALVANO, 2015; RUIZ; KAHNE; SILHAVY, 2009; BOTOS *et al*, 2016). Durante a infecção bacteriana as respostas imunes inatas desencadeadas por LPS, podem variar desde uma inflamação localizada até a sepse.

O lipídeo A é a porção bioativa do LPS e a resposta imunológica do hospedeiro à infecção advém da estrutura particular do lipídeo A das bactérias e estas variam

amplamente entre as espécies, podendo ter mais de uma estrutura lipídica em uma única espécie (RAETZ; WHITFIELD, 2002; STEIMLE; AUTENRIETH; FRICK, 2016). O LPS é uma das estruturas mais conservadas do ponto de vista molecular, ela segue um padrão associado a cada micro-organismo patogênico, ou seja, a estrutura molecular do LPS varia de uma espécie para outra e essa variação pode afetar a virulência da bactéria (WANG; QUINN, 2010). Após a bactéria infectar o hospedeiro, ocorre o reconhecimento da bactéria pelo sistema imunológico. No entanto, quando o crescimento bacteriano está exacerbado e descontrolado no interior do corpo, ocorre a liberação de grandes quantidades de LPS não ligados a membrana, levando a respostas imunes exageradas do sistema imunológico do hospedeiro, podendo levar a choque séptico (STEIMLE; AUTENRIETH; FRICK, 2016).

3.6 MATRIZ DE BIOFILME

3.6.1 Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos representam um importante componente da matriz do biofilme. Em *Pseudomonas aeruginosa* os polissacarídeos extracelulares relacionados ao biofilme são três, alginato, Pel e Psl.

3.6.1.1 Alginato

Quimicamente, o alginato é um polímero acetilado, de alto peso molecular composto de monômeros combinados de ácido L-gulorônico e D-manurônico unidos por ligação glicosídica entre os carbonos 1 e 4 (EVANS; LINKER, 1973), esta ligação oferece rigidez a estrutura. O ácido D-manurônico é normalmente acetilado no C2 ou C3. A função desta molécula vai além da estabilidade estrutural que ela oferece ao biofilme (HENTZER *et al*, 2001; FRANKLIN *et al*, 2011). A ação de uma enzima expressa por *P. aeruginosa*, chamada algL (alginato liase), ocorre a quebra polímero em oligossacarídeos curtos. A molécula perde a capacidade de ancorar as células, as bactérias são separadas, permitindo a dispersão dos micro-organismos para colonizarem outros locais (BOYD; CHAKRABARTY, 1995; SKARIYACHAN *et al*, 2018).

A resistência bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* é aumentada para colônias que são mucóides, o alginato apresenta uma resistência a despolimerização por radicais livres, que são produzidos por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro, assim como a fagocitose do hospedeiro (CABRAL; LOH; SPEERT, 1987; SIMPSON; SMITH; DEAN, 1993; RYDER; BYRD; WOZNIAK, 2007). As cepas de *P. aeruginosa* mucóides que contaminam os pacientes com fibrose cística (FC) produzem alginato em excesso. A superprodução de alginato é considerada uma forma de proteção das células aos estresses ambientais ou químicos (TAN *et al*, 2018). Normalmente, as cepas de *P. aeruginosa* que contaminam os pacientes com FC são não-mucóides, no entanto, com a persistência da infecção, estas cepas sofrem alterações genotípicas e fenotípicas, tornando-se altamente mucóides e produtoras de alginato (FOLKESSON *et al*, 2012; CIOFU *et al*, 2015).

3.6.1.2 Psl

A síntese e o transporte do polissacarídeo Psl é realizada pelos genes presentes no locus de síntese polissacarídeo (*psl*), a sua síntese é essencial para a formação de biofilmes em cepas com características não-mucóides, sendo esse tipo de bactéria não dependente do alginato como o principal polissacarídeo de estruturação do biofilme (BYRD *et al*, 2009).

Em *Pseudomonas aeruginosa* o locus *psl* contém 15 genes, *pslA-pslO*, co-transcrito, porém apenas 11 genes são necessários para produzir o Psl (BYRD *et al*, 2009). Quimicamente, o Psl é composto por pentassacarídeos com repetições distintas dos açúcares d-manose, d-glicose e l-ramnose. Um *pool* de nucleotídeos de açúcares precursores, GDP-d-manose, UDP-d-glicose e d-TDP-l-ramnose, estão comprometidos com a geração de Psl e com a sua adesão superficial. O Psl é encontrado em duas formas: associados a células bacterianas, nesse caso é caracterizado por ter um alto peso molecular, e em sobrenadante de cultura livre de células quando essas moléculas apresentam baixo peso molecular (BYRD *et al*, 2009; MANN; WOZNIAK, 2012).

O Psl é importante para adesão inicial das células sesséis em uma superfície biótica ou abiótica (BYRD *et al*, 2009). Ele também auxilia na estabilidade estrutural do biofilme, por se distribuir de forma helicoidal ao redor da superfície da célula, mantém a organização do biofilme e a interação entre as células. O Psl quando ligado

as células tem a capacidade de conectar as bactérias, umas às outras, e são então envolvidas dentro de uma matriz. Quando o biofilme forma uma estrutura tridimensional, o Psl é então observado na periferia e não no centro da microcolônia. Após o amadurecimento do biofilme, uma cavidade no centro inferior da microcolônia é formada, por morte e lise bacteriana para que ocorra a degradação do Psl e destruição da matriz, objetivando que as células bacterianas consigam soltar-se e colonizar outros locais (MA *et al*, 2009; SKARIYACHAN *et al*, 2018).

3.6.1.3 Pel

O Pel é um exopolissacarídeo catiônico, codificado pelo gene *pel*, a estrutura química dele ainda não foi totalmente descrita, no entanto, acredita-se ser um polissacarídeo de glicose. O locus de *pel* contém sete genes que são responsáveis pela síntese e exportação desse polissacarídeo (FRIEDMAN; KOLTER, 2004; COLVIN *et al*, 2011a). As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* não-mucoides, utilizam o Pel e o Psl como complexos estruturais primários, uma vez que elas não produzem quantidades suficientes de alginato. Do ponto de vista funcional, o Pel exerce o papel de proteger o biofilme em *P. aeruginosa*, aumenta também a resistência contra antibióticos (COLVIN, *et al*, 2011b).

3.6.2 DNA extracelular (eDNA)

O DNA extracelular (eDNA) é um importante componente da matriz do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Em *Pseudomonas aeruginosa*, o eDNA é um dos principais componentes e funciona como conector intercelular e apresenta a função de estabilizar o biofilme (YANG *et al*, 2007). Investigação realizada por Matsukawa e Greenberg (2004), sobre a composição da matriz estrutural apontou que o DNA extracelular é o polímero mais abundante, porém o EPS tem uma influência maior sobre a capacidade da bactéria em formar biofilme. O efeito de organização que o eDNA oferece as células é a formação de uma rede estrutural. O eDNA atua mutuamente com o Psl para formar uma rede a partir de eDNA-Psl sendo a estrutura inicial do biofilme. O eDNA funciona fortalecendo o biofilme, como fonte de nutrientes em períodos de carência de nutricional, fornece resistência aos antibióticos e ajuda na expansão do biofilme (WANG *et al*, 2015).

Em *P. aeruginosa*, o eDNA é liberado das células por autólise, a partir da lise de uma subpopulação bacteriana, sendo controlada pelo *quorum sensing*. Nestas espécies o eDNA está localizado nas estruturas multicelulares do biofilme (MONTANARO *et al*, 2011). O eDNA garante alinhamento do arranjo celular dentro do biofilme, incentivando o desenvolvimento eficiente de células bacterianas para a periférica das microcolônias e permitindo a extensão do biofilme (GLOAG *et al*, 2013).

3.7 INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS NO METABOLISMO DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Os íons metálicos são importantes em diversos processos biológicos na célula, sejam eucarióticas ou procarióticas esses metais atuam como cofatores de diversas reações bioquímicas bem como tem a função de estabilizar proteínas. Os metais de transição podem ser cofatores de enzimas como a catalase e a superóxido dismutase, oferecendo proteção da célula ao estresse oxidativo (REYES-CABALLERO; CAMPANELLO; GIEDROC, 2011).

Com base nas funções biológicas, toxicidade e concentração nas células, os metais podem ser divididos em quatro grupos diferentes. No primeiro grupo, estão presentes os metais essenciais ao metabolismo básico da célula, são eles o Na, K, Mg e Ca (WACKETT; DODGE; ELLIS, 2004). Este metabolismo está implicado com a biossíntese de ATP e integridade das paredes bacterianas. O segundo grupo de metais é chamado de metais biológicos, constituído por Co, Ni, Cu e Zn, estão presentes em variadas concentrações nas células e são responsáveis pela produção de ATP, reação de oxi-redução e estabilidade de proteínas. Com poucas funções biológicas e considerado metais tóxicos o Mo e V representam o terceiro grupo. O quarto grupo é formado por metais altamente tóxicos e não apresentam nenhuma função biológica para as células bacterianas ou outras células, portanto, para impedir a morte da célula por toxicidade esse tipo de metal deve ser eliminado das células (HOBMAN; YAMAMOTO; OSHIMA, 2007).

Nas bactérias os íons metálicos como, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni e Zn estão envolvidos no seu metabolismo e em funções relacionadas aos fatores de virulência. Alguns desses íons metálicos são essenciais ao crescimento bacteriano, no entanto, quando em excesso tornam-se tóxicos, por desempenhar funções como a geração de espécies reativas de oxigênio, ligando-se a sítios inespecíficos de enzimas, ligando-

se a grupamentos tióis (-SH) livres presentes em proteínas, provocando modificações estruturais e inativando suas funções (SCHALK; CUNRATH, 2016).

A instabilidade química dos íons metálicos essenciais ao metabolismo bacteriano podem causar danos quando estão escassos, quanto em quantidade excessivas ou quando são tóxicos, comprometendo o bom funcionamento da célula (HOBMAN; YAMAMOTO; OSHIMA, 2007; CHANDRANGSU; RENSING; HELMANN, 2017).

Os metais biológicos são necessários durante o processo de colonização e sobrevivência das bactérias em infecções, estes metais são também necessários para os hospedeiros. Gerando um duelo entre o agente patogênico e o hospedeiro, as bactérias ativam mecanismos para retirar íons metálicos do hospedeiro e em contrapartida o hospedeiro utilizam mecanismos para inibir a captação de metais pela bactéria (CHANDRANGSU; RENSING; HELMANN, 2017).

Em estudos desenvolvidos por Cunrath, Geoffroy e Schalk (2015) foi observado que *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, a distribuição dos íons metálicos segue a seguinte ordem Na-K > Mg > > Ca > > Fe-Zn > > Mn-Mo-Cu-V-Cr-Ni > > Co.

Schalk e Cunrath (2016) concluíram que, são pouco conhecidos os processos metabólicos que envolvem íons com Ni, Mn, Co, Cu em *Pseudomonas aeruginosa*, em contrapartida os processos que envolvem Fe²⁺ e Fe³⁺ são inúmeros. O conhecimento do metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa* para captação desses íons é fundamental e pode ser uma estratégia para o desenvolvimento de novos antibióticos.

A crescente resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antibióticos gera um desafio para o desenvolvimento de novos tratamentos voltados a ação bactericida ou com estratégias inovadoras para tornar os antibióticos tradicionais ativos. Considerando que os metais biológicos são nutricionalmente essenciais nas infecções bacterianas, agir sobre esses alvos pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos antibióticos (SCHALK; CUNRATH, 2016; CHANDRANGSU; RENSING; HELMANN, 2017).

3.7.1 Função do Magnésio no metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa*

A concentração de magnésio (Mg^{2+}) na célula de *Pseudomonas aeruginosa* varia entre 100 a 500 mM, considerada uma concentração elevada, ficando atrás apenas de Na-K (CUNRATH; GEOFFROY; SCHALK, 2015). O Mg^{2+} está envolvido em variados processos biológicos, como: cofatores de enzimas importantes no metabolismo bacteriano, na estabilidade dos ribossomos, membranas plasmáticas e ácidos nucleicos. Além disso, são ativadores de ATP, pois para se tornarem biologicamente ativos nas células, o ATP deve se ligar a um íon Mg^{2+} , formando o Mg-ATP. Nas bactérias o Mg^{2+} pode funcionar como uma molécula de sinalização, modulando a expressão dos transportadores de Mg^{2+} , a fim de disponibilizar quantidades suficientes desse íon para a célula (GROISMAN *et al*, 2013).

A homeostase do Mg^{2+} em bactérias Gram-negativas, não é bem elucidada (SCHALK; CUNRATH, 2016). Presume-se que a entrada de Mg^{2+} nas células de *Pseudomonas aeruginosa* ocorra a partir das porinas *OprH* (PA1178) e *OprQ* (PA2760), pois a expressão dos genes *OprH* e *OprQ* é estimulada pela baixa concentração de Mg^{2+} no interior da célula (SCHALK; CUNRATH, 2016; CHEVALIER *et al*, 2017).

A captação de Mg^{2+} ao nível da membrana plasmática em bactérias Gram-negativas ocorre a partir de três famílias de transportadores: CorA, MgtA/MgtB e MgtE. Os genes correspondentes a biossíntese dessas proteínas transportadoras estão presentes no genoma de *Pseudomonas aeruginosa* (GROISMAN *et al*, 2013). Os sistemas transportadores de Mg^{2+} parecem ter uma conexão entre a homeostase desse cátion e a virulência da bactéria.

Pseudomonas aeruginosa possui os sensores que são sensíveis para Mg^{2+} : RetS, GacS e LadS, que são responsáveis por regular a forma de crescimento planctônico e desse para biofilme. A limitação de Mg^{2+} provoca a repressão de RetS e como consequência, ocorre o aumento da agregação das células, produção de exopolissacarídeo e a formação do biofilme (MULCAHY; LEWENZA, 2018).

A expressão da proteína transportadora do Mg^{2+} , MgtE interfere na função do sistema de secreção do tipo III, T3SS, inibindo a transcrição de T3SS. Desta forma, a transcrição do *mgtE* é regulada pela baixa concentração de Mg^{2+} e pela alta concentração de antibióticos. A atividade de T3SS pode ser controlada por fatores ambientais e pela concentração de Mg^{2+} . Sendo o sistema T3SS responsável pela

liberação de toxina pelas bactérias nas células hospedeiras (CHAKRAVARTY *et al*, 2017).

3.7.2 Função do Zinco no metabolismo bacteriano especialmente em *Pseudomonas aeruginosa*

O Zinco (Zn^{2+}) na célula bacteriana se apresenta quimicamente em estado oxidado. Desta forma, participa de vários processos fisiológicos como atividade catalítica em reações enzimáticas e estabilização química de proteínas e enzimas. As proteínas bacterianas que se ligam ao zinco estão em torno de 3 a 8 % do proteoma dos procariotos. Portanto, nas bactérias utilizam o Zn^{2+} essencial para do RNA polimerase, da superóxido dismutase. Além disso, pode estar relacionado com a estabilidade do DNA e de moléculas pequenas, como ATP (WATLY; POTOCKI; ROWIŃSKA-ŻYREK, 2016; GONZALEZ *et al*, 2018).

O zinco tem importante função na colonização bacteriana do hospedeiro, na virulência bacteriana e na resistência da bactéria aos antibióticos. *Pseudomonas aeruginosa* apresenta a capacidade de se adaptar em ambientes com baixa concentração ou com excesso de zinco, e possui um sistema para controlar a homeostase do zinco no interior da célula. Os fatores de virulência presentes em *Pseudomonas aeruginosa* estão correlacionados com o sistema de importação e exportação de zinco. Portanto, ao interferir com a homeostase do zinco a capacidade de crescimento e a virulência de *Pseudomonas aeruginosa* também são alteradas e como consequência, melhoram a eficiência do antibiótico (GONZALEZ *et al*, 2018).

Em *Pseudomonas aeruginosa*, o transporte do zinco pelas bactérias é realizado a partir de transportadores específicos. A entrada de zinco do meio extracelular para o espaço periplasmático é realizado por quatro transportadores PA0781 (ZnuD), PA1922, PA4837 e PA2911. Com exceção do transportador PA2911, todos os demais podem transportar o zinco livre. O zinco para ser transportado pelo PA2911 é necessário que seja previamente quelado. A pioverdina e a pioquelina funcionam como siderofóros, captam principalmente ferro, mas podem se ligar também a outros metais como Zn^{2+} . A translocação do zinco para o citoplasma a partir do espaço periplasmático é realizado por znuABC que são transportadores ABC (ATP-binding cassette) (PEDERICK *et al*, 2015).

Pseudomonas aeruginosa possui proteínas metalo-reguladoras, dependente de zinco, como Zur (regulador da captação de Zn^{2+}). O Zur funciona como regulador responsivo ao Zn^{2+} , portanto, em condições de repleta concentração desse íon, o zinco se liga a esta proteína reguladora e ocorre a repressão das vias de importação. Em contrapartida, em condições de baixa concentração de Zn^{2+} ocorre o desligamento do Zn^{2+} com esta proteína reguladora, ativando os genes envolvidos na ativação da captação do Zn^{2+} (PEDERICK *et al*, 2015). Os fatores de virulência de *P. aeruginosa* é mediada pelo regulador transcricional CzcR que apresenta a capacidade de ativar várias regiões promotora do DNA (GONZALEZ *et al*, 2018). A presença dos metais Zn, Cd e Cu provoca a ativação de dois componentes do sistema CzcRS, ativando a expressão da bomba de efluxo e regulando negativamente a expressão da porina (MARGUERETTAZ *et al*, 2014).

D'Orazio e colaboradores (2015) demonstra que a limitação ou baixa concentração de zinco afeta a produção de alginato e das proteases extracelulares LasA e LasB, e protease IV, diminuindo a virulência de *Pseudomonas aeruginosa* em infecções sistêmicas. Num estudo realizado por Marguerettaz e colaboradores (2014) com *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em escarro artificial suplementado com zinco, foi observado uma maior produção de biofilme e fatores de virulência quando comparado a cultura com baixa concentração deste íon. Essa pesquisa concluiu que o zinco estimula o mecanismo de dois componentes CzcRS, estimula a formação do biofilme por mecanismo que não está relacionado com o regulador CzcRS, aumenta a resistência a carbapenêmicos e reprime a porina OprD.

3.7.3 Função do Cobre no metabolismo bacteriano

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial e apresenta importantes funções celulares. Caracterizado por fazer parte do grupo prostético de enzimas implicadas com reações de oxidoredução. O cobre é um cofator enzimático que catalisa transferências de elétrons devido a sua capacidade oxidação e redução [$Cu(I) \leftrightarrow Cu(II)$]. Essas alterações eletroquímicas podem tornar o cobre tóxico para a célula, através do estresse oxidativo, uma vez que o cobre pode estar envolvido com as reações de Fenton, produzindo espécies reativas de oxigênio ou provocando a quebra da reação química do *cluster* de S-Fe, fazendo que ocorra a liberação do ferro e consequente estresse oxidativo (RENSING; MCDEVITT, 2012).

Dessa forma, a homeostase do cobre em células bacterianas permite que ocorra metalização específica de diversas cupro-proteínas bem como o controle da concentração deste íon. O cobre em soluções aquosas e em sistemas aeróbios está na forma cúprica, para tanto o sistema de proteínas direcionam o Cu^+ para alvos específicos com a finalidade de este ser reduzido a Cu^{2+} . O cobre participa da cadeia transportadora de elétrons de micro-organismos através da sua função como catalizador da citocromo oxidase e de enzimas relacionadas a respiração celular como superóxido dismutase (ARGÜELLO; RAIMUNDA; PADILLA-BENAVIDES, 2013; QUINTANA; NOVOA-APONTE; ARGÜELLO, 2017).

A concentração de cobre na célula de *Pseudomonas aeruginosa* situa-se entre 40 – 400 μM . Participa de reações redox na bactéria e pouco se sabe sobre o processo de aquisição deste microelemento e todas as funções no interior da bactéria (CUNRATH; GEOFFROY; SCHALK, 2015).

Após análise do transcriptoma de *Pseudomonas aeruginosa* foi observada a presença de detectores de Cu^+ no citoplasma bacteriano, o qual foi denominado de CueR e no periplasma CopR/S, além das chaperonas CopZ1 e CopZ2 ambas implicadas na quelação do cobre (BRAVO-GÓMEZ *et al*, 2015; QUINTANA; NOVOA-APONTE; ARGÜELLO, 2017). Em estudo recente realizado por Novoa-aponte e colaboradores (2019) foi verificado que a chaperona CopZ1 tem a função de fornecer Cu^+ ao CueR enquanto a CopZ2 age armazenando o Cu^+ . Todo esse sistema tem a função de regular o efluxo e influxo de Cu^+ para manter o equilíbrio deste íon no interior da célula bacteriana.

3.7.4 Metabolismo do Cobalto em *Pseudomonas aeruginosa*

O cobalto (Co) é amplamente distribuído na natureza sobre o estado oxidado Co^{2+} ou reduzido Co^{3+} , sendo necessário para uma série de funções metabólicas em procariontes e eucariontes, no entanto, é encontrado em menor frequência nas metaloproteínas quando comparado ao Fe, Mn Cu ou Zn (CUNRATH; GEOFFROY; SCHALK, 2015).

O cobalto tem função biológica vital na biossíntese das cobalaminas e suas variantes, tais como: cianocobalaminas, metilcobalamina, hidroxicobalamina e adenosilcobalamina. A cobalamina em bactérias é sintetizada por uma via dependente da disponibilidade de oxigênio (FANG; KANG; ZHANG, 2017).

O íon cobalto está localizado no centro das cobalaminas, vitaminas que são cofatores organometálicos (OKAMOTO; ELTIS, 2011). As ribonucleotídeo redutase (RNR) são enzimas essenciais para a síntese e reparo do DNA e *Pseudomonas aeruginosa* codifica três tipos de RNR, a que depende de oxigênio (classe Ia), a independente de oxigênio (classe II) e a sensível ao oxigênio (classe III). Para ativação da ribonucleotídeo redutase de classe II é necessário a vitamina B12 (cianocobalamina) (CRESPO; BLANCO-CABRA; TORRENTS, 2018).

As RNRs de classe II são essenciais para a formação do biofilme e para seu funcionamento necessitam da vitamina B12 como cofator. Acredita-se que as células que estão na porção mais externa do biofilme e que estão em contato com o ambiente aeróbio produzem a vitamina B12, portanto, podendo a vitamina B12 se propagar pelo biofilme e o RNR de classe II ser ativado no ambiente microaerófilo, onde os RNRs de classe II seriam inativos. Dessa forma, podem sintetizar os desoxirribonucleotídeos trifosfatos que são essenciais na biossíntese do DNA. Esse mecanismo explica em parte o processo de multiplicação de *Pseudomonas aeruginosa* na sua forma planctônica e em biofilme (CRESPO; BLANCO-CABRA; TORRENTS, 2018).

3.7.5 Influência do Molibdênio (Mo) no metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa*

Em *Pseudomonas aeruginosa*, o molibdênio na sua forma de sal molibdato (MoO_4^{2-}) participa ativamente das reações de redução de nitratos a nitritos em ambientes anaeróbios ou microaeróbios (KRAFT; STROUS; TEGETMEYER, 2011). Nas células de *Pseudomonas aeruginosa* a concentração de Mo varia de 15 e 30 μM (CUNRATH; GEOFFROY; SCHALK, 2015). Nas reações de desnitrificação, comum para *Pseudomonas aeruginosa*, o Fe, Cu e Mo exercem a função de cofatores enzimáticos durante todo o processo (KRAFT; STROUS; TEGETMEYER, 2011).

O Mo é captado para as células de *Pseudomonas aeruginosa* na forma de molibdato (MoO_4^{2-}). Dentre as enzimas dependentes de Mo como cofator, estão: dimetil sulfóxido redutase, xantina oxidase, sulfato oxidase, as quais tem a função de metabolizar N, C e S, respectivamente (IOBBI-NIVOL; LEIMKÜHLER, 2013).

A obtenção de Mo em procariotos, realiza-se especialmente através da ModABC permease, trata-se de um transportador ABC (ATP-binding cassette) de alta

afinidade. A permease ModABC foi o único transportador identificado em *Pseudomonas aeruginosa* (PEDERICK *et al*, 2014). A biossíntese dessa permease é codificada pelo gene *modA* (PÉRINET *et al*, 2016).

Em infecções pulmonares causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, como nos casos de pacientes com fibrose cística, esse micro-organismo se desenvolve em anaerobiose e isso só é possível graças a presença de enzimas que são dependentes de molibdênio. Nesse contexto, inibir o transportador de molibdato pode ser uma alternativa para inibir o crescimento e proliferação de *Pseudomonas aeruginosa* (PÉRINET *et al*, 2016). Bem como inibir a disponibilidade do Mo como cofator das suas reações de redução.

3.7.6 Funções do Manganês no metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa*

Dentre os metais de transição, o manganês (Mn) é o mais significativo para as células que sofrem estresse oxidativo, pois ele apresenta a capacidade de auxiliar na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), a partir de três mecanismos: o primeiro é pela sua capacidade de atuar como cofator da superóxido dismutase (SOD) que elimina ROS; o segundo, por apresentar a capacidade de formar moléculas de baixo peso molecular que degradam ROS mas não apresentam atividade enzimática; e terceiro, a partir da substituição momentânea do Fe^{2+} pelo Mn^{2+} em sítios ativos de enzimas, a fim de evitar processo oxidativo de proteínas. Além disso, o Mn^{2+} é essencial em processos bioquímicos importantes do metabolismo celular, funcionando como cofatores enzimáticos (ZEINERT *et al*, 2018).

Quando superconcentrado na célula, o Mn^{2+} se torna tóxico, exigindo que as células apresentem mecanismos para sua exportação (LISHER; GIEDROC, 2013; ZEINERT *et al*, 2018).

Durante o processo de infecção bacteriana os hospedeiros apresentam mecanismos para restringir a disponibilidade de manganês para as bactérias, tendo em vista a sua importância para a virulência da bactéria. Diante desse aspecto, as bactérias desenvolveram sistemas para captação de Mn^{2+} , em condições de sobrecarga desse íon as bactérias regulam os níveis intracelulares, a partir de um sistema de exportação específico para Mn^{2+} (JUTTUKONDA; SKAAR, 2015).

Em *Pseudomonas aeruginosa*, a concentração intracelular de Mn^{2+} é de aproximadamente 300 μM (CUNRATH; GEOFFROY; SCHALK, 2015). Durante a

respiração aeróbia de *Pseudomonas aeruginosa* pode haver a produção de ROS, dentre elas; o superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxilas. A primeira linha de defesa que *P. aeruginosa* tem contra esses agentes oxidantes é a sua enzima superóxido dismutase (SOD), que necessita de Mn^{2+} e Fe^{2+} como cofatores. A segunda linha de defesa contra esses ROS é composta pela catalase e pela peroxidase (HASSETT; SCHWEIZER; OHMAN, 1995).

Durante o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, ocorre a biossíntese de piocianina, um pigmento hidrossolúvel com alta citotoxicidade para a célula hospedeira e para a célula bacteriana. A piocianina tem a capacidade de gerar ROS, principalmente, os íons superóxido e peróxido de hidrogênio, no entanto, *Pseudomonas aeruginosa* consegue bloquear esta ação nefasta da piocianina, através da catalase e da superóxido dismutase, esta última tendo como cofator o Mn^{2+} (HASSETT *et al*, 1992; HALL *et al*, 2016). De acordo com Schalk e Cunrath (2016), o sistema de transporte de Mn^{2+} em *Pseudomonas aeruginosa* não está totalmente elucidado e o sistema de importação de Mn^{2+} é pouco descrito na literatura.

3.7.7 Influência do Níquel no metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa*

Os micro-organismos que utilizam o Ni^{2+} desenvolvem mecanismos para garantir a homeostase desses íons no interior das células, portanto, desenvolvem funções de captação, armazenamento, efluxo, além de sua utilização molecular (CHENG *et al*, 2016). Apesar de o níquel ser um elemento essencial para várias bactérias, pouco se conhece sobre a aquisição, homeostase e relação do níquel com a sua virulência (ZAMBLE *et al*, 2017).

Em muitas espécies bacterianas, o Ni^{2+} é fundamental no metabolismo. O Ni^{2+} funciona como cofator de diversas enzimas bacterianas como as uréases, NiFe-hidrogenase, CO desidrogenase, Acetil-CoA descarboxilase/sintase, Metil-CoM Redutase, Glioxilase I e níquel superóxido dismutase (MULROONEY; HAUSINGER, 2003; HIGGINS; CARR; MARONEY, 2012).

O níquel pode atravessar a membrana externa de bactérias Gram-negativas passivamente através das porinas ou ser impulsionada através da geração de um gradiente de concentração (NIKAIDO, 2003). Algumas bactérias desenvolveram transportadores na membrana externa transportadores e o níquel pode ser captado por dois sistemas de transporte de alta afinidade, o primeiro é o transportador do tipo ABC,

e o segundo tipo de transporte ocorre através de permeases específicas para níquel (MULROONEY; HAUSINGER, 2003).

A concentração de níquel em *Pseudomonas aeruginosa* é de aproximadamente 40 μM (CUNRATH; GEOFFROY; SCHALK, 2015). A importância do Ni^{2+} em *Pseudomonas aeruginosa* em relação ao seu crescimento, virulência ou sobre a homeostase desse íon, nessas espécies bacterianas, até o momento não foram descritas (SCHALK; CUNRATH, 2016).

3.7.8 Metabolismo do Ferro em *Pseudomonas aeruginosa*

A concentração de ferro (Fe) em *Pseudomonas aeruginosa* pode variar de 4 mM e 300 μM dependente do meio onde ela vegeta (CUNRATH; GEOFFROY; SCHALK, 2015). *Pseudomonas aeruginosa* possui diversas formas de captação do ferro do ambiente ou das células do hospedeiro. Dependendo do tipo de infecção, essas bactérias se adaptam e modificam esse sistema. A captação de Fe^{3+} acontece através da produção e liberação de sideróforos (pioverdina e pioquelina) por *Pseudomonas aeruginosa*, essas moléculas são quelantes e se complexam com o Fe^{3+} formando o ferrisideróforos, esses são capturados por transporte ativo pelo receptor TonB e são internalizados para utilização pela célula bacteriana (SCHALK; MISLIN; BRILLET, 2012; CORNELIS; DINGEMANS, 2013). *Pseudomonas aeruginosa* captam o Fe^{3+} a partir da utilização de xenosideróforos, que são sideróforos produzidos por outros micro-organismos (CORNELIS; DINGEMANS, 2013; SCHALK; CUNRATH, 2016).

Em contrapartida o Fe^{2+} presente apenas em condições de baixa oxigenação são transportados para o interior das células, através das porinas OprG que são ativadas pela alta concentração de Fe^{2+} extracelular e pelo o ambiente anaeróbio (MCPHEE *et al*, 2009). Outro transporte de Fe^{2+} , é o sistema FeoABC, formado por proteínas e permeases que carregam o ferro para o citoplasma da bactéria e está presente em grande parte das bactérias Gram-negativas (KAMMLER; SCHÖN; HANTKE, 1993; CARTRON *et al*, 2006).

Durante a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, em pacientes com fibrose cística, a captação de Fe^{2+} é obtida através da redução do Fe^{3+} , cuja reação é realizada pelas fenazinas, metabólitos secundários característico das *Pseudomonas*, das quais a piocianina faz parte. As fenazinas extraem o Fe^{3+} das hemeproteínas

presentes nas células do hospedeiro, reduzem ao Fe^{2+} e nesse tipo de infecção como há formação do biofilme bacteriano a absorção é realizada pelo sistema FeO (WANG *et al*, 2011; SMITH *et al*, 2012; CORNELIS; DINGEMANS, 2013; MINANDRI *et al*, 2016).

Pseudomonas aeruginosa possui dois sistemas para extrair o grupo heme das proteínas do hospedeiro, os sistemas Has e Phu. O Phu apresenta a capacidade de absorção do heme através de um receptor denominado PhuR, enquanto, o sistema Has é dependente de uma proteína hemóforica, a HasA, que sequestra o heme e o carrega para o receptor HasR presente na membrana de *Pseudomonas aeruginosa* (OCHSNER; JOHNSON; VASIL, 2000). No periplasma, o heme se liga a uma proteína periplasmática (PhuT) para ser transportado até o citoplasma através de um transportador ABC (PhuUVW), ao atingir o citoplasma o heme é transferido para uma chaperina (PhuS) e em seguida para a heme oxigenase (Hem), que possui a função de degradar o heme em biliverdina, CO e Fe^{2+} (O'NEILL *et al*, 2012; BARKER; BARKOVITS; WILKS, 2012).

Essas características para a absorção de ferro por *Pseudomonas aeruginosa* auxiliam a adaptação e sobrevivência desse micro-organismo em ambientes com diferentes concentrações de ferro e em situação de competição por este metal (SCHALK; CUNRATH, 2016).

A absorção de ferro é controlada por uma proteína reguladora da absorção de ferro (Fur). Essa proteína age hierarquicamente na regulação da captação de ferro, por ser capaz de detectar a concentração de ferro intracelularmente. Quando esta concentração é suficiente essa proteína age reprimindo a transcrição de genes que estão relacionados com, em contrapartida quando há falta, os genes são ativados (CORNELIS; DINGEMANS, 2013).

Num estudo realizado por Banin, Vasil e Greenberg (2005) com cepas de *Pseudomonas aeruginosa* selvagens (PAO1) para produção de biofilme e de cepas mutantes para a não absorção de ferro, foi observado que para as cepas mutantes foi produzido um biofilme fino mesmo quando estas cepas foram cultivadas em quantidades suficientes de ferro. Essa característica de produção de biofilme fino, também foi observada por esses pesquisadores nas cepas selvagens cultivadas em meio com concentrações baixas de ferro. Esta mesma constatação foi publicada por Cai e colaboradores (2010), que também relataram que a depleção do ferro não

influência na motilidade de *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto, estimula o sistema do *quorum sensing* a partir dos genes *lasR* e *rhIR*.

A partir da comprovação da ação da curcumina frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, em inibir o *quorum sensing*, os fatores de virulência relacionados a estes, bem como o biofilme (RUDRAPPA; BAIS, 2008). Sethupathy e colaboradores (2016) objetivaram entender o mecanismo molecular subjacente que é encarregado de inibir o biofilme. A partir de uma abordagem molecular utilizando análises proteômicas, espectrometria de massas e ontologia genética, constataram que as proteínas distintivamente reguladas estão envolvidas na aquisição de ferro, armazenamento de ferro e na síntese de compostos intermediários para produção dos fatores de virulência. Os resultados obtidos indicam que a curcumina atua na inibição do *quorum sensing* e na homeostase do ferro em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

3.8 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANO

Pseudomonas aeruginosa, conhecida por sua característica de ser um patógeno oportunista, é um dos principais causadores de morbidade e mortalidade em indivíduos com fibrose cística ou imunocomprometidos. Devido a potente capacidade de tolerar antibióticos, apresenta mecanismos de resistência, intrínseca, adquirida e adaptativa, para combater a maioria dos antibióticos (STRATEVA; YORDANOV, 2009; PANG *et al*, 2019).

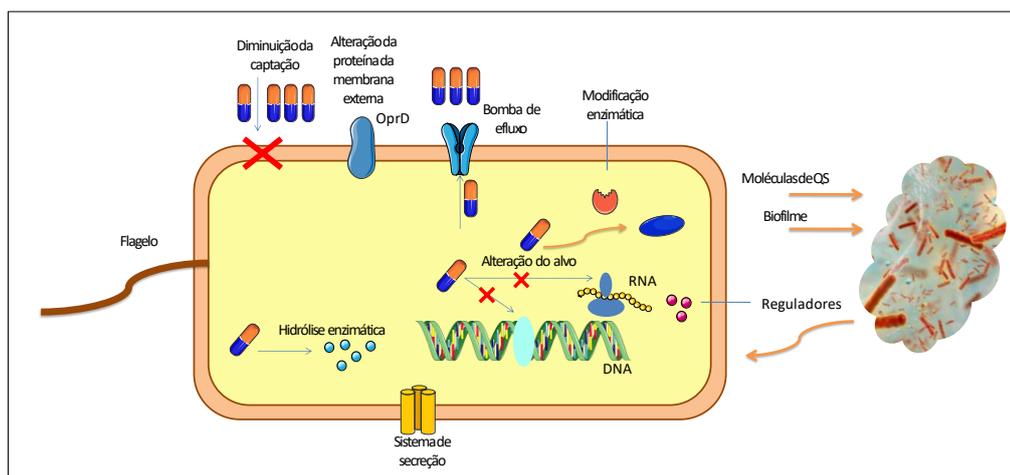
A capacidade inata da bactéria em diminuir a eficiência de um antibiótico específico, através de características funcionais ou estruturais inerentes é chamada de resistência intrínseca (BLAIR *et al*, 2015). A produção de enzimas inativadoras de antibióticos, sistemas de efluxo que bombeiam a droga para fora da célula, ou diminuição da permeabilidade da membrana externa, são tipos de resistência intrínseca bastante presente em *Pseudomonas aeruginosa* (BREIDENSTEIN; LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011).

Comparada com *Escherichia coli*, a permeabilidade da membrana externa de *P. aeruginosa* é cem (100) vezes menor, esse comportamento está ligado a falta de porinas (NIKAIDO, 1994; STRATEVA; YORDANOV, 2009). Além de que, *P. aeruginosa* possui alta expressão de bombas de efluxo, repelindo o antibiótico para

fora da célula, provocando a resistência a um amplo espectro de antibióticos (POOLE, 2005).

O controle de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* é dificultado porque estas bactérias apresentam alta resistência intrínseca para várias classes de antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e β -lactâmicos. A união de vários mecanismos de resistência bacteriana ocorre para sobrevivência do micro-organismo, iniciando pela baixa permeabilidade da membrana externa devido as porinas, reduzindo a taxa de penetração das moléculas. Desta forma, os mecanismos secundários de resistência adaptativa tornam-se ativos, podendo ocorrer o aumento do efluxo e produção enzimática para destruição do antibiótico (BREIDENSTEIN; LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011). A causa da diminuição da permeabilidade da membrana está relacionada a alterações das proteínas de porina, em especial *OprD*, sendo essa a proteína-alvo para penetrar os carbapenêmicos (Figura 7). (POOLE *et al*, 2011).

Figura 7 – Ilustração do mecanismo de defesa de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: AZAM; KHAN, 2019.

A figura acima demonstra que a alteração da proteína da membrana externa (*OprD*) provoca modificação da permeabilidade da membrana. Aponta a ação de algumas enzimas sobre o alvo, onde o fármaco não conseguirá ligar-se. Aumento da expressão do gene da bomba de efluxo, resultando na expulsão do fármaco para fora da célula. Ação das enzimas sobre as drogas, modificando-as ou tornando-as inativas. Demonstra a barreira física e proteção contra absorção do antibiótico para sobrevivência da célula.

As bactérias apresentam capacidade de sintetizar enzimas que objetivam exclusivamente inativar os antibióticos, seja através de alterações químicas ou pela destruição da molécula, conferindo resistência aos antibióticos (Figura 7). As enzimas β -lactamases e a PoxB, são enzimas codificadas cromossomicamente, e que tem a capacidade de hidrolisar β -lactâmicos e carbapenêmicos, respectivamente. A produção destas enzimas pode ser resultado da resistência adquirida ou intrínseca, elas podem ser codificadas por cromossomos e/ou por plasmídeos (ZINCKE *et al*, 2015; AZAM; KHAN, 2019).

A resistência adaptativa desenvolve mecanismos adormecidos na célula em busca da sobrevivência. Ou seja, as bactérias apresentam capacidade de modificar seu comportamento dependendo das condições ambientais extracelulares (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017). Como exemplo, a retenção do ferro é um dos mecanismos de defesa do hospedeiro a infecções por *P. aeruginosa*, em contrapartida, o patógeno passa a excretar moléculas quelantes de ferro, para retirar o ferro das proteínas do hospedeiro. Basicamente, *P. aeruginosa* produz dois tipos de sideróforos, no entanto, apresenta 34 genes para expressão de poros que serão utilizados para adquirir sideróforos de outros organismos (STOVER *et al*, 2000; BRAUN; HANTKE, 2011). A formação de biofilme é também uma maneira da bactéria se adaptar ao meio, pois esses micro-organismos envoltos por uma matriz polimérica, aumentam consideravelmente a resistência a antibióticos, quando comparado aos micro-organismos planctônicos (VAN ACKER; COENYE, 2016).

Resistência adquirida é o surgimento de genes ou mutações tornando um organismo anteriormente sensível em resistente contra determinados antibióticos. Os mecanismos de defesa dos micro-organismos, nesse tipo de resistência podem ocorrer de 4 formas: (1) inativação ou modificação do antibiótico; (2) alteração do alvo do antibiótico; (3) aumento da efluxo de antibióticos e (4) redução da absorção dos antibióticos. Muitas vezes esses mecanismos se combinam para fornecer maior resistência contra os antibióticos (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017). A Figura 8 resume a classificação e os mecanismos de resistência de *P. aeruginosa*.

Figura 8 – Quadro classificatório dos diferentes tipos de resistência bacteriana por *P. aeruginosa*:

Resistência	Mecanismo
Intrínseca	Baixa permeabilidade da membrana, Produção de β -lactamase, Super expressão da bomba de efluxo
Adquirida	Transferência gênica horizontal Mutações que levam a redução da captação e/ou Super expressão da bomba de efluxo Mutações alvo
Adaptativa	Alterações na expressão gênica incluindo: Super expressão de β -lactamase e bombas de efluxo, devido a fatores que ativam a expressão de genes reguladores

Fonte: Adaptação de BREIDENSTEIN; LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011.

3.9 ANTIMICROBIANOS

3.9.1 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos compõem uma classe de antibiótico bastante utilizado por apresentar um amplo espectro de ação. Ao se analisar a estrutura química do aminoglicosídeo, pode-se perceber que é semelhante a estrutura do carboidrato. Apresentam, na sua estrutura química um anel de aminociclitol saturado que através de ligações glicosídicas estão ligados a um ou mais açúcares, com substituições químicas de aminas (NH_2) e de hidroxilas ($-\text{OH}$). Estes antibióticos são utilizados para

infecções por bactérias Gram-negativas potencialmente fatais (MAGNET; BLANCHARD, 2005).

Os aminoglicosídeos por apresentarem características catiônicas modificam a capacidade de se ligar eletrostaticamente aos compostos carregados negativamente na membrana externa dos bacilos gram-negativos, por um processo passivo. Eles se difundem a partir das porinas na membrana externa e permeiam até o espaço periplasmático. Para atravessar a membrana externa, é necessária energia metabólica do sistema de transporte de elétrons dependente de oxigênio. Essa etapa é denominada fase I dependente de energia (EDP-1). Podendo ser inibida por cátions divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}), pH reduzido e hiperosmolaridade (ZEMBOWER *et al*, 1998; MINGEOT-LECLERCQ *et al*, 1999).

No citoplasma, o aminoglicosídeo, se liga ao ribossomo bacteriano e por meio da sua estrutura química inibe a síntese proteica por ligação de alta afinidade com o sítio-A do RNA ribossomal 16S no ribossomo 30S. O resultado dessa ligação com o antibiótico é a alteração da conformação do ribossomo, promovendo a tradução incorreta de um polipeptídeo que irá causar danos na membrana celular e alteração da sua permeabilidade, afetando a síntese proteica pela inibição, esta fase é chamada EDP-II. A ligação dos antibióticos desta classe e os efeitos posteriores são variáveis de acordo com a estrutura química da molécula, no entanto, todos os aminoglicosídeos podem ser considerados com ação bactericida (MINGEOT-LECLERCQ *et al*, 1999, AVENT *et al*, 2011).

Os mecanismos de resistência dos aminoglicosídeos podem estar relacionados a ativação da bomba de efluxo, diminuição da permeabilidade da parede bacteriana, modificação da atividade ribossomal 30s impossibilitando a ligação deste antibiótico, ação de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016). Algumas espécies de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a aminoglicosídeos possui a capacidade de produzir como acetiltransferases, nucleotransferases ou fosfotransferases inativando os aminoglicosídeos (TEIXEIRA *et al*, 2016).

3.9.2 β -lactâmicos

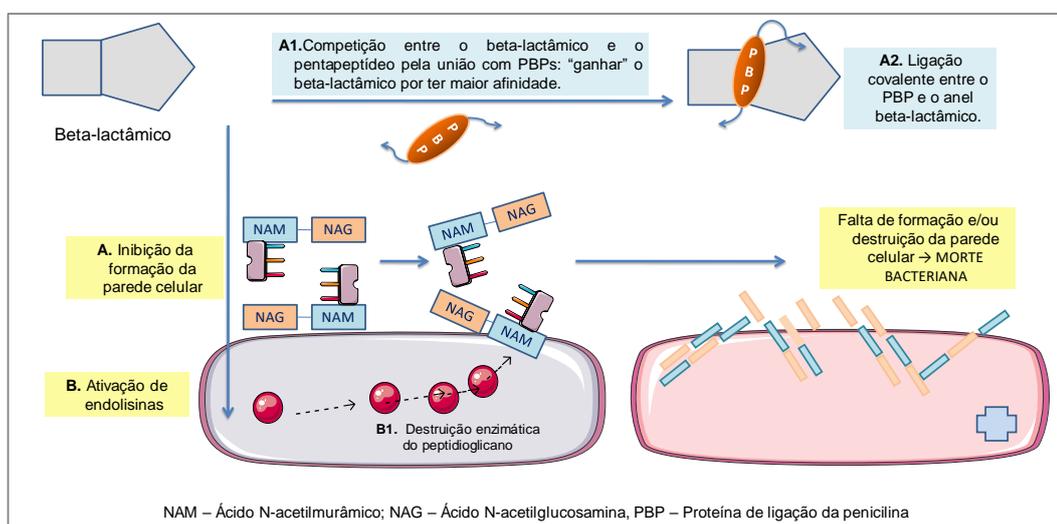
Os β -lactâmicos foram os primeiros antibióticos descobertos. Alexandre Fleming no ano de 1928 deu início a essa era histórica para medicina (FLEMING,

1929). Os β -lactâmicos são assim denominados por apresentarem em sua estrutura química um anel β -lactâmico. Estes antibióticos podem ser classificados em quatro grupos que dependem da natureza do anel heterocíclico que está ligado ao anel β -lactâmico, são as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

O mecanismo de ação dos β -lactâmicos acontece através da inibição das proteínas de ligação a penicilina (PLPs), inibindo a síntese de peptidoglicano. O peptidoglicano é o principal componente da parede celular de bactérias Gram-positivas. Em bactérias Gram-negativas elas aparecem em menor quantidade, estas apresentam uma camada de peptidoglicano mais fina localizada entre duas membranas. A unidade estrutural do peptidoglicano é um pentapeptídeo dissacarídeo que é sintetizado no citoplasma bacteriano, formado por: N-acetil-glucosamina (NAG), ácido N-acetil-murâmico (NAM) e um pentapeptídeo (L- D-alanina-glicina-L-lisina-D-alanina-D-alanina) (Figura 9) (SUÁREZ; GUDIOL, 2009; BUCKLER *et al*, 2018).

Os β -lactâmicos apresentam semelhança estrutural com os substratos (D-ala-D-ala) das enzimas PLPs, que exibem atividade transglicosilase, transpeptidase e carboxipeptidase. Estas enzimas ao se ligarem com estes fármacos são inativadas, levando a interdição da síntese de peptidoglicano e crescimento bacteriano. Ocorre também a ativação de autolisinas por esses antibióticos, levando a destruição da parede celular, com conseqüente lise (BUCKLER *et al*, 2018).

Figura 9 – Mecanismo de ação dos β -lactâmicos.



Fonte: SUÁREZ; GUDIOL, 2009.

As cefalosporinas são obtidas a partir dos fungos *Cephaosporium acremonium*. Quimicamente é um derivado ácido 7-aminocefalosporânico. São formadas de um anel de seis membros ligado a um anel β -lactâmico (SHAHBAZ, 2017). As cefalosporinas são classificadas por gerações, primeira, segunda, terceira, quarta e quinta geração, levando em consideração seu espectro de ação. As cefalosporinas de terceira geração apresentam excelente eficácia contra bactérias Gram-negativas e apresentam maior estabilidade para as β -lactamases, como a ceftriaxona e a ceftazidima, esta última é conhecida por sua atividade antipseudomonas. As cefalosporinas de 4ª geração apresentam espectro de ação para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de apresentar maior resistência as β -lactamases em relação aos de 3ª geração. Cefepima é uma cefalosporina de 4ª geração bastante ativo contra cocos Gram-positivos, enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa*. (MEHTA; SHARMA, 2015).

Os carbapenêmicos são os mais potentes β -lactâmicos em relação ao espectro de ação. Quimicamente são formados por um anel β -lactâmicos e um anel carbapenema, possui também uma cadeia hidroxietila no lugar da cadeia acilamina existente nas penicilinas. Apresentam um amplo espectro de ação, além de boa estabilidade em relação a ação das β -lactamases (BRADLEY *et al*, 1999; BUSH; BRADFORD, 2016). Os carbapenêmicos comercializados no Brasil são o ertapenem, imipenem e meropenem, este último apresenta melhor atividade antibacteriana *in vitro* em infecções por Gram-negativos (GALES *et al*, 2002).

Os mecanismos de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* para os β -lactâmicos são desencadeados por diferentes estratégias, como a mutação das proteínas de ligação as penicilinas, porém os principais mecanismos são ocasionados pela produção das enzimas inativadoras as β -lactamases, resistência mediada por porinas e através da evacuação do antibiótico pela bomba de efluxo (WOLTER; LISTER, 2012).

A resistência de *Pseudomonas aeruginosa* a carbapenêmicos é ocasionada através da produção de metalo- β -lactamases (MBL), como IMP (Imipenase), VIM (Imipenase de Verona), SPM (MBL de São Paulo), GIM (Imipenase da Alemanha), FIM (Imipenase de Florença), NDM (MBL de Nova Déli), portanto, essas enzimas apresentam a capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de β -lactâmicos, dentre eles as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (AZIMI; PEYMANI; POUR, 2018).

3.9.2.1 Metalo- β -lactamases

As β -lactamases são enzimas bacterianas com a capacidade de hidrolisar os antibióticos β -lactâmicos, sendo classificadas em quatro grupos A, B, C e D, conforme suas propriedades moleculares. As β -lactamases necessitam de cofatores para desempenharem suas atividades catalíticas. As enzimas do grupo A, C e D utilizam a serina para ativação da sua atividade catalítica. Portanto, clinicamente são utilizados inibidores destas serina β -lactamases, como o clavulonato, sulbactam e tazobactam. As metato- β -lactamases (MBLs) são enzimas pertencentes ao grupo B e utilizam íons divalentes no seu sítio ativo para ativação da catálise, em especial o zinco. Com exceção dos monobactâmicos, as MBLs podem inativar todos os β -lactâmicos (JU *et al*, 2018).

As MBLs são classificadas com base nas suas sequências de aminoácidos e com as ligações ao zinco. São divididas em três classes, B1, B2 e B3. Sendo a primeira, atualmente, a que apresenta maior interesse clínico. As variações de enzimas pertencentes ao grupo B1 são IMP (imipenase), VMP (Imipenase de Verona) e NDM (MBL de Nova Déli). A primeira MBL identificada foi a IMP, e foi assim chamada devido a sua capacidade de hidrolisar o carbapenêmico impimenem (ROTONDO; WRIGHT, 2017).

A IMP-1 foi descrita pela primeira vez em 1991, a VMP-1 foi evidenciada em 1999, ambas em *Pseudomonas aeruginosa*, a NDM-1 foi reportada em *Klebsiella pneumoniae* em 2009, estas enzimas são as mais relevantes da subclasse B1 (JU *et al*, 2018). São reconhecidos seis tipos de MBLs pertencentes a classe B em *Pseudomonas aeruginosa*, são elas: IMP, VIM, SPM (MBL de São Paulo), GIM (Imipenase da Alemanha), FIM (Imipenase de Florença), NDM, são assim classificadas porque necessitam de um íon de zinco (HONG *et al*, 2015).

As MBLs representam um dos fatores de resistência mais preocupantes, pois os inibidores da β -lactamases existentes não apresentam atividade para este subtipo de enzima. Portanto, existe a necessidade de buscar terapias que sejam capazes de inibir a ação das MBLs, com o objetivo de reverter a sua resistência bacteriana aos agentes bacterianos existentes (DOCQUIER; MANGANI, 2018). Uma estratégia óbvia para inibir as MBLs é a utilização de agentes quelantes, objetivando a quelação do zinco e reversão da resistência bacteriana (ROTONDO; WRIGHT, 2017; DOCQUIER; MANGANI, 2018).

3.9.3 Fluoroquinolonas

As quinolonas são sintetizadas a partir de modificações na molécula 4-quinolona (BALL, 2000), apresentam uma estrutura central bicíclica. O grupo carboxílico (C3) e a carbonila (C4) são essenciais para a atividade das quinolonas. As substituições de grupos volumosos nas posições 1, 7 ou 8, são determinantes para definir o espectro de antibióticos. As quinolonas de terceira geração, foram sintetizadas a partir da fluoração do carbono R6, por isso podem ser chamadas também de fluoroquinolonas e da substituição no C7 por uma piperazina ou metil-piperazina (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014). As quinolonas baseadas em piperazina apresentam melhor espectro de ação para Gram-negativos, apresentando um espectro limitado para Gram-positivos, como o ciprofloxacino e levofloxacino (FÀBREGA *et al*, 2009).

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas acontece através da inibição das topoisomerases II (DNA girase) e IV, essas enzimas são fundamentais para estruturação do DNA das bactérias, que vão desde a replicação celular e compactação do DNA bacteriano. Ao se ligar com as enzimas bacterianas as fluoroquinolonas inibem sua atividade, bloqueando a síntese de DNA bacteriano e inibindo a compactação do DNA, provocando morte celular. As fluoroquinolonas apresentam afinidade pela topoisomerase II em bactérias Gram-negativas e pela topoisomerase IV em bactérias Gram-positivas (BLONDEAU, 2004).

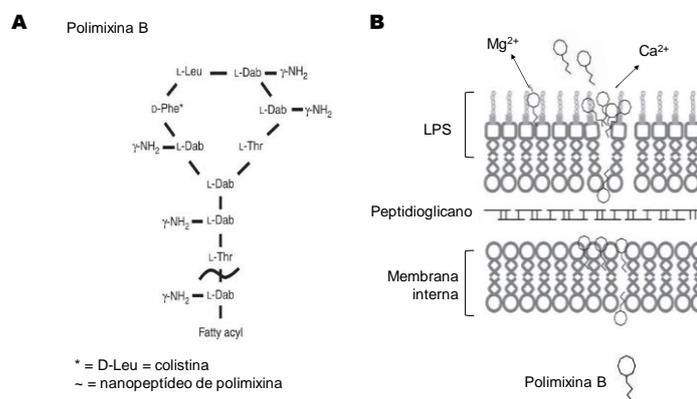
Os principais mecanismos de resistência as fluoroquinolonas apresentados por bactérias Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, são mutações pontuais em DNA girase (*gyrA* e *GyrB*), topoisomerase IV (*parC*) e dos genes reguladores da bomba de efluxo, o *mexR* (VAN *et al*, 2018).

3.9.4 Polimixinas

As polimixinas são produzidas por *Bacillus polymyxa*, são conhecidas quinze variações moleculares. No entanto, apenas a polimixina B e E são utilizadas na clínica. Quimicamente, são pequenas moléculas lipopeptídicas, pesando em torno de 1200 Da, possuem um anel peptídico policatiônico com um peptídeo curto ligado a uma cauda hidrofóbica de ácido graxo (Figura 10) (MENDES; BURDMANN, 2009). A polimixina B é uma mistura de moléculas de polimixina B3, B6, B1, B1-i, B2. A

polimixina B e a E se diferenciam pela presença do aminoácido D-leucina em colistina e D-fenilalanina em polimixina B (LANDMAN *et al*, 2008).

Figura 10 - Estrutura química da polimixina B e sua interação com a membrana da célula bacteriana.



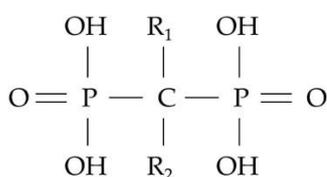
A solubilidade desta molécula em água acontece devido ao seu anel catiônico, enquanto a cadeia acil confere característica hidrofóbica, resultando na afinidade da membrana plasmática. A porção lipídica da polimixina B interage com o lipopolissacarídeo da membrana externa, retira o Ca^{2+} e Mg^{2+} (Figura 10), da membrana lipopolissacarídica, aumentando a permeabilidade e dessa forma os peptídeos farmacológicos atravessam a membrana externa e interagem com a membrana celular bacteriana provocando alteração da permeabilidade, resultando no extravasamento do conteúdo celular e morte (TRIMBLE *et al*, 2016). Apresentam potente atividade contra uma variedade de infecções causadas por bactérias Gram-negativas (MENDES; BURDMANN, 2009).

Os mecanismos de resistência das bactérias Gram-negativas estão relacionados a modificações do lipopolissacarídeo (LPS), utilização de bombas de efluxo, formação de cápsulas e superexpressão da proteína OprH. A modificação do LPS ocorre a partir da ligação covalente do 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) a porção do lipídio A (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014). Em *Pseudomonas aeruginosa* a carga negativa necessária do LPS para interação com a polimixina B é neutralizada, ocasionando a resistência a polimixina B (GUTU *et al*, 2015). A proteína oprH desempenha a função de se ligar a sítios divalentes de LPS, indisponibilizando espaço para polimixina B se ligar, ocasionando a resistência (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

3.10 BIFOSFONATOS COMO AGENTE QUELANTE

Os bifosfonatos (BF) representa uma classe de fármacos com as seguintes características químicas consiste em dois fosfatos unidos a um carbono, $\text{PO}_3\text{H}_2 - \text{C} - \text{PO}_3\text{H}_2$, farmacologicamente atuam como inibidores da reabsorção óssea (BISHOP; RUSSELL, 2014). São indicados para tratamentos de pacientes que apresenta perda óssea, que podem ser acometidos por diversas causas, como tratamentos com glicocorticoides, diminuição de estrogênio relacionado a pós-menopausa, doenças malignas, hipercalcemia de malignidade e doença óssea de Paget (FURMAN, 2007; TOLLER *et al*, 2019).

Figura 11 – Estrutura química dos bifosfonatos



Fonte: O autor.

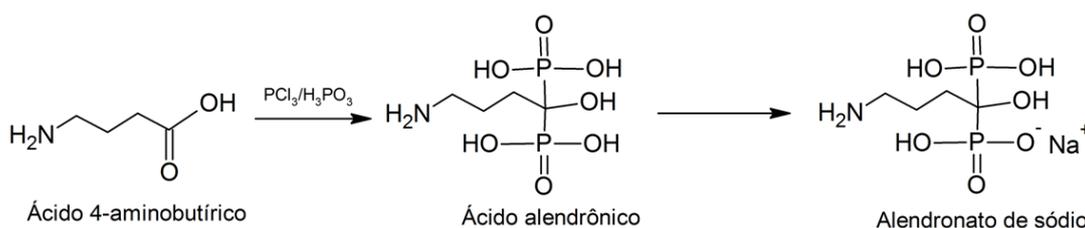
A estrutura química geral é a responsável pela atividade farmacológica geral, no entanto, os radicais R1 e R2 da molécula dos bisfosfonatos podem conter diferentes substituintes, sendo estes os responsáveis pela afinidade e potência farmacológica (Figura 11) (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005; KAVANAGH *et al*, 2006). A classe dos bifosfonatos é dividida em duas, os aminobifosfonatos que são alendronato, ibandronato, risedonato, pamidronato e zolendrato; e os não-aminobifosfonatos, que incluem clodronato, etidronato e tiludronato (FURMAN, 2007).

O mecanismo de ação da inibição da reabsorção óssea dos BF ocorre através da ligação desses compostos a hidroxiapatita, que é o principal componente da matriz inorgânica do osso, pela qual o bisfosfonato apresenta alta afinidade, essa afinidade se deve a quelação do Ca^{2+} (COLUCCI *et al*, 1998).

O alendronato de sódio (Figura 12) é um amino bifosfonato primário, é amplamente utilizado nas condições patológicas relacionadas a absorção óssea, inibe seletivamente a reabsorção mediada por osteoclastos (FLEISCH, 1991; COLUCCI *et al*, 1998). Este fármaco quimicamente chamado de 4-amino-1-hidroxi-butano bisfosfonado de sódio, provém do ácido alendrônico (ácido 4-amino-1-hidroxi-butano

bisfosfônico). O alendronato de sódio é normalmente encontrado na forma triidrato, representado pela seguinte molécula química $C_4HNNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$ (VEGA; BAGGIO; GARLAND, 1996).

Figura 12 – Estrutura química do ácido alendronico e do alendronato de sódio.



Fonte: O autor.

O alendronato de sódio contém quatro grupos de hidroxilas, todos estes podem ser dissociados, o estado eletroquímico em solução aquosa do alendronato de sódio é dependente do pH, a solubilidade, absorção biológica e metabolismo. As constantes de dissociação do alendronato de sódio são: pKa₁=2.43, pKa₂=7.55, pKa₃=10.80, pKa₄=11.99 (KE *et al*, 2016).

O alendronato de sódio em pH fisiológico é caracterizado por ser um composto *zwitterion*, possuem dois grupos fosfatos carregado negativamente, e do lado oposto o grupamento amina desprotonado, ou seja, carregado positivamente (VEGA; BAGGIO; GARLAND, 1996; LONG; FILMS, 2006). Devido a essas características físico-químicas os bifosfonatos vêm sendo utilizado em vários estudos visando sua ação quelante (DYBA *et al*, 1996; GUMIENNA-KONTECKA *et al*, 2002). Os bisfosfonato são considerados agentes quelantes também de outros metais que não apenas o cálcio (GUMIENNA-KONTECKA *et al*, 2002).

A administração dos bifosfonatos pode ser via oral ou intravenosa. Por via oral sua absorção ocorre no trato gastrointestinal, especialmente no estômago e intestino delgado, por apresentam baixa lipossolubilidade e por sua carga negativa, são absorvidos através do transporte paracelular (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; BISHOP; RUSSELL, 2014). A absorção do alendronato de sódio ocorre pelo trato gastrointestinal, quando administrado via oral e em jejum sua absorção é de 0,7 – 5%, após refeição a absorção é reduzida de 80 – 90%. Desta forma, é sempre administrada uma dose mais alta para que esses compostos possam exercer sua atividade farmacológica, no entanto, podem causar severos efeitos colaterais

gastrointestinais (GROEN *et al*, 1996; KOPKA *et al*, 2011; ANANCHENKO; NOVAKOVIC; TIKHOMIROVA, 2013).

Estudo realizado no Japão, relata que a administração intravenosa de alendronato apresenta vantagens em relação a administração oral, como boa aderência ao tratamento e tolerabilidade gastrointestinal. Além disso, a forma de administração não interfere na eficácia do tratamento para osteoporose (HORIKAWA *et al*, 2015).

O processo de absorção dos bifosfonatos ao chegar ao intestino são queladas com cálcio, o complexo formado pode vedar as junções celulares e dificultar sua absorção. Ao atingir a corrente sanguínea eles se ligam as proteínas, desaparecendo rapidamente da corrente sanguínea e se ligam a hidroxiapatita, esta é a formadora do tecido ósseo, ficando por pouco tempo em contato com os tecidos moles. Os bifosfonatos que não foram absorvidos pelo tecido ósseo são eliminados de forma inalterados na urina, a estrutura química dos bifosfonatos (P – C – P) confere a resistência destes compostos a hidrólise enzimática, por isso eles não sofrem alteração metabólica. Já a meia-vida dos bifosfonatos pelo osso, demoram de 3 (três) meses a 1 (um) ano, podendo chegar até 10 (dez) anos para serem eliminados, iniciando sua eliminação quando reiniciar a reabsorção óssea (FLEISCH, 1991; CREMERS; PILLAI; PAPAPOULOS, 2005; SOARES *et al*, 2016; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011).

4 MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMOS

Foi utilizado neste estudo um grupo composto por 12 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a qual compreende: 10 cepas clínicas (LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14, LFBM-H15, LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21 e LFBM-C03) e 2 cepas de referência (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1).

4.1.1 Isolamento

Pseudomonas aeruginosa (n=12) foram isoladas e identificadas de amostras clínicas oriundas de diferentes sítios, conforme descrito na Tabela 1. Estes isolados foram gentilmente cedidos por um Hospital da cidade do Recife-PE, para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos (LFBM) no qual recebeu as seguintes denominações: LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H08, LFBM-H09, LFBM-H14, LFBM-H15, LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03. Foram inseridas no estudo como micro-organismos de referência as cepas: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1.

Tabela 1– Sítio de origem dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* utilizados no estudo.

REGISTRO DAS BACTÉRIAS	ORIGEM
LFBM-H03	SECREÇÃO TRAQUEAL
LFBM-H06	PONTA DE CATETER
LFBM-H07	PONTA DE CATETER
LFBM-H09	SECREÇÃO/VASCULAR
LFBM-H14	SECREÇÃO TRAQUEAL
LFBM-H15	SECREÇÃO TRAQUEAL
LFBM-H16	PONTA DE CATETER
LFBM-H17	SANGUE
LFBM-H21	SECREÇÃO TRAQUEAL
LFBM-C03	SECREÇÃO TRAQUEAL

Fonte: O autor.

4.1.2 Preservação e conservação de *Pseudomonas aeruginosa*

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram preservadas em água destilada esterilizada, em frascos de penicilina seladas com anel de alumínio, como descrito por Costa e Ferreira (1991). Para essa preservação, as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram semeadas em ágar Mueller-Hinton (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) para obtenção do crescimento confluyente e incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, a cultura foi recortada em discos de 10 mm, posto em frascos de penicilina contendo água esterilizada e esses foram mantidos sob refrigeração a 4 °C.

4.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIOLÓGICA DO MICRO-ORGANISMO

Para identificação bioquímica das cepas foi realizado, inicialmente, o semeio em ágar cetrimida (Oxoid®), meio preconizado para o isolamento seletivo e identificação de *P. aeruginosa*, uma vez que cetrimida é um composto de amônio quaternário com atividade bactericida contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos. A partir desta cultura primária, foram realizados os testes para identificação dos isolados clínicos.

4.2.1 Produção de Pigmentos

A avaliação da produção dos pigmentos por *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada a partir do semeio das cepas em placas contendo ágar cetrimida, estas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após incubação, a produção dos pigmentos, piocianina, pioverdina, piorrubina e piomelanina, foram determinadas a partir da observação da coloração visualizada. A detecção da produção de piocianina foi evidenciada pela emissão de fluorescência das colônias, quando expostas a luz ultravioleta (UV).

4.2.2 Provas preliminares para identificação bioquímica de *Pseudomonas aeruginosa*

4.2.2.1 Semeio em ágar tríplice açúcar-ferro (TSI)

Para identificação bioquímica, inicialmente foi utilizado o meio tríplice açúcar-ferro (TSI), uma colônia do semeio primário, de cada cepa, foi semeada com uma agulha fincando até o fundo e na superfície do ágar inclinado. Os bacilos não fermentadores como *P. aeruginosa*, quando inoculados em ágar TSI não provocam qualquer alteração no meio, permanecendo vermelho (alcalino) no ápice e na base (KONEMAN *et al*, 2018).

4.4.2.2 Atividade da Citocromo Oxidase

Para determinar a atividade da citocromo oxidase, uma colônia do crescimento primário de cada cepa foi depositada sobre fitas de papel filtro, a esta colônia foram acrescidas 3 gotas do reativo de Kovacs. A reação positiva é identificada em alguns segundos pelo aparecimento da cor púrpura intensa (KONEMAN *et al*, 2018).

4.2.2.3 Utilização do citrato

Para avaliar a utilização do citrato, as cepas foram semeadas em ágar citrato de Simmons. A partir do crescimento, a utilização do citrato é observada com a produção de amônia, que é detectada pela alcalinização do meio a partir da conversão NH_3^+ em NH_4OH . Esta reação é detectada pela mudança de cor do meio de cultura, que quando neutro tem cor verde, porém quando alcalinizado (pH acima de 7,6) adquire a cor azul, indicando a utilização do citrato pelo micro-organismo (KONEMAN *et al*, 2018).

4.2.2.4 Atividade da urease

A urease é uma enzima presente em muitas espécies de micro-organismos que podem hidrolisar a ureia, uma diamina do ácido carbônico. A atividade da uréase foi observada a partir do semeio das cepas no caldo uréia de *Stuart*. A reação positiva

para este teste é observada com o aparecimento da cor rosa forte (*pink*), oriunda da hidrólise da ureia que promove a alcalinização de todo o meio (KONEMAN *et al*, 2018).

4.2.2.5 Produção de Hemolisinas

A avaliação produção de hemolisinas por *Pseudomonas aeruginosa* foram realizadas a partir do semeio das cepas ágar sangue, estas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A formação de um halo translúcido ao redor das colônias, indicativo de hemólise, foi interpretada como cepas produtoras de hemolisina (KONEMAN *et al*, 2018).

4.2.2.6 Produção de protease alcalina

A determinação da produção de protease pelas cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada a partir do semeio dos isolados em ágar *skim milk* 2%, estas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A interpretação foi realizada com base na formação de um halo ao redor do cultivo, indicativo de produtora de protease, ou a ausência do halo, para as cepas não produtoras de protease. A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 foi utilizada como controle positivo.

4.3 DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA

O fenótipo de resistência das cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* (LFBM-H03, LFBM-06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14, LFBM-H15, LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21 E LFBM-C03) foi determinado pelo método de disco difusão (BAUER *et al*, 1966). Por este método, os micro-organismos são caracterizados em sensíveis, resistentes ou intermediários com base no diâmetro, em milímetros, da zona de inibição do crescimento do micro-organismo em torno do disco.

Os micro-organismos resistentes a pelo menos um antimicrobiano em três classes ou mais são classificados como multidrogas resistentes (MDR). Os antimicrobianos e os critérios de interpretação determinados foram utilizados nesse estudo pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Antimicrobianos e critérios de classificação da resistência

Antimicrobiano	Concentração	Diâmetro da zona de inibição (mm)
Amicacina	30 µg	≤ 12
Aztreonam	30 µg	≤ 15
Cefepima	30 µg	≤ 14
Ceftazidima	30 µg	≤ 14
Ceftriaxona	30 µg	≤ 13
Ciprofloxacino	5 µg	≤ 15
Gentamicina	10 µg	≤ 12
Imipenem	10 µg	≤ 15
Levofloxacino	5 µg	≤ 13
Meropenem	10 µg	≤ 15
Piperaciclina com Tazobactam	100/10 µg	≤ 15

Fonte: CLSI, 2017.

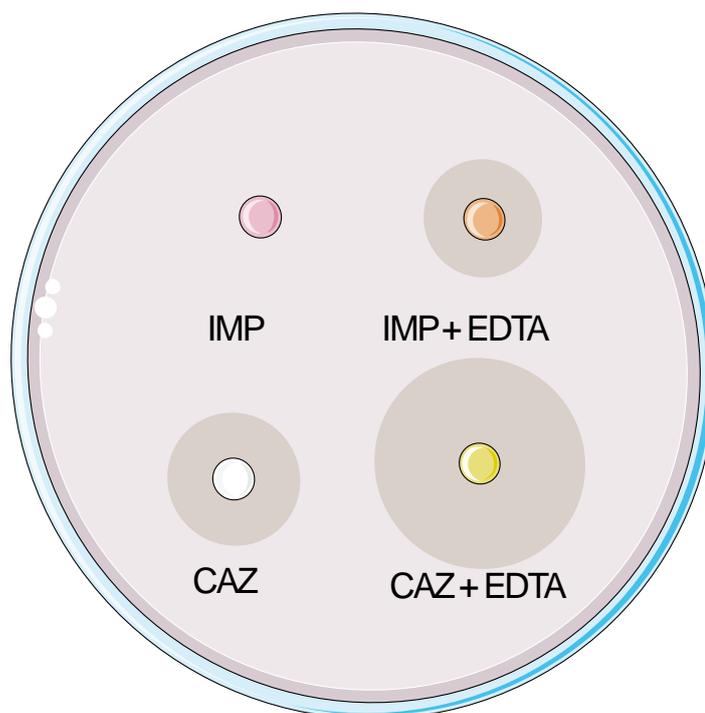
4.4 DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE METALO-β-LACTAMASE

A produção de Metallo-β-Lactamase (MBL) pelas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi avaliada, segundo metodologia de Yong e colaboradores (2002). A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 48-1997 foi utilizada como controle positivo para os genes *blas_{SPM-1}*.

A partir de uma cultura incubada por 24h em ágar Mueller-Hinton, foi preparada uma suspensão bacteriana de concentração de 10⁸ UFC/mL. O semeio foi realizado em ágar Mueller-Hinton com auxílio de *Swab* estéril, em toda superfície do meio ao fim, obtendo um crescimento confluyente.

Semelhante aos testes de difusão em disco, os antimicrobianos utilizados neste teste foram imipenem (10µg) e ceftazidima (30µg), dois discos de cada antimicrobiano para mesma cepa. Um dos discos dos antimicrobianos foram previamente impregnados com 10µL de EDTA 0,5 M (ácido etilenodiamino tetra-acético), conforme representação da Figura 13. Para comparação do efeito do antimicrobiano isolado e o antimicrobiano associado com EDTA frente as cepas semeadas. Após semeio, os discos foram depositados e as placas foram incubadas a 35°C ± 2 por 18 - 24 h. O teste foi considerado positivo para produção de MBL quando o halo do antibiótico com EDTA foi ≥ a 7 mm em relação ao antibiótico isolado.

Figura 13 – Esquema do teste fenotípico para determinação da formação da MBL.



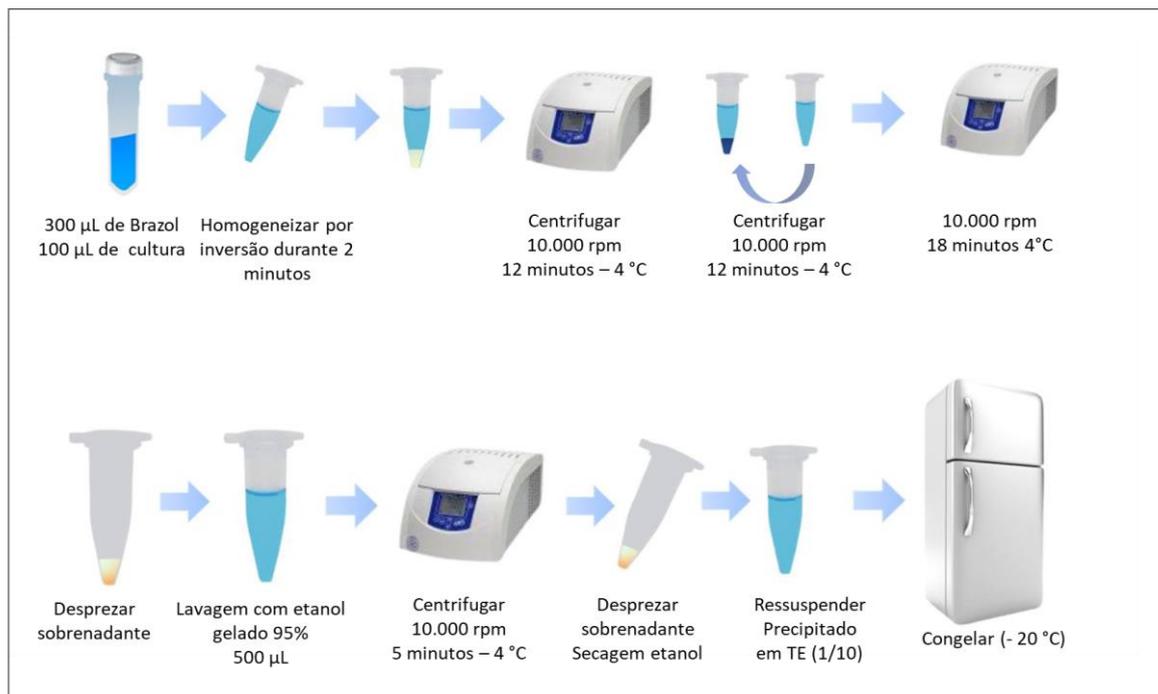
Fonte: O autor.

4.5 ANÁLISE MOLECULAR DE *Pseudomonas aeruginosa*

4.5.1 Extração e quantificação de DNA

Foi realizada a extração do DNA total das 10 cepas clínicas de *P. aeruginosa* MDR que apresentaram resistência aos β -lactâmicos. A extração foi feita utilizando o kit de extração de DNA Brazol (LGC Biotecnologia) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, e a dosagem do DNA foi realizada por espectrofotometria (Ultraspec 3000; Pharmacia Biotech) no comprimento de onda 260–280nm, conforme esquema da Figura 14.

Figura 14 – Esquema da técnica de extração de DNA de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: O autor.

4.5.2 Detecção dos genes de MβL (*bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*) e o *bla_{KPC}*

Visando elucidar o mecanismo de resistência aos β-lactâmicos nas cepas pesquisadas, foi realizada a pesquisa dos genes das MβLs e o *bla_{KPC}* utilizando primers específicos (Tabela 3) (YIGIT *et al*, 2001; GALES *et al*, 2003; DONG *et al*, 2008). Para cada reação de PCR, foi adicionado um controle negativo, consistindo de componentes da reação sem adição de DNA, e cepas de controle positivo para os genes: *bla_{SPM-1}* (*P. aeruginosa* 48-1997A), *bla_{IMP}* (*P. aeruginosa* PSA319) e *bla_{VIM}* (*P. aeruginosa* VIM-1) fornecidas pelo Laboratório Alerta da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e o *bla_{KPC}* (*P. aeruginosa* P22A) oriunda da coleção de cultura do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Tabela 3 – *Primers* utilizados para amplificação dos genes de *Pseudomonas aeruginosa*.

Gene	Primers
<i>bla_{IMP}</i>	F(5' GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC 3,) R(5, GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT 3,)
<i>bla_{VIM}</i>	F(5, CAGATTGCCGATGGTGTGGTGG 3,) R(5, AGGTGGGCCATTACAGCCAGA 3,)
<i>bla_{SPM-1}</i>	F(5,CCTACAATCTAACGGCGACC3') R (5, TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3,)
<i>bla_{kpc}</i>	F (5'TGTCACTGTATCGCCGTC 3,) R (5,CTCAGTGCTCTACAGAAAACC 3,)

Fonte: YIGIT *et al*, 2001; GALES *et al*, 2003; DONG *et al*, 2008.

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

4.6.1 Preparação e Padronização do inóculo

A preparação e padronização do inóculo foram realizadas conforme preconizado pelo CLSI (2017). Colônias isoladas de uma cultura de ágar Mueller-Hinton de 24 horas, foram inoculadas em caldo Mueller-Hinton, para obter uma turvação equivalente ao tubo nº 0,5 (10^8 UFC/mL) da escala de McFarland. A partir dessa suspensão, diluições seriadas foram realizadas na proporção de 1:10 sucessivamente em solução fisiológica (0,85% p/v) com a finalidade de enumerar as células viáveis de forma a obter um inóculo final igual a 10^5 UFC/mL.

4.6.2 Drogas

Foram utilizados o alendronato de sódio (Infinity Pharma®) e os seguintes antimicrobianos, Amicacina (Hipolabor®), Cefepima (Nova Farma®), Ceftazidima (ABL – antibióticos do Brasil), Ceftriaxona (Cellofarm), Levofloxacino (Infinity Pharma®), Meropenem (AstraZeneca®) e Polixomina B (Eurofarma). Esses antimicrobianos foram escolhidos com base na terapêutica antipseudomonas, cujo

perfil de resistência bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* foi descrito com base nos valores preconizados pelo CLSI (2017).

A preparação de cada solução desses antimicrobianos foi realizada através da pesagem analítica e solubilização em água destilada esterilizada, de forma a obter uma solução estoque de 4.096µg/mL. As soluções estoques foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore® de 0,22µm de porosidade.

4.6.3 Determinação da atividade antimicrobiana

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços, preconizado pelo CLSI (2017).

Diluições seriadas em caldo Mueller-Hinton foram realizadas a partir de 100µL da solução estoque de cada antimicrobiano, o qual foi dispensado na primeira linha (A) e diluído até a linha H de forma a obter concentrações finais que variaram de 1024 a 0,5µg/mL.

Posteriormente as culturas de *Pseudomonas aeruginosa* (100µL) foram dispensadas em todos os poços da microplaca de forma a obter ao final uma concentração de 10⁴ UFC/poço. As placas foram incubadas a 35 °C ± 2 por 24 h. Após a incubação 20µL de resazurina numa concentração de 0,02 % foram adicionadas em todos os poços da placa e reincubadas a 35 °C ± 2 por 3 horas.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada a partir dos poços onde não foram observados crescimento. Alíquotas de 10µL foram semeadas em ágar Mueller Hinton seguida de incubação a 35°C ± 2 por 24h. Após incubação foram enumeradas as unidades formadoras de colônias. A CBM foi definida como a menor concentração dos antimicrobianos e do alendronato de sódio capaz de inviabilizar 99,99% da população bacteriana inicial (COURVALIN, 1985).

4.6.4 Critérios de interpretação

As interpretações da suscetibilidade para os agentes antimicrobianos foram realizadas conforme preconiza o CLSI, descritos na Tabela 4:

Tabela 4 - Critérios de interpretação da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos, com base nos valores de concentração inibitória mínima (CIM).

Antimicrobianos	Break points*
Amicacina (AMI)	CIM ≥ 64 µg/mL
Cefepima (CMP)	CIM ≥ 32 µg/mL
Ceftazidima (CAZ)	CIM ≥ 32 µg/mL
Ceftriaxona (CRO)	CIM ≥ 64 µg/mL
Levofloxacino (LVX)	CIM ≥ 8 µg/mL
Meropenem (MER)	CIM ≥ 8 µg/mL
Polimixina B (POL B)	CIM ≥ 8 µg/mL

Fonte: CLSI, 2017.

A classificação antipseudomonal do alendronato de sódio foi realizada utilizando os seguintes critérios, atividade antimicrobiana forte a CIM é inferior a 100 µg/mL, atividade antimicrobiana moderada os valores da CIM são de 100 – 500 µg/mL, atividade antimicrobiana fraca os valores são de 500 – 1000 µg/mL, são considerados inativos quando a CIM é superior a 1000 µg/mL (PRETTO *et al*, 2014).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPSEUDOMONAS DO ALENDRONATO DE SÓDIO ASSOCIADO A ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS

4.7.1 Micro-organismos

Um grupo formado por 11 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizado neste estudo, sendo uma delas a cepa de referência *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 e as demais cepas de isolados hospitalares (LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H08, LFBM-H09, LFBM-H14, LFBM-H15, LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03).

4.7.2 Agentes antimicrobianos

Para avaliação da atividade antipseudomonas das associações de antimicrobianos foram utilizados os seguintes agentes antimicrobianos: Amicacina

(Hipolabor®), Cefepima (Nova Farma®), Ceftazidima (ABL – antibióticos do Brasil), Ceftriaxona (Cellofarm), Levofloxacino (Infinity Pharma®), Meropenem (AstraZeneca®) e o alendronato de sódio (Infinity Pharma®).

A preparação de cada solução desses antimicrobianos foi realizada através da pesagem analítica e solubilização em água destilada esterilizada, de forma a obter uma solução estoque de 4.096µg/mL. As soluções estoques foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore® de 0,22µm de porosidade.

4.7.3 Preparação e Padronização do Inóculo

A preparação e padronização do inóculo foram realizadas conforme preconizado pelo CLSI (2017). Colônias isoladas de uma cultura de ágar Mueller-Hinton de 24 horas, foram inoculadas em caldo Mueller-Hinton, para obter uma turvação equivalente ao tubo nº 0,5 (10^8 UFC/mL) da escala de McFarland. A partir dessa suspensão diluições seriadas foram realizadas na proporção de 1:10 sucessivamente em solução fisiológica (0,85% p/v) com a finalidade de enumerar as células viáveis de forma a obter um inóculo final igual a 10^5 UFC/mL.

4.7.4 Avaliação do efeito das associações entre Alendronato de sódio e antimicrobianos – Método do tabuleiro Xadrez

Os valores das CIMs foram utilizados como base para avaliação do efeito das associações entre os antimicrobianos e o alendronato de sódio. A metodologia utilizada foi a do tabuleiro xadrez (*Checkboard assay*) descrita por Lorian (2005) conforme esquema da Figura 15. As soluções dos antimicrobianos foram preparadas em caldo Mueller Hinton de forma a obter concentrações sub-inibitórias que variaram de 1/2 a 1/4096 e 1/2 e 1/256 x CIM para os antimicrobianos e para o alendronato de sódio respectivamente. A distribuição dessas soluções foi realizada por transferência de 50µL do alendronato de sódio e 50µL do antimicrobiano, seguindo a distribuição na orientação horizontal e na orientação vertical, respectivamente. Posteriormente, 100µL do inóculo (10^4 UFC/mL) previamente preparado e foi depositado em cada poço da placa de microtitulação. Essas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Figura 15 – Esquema de distribuição dos antimicrobianos pelo método do tabuleiro xadrez.

	1/2 CIM 1	1/4 CIM 2	1/8 CIM 3	1/16 CIM 4	1/32 CIM 5	1/64 CIM 6	1/256 CIM 7	1/256 CIM 8	1/512 CIM 9	1/1024 CIM 10	1/2048 CIM 11	1/4096 CIM 12
1/256 CIM A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/128 CIM B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/64 CIM C	●	●	●	●	COMBINAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS				●	●	●	●
1/32 CIM D	●	●	●	●					●	●	●	●
1/16 CIM E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/8 CIM F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/4 CIM G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/2 CIM H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Fonte: O autor.

4.7.5 Critérios de interpretação

A interpretação dos resultados do efeito da associação entre os antimicrobianos e o alendronato de sódio foi obtida através do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), de acordo com a equação:

$$ICIF = CIF A + CIF B$$

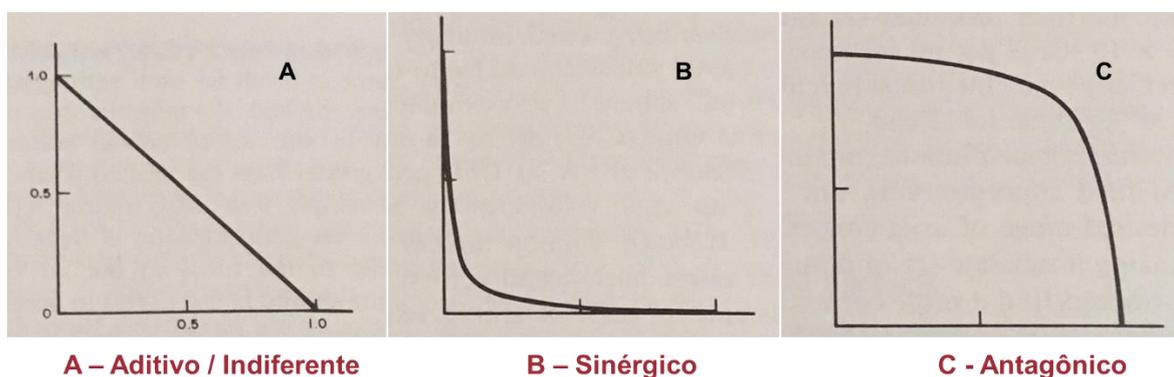
Onde:

$$CIF A = \frac{\text{CIM do alendronato de sódio em associação com antimicrobiano}}{\text{CIM do alendronato de sódio isolado}}$$

$$CIF B = \frac{\text{CIM do antimicrobiano em associação com alendronato de sódio}}{\text{CIM do antimicrobiano isolado}}$$

De acordo com os resultados, os efeitos obtidos com as associações foram classificados conforme o ICIF obtido, é considerado sinérgico quando $ICIF \leq 0,5$; aditivo quando $0,5 < ICIF \leq 1$; indiferente quando $1 < ICIF \leq 2$, antagonista quando a $ICIF \geq 2$. A Figura 16 demonstra o perfil dos isoblogramas que podem ser obtidos dependendo do efeito observado entre as associações (LORIAN, 2005).

Figura 16 – Perfil dos isobogramas com os possíveis efeitos entre as associações de fármacos: A (Aditivo), B (Sinérgico) e C (Antagônico).



Fonte: LORIAN (2005).

4.8 BIOSÍNTESE DO BIOFILME POR CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* E A ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ALENDRONATO DE SÓDIO ISOLADO E ASSOCIADO COM antimicrobianos

4.8.1 Micro-organismos

Um grupo composto por 12 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizado para o estudo da biossíntese do biofilme, sendo duas cepas controle, a de *P. aeruginosa* PAO1 e *P. aeruginosa* SPM-1 e 10 cepas clínicas (LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14, LFBM-H15, LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21 e LFBM-C03).

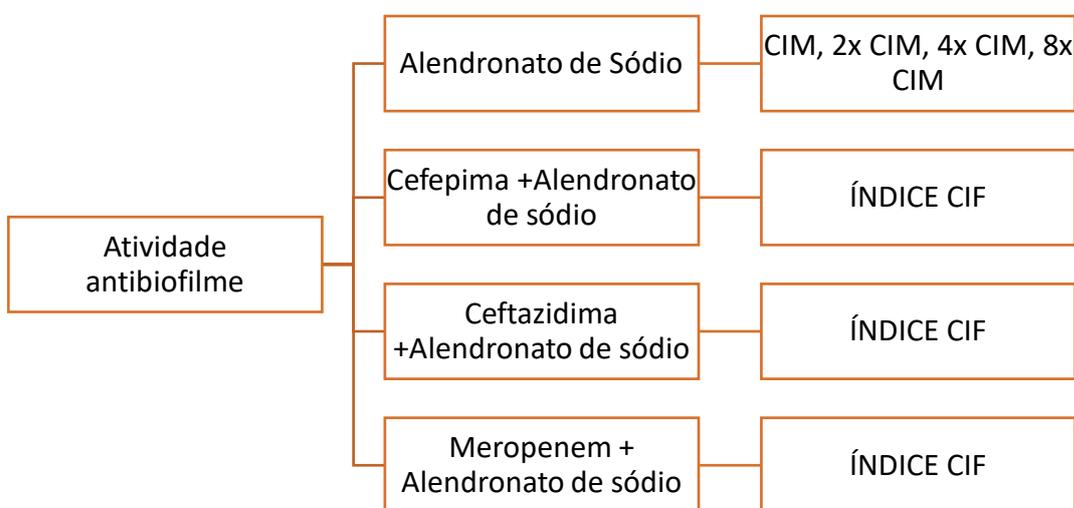
4.8.2 Meio de cultura

O caldo Lurian Bertani (LB) (Kasvi - Importação e Distribuição De Produtos Para Laboratórios Ltda) foi utilizado como meio de cultivo e para o preparo do inóculo. Para a padronização do inóculo, avaliação da produção do biofilme, da atividade antibiofilme e para o preparo das soluções seriadas das drogas foi utilizado o meio mínimo M63 suplementado com 0,4% de arginina. Esse meio foi preparado conforme as recomendações O'toole (2011) e apresenta as referidas substâncias KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 e arginina.

4.8.3 Agentes Antimicrobianos

Os testes da atividade antibiofilme foram realizados com o alendronato de sódio isolado com as concentrações variando de 1024µg/mL (CIM), 2048µg/mL (2x CIM), 4096µg/mL (4x CIM) e 8192µg/mL (8x CIM). As atividades antibiofilme também foram avaliadas a partir da associação do alendronato de sódios com os antimicrobianos, cefepima, ceftazidima e meropenem, nas concentrações do efeito sinérgico dispostos na Tabela 8 de *Pseudomonas aeruginosa*. Para avaliação da atividade antibiofilme foram realizadas as seguintes associações discriminadas na Figura 17:

Figura 17 – Diagrama dos fármacos utilizados para determinação da atividade antibiofilme



Fonte: O autor.

4.8.4 Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com a descrição de O'toole (2011). A partir do ágar cetrimida, 1µL de colônia de *P. aeruginosa* foi cultivada em Lurian Bertani a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, incubada por 18 horas. A cultura de *overnight* de *Pseudomonas aeruginosa* foi preparada em Lurian Bertani. A partir deste o inóculo foi diluído 1:100 no meio de cultivo M63 suplementado com 0,4% de arginina.

4.8.5 Avaliação da formação do biofilme *in vitro*

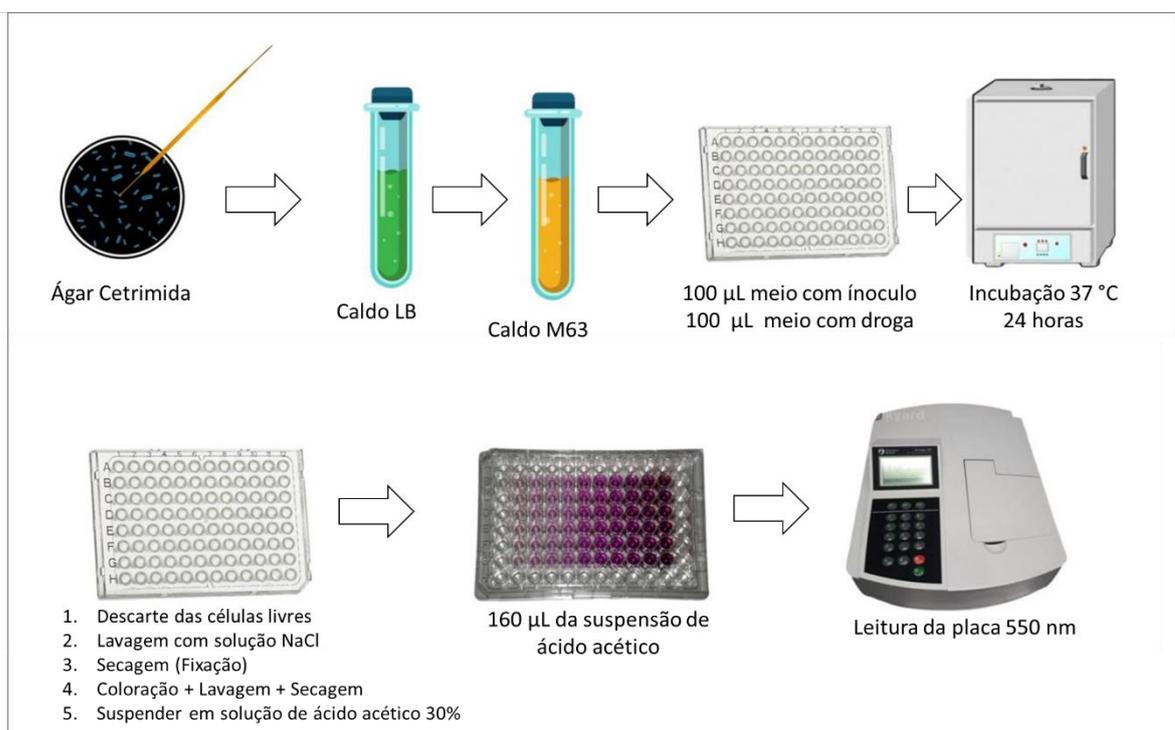
A quantificação do biofilme formado por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi baseada no método descrito por O'toole (2011) com poucas modificações. A partir do

inóculo de 1:100 (10^6 UFC/mL) no meio de cultivo M63 suplementado com 0,4% de arginina, foram adicionados 200 μ L de cada cepa de *P. aeruginosa*, em uma microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato e estéril. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 horas. Os testes foram realizados em quadruplicata.

Após o período de incubação as células livres com o meio de cultivo foram descartadas e as células bacterianas aderidas ao poliestireno, lavadas duas vezes com solução de NaCl (0,85%), secas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por duas horas, coradas com 200 μ L de uma solução de cristal violeta a 0,1%, deixando em contato durante 15 minutos. Em seguida, este corante foi descartado e os poços lavados quatro vezes com água destilada esterilizada e as placas foram secas em temperatura ambiente. Para revelação do biofilme foram adicionados 200 μ L de ácido acético glacial a 30% (v/v), deixando agir por 15 minutos.

Um volume de 160 μ L da solução já corada foi transferido para outra microplaca e a leitura realizada na leitora de microplacas (Thermo Plate, TP-READER NM) em comprimento de onda 550nm, o esquema realizado está descrito na Figura 18. Usando o meio M63 suplementado com 0,4% de arginina como padrão negativo da formação de biofilme (O'TOOLE, 2011).

Figura 18 - Esquema da biossíntese e avaliação da atividade antibiofilme em microplacas.



Fonte: O autor.

4.8.6 Critérios de interpretação e classificação do biofilme

Os resultados obtidos da formação do biofilme em relação a sua produção podem ser classificados seguindo a metodologia de Stepanovic e colaboradores (2000), com base na densidade óptica (DO) obtida nos testes, desse modo elas podem ser classificadas como não produtoras, fracamente produtoras, moderadamente ou fortemente produtoras de biofilme, conforme a relação a seguir, como controle foi utilizado a DO do meio M63 suplementado com 0,4 % de arginina:

$DO(\text{isolado}) \leq DO(\text{controle}) = \text{não produtor de biofilme};$

$DO(\text{controle}) \leq DO(\text{isolado}) \leq 2DO(\text{controle}) = \text{produtor fraco};$

$2DO(\text{controle}) \leq DO(\text{isolado}) \leq 4DO(\text{controle}) = \text{produtor moderado};$

$4 DO(\text{controle}) \leq DO(\text{isolado}) = \text{Forte produtor.}$

4.8.7 Determinação da atividade antibiofilme frente as associações de antimicrobianos e alendronato de sódio

Todas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, com exceção da PAO1, foram avaliadas frente as associações cefepime/alendronato de sódio, ceftazidima/alendronato de sódio e meropenem/alendronato de sódio em suas concentrações referentes aos valores do ICIF. Assim, em cada poço foram distribuídos 50µL do antimicrobiano, 50µL do alendronato de sódio e 100µL do inóculo. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após este período foi realizado o procedimento descrito abaixo.

Após o período de incubação foi realizado o procedimento de lavagem, fixação, coloração e quantificação do biofilme, já descrito no item 4.8.5. A porcentagem de inibição do biofilme foi estimada a partir dos valores de densidade óptica, usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do biofilme} = \frac{DO \text{ controle} - DO \text{ tratamento}}{DO \text{ controle}} \times 100$$

4.8.8 Determinação da atividade antibiofilme frente ao alendronato de sódio

A avaliação da ação do alendronato de sódio frente as 12 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi realizado com a sua CIM e com concentrações múltiplas dela, como: 1024µg/mL (1x CIM), 2048µg/mL (2x CIM), 4096µg/mL (4x CIM) e 8.192µg/mL (8x CIM). A partir do inóculo previamente preparado com LB, foi realizada a diluição 1:100 (10⁶ UFC/mL) no meio de cultivo M63 suplementado com 0,4% de arginina, foram distribuídos 100µL do inóculo e 100µL do do alendronato de sódio previamente diluído no meio M63 suplementado com 0,4% de arginina. Para obter o controle da formação do biofilme. As placas foram incubadas a 35 ± 2°C por 24 horas.

Após o período de incubação foi realizado o procedimento de lavagem, fixação, coloração e quantificação do biofilme, já descrito no item 4.8.5. A porcentagem de inibição do biofilme foi estimada a partir dos valores de densidade óptica, usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do biofilme} = \frac{\text{DO controle} - \text{DO tratamento}}{\text{DO controle}} \times 100$$

4.8.9 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata e os resultados obtidos foram expressos com média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada no *GraphPad Prism 9.0* para *Windows*. Foi observada a interação entre a concentração das drogas e a porcentagem de inibição de biofilme em Análises de Covariância (ANCOVA). Além disso, foi estudada a relação entre a concentração das drogas e a porcentagem de inibição de biofilme para cada cepa através de modelos de Análise de Variância (ANOVA) seguido pelos testes de comparação múltipla de Tukey. Os valores considerados significativos foram p <0,05.

4.9 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓPTICA DA PRODUÇÃO DO BIOFILME E DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ALENDRONATO DE SÓDIO EM *Pseudomonas aeruginosa*

4.9.1 Micro-organismos

Um grupo composto por 3 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizado para o estudo microscópico da ação do alendronato de sódio sobre o biofilme, sendo duas cepas de referência, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 e a cepa clínica LFBM-H21.

4.9.2 Meio de cultura

O caldo Lurian Bertani foi utilizado como meio de cultivo e para o preparo do inóculo. Para a padronização do inóculo, avaliação da produção do biofilme, da atividade antibiofilme e para o preparo das soluções seriadas das drogas foi utilizado o caldo M63 suplementado com 0,4 % de arginina.

4.9.3 Droga

Os testes da atividade antibiofilme foram realizados com o alendronato de sódio isolado com as concentrações variando de 1024µg/mL (CIM), 2048µg/mL (2x CIM), 4096µg/mL (4x CIM) e 8192µg/mL (8x CIM).

4.9.4 Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com a descrição de O'toole (2011). A partir do ágar cetrimida, 1µL de colônia de *P. aeruginosa* foi cultivada em caldo Lurian Bertani a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, incubada por 18 horas. A cultura de *overnight* de *Pseudomonas aeruginosa* foi preparada em caldo Lurian Bertani. A partir deste o inóculo foi diluído 1:100 no meio de cultivo M63 suplementado com arginina.

4.9.5 Avaliação da formação do biofilme em placa de poliestireno para análise microscópica

Foi realizada a visualização da atividade microscópica do alendronato de sódio sobre a formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

O cultivo do biofilme das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi baseado no método descrito por O'toole (2011), com poucas modificações. A partir do inóculo de 1:100 (10^6 UFC/mL) no meio de cultivo M63 suplementado com 0,4% de arginina, foram adicionados 1,8mL de cada cepa de *P. aeruginosa* numa microplaca de poliestireno de 24 poços de fundo chato e estéril. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 horas.

Após o período de incubação as culturas foram descartadas e as células bacterianas aderidas ao poliestireno, lavadas duas vezes com solução de NaCl (0,85%), secas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por duas horas, coradas com 2mL de uma solução de cristal violeta a 0,1%, deixando em contato durante 15 minutos. Em seguida, este corante foi descartado e os poços lavados quatro vezes com água destilada esterilizada, as placas foram secas em temperatura ambiente, observado por microscópio óptico usando lente objetiva 40x as imagens foram capturadas.

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS CLÍNICAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa quando corada pela técnica do Gram é microscopicamente visualizada como bacilo Gram-negativo, com tamanho variando entre 1,5-3,0 μ m de comprimento. A identificação morfotintorial das cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* está representada na Figura 19. As cepas foram identificadas preliminarmente a partir de testes presuntivos para bacilos Gram-negativos não fermentadores, os resultados estão representados na Tabela 5.

Figura 19 – *Pseudomonas aeruginosa* pelo método de Gram.



Fonte: O autor.

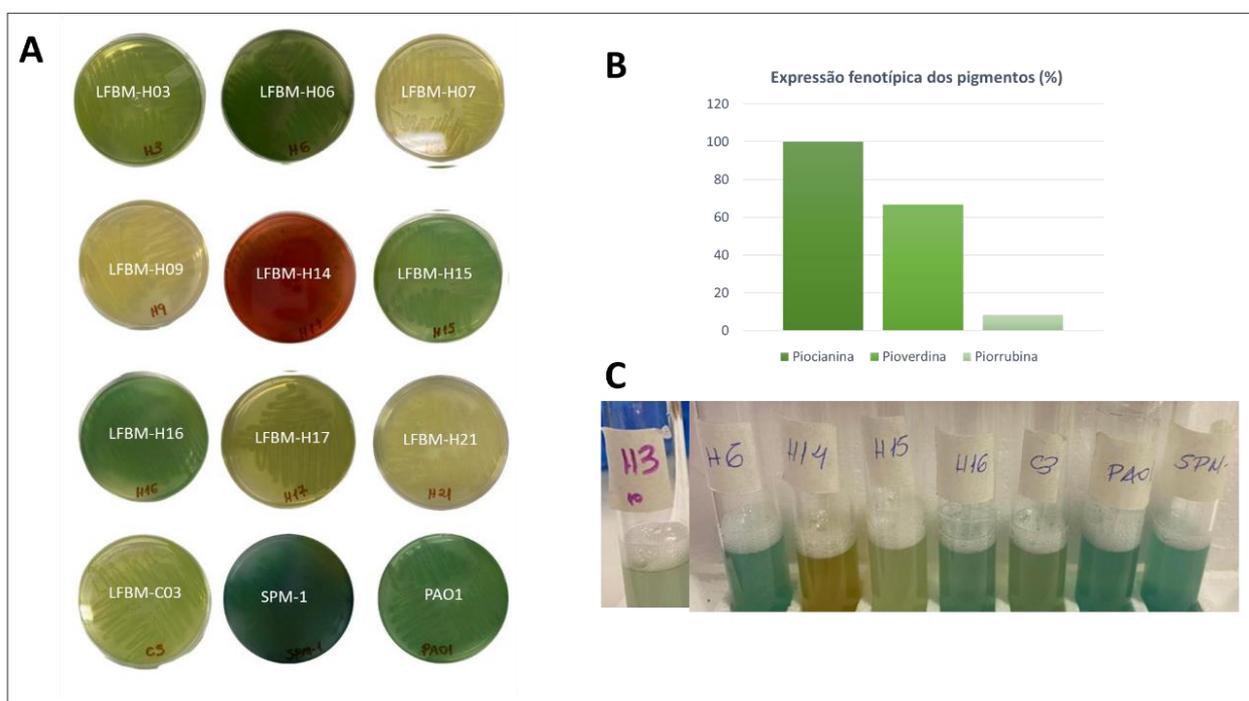
Tabela 5 – Identificação de *Pseudomonas aeruginosa* por reações bioquímicas.

Provas bioquímicas	Resultado
Ágar tríplice açúcar-ferro (TSI)	Alcalino
Utilização do citrato	Positivo
Atividade da uréase	Positivo
Citocromo oxidase	Positivo
Hemólise	Positivo
Produção de protease	Positivo

Fonte: O autor.

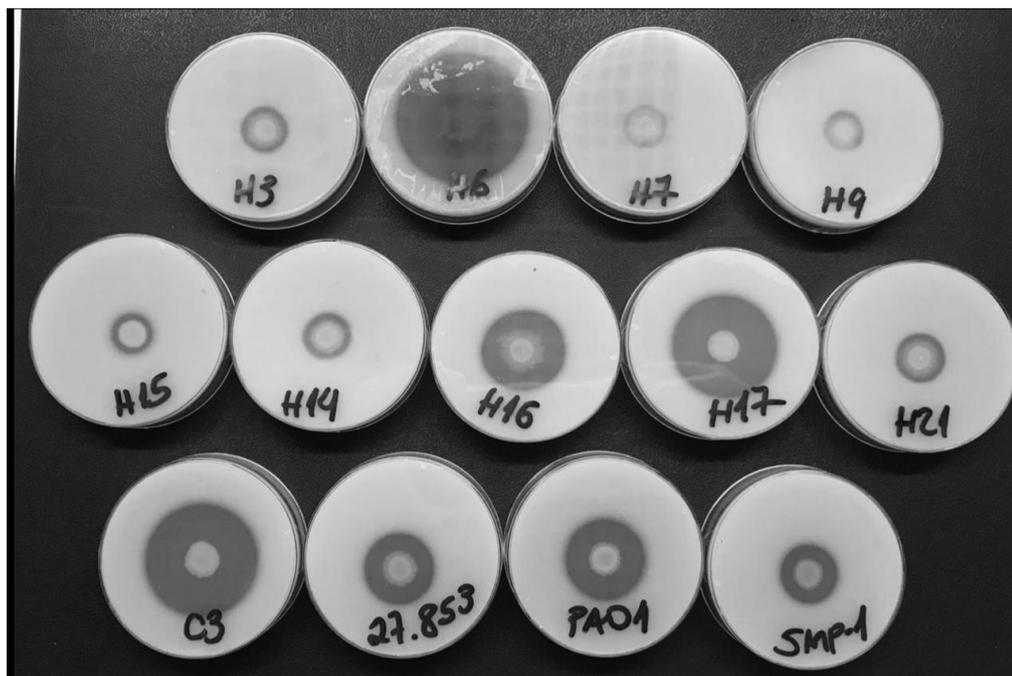
A Figura 20 demonstra a coloração das colônias de *Pseudomonas aeruginosa* de acordo com a produção e difusão dos pigmentos no Ágar cetrimida (Figura 19). Todas as cepas apresentaram produção de piocianina (n= 12, 100%), a produção de pioverdina (n= 8, 66,7%) foram identificadas nas cepas LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-14, LFBM- H15, LFBM-H16, LFBM-C03, *P. aeruginosa* PAO1 e *P. aeruginosa* SPM-1. A cepa LFBM-H14 apresentou a coloração indicativo de piorrubina (8,33%). A produção de protease foi evidenciada em todas as cepas, confirmando as características fenotípicas de *Pseudomonas aeruginosa* pela formação de um halo quando as cepas foram semeadas em Ágar *Skim milk*, conforme a Figura 21.

Figura 20 – Expressão fenotípica dos pigmentos hidrossolúveis das 12 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estudadas.



(A) Crescimento em Ágar cetrimida. (B) Porcentagem de produção dos pigmentos. (C) Crescimento em caldo MH. Fonte: O autor.

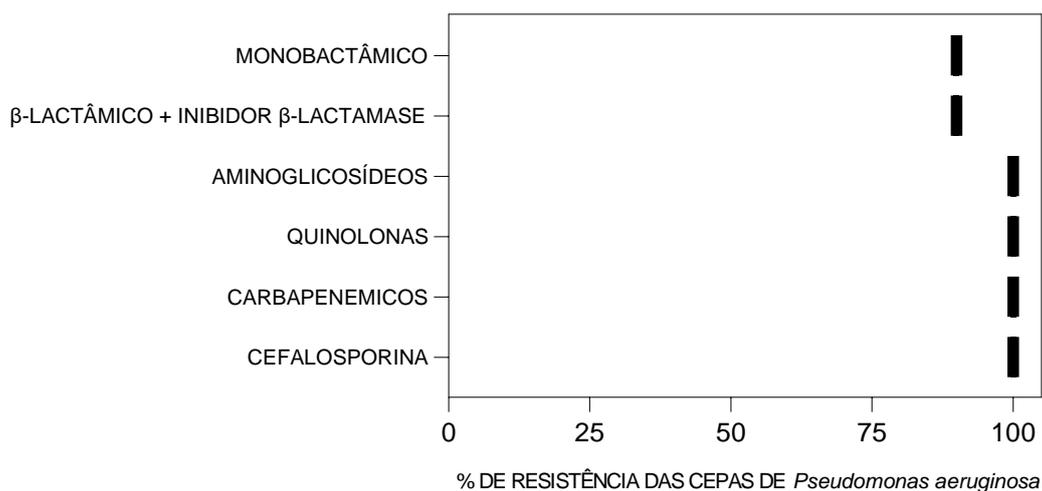
Figura 21 – Produção de protease alcalina por *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: O autor.

5.2 DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA

O perfil fenotípico de resistência das cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas neste estudo, oriundas de isolados hospitalares, estão descritos na Figura 22. Os isolados clínicos (n=10) de *Pseudomonas aeruginosa* foram resistentes a todas as classes dos antimicrobianos (100%/n=6) testados e por isso foram classificados como multidrogas resistentes (MDR). Com exceção da cepa LFBM-C03, que apresentou sensibilidade a piperaciclina associada a tazobactam (β -lactâmico associado a inibidor da β -lactamase), e ao aztreonam (monobactâmico).

Figura 22 – Perfil de susceptibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* frente a antimicrobianos

Fonte: O autor.

5.3 DETECÇÃO DOS GENES DE METALO-β-LACTAMASE (*bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*) e o *bla_{KPC}*

Das 10 cepas analisadas dos testes fenotípicos para produção de MBLs, 80% (8/10), apresentaram positivas para produção dessas enzimas. No entanto, das 10 cepas de *P. aeruginosa* analisadas neste estudo, nenhuma apresentou genes relacionados às MBL, porém 40% (4/10) foram positivos para a presença do gene *bla_{KPC}*, conforme a Tabela 6:

Tabela 6 – Detecção dos genes de resistências aos β-lactâmicos e teste fenotípico da metalo-β-lactamase.

Cepa	<i>bla_{SPM-1}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>	MβL
LFBM-H03	-	-	-	-	+
LFBM-H06	-	-	-	-	-
LFBM-H07	-	-	-	+	+
LFBM-H09	-	-	-	+	+
LFBM-H14	-	-	-	+	+
LFBM-H15	-	-	-	-	+
LFBM-H16	-	-	-	-	-
LFBM-H17	-	-	-	-	+
LFBM-H21	-	-	-	+	+
LFBM-C03	-	-	-	-	+
SPM-1	+	-	-	-	+

Genes de MβL (*bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*), *bla_{KPC}*, teste fenotípico: MBL (metalo-β-lactamase).

Fonte: O autor.

5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os valores para a CIM e CMB do alendronato de sódio e dos antimicrobianos, amicacina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, levofloxacino, meropenem e polimixina B frente a 12 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estão representados na Tabela 7.

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram resistência antimicrobiana, com exceção da polimixina, a todos os antibióticos testados, em particular para as cefalosporinas. Os valores da CIM para amicacina variaram entre 32 e 1024µg/mL. Quanto aos resultados referentes ceftazidima os valores da CIM variaram entre 16 e 512µg/mL para as cepas LFBM-H06, LFBM-H15 e LFBM-16, as demais apresentaram CIM de 1024µg/mL. Para cefepima os valores da CIM variaram entre 64 e 512µg/mL, no entanto, as cepas LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14, LFBM-H21 e SPM-1 a CIM foi de 1024µg/mL. Quanto a ceftriaxona a CIM foi de 1024µg/mL para todas as cepas, com exceção da LFBM-H06 com CIM de 512µg/mL.

A CIM de todas as cepas testadas frente ao levofloxacino demonstrou resistência, com CIM entre 16 e 1024µg/mL. O comportamento das cepas frente ao meropenem apresentou CIM entre 8 e 512µg/mL, no entanto, para cepas LFBM-H03, LFBM-07, LFBM-H09, LFBM-14 E LFBM-H21, a CIM foi de 1024µg/mL. Os resultados da CIM obtidos para polimixina B classifica a maioria das cepas bacterianas como sensível com CIM de 2µg/mL, e apenas três das cepas (LFBM-H06, LFBM-H21 e LFBM-C03) apresentaram perfil de susceptibilidade intermediária para este antimicrobiano. Para todas as cepas testadas o alendronato de sódio apresentou CIM de 1024µg/mL.

Tabela 7 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do alendronato de sódio e dos antimicrobianos frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes.

<i>Pseudomonas</i>	CIM/CBM (µg/mL)							
	<i>aeruginosa</i>	AMI	CAZ	CRO	CPM	LVX	MER	POL B
LFBM-H03	1024//>1024 (R)	>1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	512/1024 (R)	512/1024 (R)	1024/>1024 (R)	2/16 (S)	1024/>1024
LFBM-H06	32/64 (I)	16/32 (I)	512/1024 (R)	64/128 (R)	32/64 (R)	8/16 (R)	4/16 (I)	1024/>1024
LFBM-H07	256/512 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	512/1024 (R)	1024/>1024 (R)	2/8 (S)	1024/>1024
LFBM-H09	64/128 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	512/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	2/8 (S)	1024/>1024
LFBM-H14	64/128 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	2/8 (S)	1024/>1024
LFBM-H15	64/128 (R)	512/1024 (R)	1024/>1024 (R)	512/1024 (R)	512/>1024 (R)	512/1024 (R)	2/8 (S)	1024/>1024
LFBM-H16	128/256 (R)	256/512 (R)	1024/>1024 (R)	64/256 (R)	16/64 (R)	16/64 (R)	2/8 (S)	1024/>1024
LFBM-H17	32/64 (I)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	512/1024 (R)	1024/>1024 (R)	256/512 (R)	2/8 (S)	1024/>1024
LFBM-H21	64/256 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	256/1024 (R)	1024/>1024 (R)	4/8 (I)	1024/>1024
LFBM-C03	64/128 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	512/1024 (R)	1024/>1024 (R)	256/512 (R)	4/8 (I)	1024/>1024
PAO1	2/4 (S)	2/4 (S)	64/>64 (S)	2/4 (S)	2/4 (S)	4/8 (S)	0,5/1 (S)	1024/>1024
SPM-1	2/4 (S)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	256/1024 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024 (R)	1024/>1024

MBL – metalo-beta-lactamase; antimicrobianos e valores de referência: Amicacina (AMI), Cefepima (CPM), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Levofloxacino (LVX), Meropenem (MER), Polimixina B (POL B) e Alendronato de sódio (AS). Interpretação: R (resistente), I (intermediário) e S (sensível).

Fonte: O autor.

5.5 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO COM ANTIMICROBIANOS – TABULEIRO XADREZ

O índice de CIF individual de cada antimicrobiano e do alendronato de sódio, CIM da associação e o percentual de redução da CIM para as associações estão representados na Tabela 8.

A atividade do alendronato de sódio contra *Pseudomonas aeruginosa* se deu a partir de concentrações sub-inibitórias, variando entre 8 e 512 µg/mL. A associação dos antimicrobianos com o alendronato de sódio foi sinérgica com o valor do ICIF \leq 0,5, para mais de 95% dos testes.

A associação amicacina/alendronato de sódio apresentou um efeito sinérgico frente a todas as cepas avaliadas. Os valores de ICIF para esta associação variaram entre 0,25 a 0,50, reduzindo em até oito diluições o valor da CIM para este antimicrobiano. Todas as cepas que apresentaram sinergismo tiveram a reversão na sensibilidade a amicacina, obtendo após a associação valores de CIM entre 4 e 8 µg/mL o que caracteriza a cepa como sensível.

A associação de cefepima/alendronato de sódio também foi sinérgica frente a todas as cepas. Os valores dos índices CIF variaram de 0,25 a 0,50, reduzindo em até oito diluições a CIM de cefepima, com as concentrações variando entre 2 e 64µg/mL, com reversão da sensibilidade para todas as cepas testadas, com exceção da cepa LFBM-H07.

Ceftazidimia associado ao alendronato de sódio apresentou uma reversão na sensibilidade em sete das cepas LFBM avaliadas. Os valores de índice CIF variaram de 0,19 a 0,50. Os valores da CIM da ceftazidima associada ao alendronato variaram de 2 a 128µg/mL, reduzindo a CIM em até nove diluições quando comparada a CIM individual, conforme as cepas LFBM-H17 e LFBM-H21.

O sinergismo e a reversão da sensibilidade foram evidenciados na associação da ceftriaxona/alendronato de sódio para a maior parte das cepas, exceto para as cepas LFBM-H09 e LFBM-H14, as quais foram observados efeitos aditivos com o ICIF $>$ 0,50. Os valores de ICIF variaram de 0,16 a 0,50, e a CIM da ceftriaxona foi reduzida em até dez diluições.

A associação levofloxacino/alendronato de sódio exibiu atividade sinérgica frente a todas as cepas testadas, com valores de ICIF que variaram de 0,19 a 0,38. Esta associação foi capaz de reduzir a concentração do levofloxacino em até sete

diluições, mas apenas duas cepas LFBM-06, LFBM-H16 e SPM-1 apresentaram reversão da sensibilidade a esta fluoroquinolona.

O meropenem associado ao alendronato de sódio apresentou efeito sinérgico sobre o crescimento da maioria das cepas avaliadas (ICIF = 0,19 a 0,50). Com esta associação CIM do meropenem foi reduzida em até oito diluições. Apenas a cepa LFBM-H14 apresentou efeito aditivo (ICIF = 0,63). As cepas LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03 e SPM-1 apresentaram reversão na sensibilidade bacteriana frente ao meropenem quando em associação com o alendronato de sódio.

Os isobogramas resultantes das associações do alendronato de sódio com os antimicrobianos estão representados nos gráficos das Figuras 23 a 33.

Tabela 8 – Associação do Alendronato de Sódio com agentes antimicrobianos frente a *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes.

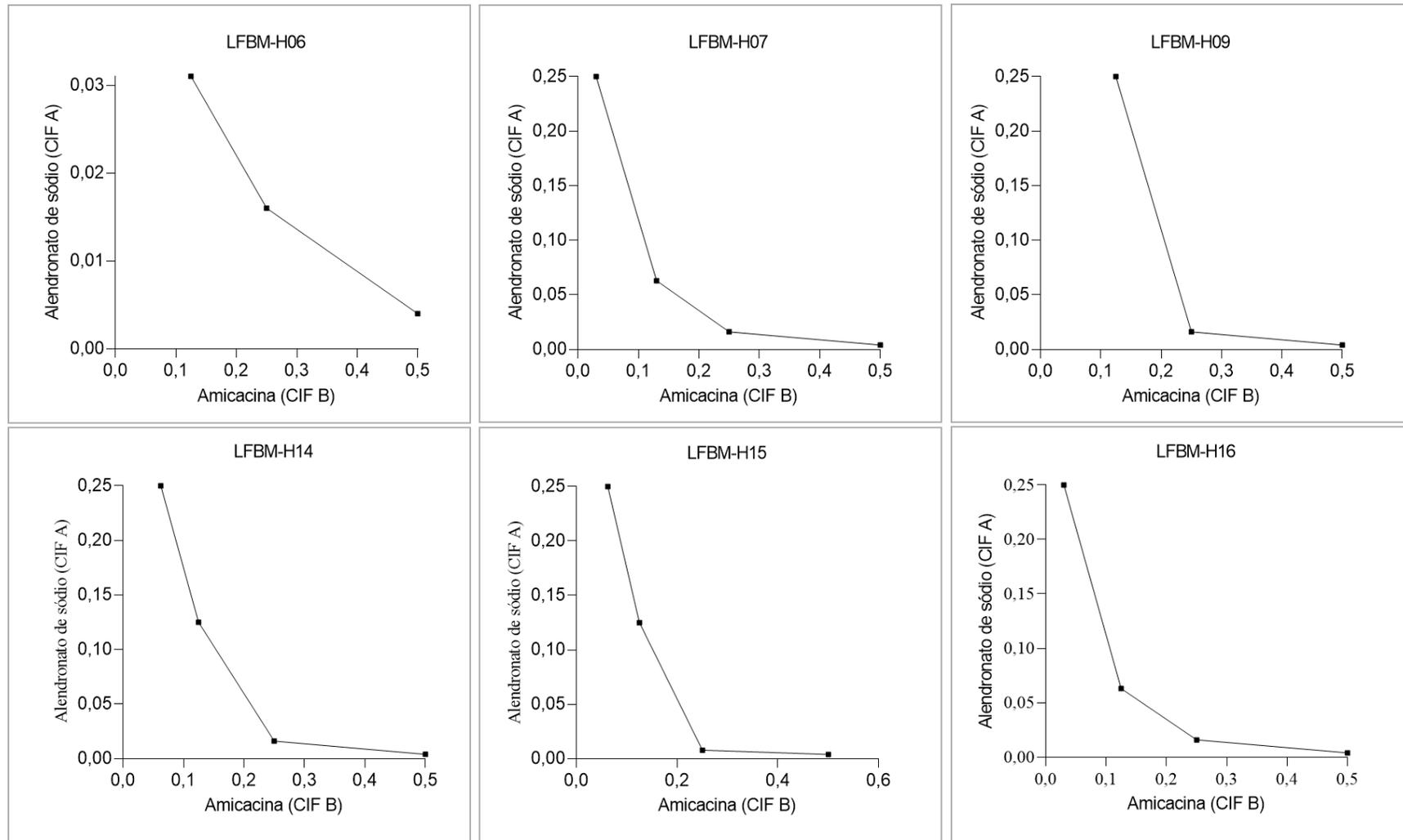
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Combinação	CIM	CIM	CIF	ICIF	Interpretação	% redução CIM
		Individual (µg/mL)	associação (µg/mL)	Individual			
LFBM-H03	AS/AMI	1024/1024	512/4	0.50/0.004	0.50*	Sinérgico	50/99.6
LFBM-H06	AS/AMI	1024/32	16/8	0.016/0.25	0.27*	Sinérgico	98.4/75
LFBM-H07	AS/AMI	1024/256	256/8	0.25/0.031	0.28*	Sinérgico	75/96.9
LFBM-H09	AS/AMI	1024/64	256/8	0.25/0.125	0.38*	Sinérgico	75/87.5
LFBM-H14	AS/AMI	1024/64	256/4	0.25/0.063	0.31*	Sinérgico	75/93.7
LFBM-H15	AS/AMI	1024/64	256/4	0.25/0.063	0.31*	Sinérgico	75/93.7
LFBM-H16	AS/AMI	1024/128	256/4	0.25/0.031	0.28*	Sinérgico	75/96.8
LFBM-H17	AS/AMI	1024/32	8/8	0.008/0.25	0.26*	Sinérgico	99.2/75
LFBM-H21	AS/AMI	1024/64	256/4	0.25/0.063	0.31*	Sinérgico	75/93.7
LFBM-C03	AS/AMI	1024/64	128/8	0.125/0.125	0.25*	Sinérgico	87.5/87.5
LFBM-H03	AS/CPM	1024/512	512/2	0.50/0.004	0.50*	Sinérgico	50/99.6
LFBM-H06	AS/CPM	1024/64	256/2	0.25/0.031	0.28*	Sinérgico	75/96.9
LFBM-H07	AS/CPM	1024/1024	256/64	0.25/0.063	0.31	Sinérgico	75/93.7
LFBM-H09	AS/CPM	1024/1024	512/4	0.50/0.003	0.50*	Sinérgico	50/99.6
LFBM-H14	AS/CPM	1024/>1024	256/4	0.25/0.004	0.25*	Sinérgico	75/99.6
LFBM-H15	AS/CPM	1024/512	256/4	0.25/0.008	0.26*	Sinérgico	75/99.2
LFBM-H16	AS/CPM	1024/64	256/2	0.25/0.031	0.28*	Sinérgico	75/96.8
LFBM-H17	AS/CPM	1024/512	256/8	0.25/0.016	0.27*	Sinérgico	75/98.4
LFBM-H21	AS/CPM	1024/1024	256/4	0.25/0.004	0.25*	Sinérgico	75/99.6
LFBM-C03	AS/CPM	1024/512	256/4	0.25/0.008	0.26*	Sinérgico	75/99.2
SPM-1	AS/CPM	1024/1024	512/8	0.50/0.008	0.50*	Sinérgico	50/99.2

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Combinação	CIM Individual (µg/mL)	CIM associação (µg/mL)	CIF Individual	ICIF	Interpretação	% redução CIM
LFBM-H06	AS/CAZ	1024/16	64/2	0.063/0.125	0.19*	Sinérgico	93.7/87.5
LFBM-H07	AS/CAZ	1024/1024	128/128	0.125/0.125	0.25	Sinérgico	87.5/87.5
LFBM-H09	AS/CAZ	1024/1024	128/128	0.125/0.125	0.25	Sinérgico	87.5/87.5
LFBM-H14	AS/CAZ	1024/>1024	256/64	0.25/0.063	0.31	Sinérgico	75/93.7
LFBM-H15	AS/CAZ	1024/512	256/8	0.25/0.016	0.27*	Sinérgico	75/98.4
LFBM-H16	AS/CAZ	1024/256	256/2	0.25/0.008	0.26*	Sinérgico	75/99.2
LFBM-H17	AS/CAZ	1024/1024	256/4	0.25/0.004	0.25*	Sinérgico	75/99.6
LFBM-H21	AS/CAZ	1024/1024	512/2	0.50/0.002	0.50*	Sinérgico	50/99.8
LFBM-C03	AS/CAZ	1024/1024	256/4	0.25/0.004	0.25*	Sinérgico	75/99.7
SPM-1	AS/CAZ	1024/1024	512/8	0.50/0.008	0.50*	Sinérgico	50/99.2
LFBM-H03	AS/CRO	1024/1024	512/1	0.50/0.001	0.50*	Sinérgico	50/99.9
LFBM-H06	AS/CRO	1024/512	512/2	0.50/0.004	0.50*	Sinérgico	50/99.6
LFBM-H07	AS/CRO	1024/1024	512/4	0.50/0.004	0.50*	Sinérgico	50/99.6
LFBM-H09	AS/CRO	1024/1024	512/256	0.50/0.25	0.75	Aditivo	50/75
LFBM-H14	AS/CRO	1024/>1024	512/64	0.50/0.063	0.56	Aditivo	50/93.7
LFBM-H15	AS/CRO	1024/1024	512/2	0.50/0.002	0.50*	Sinérgico	75/99.8
LFBM-H16	AS/CRO	1024/1024	512/4	0.50/0.004	0.50*	Sinérgico	50/99.6
LFBM-H17	AS/CRO	1024/1024	256/2	0.25/0.002	0.25*	Sinérgico	75/99.8
LFBM-H21	AS/CRO	1024/1024	128/32	0.125/0.031	0.16*	Sinérgico	87.5/96.9
LFBM-C03	AS/CRO	1024/1024	256/2	0.25/0.002	0.25*	Sinérgico	75/99.8
SPM-1	AS/CRO	1024/1024	512/4	0.50/0.004	0.50*	Sinérgico	50/99.6

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Combinação	CIM Individual (µg/mL)	CIM associação (µg/mL)	CIF Individual	ICIF	Interpretação	% redução CIM
LFBM-H03	AS/LVX	1024/512	256/64	0.25/0.125	0.38	Sinérgico	75/87.5
LFBM-H06	AS/LVX	1024/32	256/2	0.25/0.063	0.31*	Sinérgico	75/93.7
LFBM-H07	AS/LVX	1024/512	256/32	0.25/0.063	0.31	Sinérgico	75/93.7
LFBM-H09	AS/LVX	1024/512	256/32	0.25/0.063	0.31	Sinérgico	75/93.7
LFBM-H14	AS/LVX	1024/1024	256/64	0.25/0.063	0.31	Sinérgico	75/93.7
LFBM-H15	AS/LVX	1024/512	128/32	0.125/0.063	0.19	Sinérgico	87.5/93.7
LFBM-H16	AS/LVX	1024/16	256/0.5	0.25/0.031	0.28*	Sinérgico	75/96.8
LFBM-H17	AS/LVX	1024/1024	256/64	0.25/0.063	0.31	Sinérgico	75/93.7
LFBM-H21	AS/LVX	1024/256	128/64	0.125/0.25	0.38	Sinérgico	87.5/75
LFBM-C03	AS/LVX	1024/1024	256/16	0.25/0.016	0.27	Sinérgico	75/98.4
SPM-1	AS/LVX	1024/256	256/2	0.25/0.008	0.26*	Sinérgico	75/99.2
LFBM-H03	AS/MER	1024/1024	128/64	0.125/0.063	0.19	Sinérgico	87.5/93.7
LFBM-H06	AS/MER	1024/8	128/1	0.125/0.125	0.25*	Sinérgico	87.5/87.5
LFBM-H07	AS/MER	1024/1024	512/4	0.50/0.004	0.50*	Sinérgico	50/99.6
LFBM-H09	AS/MER	1024/1024	256/256	0.25/0.25	0.50	Sinérgico	75/75
LFBM-H14	AS/MER	1024/1024	512/128	0.50/0.125	0.63	Aditivo	50/87.5
LFBM-H15	AS/MER	1024/512	256/8	0.25/0.016	0.27	Sinérgico	75/98.4
LFBM-H16	AS/MER	1024/16	256/1	0.25/0.063	0.31*	Sinérgico	75/93.7
LFBM-H17	AS/MER	1024/256	512/2	0.50/0.008	0.50*	Sinérgico	50/99.2
LFBM-H21	AS/MER	1024/1024	512/4	0.50/0.004	0.50*	Sinérgico	50/99.6
LFBM-C03	AS/MER	1024/256	512/1	0.50/0.004	0.50*	Sinérgico	50/99.6
SPM-1	AS/MER	1024/1024	256/8	0,25/0,008	0,26	Sinérgico	75/99.2

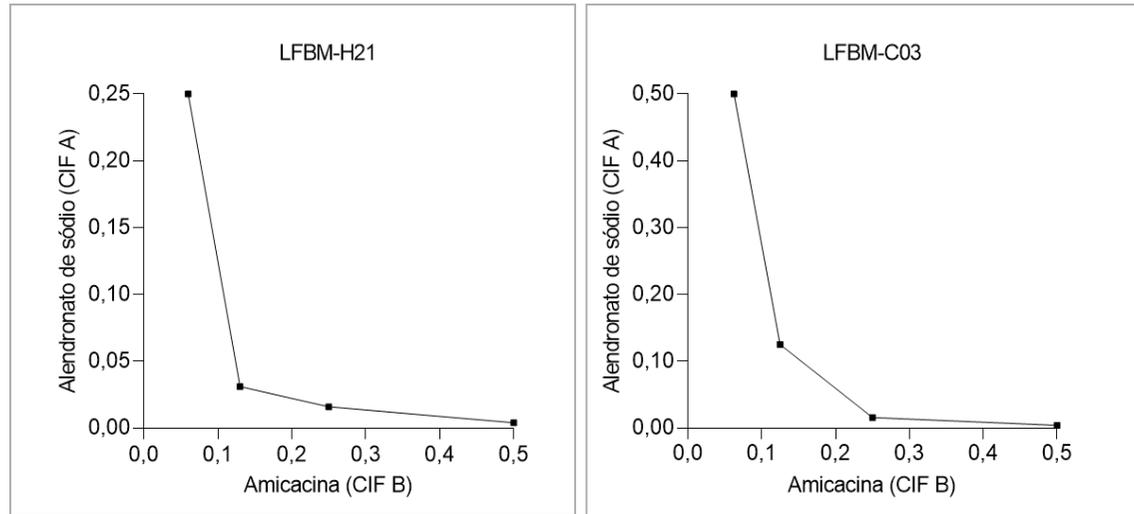
CIM – Concentração Inibitória Mínima; CIF – Concentração Inibitória Fracionada; ICIF – Índice da Concentração Inibitória Fracionada; (*): Reversão dos valores da CIM do antimicrobiano em associação com o alendronato de sódio na qual a cepa de *P. aeruginosa* volta a ser sensível – Antimicrobianos: Amicacina (AMI), Cefepima (CPM), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Levofloxacino (LVX), Meropenem (MER), Alendronato de sódio (AS). Fonte: O autor.

Figura 23 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Amicacina frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14, LFBM-H15 e LFBM-H16.



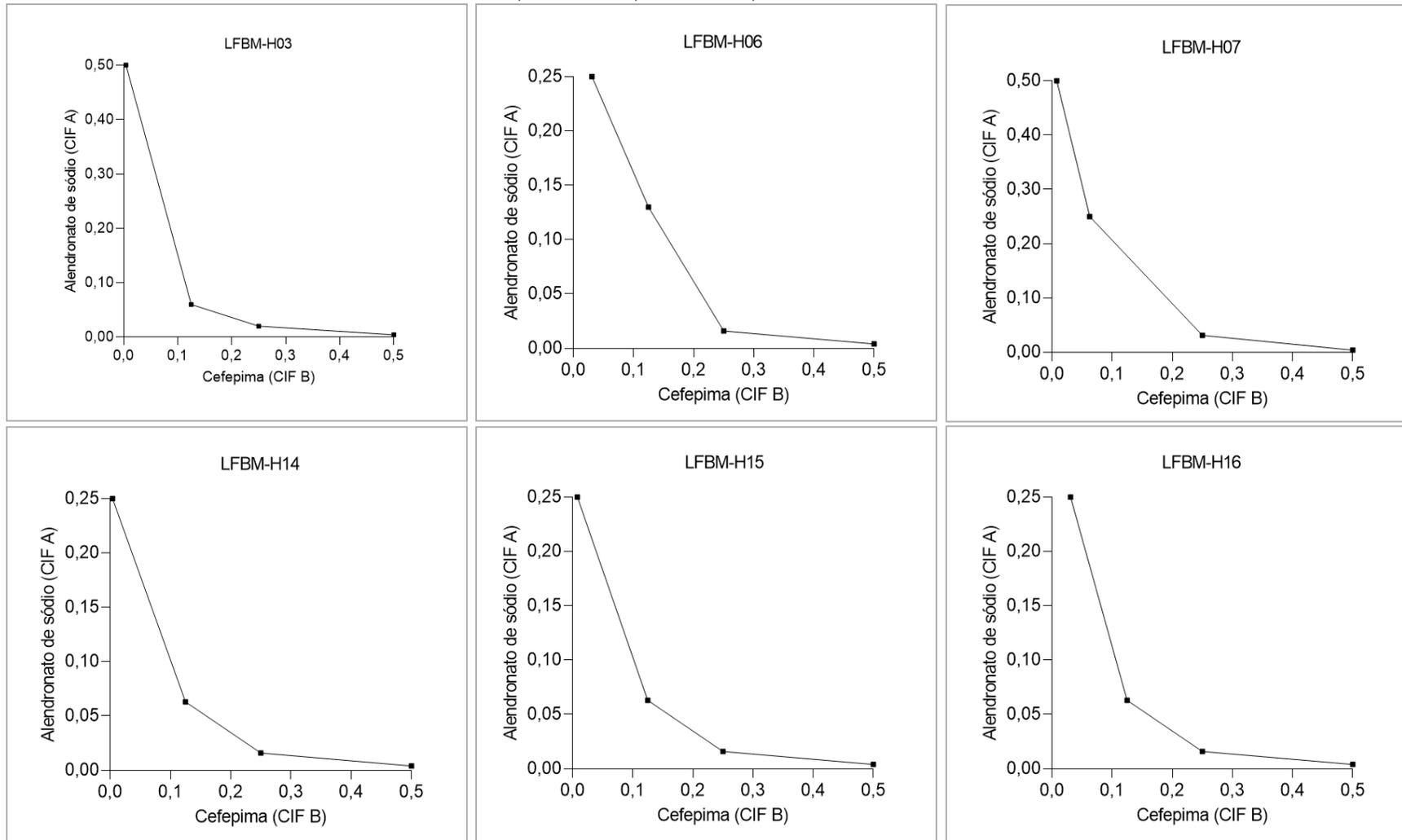
Fonte: O autor.

Figura 24 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Amicacina frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H21, LFBM-C03.



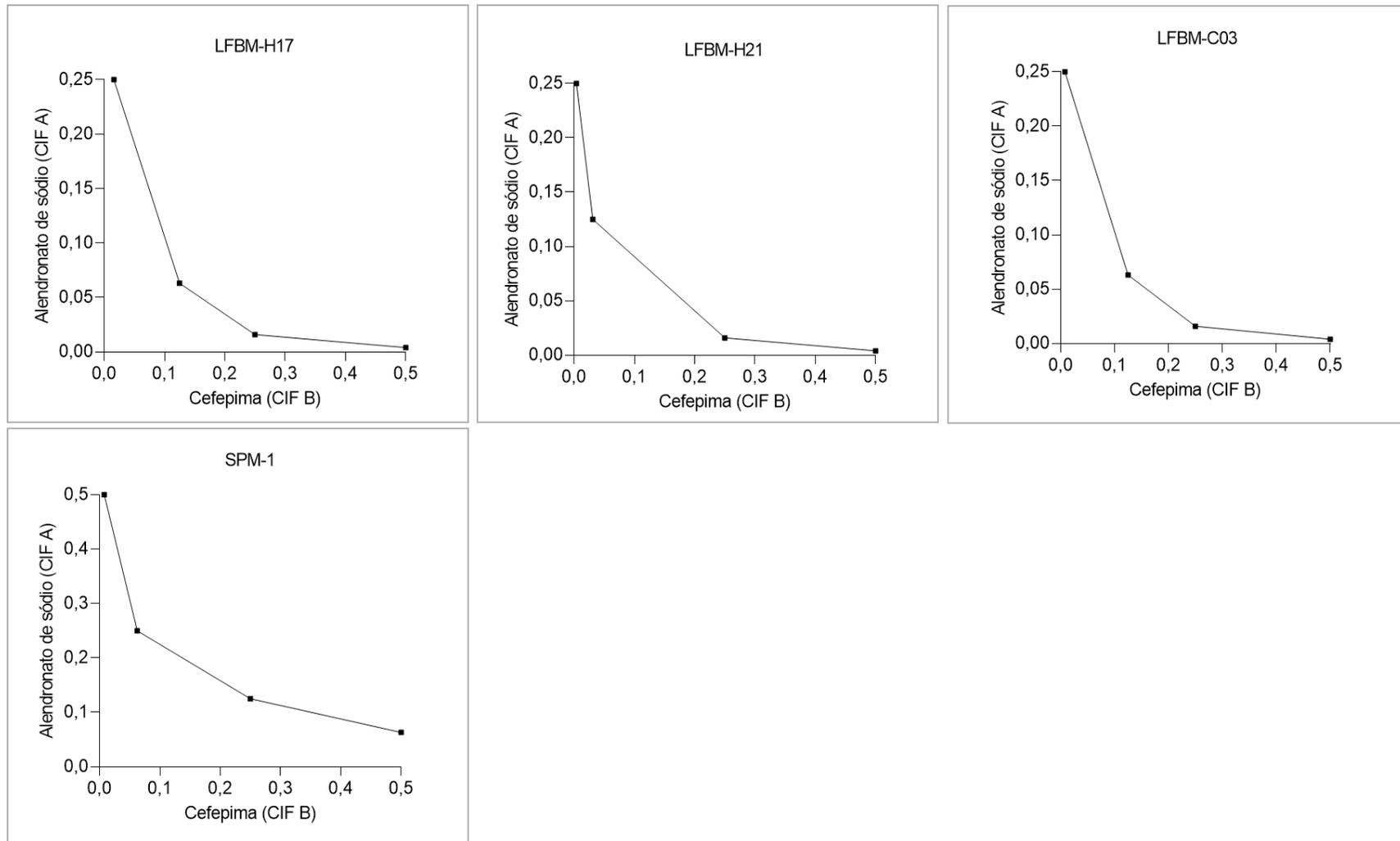
Fonte: O autor.

Figura 25 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Cefepima frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H14, LFBM-H15 e LFBM-H16.



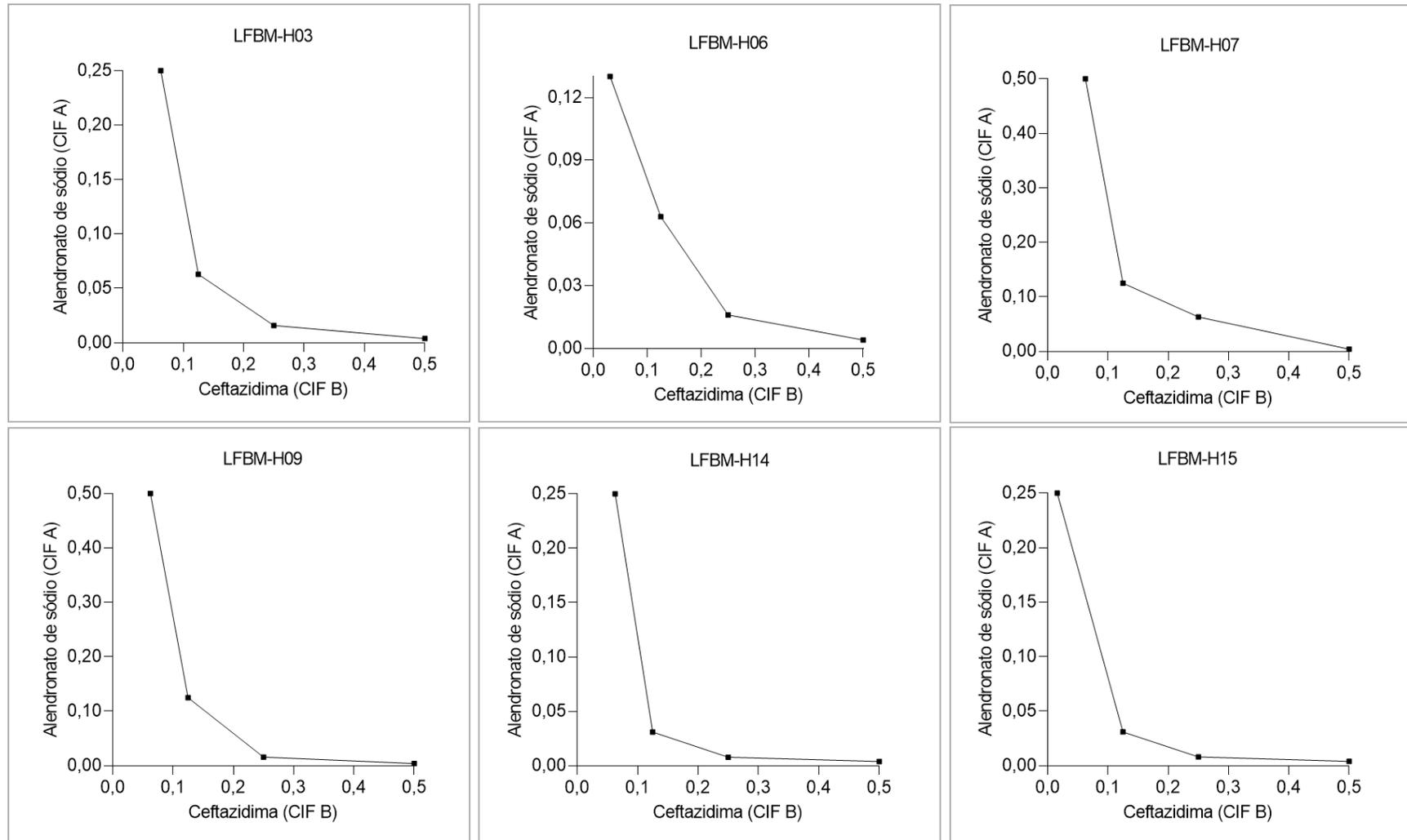
Fonte: O autor.

Figura 26 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Cefepima frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03 e SPM-1.



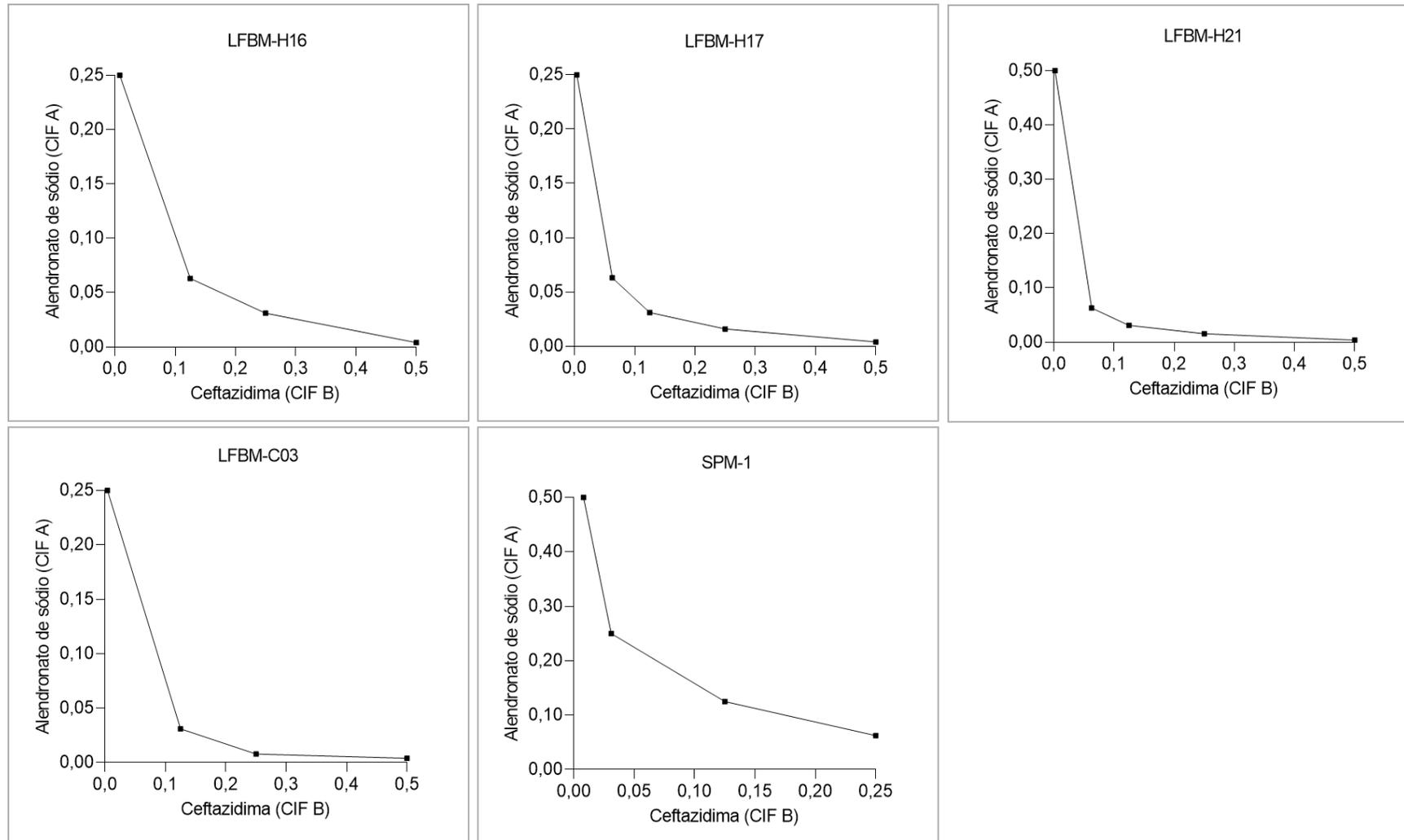
Fonte: O autor.

Figura 27 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Ceftazidima frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14 e LFBM-H15.



Fonte: O autor.

Figura 28 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Ceftazidima frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03 e SPM-1.



Fonte: O autor.

Figura 29 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Ceftriaxona frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H06, LFBM-H15, LFBM-H16 e SPM-1.

Fonte: O autor.

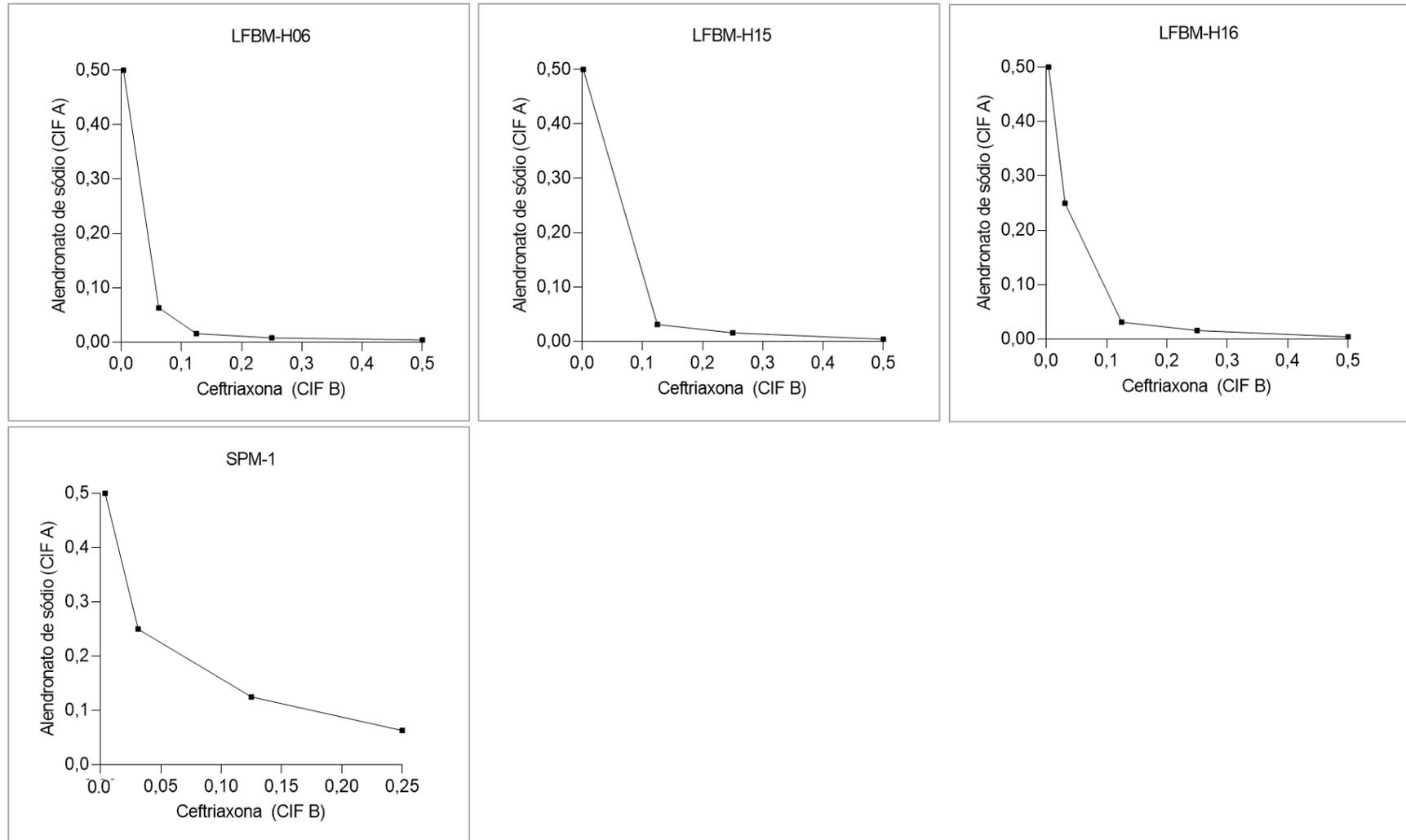
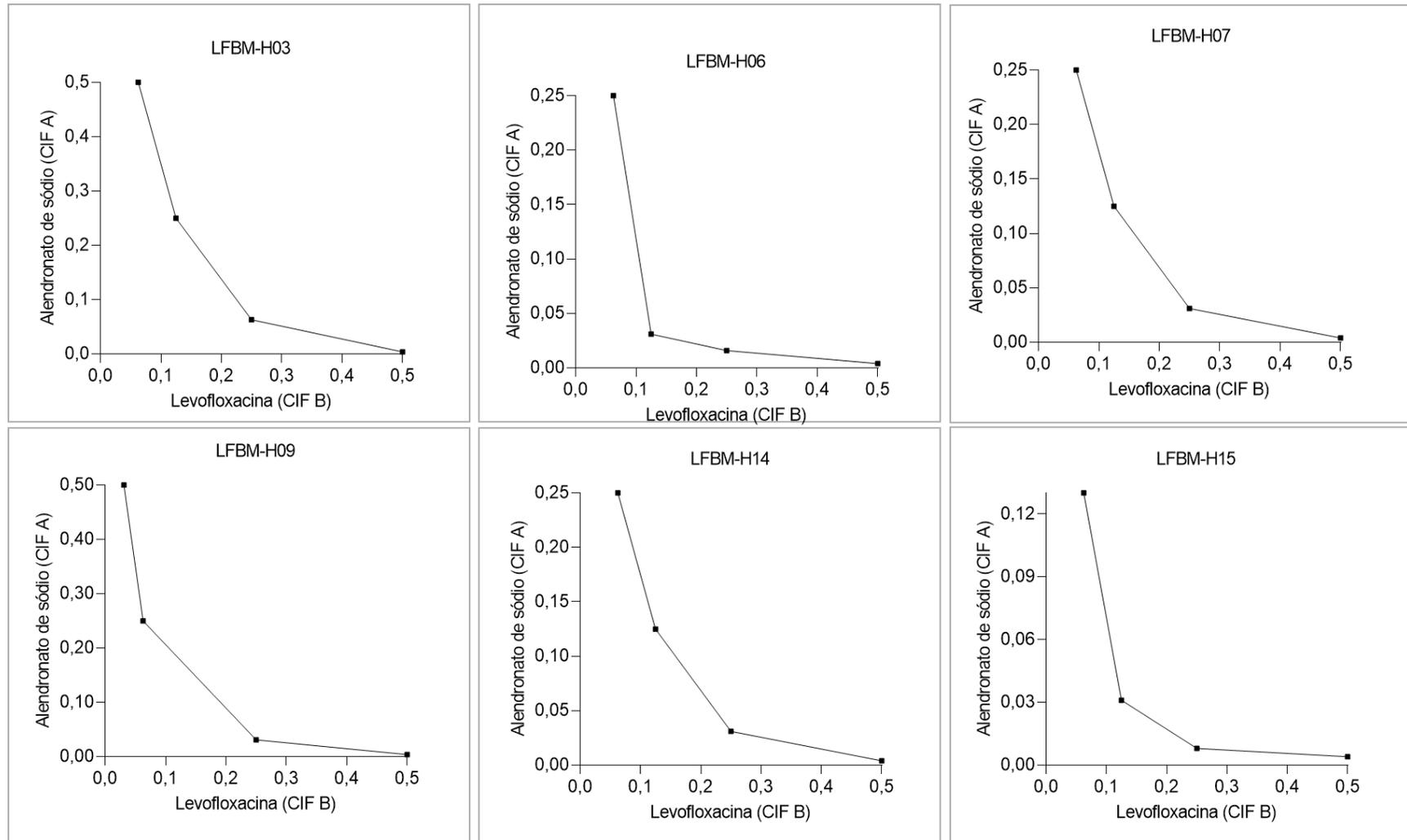
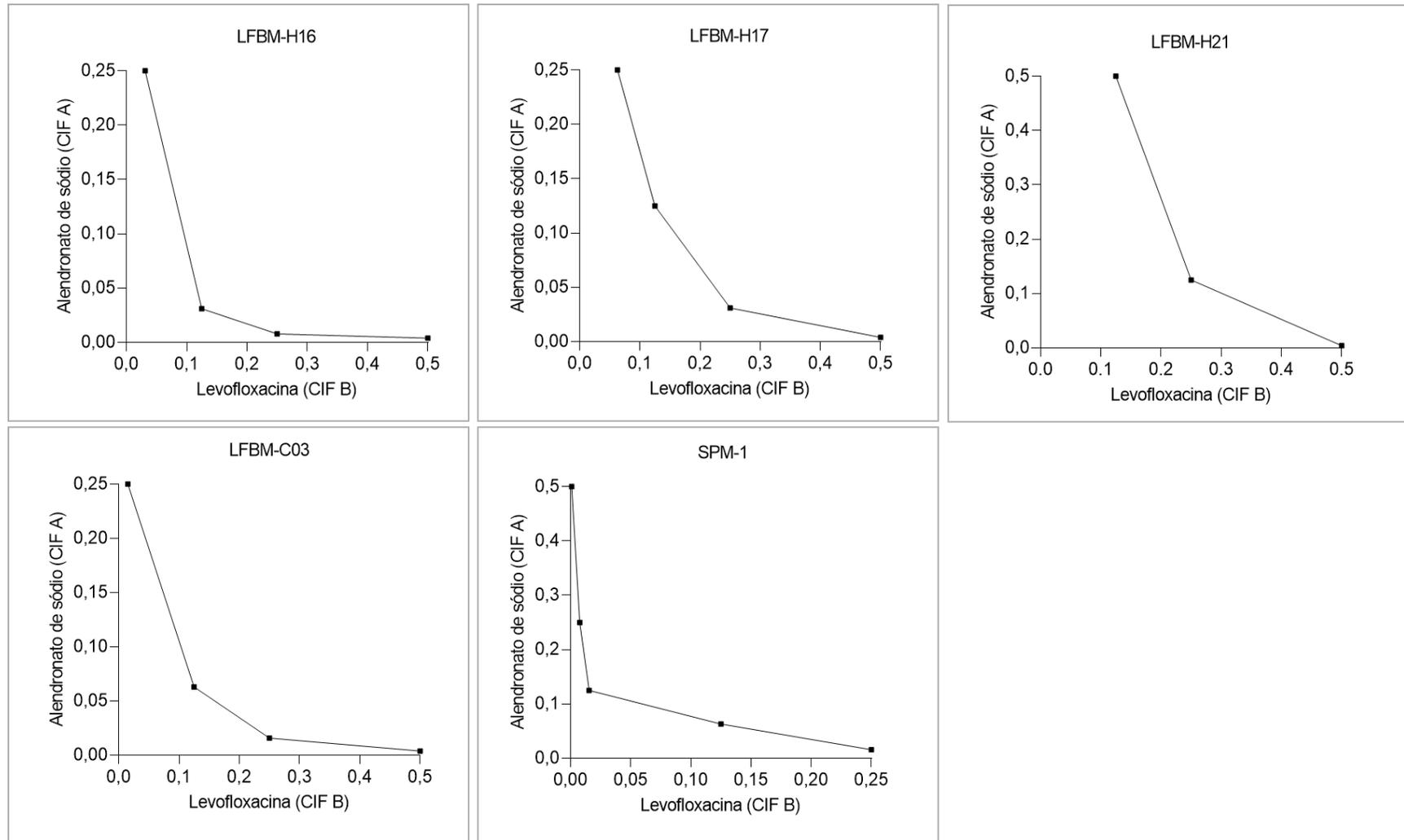


Figura 30 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Levofloxacino frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14 e LFBM-H15.



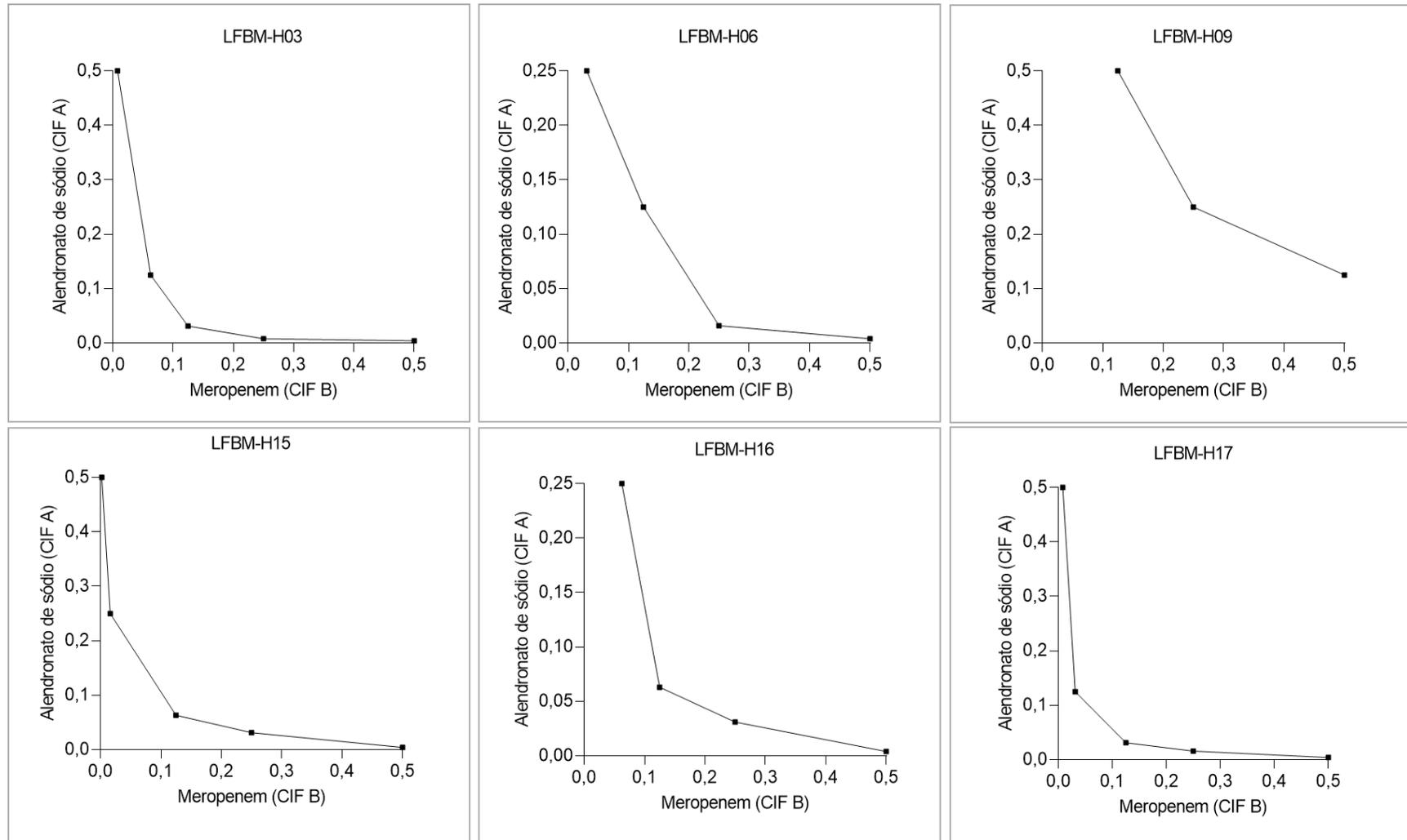
Fonte: O autor.

Figura 31 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Levofloxacino frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03 e SPM-1.



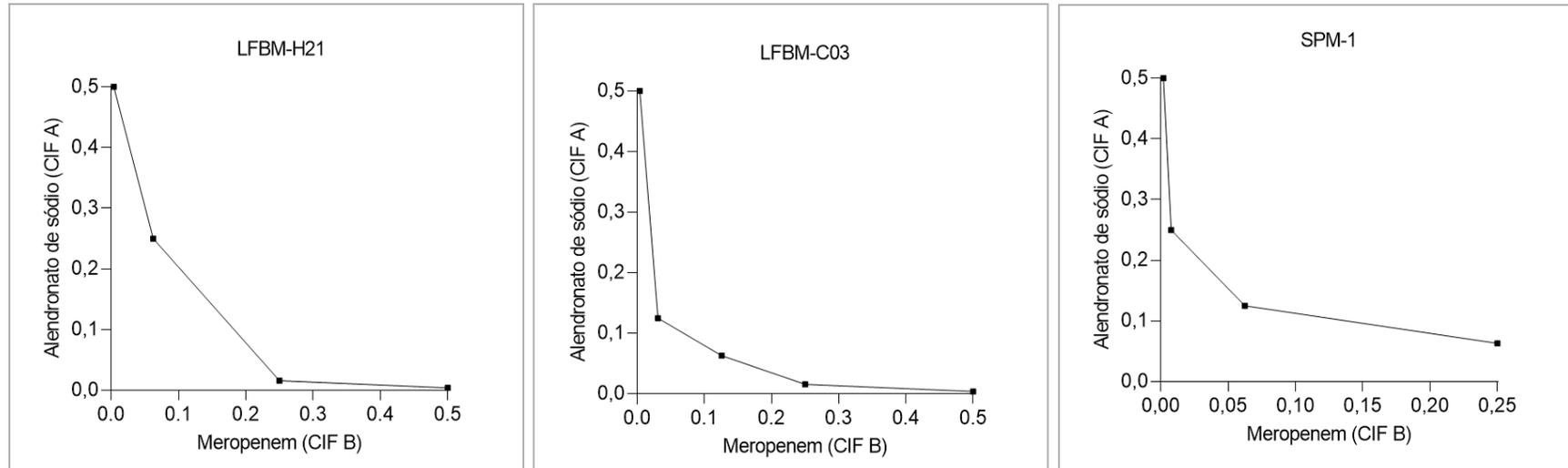
Fonte: O autor.

Figura 32 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Meropenem frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H09, LFBM-H15, LFBM-H16 e LFBM-H17.



Fonte: O autor.

Figura 33 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico do Alendronato de sódio em associação com Meropenem frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H21, LFBM-C03, SPM-1.

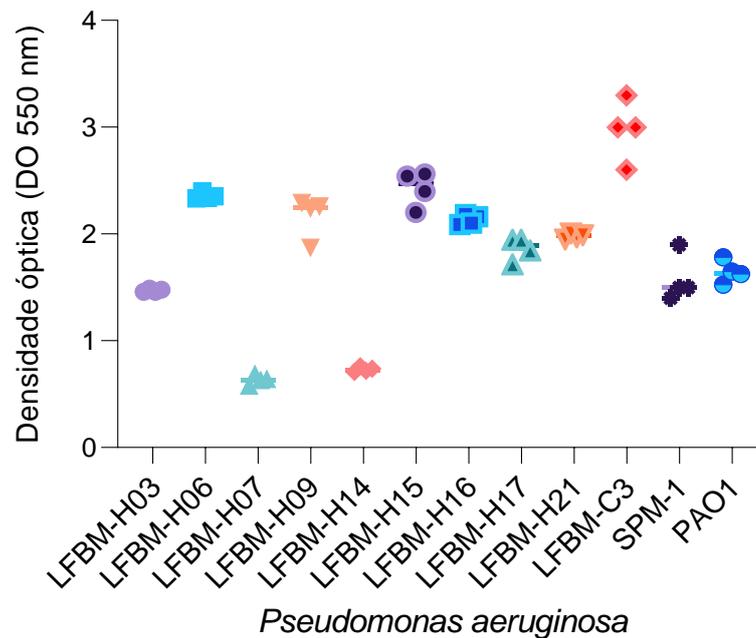


Fonte: O autor.

5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME PELO MÉTODO DE MICROPLACA

A quantificação do biofilme das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* deste estudo, mostrou que 83,33% (10) das cepas foram classificadas como altamente aderentes e 16,6% (2) como moderadamente aderentes (Figura 34).

Figura 34 – Avaliação da produção de biofilme em microplaca.



Fonte: O autor.

5.7 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ALENDRONATO DE SÓDIO

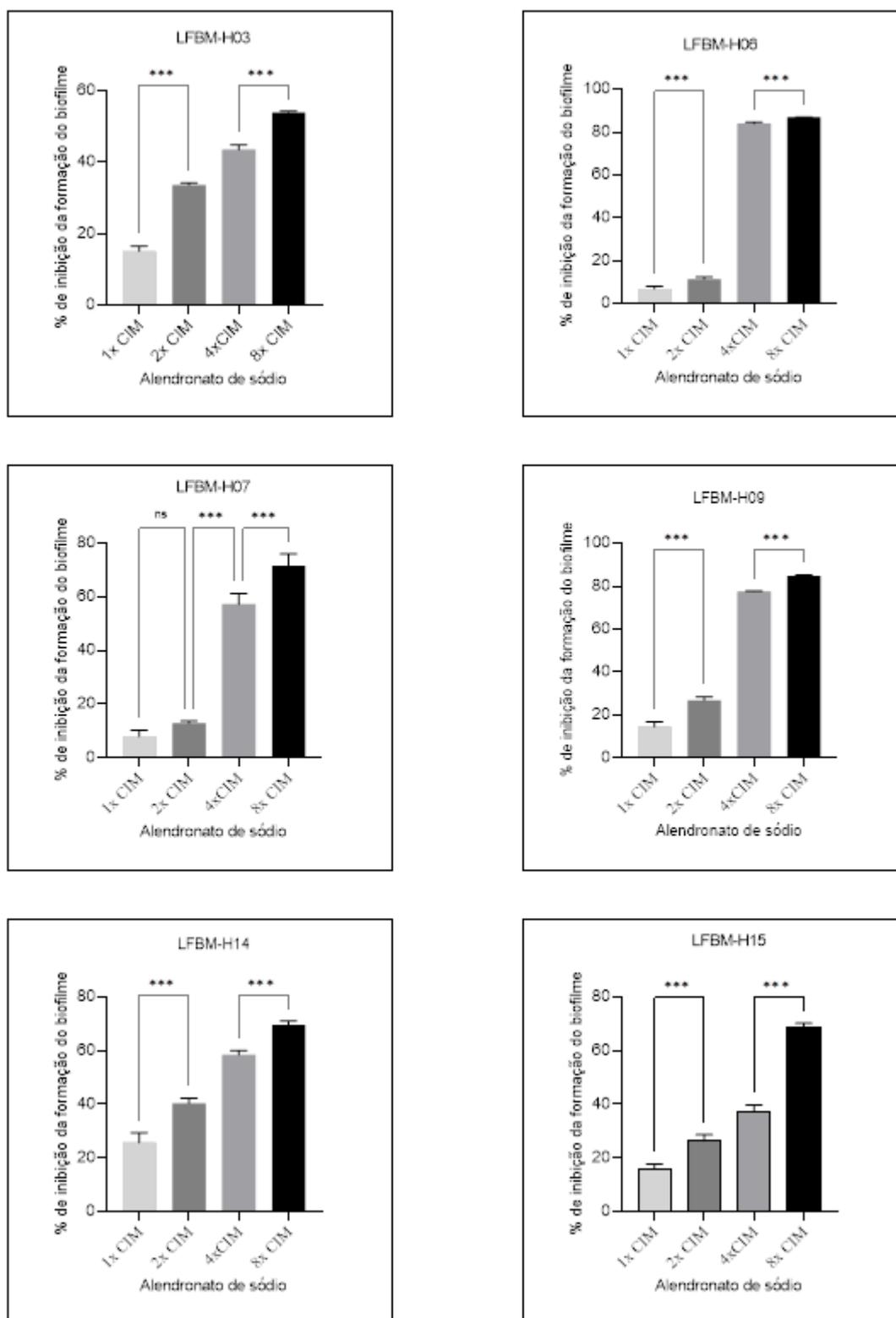
A atividade do alendronato de sódio frente a 12 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi expressa em percentual de redução conforme apresentado na Tabela 9 e nas Figuras 34 e 35. Foram utilizadas quatro múltiplas concentrações a partir da CIM (1024µg/mL), anteriormente determinada, para avaliar a atividade dessa droga frente a essas espécies bacterianas.

A redução da formação do biofilme apresentou efeito dose-dependente para o tratamento com alendronato de sódio. A ANCOVA realizada aponta que a produção do biofilme sofre influência da cepa e da concentração do alendronato de sódio.

A inibição da formação do biofilme pelo alendronato de sódio frente às cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentou uma redução (Tabela 9) de 46,4 a 87,1% quando tratado com 8x CIM (8.192µg/mL), 34,4 a 84,1% quando tratado com 4x CIM (4.096µg/mL), 11,5 a 66,5% quando tratado com 2x CIM (2.048µg/mL) e 7,0 a 28,1% quando tratado com a CIM (1.024µg/mL), em relação ao controle. Os testes estatísticos, ANOVA, foram feitos para todas as cepas em relação as quatro concentrações estudadas, demonstram que a concentração do alendronato de sódio influencia na inibição do biofilme.

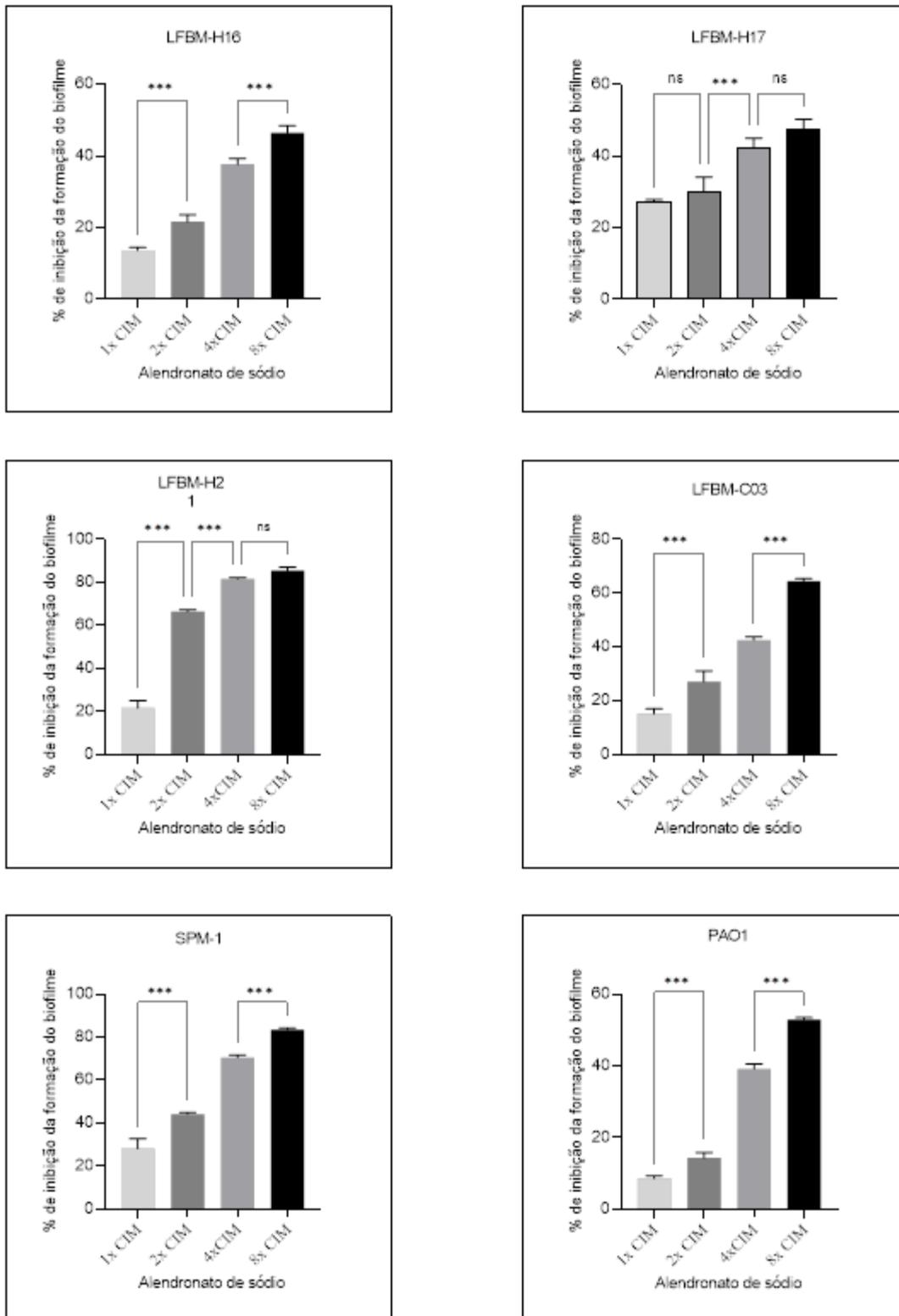
Os resultados estatísticos apontam que para todas as cepas testadas as concentrações de tratamento apresentaram atividade antibiofilme significativa ($p < 0,001$). O teste de Tukey demonstrou uma redução significativa quando comparado a concentração menor (1.024µg/mL) com a concentração maior (8.192µg/mL) da mesma cepa. Entretanto, três cepas não demonstraram resultados significativos entre uma concentração e outra, que foram LFBM-H07, LFBM-H17 e LFBM-H21 como descrita na Figura 35 e 36.

Figura 35 - Percentual de redução da formação do biofilme das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14 e LFBM H15.



Após tratamento com Alendronato de sódio 8192 µg/mL (8x CIM), 4096 µg/mL (4x CIM), 2048 µg/mL (2x CIM) e 1024 µg/mL (1x CIM). Os resultados estatísticos estão expressos nos gráficos conforme o grau de significância * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Fonte: O autor.

Figura 36 - Percentual de redução da formação do biofilme das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03, SPM-1 e PAO1.



Após tratamento com Alendronato de sódio 8192 µg/mL (8x CIM), 4096 µg/mL (4x CIM), 2048 µg/mL (2x CIM) e 1024 µg/mL (1x CIM). Os resultados estatísticos estão expressos nos gráficos conforme o grau de significância * p < 0,05; ** p < 0,01, *** p < 0,001. Fonte: O autor.

Tabela 9 – Percentual de redução da produção de biofilme frente ao tratamento com AS.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	% de redução de formação do biofilme				
	Alendronato de sódio				p valor
	8x CIM 8192 µg/mL	4x CIM 4096 µg/mL	2x CIM 2048 µg/mL	1X CIM 1024 µg/mL	
	X ± σ	X ± σ	X ± σ	X ± σ	
LFBM-H03	54,0 ± 0,3	43,5 ± 1,4	33,7 ± 0,6	15,2 ± 1,4	< 0,001
LFBM-H06	87,1 ± 0,1	84,1 ± 0,6	11,5 ± 0,9	7,0 ± 1,1	< 0,001
LFBM-H07	71,7 ± 4,4	57,3 ± 4,0	13,0 ± 0,8	8,1 ± 2,3	< 0,001
LFBM-H09	85,0 ± 0,2	77,6 ± 0,2	26,9 ± 1,4	14,6 ± 2,3	< 0,001
LFBM-H14	69,7 ± 1,3	58,5 ± 1,6	40,4 ± 1,8	25,8 ± 3,7	< 0,001
LFBM-H15	68,9 ± 1,3	37,4 ± 2,4	26,3 ± 2,4	16,1 ± 1,6	< 0,001
LFBM-H16	46,4 ± 2,0	37,7 ± 1,6	21,7 ± 1,9	13,7 ± 0,8	< 0,001
LFBM-H17	47,6 ± 2,7	42,3 ± 2,8	30 ± 4,1	27,3 ± 0,6	< 0,001
LFBM-H21	85,5 ± 1,8	81,6 ± 0,7	66,5 ± 0,9	21,6 ± 3,3	< 0,001
LFBM-C03	64,6 ± 0,9	42,6 ± 1,2	27,1 ± 3,9	15,1 ± 1,9	< 0,001
SPM-1	83,4 ± 0,9	70,5 ± 1,2	44,2 ± 0,7	28,1 ± 4,6	< 0,001
PAO1	52,9 ± 0,5	39,2 ± 1,4	14,4 ± 1,5	8,7 ± 0,7	< 0,001

Fonte: O autor.

5.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME ENTRE AS ASSOCIAÇÕES DE ALENDRONATO DE SÓDIO E AS CEFALOSPORINAS

A atividade antibiofilme das associações AS/CPM, AS/CAZ e AS/MER frente as cepas LFBM-H03, LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H09, LFBM-H14, LFBM-H15, LFBM-H16, LFBM-H17, LFBM-H21, LFBM-C03 de *Pseudomonas aeruginosa* e a cepa controle *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 são apresentadas nas Figuras 36, 37 e 38.

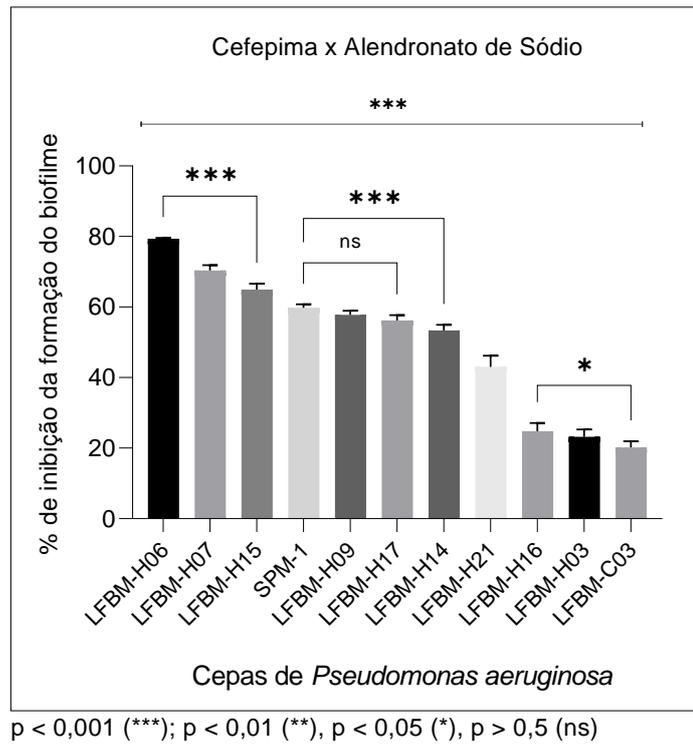
Os resultados apontam que as concentrações sub-inibitórias, dos valores do ICIF, obtidas no ensaio de tabuleiro xadrez entre os β -lactâmicos e o alendronato de sódio, foram capazes de inibir a formação do biofilme em todas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Não se mostrando eficiente o tratamento das drogas quando não associados.

O percentual de inibição da formação do biofilme pelas combinações dos antimicrobianos β -lactâmicos com o alendronato de sódio variou de 85 a 13%. O resultado estatístico aponta que a combinação dos antimicrobianos influenciou na atividade antibiofilme, bem como sofre a influência das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e dos antimicrobianos β -lactâmicos avaliados. Dentre as combinações estudadas dos β -lactâmicos com alendronato de sódio, evidenciou-se que das 11 cepas estudadas, a maior parte delas (63 a 54%) apresentaram redução superior a 50% da produção do biofilme, conforme apresentado nas Figuras 36, 37 e 38.

Os resultados estatísticos do teste de Tukey apontam que cepas que sofreram efeitos de inibição similares, com $p > 0,05$, normalmente as que apresentaram percentual de redução próximo. Quando realizada a comparação entre as cepas que tiveram maior percentual de redução com as que tiveram menor percentual de redução é possível evidenciar um efeito significativo com o $p < 0,05$.

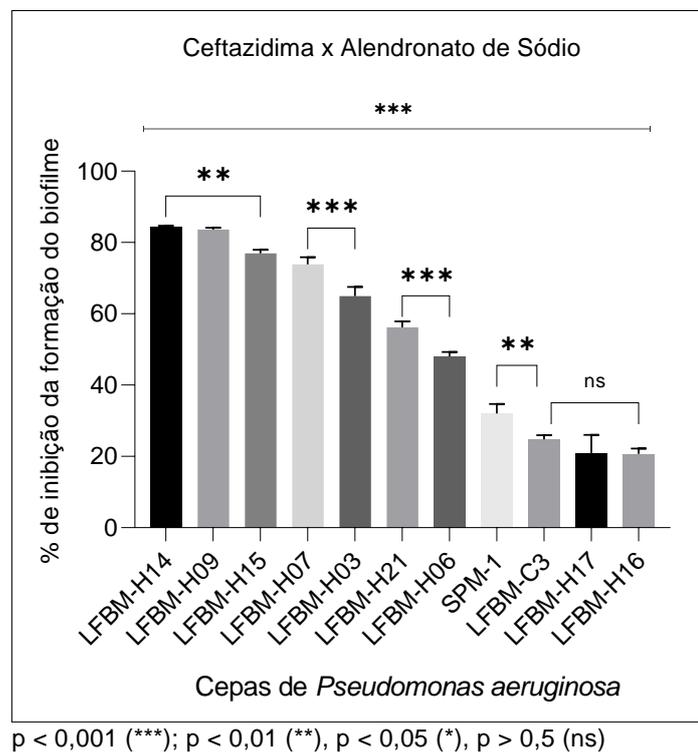
Dentre as onze cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, houve cepas que apresentaram maior redução do biofilme de acordo com a combinação tratada. A combinação AS/CPM expressou atividade antibiofilme melhor para as cepas LFBM-H06, LFBM-H07, LFBM-H15 e SPM-1 (79,36 – 59,7%). As cepas LFBM-H14, LFBM-H09, LFBM-H15 e LFBM-H07 (84,3 – 73,9%) revelou maior redução do biofilme quando tratadas pela combinação AS/CAZ. Para cepas, LFBM-H06, LFBM-H09, LFBM-H14 e LFBM-C03 (85,4 – 76,2%) a redução da formação do biofilme foi maior para a combinação AS/MER.

Figura 37 – Gráfico representativo da redução da produção de biofilme entre as associações cefepima e alendronato de sódio.



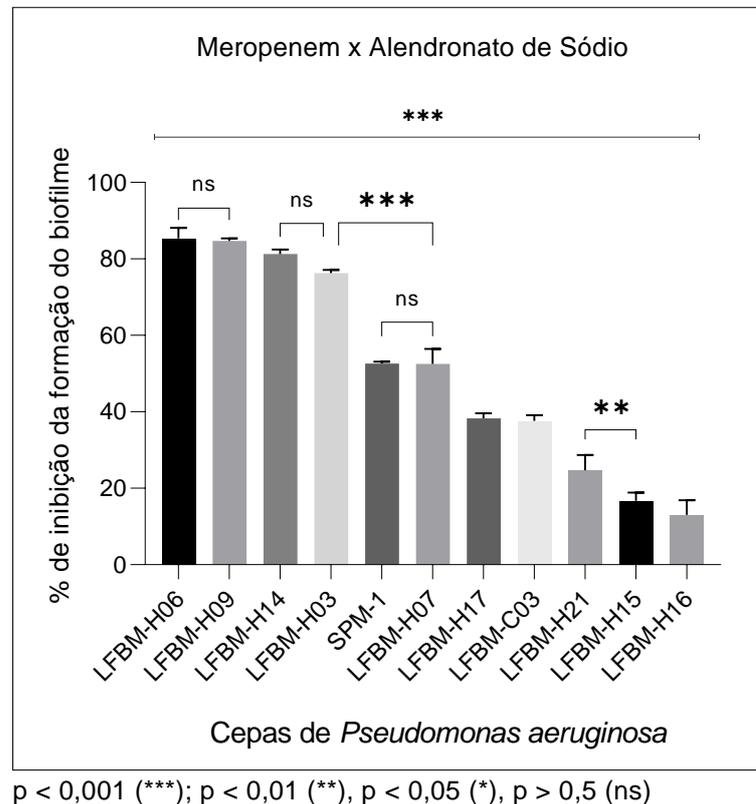
Fonte: O autor.

Figura 38 – Gráfico representativo da redução da produção de biofilme entre as associações ceftazidima e alendronato de sódio.



Fonte: O autor.

Figura 39 – Gráfico representativo da redução da produção de biofilme entre as associações meropenem e alendronato de sódio.



Fonte: O autor.

5.9 ANÁLISE DESCRITIVA DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME POR MICROSCOPIA ÓPTICA

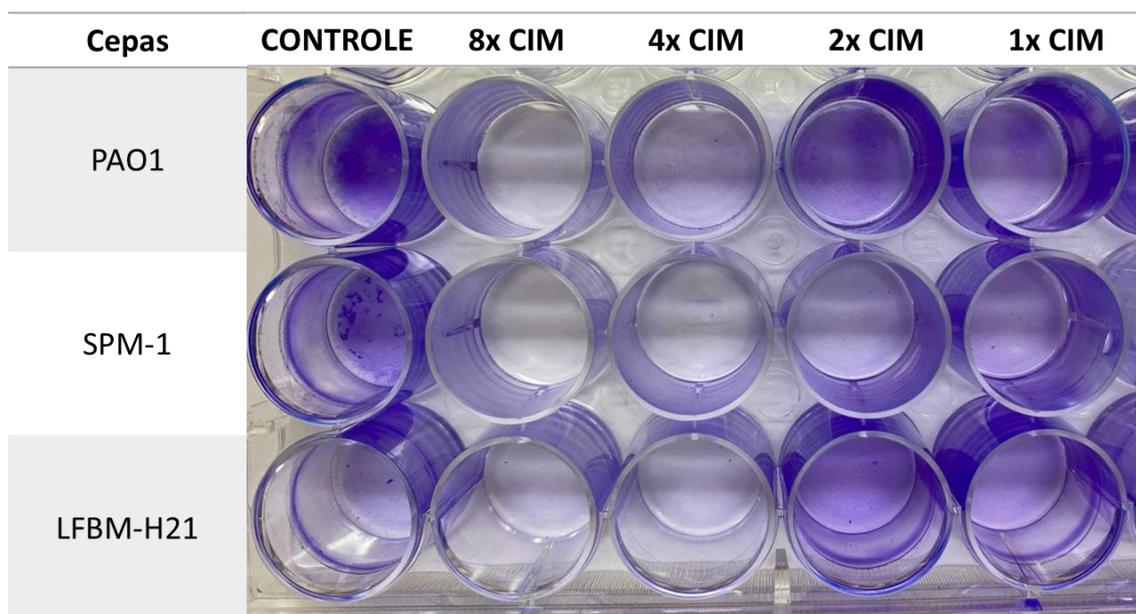
O efeito do tratamento com alendronato de sódio na formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* a partir da coloração expressa na placa observada a olho nu e os efeitos observados microscopicamente estão expostos na Figura 39 e Figura 40, respectivamente.

As imagens capturadas evidenciam mudanças na intensidade da coloração dos poços de acordo com o tratamento aplicado e com o poço controle. Possivelmente, ocorre uma desestruturação da arquitetura do biofilme após o tratamento com alendronato de sódio quando comparado ao biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* não tratado.

Os resultados visualizados por microscopia corroboram com os outros resultados experimentais deste trabalho, observando uma supressão considerável do biofilme. Embora a microscopia óptica de luz permita a visualização do biofilme ela

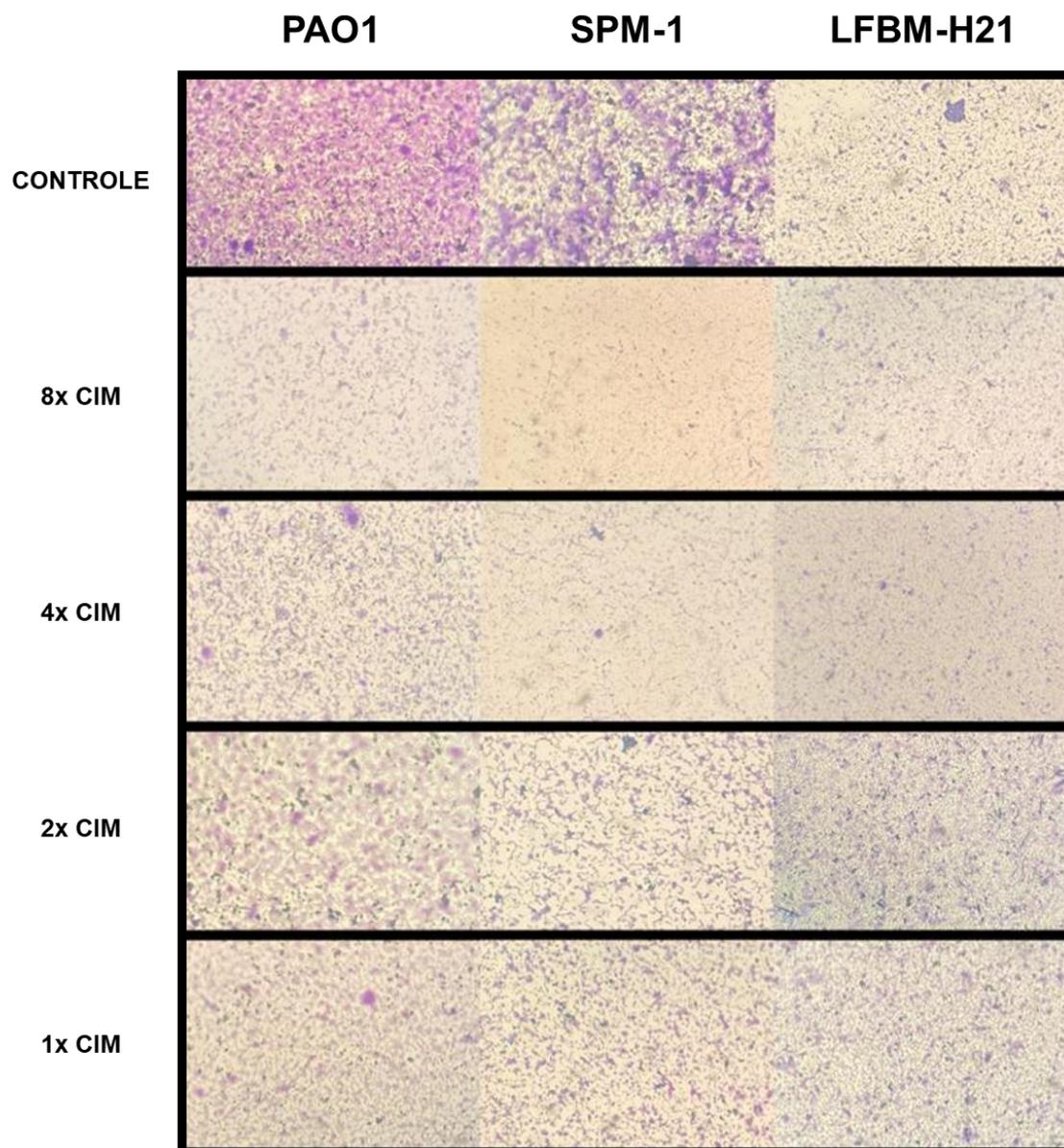
tem suas limitações para capacidade de quantificação e a visualização tridimensional também fica comprometida.

Figura 40 - Microplaca corada após etapa de fixação do biofilme, criando uma comparação entre o controle de crescimento e o tratamento com Alendronato de sódio (8192, 4096, 2048 e 1024 $\mu\text{g/mL}$).



Fonte: O autor.

Figura 41 - Microscopia óptica do biofilme. Imagens microscópicas do crescimento do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* – PAO1, SPM-1 e LFBM-H21.



Imagens da microscopia óptica (objetiva 40x) mostram a morfologia do biofilme para um mesmo inóculo, relacionado o controle de crescimento (sem tratamento) e os tratamentos de alendronato de sódio nas respectivas concentrações 1024 μ g/mL (CIM), 2048 μ g/CIM (2x CIM), 4096 μ g/mL (4x CIM) e 8192 μ g/mL (8x CIM), após 24 horas de cultivo em uma cultura estática. Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma das espécies bacterianas de maior relevância clínica e epidemiológica, por ser um patógeno oportunista e frequentemente estar associado a infecções hospitalares. Cepas dessas espécies são comumente relatadas como multirresistentes pela comunidade científica, sendo à pressão seletiva dos ambientes hospitalares um dos principais responsáveis por causar sua resistência. A capacidade de formação de biofilme e outros fatores de virulência oferecem proteção das células bacterianas de *P. aeruginosa* à ação dos antimicrobianos (PANG *et al*, 2019). Compreender os mecanismos envolvidos na resistência bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* as diferentes classes de antimicrobianos pode ser a chave para diminuir o impacto clínico, que conseqüentemente aumenta o tempo de tratamento e hospitalização, podendo levar à morte (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015). No presente trabalho foi realizado o estudo de diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origem clínica frente a atividade antimicrobiana do alendronato de sódio sozinho e em associação com os antimicrobianos convencionais, assim como o seu desempenho frente à formação de biofilme.

A busca incessante por novos tratamentos tornou-se objetivo de inúmeras pesquisas científicas em todo o mundo. A pesquisa por novas drogas que sejam capazes de atuar sobre a inibição do *quorum sensing*, inibição da formação do biofilme, sobre fatores de virulência e na inibição da função dos íons envolvidos em processos metabólicos bacterianos é primordial para a idealização de protótipos de fármacos que sejam ativos contra *Pseudomonas aeruginosa* (PANG *et al*, 2019). Contudo a maioria dos estudos relacionados ao desenvolvimento de novos princípios ativos ainda se encontram em fase pré-clínica. Diante deste cenário, ser capaz de observar a modificação da sensibilidade de cepas previamente resistentes para cepas susceptíveis aos antimicrobianos tradicionais torna-se uma abordagem desejada. Uma das técnicas sugeridas é a utilização de esquemas terapêuticos inéditos associando fármacos já existentes no mercado (CHATTERJEE *et al*, 2016).

No presente estudo, foi observado que o uso de um composto bisfosfonato, sem aparente função antimicrobiana, foi capaz de sensibilizar cepas MDR de *Pseudomonas aeruginosa* e torná-las mais suscetíveis a compostos antimicrobianos que apresentavam prévia resistência. Considerando a segurança clínica dos

compostos envolvidos, a associação desses fármacos é uma inovação terapêutica e surge como um protocolo que deve ser analisado clinicamente.

Na prática clínica, o tratamento de infecções provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* é fundamentado em três classes de antibióticos: os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (TREEPONG *et al*, 2018). Porém, tem se constatado a crescente resistência de *Pseudomonas aeruginosa* a estas classes de antimicrobianos. Atribui-se essa resistência tanto à capacidade desta bactéria em gerar mutações nos genes cromossômicos, assim como pela transferência de genes que codificam enzimas que inativam os antimicrobianos tradicionais, como as carbapenemases de classe B (MBL), β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e enzimas que modificam aminoglicosídeos (POOLE, 2011; OLIVER *et al*, 2015).

Atestando a literatura, foram avaliadas diferentes cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, todas foram consideradas multidroga resistentes (MDR), uma vez que apresentaram resistência microbiana a aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e quinolonas. Foi observada resistência especialmente à classe das cefalosporinas. Esses fármacos passaram a ser comumente utilizados após o aparecimento da resistência a penicilinas mediadas por β -lactamases, favorecendo o surgimento de bactérias produtoras de ESBLs (β -lactamases de espectro estendido) e por pressão seletiva aumentando a disseminação de bactérias resistentes. Acredita-se que, a resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração esteja relacionada à produção de β -lactamases cromossomais do tipo AmpC, que inativam as cefalosporinas de amplo espectro e não são inibidas pelos inibidores de β -lactamases (PICÃO; GALES, 2007; THOMSON, 2010).

Por outro lado, as cepas analisadas foram sensíveis ou intermediárias à polimixina B, corroborando com outros estudos científicos que evidenciaram que os isolados bacterianos foram na maioria sensíveis ou raramente resistentes à essa classe de antimicrobianos (YAYAN; GHEBREMEDHIN; RASCHE, 2015; SCHEFFER *et al*, 2010).

Na prática clínica, o uso da polimixina B tem sido reinserido na terapêutica das infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes e utilizado como alternativa terapêutica quando outros fármacos não se mostram eficazes. Devido à alta nefrotoxicidade, o uso desse antimicrobiano deve ser ponderado, evidenciando a necessidade de esquemas terapêuticos eficientes e com menor toxicidade para o paciente (POGUE; ORTWINE; KAYE, 2016; OLIOTA *et al*, 2019).

Além das classes de antimicrobianos citadas, carbapenêmicos perfazem uma das opções tradicionais de escolha para tratamento da infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, devido a sua elevada potência e a estabilidade à hidrólise das beta-lactamases (FIGUEIREDO *et al*, 2007). Porém, a resistência a essa classe de fármacos iniciou ainda nos anos 80, devido a mudança na expressão de porinas (QUINN *et al*, 1986). Dentre os carbapenêmicos, o meropenem é o que menos sofre desse mecanismo de resistência, porém a *Pseudomonas aeruginosa* pode se tornar resistente a ele por expressão de bombas de efluxo (KOHLENER *et al*, 1999).

Gonçalves e colaboradores (2017) constataram que a resistência de *Pseudomonas aeruginosa* a carbapenêmicos está relacionada não somente às MBL, mas também a outros fatores como formação de biofilme, impermeabilidade da membrana e bombas de efluxo.

Todas as cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram resistência ao meropenem; contudo nenhuma delas apresentou genes relacionados às MBL, reforçando a informação de que outros mecanismos devem estar envolvidos no processo de resistência das cepas analisadas. Shahcheraghi, Nikbin e Feizabadi (2010) apresentaram resultados similares, em que a maioria das cepas que demonstraram resistência ao imipenem e a ceftazidima não revelaram expressão de genes para MBL. Esses dados fortalecem a hipótese que outros fatores de resistência estão envolvidos.

Em relação à detecção dos genes relacionados a produção β -lactamases, uma cepa apresentou o gene *bla_{SPM-1}* e 4 cepas apresentaram o gene *bla_{KPC}*. A identificação de cepas produtoras de β -lactamases é um importante aliado na escolha de uma terapêutica farmacológica adequada à cepa detectada no paciente (GHAMGOSHA *et al*, 2015). Porém, foi observado nos resultados deste trabalho, que nem sempre o *screening* do estudo fenotípico será fidedigno aos resultados encontrados genotipicamente, demonstrando que os testes fenotípicos podem ser insuficientes na escolha do antimicrobiano.

A análise dos testes fenotípicos relacionados à produção das MBL apresentou resultados contraditórios quando comparados aos testes genotípicos, que avaliaram a presença desta enzima, pois os genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}* não foram detectados. No entanto, as cepas apresentaram resistência à variados antimicrobianos, sugerindo que outros genes ou fatores de resistência estejam relacionados com a resistência bacteriana dessas cepas.

Considerando os isolados avaliados, 40% do número total apresentaram o gene *bla_{KPC}*, gene que foi primeiramente descrito em *Klebsiella pneumoniae* e responsável pela produção de KPC (*carbapenemases de Klebsiella pneumoniae*). Esse gene é associado a plasmídeos e transposons disseminados entre diferentes enterobactérias, e nos últimos dez anos foi observado na literatura relatos de caso da sua presença em *Pseudomonas aeruginosa*. No Brasil, *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de KPC foram primeiramente descritas em 2011, onde 7,65% dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos apresentaram esse gene (JÁCOME, 2011). Apesar do limitado número de isolados bacterianos analisados em relação a esse gene no presente trabalho, a literatura mais atual suporta a hipótese de que o uso dessa classe de antimicrobianos acaba por selecionar as cepas que abrigam mais mecanismos de evasão aos tratamentos, incluindo o gene *bla_{KPC}* (PACHECO *et al*, 2019).

Adicionalmente, foram relatados na literatura dos últimos dez anos casos de presença concomitante de mais de um gene relacionado às β -lactamases em uma mesma cepa (CORREA *et al*, 2012; VANEGAS *et al*, 2014; KAZMIERCZAK *et al*, 2016a; KAZMIERCZAK *et al*, 2016b; MARTINEZ *et al*, 2012), representando um desafio de saúde pública, caso haja um surto desse tipo. Nos isolados analisados não foi evidenciada a presença de dois genes de β -lactamases simultaneamente, o que pode ter contribuído para o efeito sinérgico do alendronato de sódio associado aos antimicrobianos.

Alguns autores sugerem que a produção de pigmentos por *Pseudomonas aeruginosa* pode ser uma das razões para a resistência microbiana. A informação de que os pigmentos agem como fatores de virulência foi relatado desde 1990, onde estudiosos demonstraram que a piocianina e a pioverdina podem estar relacionados à resistência das células bacterianas, após o uso de radiação ultravioleta (BURKE *et al*, 1990).

Finlayson e Brown (2011) observaram que não houve diferença entre os isolados pigmentados e não pigmentados quanto a resistência aos antimicrobianos, porém à resistência bacteriana a múltiplos fármacos parecem aumentar significativamente a produção de pigmentos e a expressão de outros fatores de virulência, sugerindo que a análise de pigmentos como a piocianina e pioverdina, sirva como indício do estado de virulência dos isolados.

Orlandi e colaboradores (2015) observaram que a hiperprodução dos pigmentos está relacionada com a capacidade dessa bactéria de tolerar terapia fotodinâmica. Quando há maior produção de piocianina, *Pseudomonas aeruginosa* se torna mais resistente à terapia fotodinâmica e não sofre alterações a partir dos espécimes reativos de oxigênio, relatam ainda que piocianina e pioverdina são capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio. No entanto, a proteção do estresse foto-oxidativo não pode ser atribuída exclusivamente à presença dos pigmentos.

As cepas clínicas foram classificadas como MDR, foi observado que 100% das cepas apresentaram produção de piocianina, 70% apresentaram produção de pioverdina, ratificando a hipótese que a produção desses pigmentos está relacionada com cepas MDR. Provavelmente, a produção dos pigmentos esteja relacionada com a produção de enzimas ou fatores de virulência que favoreçam a proteção das cepas MDR, tornando-se inclusive um fator de análise das cepas pré-tratamento clínico. Estudos mais recentes sugerem ainda que quanto maior a presença de piocianina maior a letalidade da cepa bacteriana (KAMAL; PAMBUK; HUSEIN, 2016). Considerando essas informações, realizar a observação dos pigmentos produzidos e associar à análise do fenótipo de resistência antimicrobiana, pode ser uma alternativa que indique a virulência e letalidade daquela cepa.

Além da análise fenotípica e genotípica das cepas como forma de avaliar sua resistência, as cepas foram testadas quanto a associação entre um antimicrobiano e o alendronato de sódio, uma molécula da classe dos bifosfonatos. Esses fármacos atuam como inibidores da reabsorção óssea, funcionando prioritariamente como um agente quelante do Ca^{2+} (COLUCCI *et al*, 1998).

Poucos estudos foram publicados acerca da atividade antimicrobiana dos bisfosfonatos, haja vista que esse não é o propósito inicial da classe de fármacos. O alendronato de sódio apresentou atividade antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 cuja CIM foi igual a 10mg/mL e os testes foram realizados pela técnica de difusão em meio sólido (KRUSZEWSKA; ZAREBA; TYSKI, 2002). No presente estudo, foi demonstrado que a CIM do alendronato de sódio foi de 1024µg/mL frente às cepas testadas, de maneira similar aos estudos publicados anteriormente. Além disso, foi evidenciado um efeito sinérgico frente a maior parte das cepas de *P. aeruginosa* avaliadas a partir das concentrações sub-inibitórias do alendronato de sódio em associação com os antimicrobianos, aos quais estes isolados

apresentavam resistência. Resultados similares estão descritos na literatura, onde os autores testaram a atividade de várias substâncias não-antibióticas e observaram que as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* testadas foram sensíveis ao alendronato de sódio (KRUSZEWSKA; ZAREBA; TYSKI, 2002; LAUDY; KULIŃSKA; TYSKI, 2017). Entretanto, nesses trabalhos não foi analisado se as cepas apresentavam resistência fenotípica aos antimicrobianos tradicionais. Por outro lado, essa informação é suficiente para sugerir o potencial dos compostos bifosfonatos na terapêutica antimicrobiana.

Reshamwala e colaboradores (2016) demonstraram a atividade anti-biofilme do risedronato de sódio, em culturas de *Escherichia coli* e *Salmonella pullorum*. Este composto foi testado numa concentração entre 300 – 400µM e a formação do biofilme foi reduzida em mais de 60%. No entanto, nenhuma diferença no crescimento planctônico foi observada nas culturas de *E. coli* quando expostas 350µM de risedronato de sódio. Nesse mesmo estudo, foi avaliada a atividade de 400µM do risedronato de sódio, em cateter Foley por microscopia confocal e foi observada a redução drástica na formação do biofilme. Esses dados estão de acordo com os resultados encontrados neste trabalho, onde a presença do alendronato de sódio diminuiu a formação do biofilme. De maneira, similar também foi possível observar que a maioria das cepas analisadas no presente trabalho apresentou diminuição da produção do biofilme, quando tratadas com o alendronato de sódio.

Esses achados são relevantes, considerando que um dos mecanismos patogênicos de *Pseudomonas aeruginosa* é principalmente a formação de biofilme. Caracterizado por ser um fator de virulência crítico, levando em consideração pacientes imunocomprometidos, estando relacionado ao desenvolvimento de infecções crônicas (LEE; YOON, 2017; PANG, 2019). Sharma e colaboradores (2014) consideram que o uso de novas estratégias terapêuticas que diminuam o biofilme é uma ferramenta importante para erradicar a resistência bacteriana, principalmente quando se considera espécies como *Pseudomonas aeruginosa*.

Foi evidenciado neste trabalho, que as concentrações crescentes de alendronato de sódio sozinho e em associação com antibióticos diminuíram de maneira significativa a presença de biofilme na placa, de maneira dose-dependente para maioria das cepas analisadas. Essa observação sugere que o alendronato de sódio ao reduzir a formação do biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*, as tornam susceptíveis a diferentes antimicrobianos.

Os compostos bifosfonatos são elementos naturalmente quelantes de Ca^{2+} , mas podem exercer efeito quelante com outras substâncias com características catiônicas. Na literatura, existem relatos que substâncias quelantes podem exercer efeito significativo o biofilme bacteriano, de maneira similar à do presente estudo.

Kang e Kirienko (2018) descrevem o papel do ferro na formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, exemplificando como a homeostase desse íon é essencial para a resistência bacteriana e para a evasão do sistema imune. Os autores ainda relatam que a presença de substâncias quelantes de ferro podem inibir a formação do biofilme e tornar esses micro-organismos mais suscetíveis a tratamentos farmacológicos. Corroborando com essa hipótese, um estudo *in vitro* realizado frente a cultura de células epiteliais das vias aéreas de fibrose cística infectada por *P. aeruginosa*, demonstra que agentes quelantes de ferro, como deferoxamina ou deferasirox, quando utilizado em associação com tobramicina, aumentaram a atividade anti-biofilme e a morte da bactéria, reduzindo em até 7-logs o crescimento, pela ação da tobramicina (MOREAU-MARQUIS; OTOOLE; STANTON, 2009).

Além do ferro, outros íons devem estar envolvidos no processo de resistência bacteriana. A resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos β -lactâmicos pode estar relacionada com a produção das metalo- β -lactamases que utilizam os íons Zn^{2+} como cofatores essenciais destas enzimas (JU *et al*, 2018). Sabe-se que o efeito dos β -lactâmicos é inativado em maior parte devido a ação das enzimas MBL. O uso de inibidores da MBL funciona por quelação do íon zinco livre ou a partir da captação do zinco presente no sítio ativo da enzima (ROTONDO; WRIGHT, 2017). Portanto, ao utilizar o alendronato de sódio como agente quelante, esses cátions divalentes podem se complexar com o alendronato de sódio e conseqüentemente inativar a MBL. Essa seria uma das justificativas do efeito sinérgico observado na cepa de *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1, entre as combinações do alendronato de sódio com os β -lactâmicos.

Ademais, é sabido que o zinco aumenta o mecanismo de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos carbapenêmicos por oprimir a expressão de OprD, principal porina presente na membrana plasmática – e assim impedir a entrada desses antibióticos (GONZALEZ *et al*, 2018). A presença do alendronato de sódio no meio de cultivo e a possível quelação desse íon podem normalizar a biossíntese da OprD nas células bacterianas as tornando susceptíveis à ação dos antimicrobianos. Sugerindo que a presença desse agente quelante pode sobrepor um fator de virulência da cepa,

consolidando a sugestão de Pang e colaboradores (2019), sobre o uso de agentes quelantes em associação com antimicrobianos como alternativa terapêutica. Confirmando essa hipótese, Leon e colaboradores (2006) reportaram o efeito sinérgico da associação entre fosmidomicina e o análogo do pamidronato, um bisfosfonato de fórmula (*N*-[metil(4-fenilbutil)]-3-aminopropil-1-hidroxi-1,1-bisfosfonato). Os testes foram realizados frente a *Escherichia coli* com valor de ICIF de 0,15, sugerindo um efeito sinérgico entre o agente quelante e o antimicrobiano. Em contrapartida, observou-se que outros compostos do grupo dos bisfosfonatos não tiveram nenhum efeito no crescimento dessa bactéria, o que provavelmente está relacionado com a estrutura química dessas substâncias.

Outros cátions divalentes, como Mg^{2+} e Ca^{2+} , são essenciais para integridade da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Isso ocorre porque o LPS possui numerosos grupos fosfato com característica polianiônica; de forma a garantir integridade dessas moléculas se ligam eletrostaticamente a cátions divalentes para equilibrar as cargas. Essa forma de estruturação química do LPS fornece à célula bacteriana resistência a permeabilidade aos antimicrobianos hidrofóbicos. Ocorrendo uma reação de quelação desses cátions divalentes há um aumento da permeabilidade aos antimicrobianos pelas bactérias Gram-negativas diminuindo sua resistência (CLIFTON *et al*, 2014).

Uma substância quelante bastante conhecida e utilizada na indústria é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Em estudo realizado por Umerska e colaboradores (2018) foi observado um efeito sinérgico de um antimicrobiano peptídico derivado da Arecina-3 (AA230) associado ao EDTA. Essa combinação apresentou efeito sinérgico sobre bacilos Gram-negativos, de tal forma que o EDTA promoveu o aumento da atividade antibacteriana do AA230. O AA230 se assemelha quimicamente a polimixina B e acredita-se que tenha mecanismo de ação similar. Os autores propõem que o efeito sinérgico apresentado está relacionado à capacidade do EDTA de sequestrar íons metálicos, atuando assim na desestruturação da membrana plasmática e permitindo a passagem do antimicrobiano através da membrana celular.

Outros trabalhos evidenciam o papel do biofilme na patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa*. Substâncias capazes de diminuir o biofilme acabam por aumentar a atividade de antimicrobianos a eles associados. Esse tipo de descoberta foi demonstrado por e Sheng e colaboradores (2015) e Zhou e colaboradores (2018),

que desenvolveram estudos com *Pseudomonas aeruginosa* e o resveratrol. Essa molécula é um polifenol não-flavonóide presente em vegetais e frutas fortemente pigmentadas, conhecida por suas propriedades antioxidantes e foi capaz de inibir a formação do biofilme *in vitro* e com isso inibir outros fatores de virulência.

Sheng e colaboradores (2015) apontam que o resveratrol apresentou atividade sobre o controle do *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, diminuindo a produção de pigmentos e a motilidade bacteriana. Zhou e colaboradores (2018) relataram que apesar da CIM do resveratrol frente a *P. aeruginosa* ser maior de que 1000µg/mL, esse composto inibiu parcialmente a formação do biofilme e apresentou ação sobre o *quorum sensing* dessas espécies, aumentando a susceptibilidade aos aminoglicosídeos. Este estudo exemplifica como a inibição da expressão dos fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* pode reverter a resistência aos antimicrobianos tradicionais. Essa ação pode ocorrer mesmo quando a droga utilizada não apresente efeito bactericida específico, mas apresente inibição da formação do biofilme com consequente exposição das colônias a ações dos antimicrobianos, tornando-os eficazes. Essa informação corrobora os dados encontrados no presente estudo, onde o uso do alendronato de sódio, sem atividade antimicrobiana relatada anteriormente, foi capaz de inibir o biofilme e reverter a resistência bacteriana aos antimicrobianos tradicionais.

Evidências atuais sugerem o uso de bifosfonatos para impedir a formação de biofilmes em filmes de polipropileno. Esses autores realizaram a polimerização de monômeros de bifosfonatos na superfície do filme, evidenciando a inibição significativa da formação do biofilme, tanto para bactérias Gram-negativas como Gram-positivas (STEINMETZ *et al*, 2016). Corroborando com esses dados, Tal e colaboradores (2018) observaram que nanopartículas cobertas de monômeros de bisfosfonatos foram capazes de diminuir a concentração de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria*. Esses autores sugerem que esse efeito é causado pela ação quelante dos bifosfonatos com o Ca^{2+} . Esses estudos ressaltam que o Ca^{2+} auxilia na formação do biofilme, aumentando sua estabilidade, viscosidade e resistência, além disso, é abundante na parede celular bacteriana, para tanto, os bisfosfonatos parecem alterar a homeostase do cálcio nas células bacterianas.

Outra linha de pensamento está relacionada com a expressão da enzima farnesil pirofosfato sintase (FPFS), responsável pela biossíntese de isoprenoides,

substâncias críticas para a sobrevivência celular. As FPFS humanas são alvo dos bifosfonatos aminados; estes atuam como inibidores dessas enzimas produzidas por osteoclastos, impedindo a via de sinalização celular patológica e assim diminuindo a reabsorção óssea (SCHMIDBERGER *et al*, 2015). Esses autores observaram que as enzimas FPFS de *Pseudomonas aeruginosa* clonadas em *Escherichia coli* podem se ligar diretamente à bifosfonatos aminados, como ibandronato e zoledronato e serem inibidas de maneira bastante potente. Desai e colaboradores (2016) utilizaram *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* frente à inibidores dos FPFS bacterianos. A classe mais ativa foi a dos bisfosfonatos com cadeias laterais aril-alquil, que foram capazes de inibir o crescimento das colônias bacterianas. Além da ação quelante, o alendronato de sódio pode ter ação na FPFS das cepas estudadas, elucidando assim, o efeito sinérgico em associação aos antimicrobianos.

No entanto, há uma linha de pesquisa que hipotetiza que os compostos bifosfonatos seriam capazes de facilitar a colonização bacteriana. Estudos *in vitro* demonstraram que o uso de pamidronato e ácido zoledrônico (bifosfonatos aminados) estão relacionados ao aumento da adesividade bacteriana em biofilmes uniespécies na superfície de discos de hidroxiapatita (GANGULI *et al*, 2005; KOBAYASHI *et al*, 2010; KOS *et al*, 2013; KOS *et al*, 2015).

No estudo de Ganguli e colaboradores (2005) os bifosfonatos foram impregnados em discos de hidroxiapatita similares a implantes ósseos; nesses grupos houve um claro aumento da adesão bacteriana, e o autor sugere que o uso dessa classe de fármacos como ferramenta para o sucesso do implante pode ser limitado, considerando a probabilidade de contaminação.

Kos e colaboradores (2013) sugerem que o aumento da adesão bacteriana provocada pelos bisfosfonatos pode estar relacionada a osteonecrose mandibular, efeito colateral relatado por usuários destas classes de fármacos. Esse mesmo autor, em estudo mais recentes (KOS *et al*, 2015) realizou o cultivo de cepas de *Streptococcus mutans* 25175, *Staphylococcus aureus* 6538, e *Pseudomonas aeruginosa* 14454 em discos de hidroxiapatita revestidos e não revestidos de bisfosfonatos, observaram o aumento da adesão bacteriana e da formação de biofilme nos discos de hidroxiapatita. Os autores sugerem que os grupos amino catiônicos presentes no pamidronato podem atrair bactérias por interação eletrostática.

Howe e colaboradores (2012) relataram a presença de infecção polimicrobiana em uma fratura femoral atípica em paciente que fazia uso de alendronato de sódio, durante cirurgia ortopédica foi colhido material para biópsia que indicou infecção por *Bifidobacterium subtile* e *Pseudomonas mendocina*. Mais investigações são necessárias para corroborarem com tal relato.

Considerando as evidências aqui apresentadas, o uso do alendronato de sódio em associação com antimicrobianos contra a *Pseudomonas aeruginosa* MDR pode ser uma nova alternativa terapêutica. No entanto, estudos *in vivo* randomizados devem ser levados em consideração para tornar o uso do alendronato de sódio uma estratégia terapêutica, haja vista que existem dados controversos sobre o bifosfonato estimular ou inibir a produção de biofilme.

7 CONCLUSÃO

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram perfil de resistência a quase todos os antimicrobianos avaliados, com exceção da polimixina B. A maior parte das cepas foram caracterizadas como produtoras de metalo-B-lactamase, pelo teste fenotípico. No entanto, a pesquisa do gene não evidenciou achados que corroborassem com os testes fenotípicos para algumas das cepas estudadas.

Para a maior parte das associações dos antimicrobianos com o alendronato de sódio foi observado efeito sinérgico. Tendo em vista os estudos realizados com alendronato de sódio ou agentes quelantes atuando sobre mecanismos de resistência de *Pseudomonas aeruginosa*, o alendronato de sódio pode ser um potente agente contra infecções por estas bactérias. As combinações entre alendronato de sódio e os antimicrobianos estudados podem ter um papel promissor no desenvolvimento de tratamento capaz de reverter a resistência bacteriana em *Pseudomonas aeruginosa*.

O alendronato de sódio em associação com cefalosporinas (cefepima, ceftazidima e meropenem) mostrou eficácia em relação a redução da produção do biofilme. O tratamento com alendronato de sódio em concentrações superiores a CIM apresentou uma redução significativa do biofilme. As evidências experimentais apontaram uma potente atividade antibiofilme do alendronato de sódio em superfície, com a base de poliestireno. As imagens do microscópio óptico de luz da superfície da placa corroboraram os achados da redução do biofilme, quantificado por espectrofotometria.

O alendronato de sódio parece potencializar a eficácia dos antimicrobianos, tanto no sinergismo quanto na redução da produção do biofilme. Assim, o alendronato de sódio representa uma perspectiva promissora na remediação das infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

Enfatizando a atividade dos íons metálicos sobre as células bacterianas, especialmente em relação a *Pseudomonas aeruginosa*, na revisão bibliográfica e diante dos resultados obtidos nesse estudo em relação ao agente quelante, alendronato de sódio, é possível afirmar que os íons metálicos são componentes essenciais para o desempenho metabólico das células bacterianas. Portanto, um caminho promissor seria limitar esses metais, entendendo o processo de captação de íons das bactérias tanto no meio ambiente quanto no hospedeiro.

Além disso, há necessidade de compreender a relação dos íons metálicos na interação patógeno-hospedeiro, bem como saber molecularmente a necessidade de quais são os íons essenciais para a patogenicidade bacteriana. Embora, os avanços da biologia química bacteriana sejam limitados pela escassez de recursos molecularmente aplicáveis, já se tem relato na literatura sobre metodologias inovadoras que buscam elucidar a utilização dos íons metálicos por bactérias em busca de um alvo molecular para o tratamento contra essas infecções multirresistentes.

REFERÊNCIAS

- AIZAWA, S. F. **Molecular Medical Microbiology**. 2 ed. Tokyo: Academic Press, 2015.
- ALBUQUERQUE, C. F. G. de *et al.* Possible mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*-associated lung disease. **International Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 306, n. 1, p. 20-28, jan. 2016.
- ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**, [s.l.], v. 53, n. 10, p. 1565-1574, mar. 2014.
- ALI, S. A. *et al.* Synthesis of a novel zwitterionic bisphosphonate cyclopolymer containing residues of alendronic acid. **Reactive And Functional Polymers**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.80-86, jan. 2015.
- ANANCHENKO, G.; NOVAKOVIC, J.; TIKHOMIROVA, A. Alendronate Sodium. In: BRITTAİN, H. G. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. Toronto: Academic Press, 2013, p. 1-33.
- ARGÜELLO, J. M.; RAIMUNDA, D.; PADILLA-BENAVIDES, T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 73, p. 1-14, 2013.
- ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays In Biochemistry**, [s.l.], v. 61, n. 1, p. 49-59, mar. 2017.
- AVENT, M. L. *et al.* Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Internal Medicine Journal**, [s.l.], v. 41, n. 6, p. 441-449, jun. 2011.
- AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 350-359, jan. 2019.
- AZIMI, A.; PEYMANI, A.; POUR, P. K. Phenotypic and molecular detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with burns in Tehran, Iran. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 51, n. 5, p. 610-615, out. 2018.
- BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **J Antimicrob Chemother**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 17-24, 2000.
- BANIN, E.; VASIL, M. L.; GREENBERG, E. P. From The Cover: Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 102, n. 31, p. 11076-11081, jul. 2005.

BARKER, K. D.; BARKOVITS, K.; WILKS, A. Metabolic Flux of Extracellular Heme Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* Is Driven by the Iron-regulated Heme Oxygenase (HemO). **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 287, n. 22, p. 18342-18350, abr. 2012.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal Of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 493-496, abr. 1966.

BISHOP, N. J.; RUSSELL, G. Bisphosphonates. In: SHAPIRO, J. R. *et al.* **Osteogenesis Imperfecta: a Translational Approach to Brittle Bone Disease**. Baltimore, Usa: Academic Press, 2014. p. 495-500.

BLAIR, J. M. A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 42-51, dez. 2014.

BLEVES, S. *et al.* Quorum Sensing Negatively Controls Type III Secretion Regulon Expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal Of Bacteriology**, Rondônia, v. 187, n. 11, p. 3898-3902, maio. 2005.

BLONDEAU, J. M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey Of Ophthalmology**, [s.l.], v. 49, n. 2, p. 73-78, mar. 2004.

BOTOS, I. *et al.* Structural and Functional Characterization of the LPS Transporter LptDE from Gram-Negative Pathogens. **Structure**, [s.l.], v. 24, n. 6, p. 965-976, jun. 2016.

BOYD, A.; CHAKRABARTY, A. M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. **J Ind Microbiol**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 162-168, 1995.

BRADLEY, J. S. *et al.* Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 93-100, fev. 1999.

BRAUN, V.; HANTKE, K. Recent insights into iron import by bacteria. **Current Opinion In Chemical Biology**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 328-334, abr. 2011.

BRAVO-GÓMEZ, M. E. *et al.* Metalochaperonas: escoltas personales en el tráfico intracelular de iones metálicos. **Educación Química**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 26-37, jan. 2015.

BREIDENSTEIN, E. B. M.; LAFUENTE-NÚÑEZ, C. de; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 19, n. 8, p. 419-426, ago. 2011.

BRINDHADEVI, K. *et al.* Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 96, n. 1, p. 49-57, set. 2020.

BRUZAUD, J. *et al.* Flagella but not type IV *pili* are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 131, n. 1, p. 59-66, jul. 2015.

BUCKLER, R. A. *et al.* Beta-Lactams and Tetracyclines. In: RAY, S. D. **Side Effects of Drugs Annual. Amsterdam**: Elsevier, 2018, p. 1-13.

BURDMAN, S. *et al.* Involvement of Type IV *Pili* in Pathogenicity of Plant Pathogenic Bacteria. **Genes**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 706-735, out. 2011.

BURKE, R. M. *et al.* Influence of Pigment Production on Resistance to Ultraviolet Irradiation in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. **Irish Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 51-60, 1990.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 8, p. 1-22, jun. 2016.

BYRD, M. S. *et al.* Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. **Molecular Microbiology**, Winston-Salem, Estados Unidos, v. 73, n. 4, p. 622-638, ago. 2009.

CABRAL, D. A.; LOH, B. A.; SPEERT, D. P. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Resists Nonopsonic Phagocytosis by Human Neutrophils and Macrophages. **Pediatric Research**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 429-431, out. 1987.

CAI, Y. *et al.* Iron-depletion prevents biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through twitching motility and quorum sensing. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 37-41, mar. 2010.

CARTRON, M. L. *et al.* Feo – Transport of Ferrous Iron into Bacteria. **Biometals**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 143-157, abr. 2006.

CHAKRAVARTY, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Magnesium Transporter MgtE Inhibits Type III Secretion System Gene Expression by Stimulating rsmYZ Transcription. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 199, n. 23, p. 1-11, ago. 2017.

CHANDRANGSU, P.; RENSING, C.; HELMANN, J. D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 15, n. 6, p. 338-350, mar. 2017.

CHANG, Y. *et al.* Architecture of the type IVa pilus machine. **Science**, Pasadena, Califórnia, v. 351, n. 6278, p. 1-18, mar. 2016.

CHATTERJEE, M. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **International Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 306, n. 1, p. 48-58, 2016.

CHENG, T. *et al.* Exploration into the nickel 'Osmos' in prokaryotes. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 311, n. 15, p. 24-37, mar. 2016.

CHEVALIER, S. *et al.* Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 41, n. 5, p. 698-722, jul. 2017.

CHEVANCE, F. F. V.; HUGHES, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 6, n. 6, p. 455-465, jun. 2008.

CHURCHILL, M. E. A.; CHEN, L. Structural Basis of Acyl-homoserine Lactone-Dependent Signaling. **Chemical Reviews**, Colorado, Estados Unidos, v. 111, n. 1, p. 68-85, jan. 2011.

CIOFU, O. *et al.* Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Copenhagen, v. 85, n. 1, p.7-23, maio. 2015.

CLIFTON, L. A. *et al.* Effect of divalent cation removal on the structure of gram-negative bacterial outer membrane models. **Langmuir**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 404-412, 2015.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 27. ed. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2017.

COLUCCI, S. *et al.* Alendronate Reduces Adhesion of Human Osteoclast-like Cells to Bone and Bone Protein-Coated Surfaces. **Calcified Tissue International**, Roma, Itália, v. 63, n. 3, p. 230-235, set. 1998.

COLVIN, K. M. *et al.* The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 14, n. 8, p. 1913-1928, dez. 2011.

COLVIN, K. M. *et al.* The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. **Plos Pathogens**, Austin, Texas, v. 7, n. 1, p. 11264-11270, jan. 2011.

CORNELIS, P.; DINGEMANS, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 1-7, out. 2013.

CORREA, A. *et al.* First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate coharboring KPC and VIM carbapenemases. **Antimicrob. Agents Chemother**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 5422-5423, 2012.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de micro-organismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COURVALIN, P. **L'antibiogramme**. Paris, France: Ed. MPC/Videom, 1985.

CRAIG, L.; PIQUE, M. E.; TAINER, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, La Jolla, California, v. 2, n. 5, p. 363-378, maio. 2004.

CRAIG, L.; LI, J. Type IV *pili*: paradoxes in form and function. **Current Opinion In Structural Biology**, Ontário, Canadá, v. 18, n. 2, p. 267-277, abr. 2008.

CREMERS, S.; PILLAI, G.; PAPAPOULOS, S. Pharmacokinetics / Pharmacodynamics of Bisphosphonates. **Clinical Pharmacokinetics**, [s.l.], v. 44, n. 6, p. 551-570, 2005.

CREMERS, S.; PAPAPOULOS, S. Pharmacology of bisphosphonates. **Bone**, Nova York, EUA, v. 49, n. 1, p. 42-49, jul. 2011.

CRESPO, A.; BLANCO-CABRA, N.; TORRENTS, E. Aerobic Vitamin B12 Biosynthesis Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* Class II Ribonucleotide Reductase Activity During Planktonic and Biofilm Growth. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-10, maio. 2018.

CUNRATH, O.; GEOFFROY, V. A.; SCHALK, I. J. Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 18, n. 10, p. 3258-3267, ago. 2015.

D'ARGENIO, D. A.; MILLER, S. I. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. **Microbiology**, Seattle, Washington, v. 150, n. 8, p. 2497-2502, ago. 2004.

DAVIES, J. C. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. **Paediatric Respiratory Reviews**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.128-134, jun. 2002.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1794, n. 5, p. 808-816, maio. 2009.

DESAI, J. *et al.* Isoprenoid Biosynthesis Inhibitors Targeting Bacterial Cell Growth. **Chem Med Chem**, [s.l.], v. 11, n. 19, p. 2205-2215, out. 2016.

DIGGLE, S. P. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. **Chemistry & Biology**, Nottingham, Inglaterra, v. 14, n. 1, p. 87-96, jan. 2007.

DOCQUIER, J.; MANGANI, S. An update on β -lactamase inhibitor discovery and development. **Drug Resistance Updates**, [s.l.], v. 36, n. 1, p. 13-29, jan. 2018.

DONG, F. *et al.* Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, [s.l.], v. 121, n. 17, p. 1611-1616, set. 2008.

D'ORAZIO, M. *et al.* The capability of *Pseudomonas aeruginosa* to recruit zinc under conditions of limited metal availability is affected by inactivation of the ZnuABC transporter. **Metallomics**, [s.l.], v. 7, n. 6, p. 1023-1035, 2015.

DYBA, M. *et al.* 1-Hydroxyalkane-1,1-diylidiphosphonates as potent chelating agents for metal ions. Potentiometric and spectroscopic studies of copper (II) co-ordination. **Journal Of The Chemical Society, Dalton Transactions**, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 1119-1123, 1996.

EVANS, L. R.; LINKER, A. Production and Characterization of the Slime Polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 116, n. 2, p. 915-924, 1973.

FÀBREGA, A. *et al.* Mechanism of action of and resistance to quinolones. **Microbial Biotechnology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 40-61, jan. 2009.

FANG, H.; KANG, J.; ZHANG, D. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 1-14, jan. 2017.

FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 274-280, mar. 2005.

FIGUEIREDO, E. A. P. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista brasileira de Terapia intensiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 421-427, 2007.

FINLAYSON, E. A.; BROWN, P. D. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. **West Indian Med J**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 24-32, 2011.

FLEISCH, H. Bisphosphonates. **Drugs**, Berna, Suíça. v. 42, n. 6, p. 919-944, dez. 1991.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their use in the Isolation of *B. influenzae*. **Br J Exp Pathol**, [s.l.], v. 10, n. 9, p. 226-236, jun. 1929.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 9, p. 623-633, ago. 2010.

FOLKESSON, A. *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. **Nature Reviews Microbiology**, Lyngby, Dinamarca, v. 10, n. 12, p.841-851, nov. 2012.

FRANKLIN, M. *et al.* Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 1-16, 2011.

MELO NETO, J. C. **Poesias completas: 1940-1965**, Rio de Janeiro: J. Olympio, 1986.

FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. **Journal Of Bacteriology**, Boston, Estados Unidos, v. 186, n. 14, p. 4457-4465, jul. 2004.

FUQUA, C.; GREENBERGL, E. P. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. **Current Opinion In Microbiology**, San Antonio, Texas, v.1, n. 1, p.183-189, 1998.

FURMAN, B. L. British National Formulary: Bisphosphonates. In: ENNA, S. J.; BYLUND, D. B. **XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. 47. ed. London: Pharmaceutical Press, 2007. p. 22-37.

GALES, A. C. *et al.* Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 13-20, jan. 2002.

GALES, A. C. *et al.* Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-lactamase. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 52, n. 4, p. 699-702, set. 2003.

GALLAGHER, L. A. *et al.* Functions Required for Extracellular Quinolone Signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of Bacteriology**, Washington, Estados Unidos, v. 184, n. 23, p. 6472-6480, dez. 2002.

GANGULI, A. *et al.* Bacterial adhesion to bisphosphonate coated hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 283–287, 2005.

GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. **Medchemcomm**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 11-27, 2016.

GHAMGOSHA, M. *et al.* Metallo-beta-Lactamase VIM-1, SPM-1, and IMP-1 Genes Among Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Species Isolated in Zahedan, Iran. **Jundishapur J Microbiol**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 174-189, 2015.

GILLARD, G. L. *Pseudomonas* and other related genera in Manual of clinical Microbiology (eds) Balows. **Am society for Microbiology**, [s.l.], v. 1, n. 1, não p. 1991.

GILTNER, C. L.; HABASH, M.; BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* Minor Pili Are Incorporated into Type IV Pili. **Journal Of Molecular Biology**, Ontario, Canadá, v. 398, n. 3, p. 444-461, maio. 2010.

GLOAG, E. S. *et al.* Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 110, n. 28, p. 11541-11546, jun. 2013.

GONÇALVES, I. R. *et al.* Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 2, p. 211-217, abr. 2017.

GONZALEZ, M. R. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* zinc homeostasis: key issues for an opportunistic pathogen. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Gene Regulatory Mechanisms**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-12, fev. 2018.

GROEN, P. C. *et al.* Esophagitis Associated with the Use of Alendronate. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 335, n. 14, p. 1016-1021, out. 1996.

GROISMAN, E. A. *et al.* Bacterial Mg²⁺ Homeostasis, Transport, and Virulence. **Annual Review Of Genetics**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 625-646, nov. 2013.

GUMIENNA-KONTECKA, E. *et al.* Bisphosphonate chelating agents: complexation of Fe(III) and Al(III) by 1-phenyl-1-hydroxymethylene bisphosphonate and its analogues. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 339, n. 1, p. 111-118, nov. 2002.

GUTU, A. D. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* High-Level Resistance to Polymyxins and Other Antimicrobial Peptides Requires *scrA*, a Gene That Is Disrupted in the PAO1 Strain. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 59, n. 9, p. 5377-5387, jun. 2015.

HALL, S. *et al.* Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Toxins**, [s.l.], v. 8, n. 236, p.1-14, ago. 2016.

HASSETT, D. J. *et al.* Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 2, n. 60, p. 328-336, fev. 1992.

HASSETT, D. J.; SCHWEIZER, H.; OHMAN, D. E. *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 22, n. 177, p. 6330-6337, nov. 1995.

HAWVER, L. A.; JUNG, S. A.; NG, W. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. **Fems Microbiology Reviews**, Boston, Estados Unidos, v. 40, n. 5, p.738-752, jun. 2016.

HENTZER, M. *et al.* Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 183, n. 18, p. 5395-5401, set. 2001.

HIGGINS, K. A.; CARR, C. E.; MARONEY, M. J. Specific Metal Recognition in Nickel Trafficking. **Biochemistry**, [s.l.], v. 51, n. 40, p. 7816-7832, set. 2012.

HOBMAN, J. L.; YAMAMOTO, K.; OSHIMA, T. Transcriptomic Responses of Bacterial Cells to Sublethal Metal Ion Stress. **Molecular Microbiology Of Heavy Metals**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 73-115, fev. 2007.

- HONG, D. J. *et al.* Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection & Chemotherapy**, [s.l.], v. 47, n. 2, p. 81-97, jun. 2015.
- HORIKAWA, A. *et al.* A comparative study between intravenous and oral alendronate administration for the treatment of osteoporosis. **Springerplus**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 1-5, 5 nov. 2015.
- HOSSAIN, Z. Bacteria: Pseudomonas. **Encyclopedia Of Food Safety**, Dhaka, Bangladesh, v. 1, n. 1, p.490-500, 2014.
- HOWE, T. S. *et al.* A case of an atypical femoral fracture associated with bacterial biofilm—pathogen or bystander? **Osteoporosis International**, [s.l.], v. 24, n. 5, p. 1765–1766, 2012.
- HUANG, J. *et al.* Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing and quorum quenching hold promise to determine the performance of biological wastewater treatments: An overview. **Chemosphere**, Xangai, China, v. 157, n. 1, p.137-151, ago. 2016.
- IOBBI-NIVOL, C.; LEIMKÜHLER, S. Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, [s.l.], v. 1827, n. 8-9, p. 1086-1101, ago. 2013.
- JÁCOME, P. R. L. A. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes internados em hospitais de Recife-PE. 2011. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- JENAL, U.; MALONE, J. Mechanisms of Cyclic-di-GMP Signaling in Bacteria. **Annual Review Of Genetics**, Switzerland, Suíça, v. 40, n. 1, p. 385-407, dez. 2006.
- JIMENEZ, P. N. *et al.* The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Oeiras, Portugal, v. 76, n. 1, p.46-65, mar. 2012.
- JOHANSEN, H. K. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and Burkholderia cepacia infection in cystic fibrosis patients treated in Toronto and Copenhagen. **Pediatric Pulmonology**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.89-96, ago. 1998.
- JU, L. *et al.* The Continuing Challenge of Metallo- β -Lactamase Inhibition: Mechanism Matters. **Trends In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 39, n. 7, p. 635-647, jul. 2018.
- JUTTUKONDA, L. J.; SKAAR, E. P. Manganese homeostasis and utilization in pathogenic bacteria. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 97, n. 2, p. 216-228, maio. 2015.

JYOT, J. *et al.* Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by *Pseudomonas aeruginosa* in human mucus. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 63, n. 4, p. 1026-1038, fev. 2007.

KAMAL M. A.; PAMBUK, C. I. A.; HUSEIN, A. S. The Virulence of Pigmented and Non-Pigmented *Pseudomonas Aeruginosa* in Mice with Antibiotics Susceptibility. **Int J Vaccines Vaccin**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 56-66, 2016.

KAMMLER, M; SCHÖN, C; HANTKE, K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 175, n. 19, p. 6212-6219, out. 1993.

KANG, D.; KIRIENKO, N. V. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Microbiol**, [s.l.], v. 56, n. 7, p. 449-457, 2018.

KARIMINIK, A.; BASERI-SALEHI, M.; KHEIRKHAH, B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: an updated review article. **Immunology Letters**, [s.l.], v. 190, n. 1, p.1-6, out. 2017.

KAVANAGH, K. L. *et al.* The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 103, n. 20, p. 7829-7834, maio. 2006.

KAZMIERCZAK, K. M. *et al.* Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 1067-1078, 2016a.

KAZMIERCZAK, K. M. *et al.* Global Dissemination of blaKPC into Bacterial Species beyond *Klebsiella pneumoniae* and In Vitro Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam-Avibactam. **Antimicrob. Agents Chemother**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 4490-4500. 2016b.

KE, J. *et al.* Determination of pKa values of alendronate sodium in aqueous solution by piecewise linear regression based on acid-base potentiometric titration. **Journal Of Pharmaceutical Analysis**, Lanzhou, China, v. 6, n. 6, p. 404-409, dez. 2016.

KIEVIT, T. R. de *et al.* Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: their role and expression patterns. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 67, n. 4, p. 1865-1873, abr. 2001.

KLOCKGETHER, J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. **Frontiers In Microbiology**, Hannover, Germany, v. 2, n. 1, p.1-18, jun. 2011.

KOBAYASHI, Y. *et al.* Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 165-175, 2010.

KOHLER, T. *et al.* Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother*, [s.l.], v. 43, n. 1, p. 424–427, 1999.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e Atlas colorido. 7. ed. Hippincott, Philadelphia: Guanabara Koogan, 2018.

KOPKA, A. *et al.* The effect of alendronate sodium on human erythrocytes. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 306-314, set. 2011.

KOS, M. *et al.* Pamidronate enhances bacterial adhesion to bone hydroxyapatite. Another puzzle in the pathology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw? **J Oral Maxillofac Surg**, [s.l.], v. 71, n. 6, p. 1010-1016, jun. 2013.

KOS, M. *et al.* Bisphosphonates enhance bacterial adhesion and biofilm formation on bone hydroxyapatite. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 43, n. 6, p. 863–869, 2015.

KRAFT, B.; STROUS, M.; TEGETMEYER, H. E. Microbial nitrate respiration – Genes, enzymes and environmental distribution. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 155, n. 1, p. 104-117, ago. 2011.

KRUSZEWSKA, H.; ZAREBA, T.; TYSKI, S. Search of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. **Acta Pol Pharm**, [s.l.], v. 59, n. 6, p. 436-439, 2002.

LANDMAN, D. *et al.* Polymyxins Revisited. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 449-465, jul. 2008.

LAUDY, A. E.; KULIŃSKA, E.; TYSKI, S. The Impact of Efflux Pump Inhibitors on the Activity of Selected Non-Antibiotic Medicinal Products against Gram-Negative Bacteria. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 114-128, jan. 2017.

LAVENTIE, B. *et al.* A Surface-Induced Asymmetric Program Promotes Tissue Colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. **Cell Host & Microbe**, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 1-13, jan. 2019.

LEE, J. *et al.* A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. **Nature Chemical Biology**, Singapura, v. 9, n. 5, p. 339-343, mar. 2013.

LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein & Cell**, Singapura, v. 6, n. 1, p. 26-41, set. 2014.

LEE, K.; YOON, S. S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. **J Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 27, n. 6, p. 1053-1064, 2017.

LEON, A. *et al.* Isoprenoid Biosynthesis as a Drug Target: Bisphosphonate Inhibition of *Escherichia coli* K12 Growth and Synergistic Effects of Fosmidomycin. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 25, p. 7331-7341, 2006.

LISHER, J. P.; GIEDROC, D. P. Manganese acquisition and homeostasis at the host-pathogen interface. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 3, p. 1-15, dez. 2013.

LONG, K.; FILMS, C. **Controlled Release Of Alendronate From Polymeric. Controlled Release of Alendronate from Polymeric Films**. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pharmaceutical Science, University Of British Columbia, 2006.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5. ed. France: Lippincott, Williams & Wilkins, 2005.

MA, L. *et al.* Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 1354-1412, mar. 2009.

MAGNET, S.; BLANCHARD, J. S. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 105, n. 2, p. 477-498, fev. 2005.

MANN, E. E.; WOZNIAK, D. J. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. **Fems Microbiology Reviews**, Columbus, Estados Unidos, v. 36, n. 4, p. 893-916, jul. 2012.

MARGUERETTAZ, M. *et al.* Sputum containing zinc enhances carbapenem resistance, biofilm formation and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 36-41, dez. 2014.

MARKO, V. A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* type IV minor *pilins* and PilY1 regulate virulence by modulating FimS-AlgR activity. **Plos Pathogens**, Ontário, Canadá, v. 14, n. 5, p. 1-26, maio. 2018.

MARTINEZ, T. *et al.* First report of a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate co-harbours KPC-2 and IMP-18 carbapenemases. **Int. J. Antimicrob. Agents**, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 542-543, 2012.

MATSUKAWA, M.; GREENBERG, E. P. Putative Exopolysaccharide Synthesis Genes Influence *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 186, n. 14, p. 4449-4456, jul. 2004.

MCCALLUM, M. *et al.* The molecular mechanism of the type IVa pilus motors. **Nature Communications**, Toronto, Canadá, v. 8, n. 1, p. 1-7, maio. 2017.

MCGRATH, S.; WADE, D. S.; PESCI, E. C. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the Pseudomonas quinolone signal (PQS). **Fems Microbiology Letters**, Greenville, Carolina do Norte, v. 230, n. 1, p. 27-34, jan. 2004.

MCKNIGHT, S. L.; IGLEWSKI, B. H.; PESCI, E. C. The Pseudomonas Quinolone Signal Regulates rhl Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of bacteriology**, [s.l.], v. 182, n. 10, p. 2702-2708, maio. 2000.

MCPHEE, J. B. *et al.* The major outer membrane protein OprG of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to cytotoxicity and forms an anaerobically regulated, cation-selective channel. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 296, n. 2, p. 241-247, jul. 2009.

MEHTA, D.; SHARMA, A. K. Cephalosporins: a review on imperative class of antibiotics. **Nventi Rapid: Molecular Pharmacology** Nova Delhi, v. 6, n. 1, p. 1-6, dez. 2015.

MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. A. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 55, n. 6, p. 752-759, 2009.

MIGULA, W. Über ein neues system der bakterien, vol. **Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 235–238, 1895.

MINANDRI, F. *et al.* Role of Iron Uptake Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Airway Infection. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 84, n. 8, p. 2324-2335, jun. 2016.

MINGEOT-LECLERCQ, M. p.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 43, n. 4, p. 727-737, abr. 1999.

MOGHADDAM, M. M. *et al.* Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology**, Tehran, Iran, v. 3, n. 4, p. 46-65, 2014.

MONTANARO, L. *et al.* Extracellular DNA in Biofilms. **The International Journal Of Artificial Organs**, [s.l.], v. 34, n. 9, p. 824-831, set. 2011.

MOREAU-MARQUIS S.; O'TOOLE, G. A.; STANTON, B. A. Tobramycin and FDA-approved iron chelators eliminate *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, [s.l.], v. 41, m. 3, p. 305-313, set. 2009.

MUKHERJEE, S. *et al.* The PqsE and RhIR proteins are an autoinducer synthase–receptor pair that control virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, Princeton, Eua, v. 115, n. 40, p. 9411-9418, set. 2018.

MULCAHY, H.; LEWENZA, S. Magnesium Limitation Is an Environmental Trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Lifestyle. **PloS one**, [s.l.], v. 6, n. 8, p. e23307, ago. 2018.

MULROONEY, S. B.; HAUSINGER, R. P. Nickel uptake and utilization by microorganisms. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 27, n. 2-3, p. 239-261, jun. 2003.

NAKAGAMI, G. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signaling molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone induces matrix metalloproteinase 9 expression via the AP1 pathway in rat fibroblasts. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 79, n. 10, p.1719-1724, jun. 2015.

NEVES, P.R. *et al.* *Pseudomonas: Pseudomonas aeruginosa*. **Encyclopedia Of Food Microbiology**, [s.l.], v.1, n. 1, p.253-260, 2014.

NIKAIDO, H. *et al.* Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, [s.l.], v. 264, n. 5157, p. 382-388, abr. 1994.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 67, n. 4, p. 593-656, dez. 2003.

NOVOA-APONTE, L.; RAMÍREZ, D.; ARGÜELLO, J. M. The interplay of the metallosensor CueR with two distinct CopZ chaperones defines copper homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 294, n. 13, p. 4934-4945, mar. 2019.

OCHSNER, U. A.; JOHNSON, Z.; VASIL, M. L. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, [s.l.], v. 146, n. 1, p. 185-198, jan. 2000.

OKAMOTO, S.; ELTIS, L. D. The biological occurrence and trafficking of cobalt. **Metallomics**, [s.l.], v. 3, n. 10, p. 963-970, maio. 2011.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 1-18, nov. 2014.

OLIOTA, A. F. *et al.* Nephrotoxicity prevalence in patients treated with polymyxins: a systematic review with meta-analysis of observational studies. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [s.l.], v. 94, n. 1, p. 41-49, maio. 2019.

OLIVER, A. *et al.* The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. **Drug Resistance Updates**, [s.l.], v. 21-22, n. 1, p. 41-59, jul. 2015.

O'LOUGHLIN, C. T. *et al.* A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 110, n. 44, p. 17981-17986, out. 2013.

O'NEILL, M. J. *et al.* Induced fit on heme binding to the *Pseudomonas aeruginosa* cytoplasmic protein (PhuS) drives interaction with heme oxygenase (HemO). **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 15, p. 5639-5644, mar. 2012.

ORLANDI, V. T. *et al.* Pigments influence the tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to photodynamically induced oxidative stress. **Microbiology**, [s.l.], v. 161, n. 12, p. 2298-2239, 2015.

- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 295-304, out. 1998.
- O'TOOLE, G. A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. **Journal Of Visualized Experiments**, [s.l.], v. 1, n. 47, p. 1-2, jan. 2011.
- PACHECO, T *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Coharboring *Blak_{PC-2}* and *Blav_{IM-2}* Carbapenemase Genes. **Antibiotics**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 98, 2019.
- PALLERONI, N. J. *Pseudomonas*. **Bergey's Manual Of Systematics Of Archaea And Bacteria**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-1, set. 2015.
- PALLERONI, N. J. The *Pseudomonas* Story. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.1377-1383, jun. 2010.
- PANG, Z. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.177-192, jan. 2019.
- PASSADOR, L. *et al.* Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. **Science**, Rochester, Nova York, v. 260, n. 5111, p.1127-1130, maio. 1993.
- PATTNAIK, S. S. *et al.* Attenuation of quorum sensing regulated virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by *Diaporthe phaseolorum* SSP12. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 118, n. 1, p. 177-189, maio. 2018.
- PEARSON, J. P. *et al.* Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.197-201, jan. 1994.
- PEARSON, J. P. *et al.* A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, Iowa, Eua, v. 92, n. 5, p. 1490-1494, fev. 1995.
- PEDERICK, V. G. *et al.* Acquisition and Role of Molybdate in *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 80, n. 21, p. 6843-6852, ago. 2014.
- PEDERICK, V. G. *et al.* ZnuA and zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 1-14, ago. 2015.
- PÉRINET, S. *et al.* Molybdate transporter ModABC is important for *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection. **Bmc Research Notes**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 1-9, jan. 2016.
- PICÃO, R. C.; GALES, A. C. β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? **Prática Hospitalar**, [s.l.], v. 1, n. 49, p. 79- 84, 2007.

POGUE, J. M.; ORTWINE, J. K.; KAYE, K. S. Are there any ways around the exposure-limiting nephrotoxicity of the polymyxins? **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 48, n. 6, p. 622-626, dez. 2016.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 20-51, maio. 2005.

POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the Max. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 1-13, abr. 2011.

PRETTO, J. B. *et al.* Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Zeitschrift fuer Naturforschung C**, [s.l.], v. 59, n. 9-10, p. 657-662, 2004.

QUINN J. P. *et al.* Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. **J Infect Dis**, [s.l.], v. 154, n. 1, p. 289-294, 1986.

QUINTANA, J.; NOVOA-APONTE, L.; ARGÜELLO, J. M. Copper homeostasis networks in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 292, n. 38, p. 15691-15704, jul. 2017.

RADA, B. Interactions between Neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. **Pathogens**, Athens, Eua, v. 6, n. 1, p. 10-24, mar. 2017.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review Of Biochemistry**, [s.l.], v. 71, n. 1, p. 635-700, jun. 2002.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 12, n. 11, p. 509-517, nov. 2004.

RAMPIONI, G. *et al.* Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* plant and animal hosts. **Environmental Microbiology**, Nottingham, Inglaterra, v. 1, n. 1, p.1659-1673, maio. 2010.

RASAMIRAVAKA, T. *et al.* The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 1-17, 2015.

RENSING, C.; MCDEVITT, S. F. The Copper Metallome in Prokaryotic Cells. **Metal Ions In Life Sciences**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 417-450, dez. 2012.

RESHAMWALA, S. M. S. *et al.* Evaluation of risedronate as an antibiofilm agent. **J Med Microbiol**, [s.l.], v. 65, n. 1, p. 9-18, 2016.

REYES-CABALLERO, H.; CAMPANELLO, G. C.; GIEDROC, D. P. Metalloregulatory proteins: Metal selectivity and allosteric switching. **Biophysical Chemistry**, [s.l.], v. 156, n. 2-3, p. 103-114, jul. 2011.

RIETSCHER, E. *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 217-225, fev. 1994.

ROMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Stockholm, Suécia, v. 77, n. 1, p. 1-52, mar. 2013.

ROTONDO, C. M.; WRIGHT, G. D. Inhibitors of metallo- β -lactamases. **Current Opinion In Microbiology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 96-105, out. 2017.

RUDRAPPA, T.; BAIS, H. P. Curcumin, a Known Phenolic from *Curcuma longa*, Attenuates the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in Whole Plant and Animal Pathogenicity Models. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 6, p. 1955-1962, mar. 2008.

RUIZ, N.; KAHNE, D.; SILHAVY, T. J. Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 7, n. 9, p. 677-683, jul. 2009.

RYBTKE, M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. **Journal Of Molecular Biology**, Copenhagen, Dinamarca, v. 427, n. 23, p. 3628-3645, nov. 2015.

RYDER, C.; BYRD, M.; WOZNIAK, Daniel J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Current Opinion In Microbiology**, Winston-salem, Carolina do Norte, v. 10, n. 6, p. 644-648, dez. 2007.

SANTOS, I. A.L.; NOGUEIRA, J. M. R.; MENDONÇA, F. C. R. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa* Mechanisms responsible for antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **RBAC**, [s.l.], v. 47, n. 1-2, p. 5-12, 2015.

SCHALK, I. J.; CUNRATH, O. An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 18, n. 10, p. 3227-3246, out. 2016.

SCHALK, I. J.; MISLIN, G. L.; BRILLET, K. Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore-Iron Outer Membrane Transporters. **Metal Transporters**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 37-66, 2012.

SCHEFFER, M. C. *et al.* Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [s.l.], v. 43, n. 4, p. 367-371, ago. 2010.

SCHMIDBERGER, J. W. *et al.* Structural characterization of substrate and inhibitor binding to farnesyl pyrophosphate synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [s.l.], v. 71, n. 3, p. 721-731, fev. 2015.

SCHUSTER, M.; GREENBERG, E. P. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal Of Medical Microbiology**, Washington, Eua, v. 296, n. 2-3, p. 73-81, abr. 2006.

SETHUPATHY, S. *et al.* Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis and oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production. **Journal Of Proteomics**, [s.l.], v. 145, n.1, p. 112-126, ago. 2016.

SHAHBAZ, K. Cephalosporins: pharmacology and chemistry. **Pharmaceutical And Biological Evaluations**, [s.l.], v. 4, n. 6, p. 234-238, dez. 2017.

SHAHCHERAGHI, F.; NIKBIN, V. S.; FEIZABADI, M. M. Identification and genetic characterization of metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran. **New Microbiol**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 243-248, 2010.

SHARMA, G. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. **Biologicals**, [s.l.], v. 42, n. 1, p. 1-7, jan. 2014.

SHENG, J. *et al.* The quorum-sensing inhibiting effects of stilbenoids and their potential structure-activity relationship. **Bioorg Med Chem Lett**, [s.l.], v. 15, n. 22, p. 5217-5220, 2015.

SIMPSON, J. A.; SMITH, S. E.; DEAN, R. T. Alginate may accumulate in cystic fibrosis lung because the enzymatic and free radical capacities of phagocytic cells are inadequate for its degradation. **Biochem Mol Biol Int**, [s.l.], v. 6, n. 30, p. 1021-1034, ago. 1993.

SKARIYACHAN, S. *et al.* Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. **Folia Microbiologica**, Bombaim, Índia, v. 63, n. 4, p. 413-432, jan. 2018.

SMITH, D. J. *et al.* Targeting iron uptake to control *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **European Respiratory Journal**, [s.l.], v. 42, n. 6, p. 1723-1736, nov. 2012.

SOARES, A. P. *et al.* Bisphosphonates: Pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, Vitória da Conquista, BA, v. 42, n. 1, p. 212-217, mar. 2016.

SOHEILI, V. *et al.* Anti-PqsR compounds as next-generation antibacterial agents against *Pseudomonas aeruginosa*: A review. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 1-34, mar. 2019.

STEIMLE, A.; AUTENRIETH, I. B.; FRICK, J. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. **International Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 306, n. 5, p. 290-301, ago. 2016.

STEINMETZ, H. P. *et al.* Graft polymerization of styryl bisphosphonate monomer onto polypropylene films for inhibition of biofilm formation. **Colloids Surf B Biointerfaces**, [s.l.], v. 1, n. 147, p. 300-306, 2016.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 175-179, abr. 2000.

STOVER, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, [s.l.], v. 406, n. 6799, p. 959-964, ago. 2000.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 58, n. 9, p. 1133-1148, set. 2009.

STROM, M.; NUNN, D.; LORY, S. A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV *pilin* family. **Proc. Natl. Acad. Sci.** [s.l.], v. 90, n. 1, p. 2404–2408, 1993.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 116-129, fev. 2009.

TAL, N. *et al.* Engineering of a New Bisphosphonate Monomer and Nanoparticles of Narrow Size Distribution for Antibacterial Applications. **ACS Omega**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 1458-1469, fev. 2018.

TAN, Q. *et al.* Polymorphonuclear Leukocytes or Hydrogen Peroxide Enhance Biofilm Development of Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*. **Mediators Of Inflammation**, Chongqing, China, v. 2, n. 1, p. 1-14, jul. 2018.

TAYLOR, P. K.; YEUNG, A. T.; HANCOCK, R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. **Journal Of Biotechnology**, Vancouver, Canadá, v. 191, n. 1, p.121-130, dez. 2014.

TEIXEIRA, B. *et al.* Aminoglycoside Resistance Genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Cumana, Venezuela. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 58, n. 13, p. 1-5, maio. 2016.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. **Journal of clinical microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 4, p. 1019-1025, 2010.

TOLLER, C. S. *et al.* Bisphosphonates. **Journal Of Pain And Symptom Management**, Londres, v. 1, n. 1, p. 1-18, fev. 2019.

TREEPONG, P. *et al.* Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 258-266, mar. 2018.

TRIMBLE, M. J. *et al.* Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 10, p. 1-22, ago. 2016.

UMERSKA, A. *et al.* Synergistic Effect of Combinations Containing EDTA and the Antimicrobial Peptide AA230, an Arenicin-3 Derivative, on Gram-Negative Bacteria. **Biomolecules**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 122-137, out. 2018.

VALVANO, M. A. Genetics and Biosynthesis of Lipopolysaccharide. **Molecular Medical Microbiology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 55-89, 2015.

VAN ACKER, H.; COENYE, T. The Role of Efflux and Physiological Adaptation in Biofilm Tolerance and Resistance. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 291, n. 24, p. 12565-12572, abr. 2016.

VAN GERVEN, N.; WAKSMAN, G.; REMAUT, H. *Pili* and Flagella. Progress In Molecular Biology And Translational Science, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 21-72, 2011.

VAN, K. N. *et al.* Mutations in the *gyrA*, *parC*, and *mexR* genes provide functional insights into the fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Vietnam. **Infection And Drug Resistance**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 275-282, fev. 2018.

VANEGAS, J. M. *et al.* Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellin, Colombia. **J. Clin. Microbiol**, [s.l.], v. 52, n. 1, p. 3978–3986, 2014.

VASUDEVAN, R. Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. **Journal Of Microbiology & Experimentation**, [s.l.], v. 1, n. 3, p. 1-16, jun. 2014.

VEGA, D.; BAGGIO, R.; GARLAND, M. T. Monosodium 4-Amino-1-hydroxy-1,1-butanedioldiphosphonate Trihydrate (Alendronate). **Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications**, [s.l.], v. 52, n. 9, p. 2198-2201, set. 1996.

WACKETT, L. P.; DODGE, A. G.; ELLIS, L. B. M. Microbial Genomics and the Periodic Table. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 70, n. 2, p. 647-655, fev. 2004.

WANG, X.; QUINN, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. **Progress In Lipid Research**, [s.l.], v. 49, n. 2, p. 97-107, abr. 2010.

WANG, Y. *et al.* Phenazine-1-Carboxylic Acid Promotes Bacterial Biofilm Development via Ferrous Iron Acquisition. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 193, n. 14, p. 3606-3617, maio. 2011.

WANG, S. *et al.* The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology Reports**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 330-340, jan. 2015.

WATLY, J.; POTOCKI, S.; ROWIŃSKA-ŻYREK, M. Zinc Homeostasis at the Bacteria/Host Interface-From Coordination Chemistry to Nutritional Immunity. **Chemistry - A European Journal**, [s.l.], v. 22, n. 45, p. 15992-16010, ago. 2016.

WOLTER, D. J.; LISTER, P. D. Mechanisms of β -lactam Resistance Among *Pseudomonas aeruginosa*. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 209-222, nov. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics**. 2017. Disponível em: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf. Acesso em: 09 mar. 2019.

WU, W. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Medical Microbiology**, Tianjin, China, v. 1, n. 1, p.753-767, 2015.

WU, Y.; CHENG, N.; CHENG, C. Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis. **Trends In Biotechnology**, Taipei, Taiwan, v. 1, n. 1, p. 1-13, nov. 2018.

YANG, L. *et al.* Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, [s.l.], v. 153, n. 5, p. 1318-1328, maio. 2007.

YAYAN, J; GHEBREMEDHIN, B; RASCHE, K. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-Year period. **PloS one**, [s.l.], v. 10, n. 10, p. 139-836, 2015.

YIGIT, H. *et al.* Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 1151-1161, abr. 2001.

YONG, D. *et al.* Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo-Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 40, n. 10, p. 3798-3801, out. 2002.

ZAMBLE, D. *et al.* **The biological chemistry of nickel**. Cambridge, Uk: Royal Society Of Chemistry, 2017.

ZEINERT, R. *et al.* Structure–function analysis of manganese exporter proteins across bacteria. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 293, n. 15, p. 5715-5730, fev. 2018.

ZEMBOWER, T. R. *et al.* The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 95-105, maio. 1998.

ZHOU, J. W. *et al.* Can the quorum sensing inhibitor resveratrol function as an aminoglycoside antibiotic accelerant against *Pseudomonas aeruginosa*? **Int J Antimicrob Agents**, [s.l.], v. 52, v. 1, p. 35-41, jul. 2018.

ZINCKE, D. *et al.* Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme, PoxB, in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 60, n. 2, p. 936-945, nov. 2015.

APÊNDICE A – PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO BR 102020009449 1

	<p>13/05/2020 870200058992 09.52</p>  <p>29409161918916313</p>
<p>Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT</p>	
<p>Número do Processo: BR 10 2020 009449 1</p>	
<p>Dados do Depositante (71)</p> <hr/>	
<p>Depositante 1 de 1</p>	
<p>Nome ou Razão Social: EULÁLIA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO XIMENES</p>	
<p>Tipo de Pessoa: Pessoa Física</p>	
<p>CPF/CNPJ: 48726672472</p>	
<p>Nacionalidade: Brasileira</p>	
<p>Qualificação Física: Professor do ensino superior</p>	
<p>Endereço: Rua de Apipucos 355 apt 202</p>	
<p>Cidade: Recife</p>	
<p>Estado: PE</p>	
<p>CEP: 52071-000</p>	
<p>País: Brasil</p>	
<p>Telefone: 8132675090</p>	
<p>Fax:</p>	
<p>Dados do Pedido</p> <hr/>	
<p>Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)</p>	
<p>Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):</p>	<p>Composição sinérgica entre alendronato de sódio e antimicrobianos frente a Pseudomonas aeruginosa multirresistentes: Reversão da resistência e atividade anti-biofilme</p>
<p>Resumo:</p>	<p>A presente invenção compreende a utilização de uma composição com atividade antimicrobiana como alternativa ao tratamento de infecções por Pseudomonas aeruginosa multirresistentes, cujos resultados revelaram-se, em sua grande maioria, sinérgicos quando o alendronato de sódio foi associado à amicacina, ou à cefepima, ou à ceftazidima, ou à ceftriaxona, ao levofloxacino e ao meropenem. Essas associações apresentaram atividade antimicrobiana contra Pseudomonas aeruginosa multi droga resistentes e reverteram a sensibilidade dessas cepas a todos os antimicrobianos utilizados, reduzindo a concentração inibitória mínima (CIM) de 75,0 a 99,8% para os antibióticos e de 50 a 99,2 % para o alendronato de sódio. Ademais, as associações de beta-lactâmicos com alendronato de sódio foram capazes de inibir a formação do biofilmes das cepas de Pseudomonas aeruginosa multirresistentes. Essa redução na concentração inibitória mínima induzirá também reduções nos custos e nos efeitos adversos. Esta composição poderá ser aplicada na área de saúde humana e veterinária. Principalmente em produtos farmacêuticos, odontológicos e afins.</p>
<p>Figura a publicar:</p>	<p>03</p>

APÊNDICE B – CARTA DE ACEITE DE ARTIGO REVISTA RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT

RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT

Letter of Acceptance

The manuscript entitled "A influência do quórum sensing na formação do biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*", submitted on "02/04/2021" was accepted for publication and will be published within 30 days in the Research, Society and Development Journal - ISSN 2525-3409.

The manuscript is authored by:

Marina Luizy da Rocha Neves, Luanne Eugênia Nunes, Wilma Raianny Vieira da Rocha, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes and Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque.

São Paulo, February 11, 2021, Brazil.



Dr. Ricardo Shitsuka
Editor