
**AVALIAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA DA INDOLICIDINA SOBRE
Acinetobacter baumannii RESISTENTE A POLIMIXINA B**
**EVALUATION OF THE BACTERICIDAL EFFECT OF INDOLICIDIN ON POLYMYXIN B-
RESISTANT *Acinetobacter baumannii***

CARVALHO, Marianna Ribeiro¹; FARIA, Rebeca Silva¹; DARRIEUX, Michelle²

¹Graduando do Curso de Biomedicina – Universidade São Francisco; ²Professora do PPG em
Ciências da Saúde – Universidade São Francisco

marianna.carvalho@outlook.com; rebecasifaria@gmail.com

RESUMO. *Acinetobacter baumannii* é um cocobacilo Gram-negativo aeróbico, notório entre infecções nosocomiais, especialmente em pacientes de UTI, podendo colonizar o trato respiratório inferior, corrente sanguínea, ferimentos pós-cirúrgicos e trato urinário. Possui exímia capacidade de resistir a condições desfavoráveis e longos períodos em ambientes bióticos ou abióticos devido a ampla gama de mecanismos de resistência como β -lactamases e formação de biofilme; aumentando a disseminação, multirresistência, limitando as opções terapêuticas, tornando-se uma ameaça à saúde pública. Entre as poucas alternativas de tratamento, a polimixina B é a mais utilizada pela eficácia, no entanto seu alto potencial de causar nefrotoxicidade e neurotoxicidade, a torna o último recurso. A multirresistência de isolados de *Acineto* tornou necessários estudos para a síntese de novos medicamentos. Um potencial candidato terapêutico para esse fim são os peptídeos antimicrobianos (AMPs), em função das suas múltiplas propriedades antibactericidas. Entre os AMP, a Indolicidina se destaca pelo amplo espectro de atividade antibacteriana. O presente estudo buscou avaliar a ação bactericida da indolicidina sobre *Acineto* resistente à Polimixina B. Foi realizado um ensaio de morte de *Acineto* sob tratamento com diferentes concentrações de Indolicidina e comparado por meio de análises estatísticas a susceptibilidade do microrganismo sensível e resistente a Polimixina B. A cepa resistente à polimixina B também apresentou maior resistência à ação da indolicidina quando comparada à bactéria sensível. Devido ao caráter introdutório do estudo, faz-se necessário o aprofundamento para adequada compreensão da eficácia da Indolicidina em diferentes isolados de *Acinetobacter*.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; multirresistência; Polimixina B; Peptídeos antimicrobianos; Indolicidina.

ABSTRACT. *Acinetobacter baumannii* is an aerobic Gram-negative coccobacillus, notorious among nosocomial infections, especially in ICU patients, and can colonize the lower respiratory tract, bloodstream, postsurgical wounds and urinary tract. It has excellent ability to resist unfavorable conditions and long periods in biotic or abiotic environments due to a wide range of resistance mechanisms such as β -lactamases and biofilm formation; increasing spread, multidrug resistance, limiting therapeutic options, becoming a threat to public health. Among the few treatment alternatives, polymyxin B is the most used for its effectiveness, however its high potential to cause nephrotoxicity and neurotoxicity makes it the last resort. The multidrug resistance of *Acineto* isolates made studies necessary for the synthesis of new drugs. A potential therapeutic candidate for this purpose are antimicrobial peptides (AMPs), due to their multiple antibacterial properties. Among AMPs, Indolicidin stands out for its broad spectrum of antibacterial activity. The present study sought to evaluate the bactericidal action of indolicidin on *Acineto* resistant to Polymyxin B. An *Acineto* death assay was carried out under treatment

with different concentrations of Indolicidin and compared by means of statistical analysis the susceptibility of the microorganism sensitive and resistant to Polymyxin B. The strain resistant to polymyxin B also showed greater resistance to the action of indolicidin when compared to the sensitive bacteria. Due to the introductory nature of the study, it is necessary to deepen it for a proper understanding of the effectiveness of Indolicidine in different *Acinetobacter* isolates.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; Multi-resistance; Polymyxin B; Antimicrobial peptides; Indolicidin.

INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii

Nas últimas décadas, a bactéria *Acinetobacter baumannii* tem ganhado relevância clínica pela constante associação com IRAS (infecções relacionadas à assistência à saúde) especialmente em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI). Por muito tempo foi descrita como um patógeno de baixa virulência, mas vem ganhando notoriedade como o patógeno nosocomial líder de infecções do trato respiratório inferior, corrente sanguínea, pele e tecidos moles, queimaduras, sítios cirúrgicos e trato urinário, se tornando uma ameaça significativa à saúde pública mundial ('WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee' 2017; Mea, Yong, and Wong 2021). A elevada incidência de infecções se dá pelo surgimento de patógenos oportunistas cada vez menos vulneráveis a agentes antimicrobianos, em especial os carbapenêmicos, amplamente utilizados como referência de tratamento para infecções graves por *A. baumannii*, resultando na evolução de cepas multirresistentes, tratamento árduo, poucas opções de antibióticos que expressam atividade e alta mortalidade (Ibrahim 2019).

O gênero *Acinetobacter* é classificado na família *Moraxellaceae* dentro da ordem *Gammaproteobacteria*, dentre essas espécies a *A. baumannii* é considerada a mais notável (Peleg, Seifert, and Paterson 2008). Trata-se de um cocobacilo Gram-negativo aeróbico; não apresentam flagelos, por isso são imóveis, podem apresentar cápsulas ou fímbrias que auxiliam na formação de biofilme e adesão a superfícies como equipamentos de ventilação mecânica, cateteres, tubos, maçanetas. São catalase-positivas, oxidase-negativas, não fermentadoras e não fastidiosas, o que confere a esse microorganismo a capacidade de resistir a longos períodos em ambientes bióticos ou abióticos, mesmo em condições adversas de temperatura, pH, desidratação ou baixa disponibilidade de nutrientes (Lin and Lan 2014; Yang et al.).

A capacidade da *A. baumannii* de resistir a condições desfavoráveis contribui para a disseminação de cepas multirresistentes por seleção clonal (Ibrahim 2019). Enquanto sua incidência na comunidade é baixa, a taxa de contaminação em ambientes hospitalares e o transporte entre profissionais da saúde e pacientes é exorbitante (Zarrilli et al. 2009). A violação de práticas de controle de infecção, utilização incorreta de equipamentos de proteção coletivo e individual (EPC e EPI) e a utilização incontida de antimicrobianos de amplo espectro aumentam a disseminação e a chance de transmissão cruzada entre pacientes internados (Jain et al. 2019).

Essas infecções ocorrem em sua maioria em pacientes críticos de UTIs, como idosos, imunossuprimidos, pacientes que receberam tratamento prévio com antibióticos ou portadores de doenças crônicas subjacentes, como alcoolismo, diabetes mellitus, câncer, doenças pulmonares obstrutivas; e principalmente quando necessitam de intervenções invasivas recorrentes, como utilização de cateteres, ventilação mecânica ou tratamento de lesões pós cirúrgicas, já que os principais meios de transmissão da bactéria são através da pele e das vias

respiratórias (Ibrahim 2019; Lin and Lan 2014; Harding, Hennon, and Feldman 2018). Um estudo realizado entre 2016 e 2017 apontou que de 10 a 25% de todos os pacientes colonizados em UTIs apresentam infecções de trato respiratório inferior (ITRI), resultando em uma mortalidade de 22 a 71% (Jain et al. 2019). Entre elas, a pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é uma das infecções mais frequentes, com alta taxa de mortalidade que varia entre 40-70% (Chaari et al. 2013). As infecções na corrente sanguínea, decorrentes principalmente do uso de cateteres centrais, também são comuns, e apresentam uma mortalidade de 28 a 43% (Ibrahim et al. 2021). Outras patologias que podem ser desencadeadas são meningite, endocardite, bacteremia, infecções de pele e tecido mole, feridas e trato urinário (Harding, Hennon, and Feldman 2018). As opções terapêuticas limitadas podem ser um dos fatores causais para o aumento dessas taxas de morbidade e mortalidade, assim como a associação de patógenos bacterianos com infecções respiratórias virais, quadro muito observado em pacientes hospitalizados por Covid-19 nos últimos dois anos (Rangel, Chagas, and De-Simone 2021).

Inúmeros estudos epidemiológicos vêm apontando um crescimento exponencial de isolados de *A. baumannii* distribuídos nos cinco continentes, com alta prevalência nos países do norte da África, EUA, Índia, Grécia, Israel e Itália. Em uma pesquisa realizada em 2015 com 27 países da Europa, 12 países relataram uma taxa de mais de 50% de resistência aos carbapenêmicos; nos EUA, essa taxa também ficou em torno de 49,5% ('WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee' 2017). No Brasil, o primeiro surto de *A. baumannii* produtor de OXA-23 foi relatado em 1999, em 2017 a porcentagem de resistência já era classificada como alta, variando de 30 a 70% (Mirzaei et al. 2020). O que torna esses dados alarmantes é que, comparativamente, pacientes colonizados com cepas multirresistentes apresentam uma maior taxa de mortalidade, tempo de hospitalização e custos associados em relação àqueles infectados por cepas suscetíveis (Zarrilli et al. 2009; Lemos et al. 2014; Nordmann and Poirel 2019).

A notável resiliência da *A. baumannii* se dá pela ampla gama de mecanismos de resistência, como β -lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, bombas de efluxo de múltiplas drogas, formação de biofilme, defeitos de permeabilidade, modificações de sítios-alvo e elementos genéticos móveis ('WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee' 2017). A somatória desses vários mecanismos resulta na diminuição gradual das classes de antibióticos disponíveis para terapêutica (Lee et al. 2017).

Os antibióticos carbapenêmicos surgiram em torno da década de 80, quando se fez necessário a descoberta de inibidores de β -lactamases, enzimas que limitam a eficácia da penicilina; assim foram descobertos o ácido clavulânico a partir da bactéria Gram-positiva *Streptomyces clavuligerus* e a tienamicina, da *Streptomyces cattleya*. A tienamicina foi o primeiro carbapenêmico clinicamente disponível e base para os que viriam futuramente (Papp-Wallace et al.). Os carbapenêmicos são os antibióticos mais utilizados, por possuírem efeito antibacteriano de amplo espectro e alta eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e há anos são utilizados como antibióticos de “último recurso” em pacientes com infecções graves ou colonizados por bactérias multirresistentes, como é o caso da *A. baumannii* (El-Gamal et al.).

Apesar da eficácia que os carbapenêmicos apresentavam para o tratamento de infecções por *A. baumannii*, a diminuição da suscetibilidade dos isolados têm limitado as opções de terapias disponíveis, com isso os cientistas passaram a estudar a possibilidade de utilizar terapias combinadas para um efeito sinérgico, a maioria a base de colistina que possui uma taxa de resistência menor (10,4%) comparado a rifampicina (47,8%) ou tigeciclina (45,5%). Devido a ampla resistência aos antibióticos, as poucas opções que ainda manifestam atividade contra

isolados clínicos de *A. baumannii* são a minociclina e polimixinas B e E (colistina) (Nordmann and Poirel 2019; Lee et al. 2017). Ainda assim, é possível identificar em inúmeros países o crescimento das taxas de isolados resistentes também às polimixinas (El-Gamal et al.).

Polimixina B e *A. baumannii*

As polimixinas B são antibióticos polipeptídicos produzidos a partir da fermentação da bactéria *Paenibacillus polymyxa*, sua composição inclui beta-lactâmicos e lipopeptídeo deptomicina, um dos mais recentes introduzidos nas classes de antibióticos (Robbel and Marahiel ; Tran et al.). Seu uso foi aprovado em meados da década de 1950, porém, devido às preocupações sobre seu potencial para causar nefrotoxicidade e neurotoxicidade relativamente altas, houve uma queda em sua utilização para fins terapêuticos até os anos atuais, quando o interesse clínico aumentou devido o surgimento de bactérias Gram-negativas (BGN) resistentes (Goode, Yeh, and Bonev). Atualmente utilizada como último recurso para o tratamento dessas infecções, seu mecanismo de ação ainda não está claro; no entanto, acredita-se que a atividade bactericida esteja relacionada à alterações na estrutura do lipopolissacarídeo (LPS) (Trimble et al.). O LPS é uma molécula essencial da membrana externa de bactérias Gram-negativas, composto pelo lipídio A hidrofóbico (endotoxina) que possui carga negativa pela presença de grupos fosfato livres, e juntamente com o Ca^{2+} e o Mg^{2+} , carregados positivamente auxiliam na estabilidade do LPS (Avedissian et al.). A polimixina possui carga positiva e maior afinidade com os grupos fosfato, dessa forma, quando inserida compete com a ligação dos cátions bivalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , essas interações eletrostáticas, por consequência, desestabilizam a LPS e prejudicam a integridade das membranas externas e internas, levando a ruptura e o aumento da permeabilidade (Velkov et al. 2010; Avedissian et al.) (Figura 1).

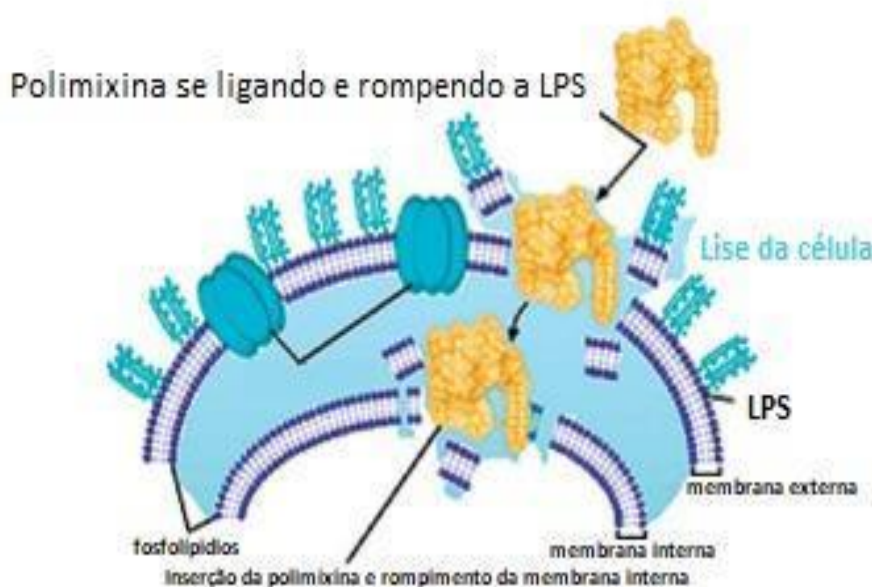


FIGURA 1. Ação antimicrobiana da polimixina B nas membranas externas e interna de bactérias Gram-negativas. Fonte: Figura adaptada de Velkov, T. 2010 (Velkov et al. 2010).

A maioria dos mecanismos de resistência empregados pelas BGNs está relacionado a alterações de carga e estrutura do LPS, como a adição de fosfoetanolamina (PEtN) que diminui a carga líquida de -1,5 a -1, ou a adição de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) que neutraliza a carga do lipídio A, sendo mais efetiva (Moffatt, Harper, and Boyce). Essas interações ocorrem com os grupos fosfato do lipídio A, tornando a carga do LPS positiva, reduzindo sua ligação com a polimixina e levando a resistência. Outras estratégias podem ser a formação de cápsulas ou a utilização de bombas de efluxo (Avedissian et al. ; Moffatt, Harper, and Boyce).

Peptídeos antimicrobianos e A. baumannii

Devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos convencionais, muitos pesquisadores começaram a estudar a síntese de novos antibióticos para combater os microrganismos multirresistentes (Moghaddam et al.). Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) estão entre os mais novos antibióticos, também conhecidos peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs). São compostos produzidos por todos os tipos de organismos como parte da defesa imunológica inata contra parasitas, fungos, bactérias patogênicas e vírus (Anaya-López, López-Meza Je Fau - Ochoa-Zarzosa, and Ochoa-Zarzosa). Além disso, os AMPs podem estimular as células a produzir quimiocinas, estimular a angiogênese, acelerar a cicatrização de feridas e influenciar a morte celular programada em organismos multicelulares (Zasloff 2002).

O AMP é um potencial candidato terapêutico para sepse devido às suas múltiplas propriedades antibactericidas diretas (Nagaoka, Tamura, and Reich). A sepse é uma causa frequente de mortalidade na unidade de terapia intensiva (UTI), que vêm apresentando respostas prejudiciais ao hospedeiro, gerando falência de órgãos, resultantes da produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Angus). Infelizmente, ensaios clínicos revelaram que muitas das abordagens terapêuticas com citocinas anti-inflamatórias não são eficazes, portanto, a necessidade de desenvolver uma nova abordagem para fins terapêuticos torna-se uma realidade cada vez mais presente (Nagaoka, Tamura, and Reich; O'Brien et al.).

Os AMPs, agentes antimicrobianos de amplo espectro, agem por múltiplos mecanismos como; perturbações diretamente na membrana plasmática; interações com alvos internos e modulação das respostas imunes (Torrent et al. 2012). Seu potencial efeito de permeabilizar membranas bacterianas e paredes celulares, compreende um importante mecanismo microbida (Sohlenkamp and Geiger). Existem diferenças na composição lipídica das membranas celulares bacterianas e eucarióticas (Andersson, Hughes, and Kubicek-Sutherland 2016). A maioria dos AMPs possui carga positiva e estrutura catiônica, por sua vez, as membranas bacterianas são ricas em fosfolipídios carregados negativamente (Giuliani et al. 2008).

Os AMPs humanos, como a catelicidina LL-37, podem discriminar entre diferentes membranas com base em seus constituintes lipídicos, inserindo-se preferencialmente em lipídios contendo peptidoglicano, típicos de membranas bacteriana, assim, as moléculas de LL-37 são inicialmente atraídas à superfície bacteriana por interações eletrostáticas de modo que a hélice anfipática seja orientada paralelamente à superfície da bicamada lipídica (Henzler Wildman, Lee Dk Fau - Ramamoorthy, and Ramamoorthy). Acredita-se que após a interação eletrostática inicial com a superfície elas se insiram na membrana da célula da bactéria, formando um poro que rompe a integridade da membrana, levando à lise osmótica da célula (Giuliani et al. 2008; Kraus and Peschel 2006).

Indolicidina e *A. baumannii*

A Indolicidina é um peptídeo antimicrobiano (AMP) catiônico pertencente à família das catelicidinas, que também inclui o LL-37 (Zasloff 2002). Foi isolada do citoplasma de neutrófilos bovinos, e sua estrutura, composta por 13 aminoácidos (ILPWKWPWWPWR-NH₂), é anfipática e possui carga líquida positiva – características fundamentais contra as células microbianas (Selsted et al. 1992). A atração eletrostática que ocorre entre este AMP e os compostos carregados negativamente na parede e membrana celular microbiana causam ruptura da mesma (Zasloff 2002; Selsted et al. 1992).

Este peptídeo tem recebido atenção na pesquisa devido a sua estrutura primária menor comparado a outros AMPs lineares, possui alta porcentagem de resíduos de prolina e triptofano, apresenta amplo espectro antibacteriano, incluindo bactérias multirresistentes, e acredita-se que sua ação aumenta a permeabilidade das membranas citoplasmáticas do microrganismo alvo (Chan, Prenner, and Vogel 2006; Kim et al. 2009).

Apesar de seu mecanismo de ação ser pouco compreendido, estudos apontam que a ação da indolicidina ocorre através do rompimento de membranas bacterianas mediante do modelo *Carpet-like*, onde a região anfipática do AMP entra em contato com a membrana plasmática revestindo uma porção da mesma, permitindo assim a penetração do AMP na bicamada lipídica (Galdiero et al. 2016; Assoni et al. 2020). Em bactérias Gram-negativas foi observado que a indolicidina é capaz de permear rapidamente a parede celular atingindo a membrana plasmática levando à desestabilização e pôr fim a lise celular, essa desestabilização da membrana celular bacteriana resulta da interação entre a membrana carregada negativamente e a indolicidina com carga positiva, conteúdo hidrofóbico e alta concentração de triptofano (Jindal et al. 2015). Outro mecanismo de ação da indolicidina é da capacidade de inibição da síntese de DNA (Selsted and Ouellette 2005; Brahma et al. 2015), em que a indolicidina se liga à dupla hélice do DNA, impedindo a replicação, a transcrição e amplificando sua ação antimicrobiana (Ghosh et al. 2014).

Em inúmeras publicações científicas e documentos de autoridades dos principais órgãos de saúde mundial é um consenso a preocupação com patógenos que apresentam potencial para se tornarem ameaças epidemiológicas, principalmente em relação com os medicamentos disponíveis no mercado. As infecções por *A. baumannii* apresentam todos os fatores para torná-la uma prioridade de ação no controle da disseminação, pois é facilmente transmissível, está associada a um alto potencial de gerar surtos, possui uma exímia capacidade de se fixar a objetos e superfícies, uma elevada taxa de morbidade e mortalidade, é responsável por um impacto econômico significativo para os sistemas de saúde, além da falta de tratamentos eficazes disponíveis. Em suma, estudos de abordagens terapêuticas e desenvolvimento de novas classes de antibióticos se fazem necessários para manter a eficácia no tratamento de infecções por *A. baumannii* multirresistente, garantindo sobrevida com segurança aos pacientes. Sendo assim, a proposta deste estudo é avaliar a ação bactericida da Indolicidina através de um ensaio de morte, determinando a sobrevivência de Cepas de *A. baumannii* sensíveis e resistentes à Polimixina B após o tratamento com doses crescentes do AMP.

METODOLOGIA

Cultivo Bacteriano

As cepas bacterianas utilizadas no estudo foram fornecidas pelo laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade São Francisco, identificadas como AS4 (*Acinetobacter baumannii* sensível 4) e AR4 (*Acinetobacter baumannii* resistente 4), mantidas congeladas a -80°C. Na noite anterior a cada experimento, 20 µl do estoque congelado da cepa de AS4 e AR4 foram semeados em placas separadas, cultivadas em meio Trypticasein Soy Agar (TSA; adquirido da Kasvi) e incubados overnight em estufa a 37°C.

No dia seguinte, as colônias bacterianas foram transferidas para 6 ml de meio Luria Bertani broth (LB; adquirido da Kasvi) até a densidade óptica (DO_{600nm}) atingir próximo de 0,1 em seguida incubadas a 38°C em agitação e monitoradas até a DO_{600nm} atingir entre 0,3-0,4.

Preparação da Indolicidina

Utilizando um estoque de Indolicidina na concentração de 500 µg/ml congelado a -20°C, foi preparada uma diluição com concentração final de 60µg/ml, dessa forma, acrescentando em um tubo Falcon 30µl do estoque de Indolicidina mais 220 µl de PBS estéril.

Ensaio Bactericida

Os tubos com 6 ml do caldo LB com a cultura bacteriana na DO desejada foram submetidos a centrifugação a 5000_{rpm} por 5 minutos para sedimentação, o sobrenadante foi descartado e a cultura lavada com solução de PBS estéril, ressuspensa, centrifugada novamente e em seguida ressuspensa em 2ml de PBS estéril. As suspensões bacterianas foram incubadas em concentrações crescentes de Indolicidina de 0 (tubos controle), 7,5 µg/ml, 15 µg/ml e 30µg/ml, diluídas em solução de PBS estéril até o volume de 100µl. As amostras do grupo controle foram incubadas apenas com PBS estéril.

As amostras foram incubadas a 37° C por 1 hora, foi realizada a diluição em série e 10 µl de cada diluição foram plaqueadas em TSA, após 1 a 2 horas para secagem, as placas foram incubadas overnight a 37° C. Após o período, as bactérias sobreviventes foram quantificadas mediante a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), desse modo comparando cada grupo com o controle não tratado. Os experimentos foram repetidos duas vezes e realizados em duplicata e quadruplicata, respectivamente. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA com pós teste de Dunnet. As análises estatísticas e os gráficos foram criados através do GraphPad Prism.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o efeito bactericida da indolicidina em *A. baumannii*, isolados sensíveis e resistentes à Polimixina B foram submetidos ao tratamento de concentrações crescentes do AMP, variando de 7,5 a 30µg/ml.

Conforme observado na figura 2, o tratamento com indolicidina levou a redução significativa das UFCs de isolados de acineto sensíveis à polimixina B, mostrando-se suscetível em todas as concentrações testadas do AMP. Podemos observar uma redução de aproximadamente 51,64% do controle para Ind 7.5 µg/mL, 73,42% do da amostra controle para Ind 15 µg/mL e 82,04% do controle para Ind 30 µg/mL.

Sensibilidade *Acineto AS4* a indolicidina

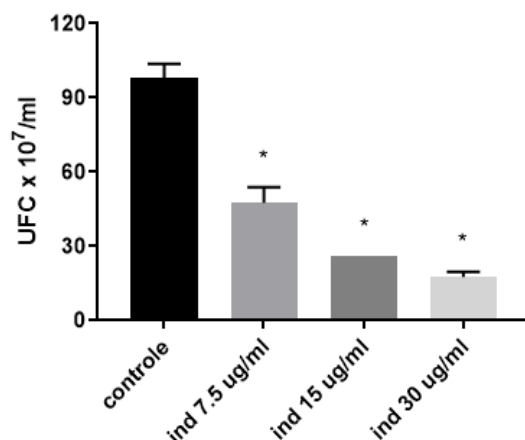


FIGURA 2. Ensaio de morte de *A. baumannii* sensível a polimixina B tratado com concentrações crescentes de indolicidina. As colunas correspondem ao número de bactérias sobreviventes ao tratamento com 7,5 15 e 30 µg /ml de indolicidina. O controle foi incubado apenas com solução tampão. As comparações entre grupos foram realizadas por ANOVA com pós teste de Dunnet. *p<0,05 em comparação com o grupo controle.

A figura 3 demonstra a atividade da indolicidina na cepa de *Acineto* resistente. É possível observar que na concentração mais baixa não houve redução significativa das colônias, passando a ser susceptível apenas a partir da maior concentração de indolicidina, de 30 µg/ml. O gráfico apresenta maior relutância das cepas resistentes à atividade da Indolicidina, com uma redução de aproximadamente 5,88% do grupo controle para Ind 7.5 µg/mL, 26,9% do controle para Ind 15 µg/mL e 52,39% do controle para Ind 30 µg/mL, indicando que os mecanismos que tornam a *A. baumannii* resistente a Polimixina também agem sob a Indolicidina, sendo necessárias doses maiores do fármaco para surtir efeito.

Sensibilidade *Acineto AR4* a indolicidina

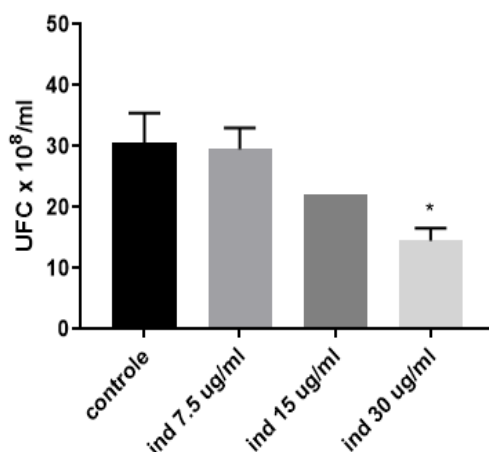


FIGURA 3. Ensaio de morte de *A. baumannii* resistente a polimixina B tratado com concentrações crescentes de indolicidina. As colunas correspondem ao número de bactérias sobreviventes ao tratamento com 7,5 15 e 30 µg /ml de indolicidina. O controle foi incubado apenas com solução tampão. As comparações entre grupos foram realizadas por ANOVA com pós teste de Dunnet. *p<0,05 em comparação com o grupo controle.

Considerando os resultados, observamos que a indolicidina possui um eficiente efeito bactericida em cepas sensíveis, já que mesmo na concentração mais baixa de 7,5 µg/mL já obtivemos uma porcentagem de morte bacteriana superior a 50%, apontando considerável sensibilidade ao AMP, enquanto as cepas resistentes apresentaram maior relutância, atingindo esse resultado somente na maior concentração.

CONCLUSÃO

Diante dos dados abordados no estudo, buscamos compreender o funcionamento da atividade bactericida da indolicidina em isolados de *A. baumannii* resistente a Polimixina B, a fim de encontrar uma nova via terapêutica, para que fosse possível obter menos efeitos adversos, prognósticos mais favoráveis aos pacientes, e consequentemente a redução das taxas de morbidade e mortalidade da doença, em razão ao caráter emergencial do controle da *A. baumannii* multirresistente na saúde pública.

A execução dos ensaios permitiu uma breve visualização da ação lítica da Indolicidina sobre *A. baumannii*, que se mostrou em desacordo com a hipótese inicial da pesquisa, que as bactérias resistentes à Polimixina B seriam vulneráveis a Indolicidina, era esperado que o índice de crescimento bacteriano das cepas resistentes fosse menor e a atividade bactericida fosse expressa em uma menor concentração. Uma possível explicação para este efeito é de que os múltiplos mecanismos de resistência que tornam a *A. baumannii* insensível a Polimixina B e outros antibióticos disponíveis, também agem sobre o AMP estudado, sendo compatível com os diversos trabalhos publicados que evidenciam a alta resistência do microrganismo.

Entretanto, o projeto desenvolvido é uma análise introdutória para a tese, fazendo-se necessários estudos aprofundados que compreendam a efetividade, efeitos adversos, toxicidade e possibilidade de ações sinérgicas da Indolicidina antes de descartá-la como possível candidato terapêutico para as infecções adquiridas por *Acinetobacter*.

AGRADECIMENTO

Nossos sinceros agradecimentos pela colaboração e conhecimento compartilhado às orientadoras Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini e Profa. Dra. Amanda Manoel Della Coletta, a Profa. Dra. Raquel Girardello e ao Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos pela disponibilização do espaço e insumos utilizados no projeto.

REFERÊNCIAS

Anaya-López, J. L., Alejandra López-Meza Je Fau - Ochoa-Zarzosa, and A. Ochoa-Zarzosa. 'Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides'.

Andersson, D. I., D. Hughes, and J. Z. Kubicek-Sutherland. 2016. 'Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides', *Drug Resist Updat*, 26: 43-57.

Angus, D. C. 'The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board?'.

Assoni, L., B. Milani, M. R. Carvalho, L. N. Nepomuceno, N. T. Waz, M. E. S. Guerra, T. R. Converso, and M. Darrieux. 2020. 'Resistance Mechanisms to Antimicrobial Peptides in Gram-Positive Bacteria', *Front Microbiol*, 11: 593215.

Avedissian, S. N., J. Liu, N. J. Rhodes, A. Lee, G. M. Pais, A. R. Hauser, and M. H. Scheetz. 'A Review of the Clinical Pharmacokinetics of Polymyxin B. LID - 10.3390/antibiotics8010031 [doi] LID - 31'.

Brahma, B., M. C. Patra, S. Karri, M. Chopra, P. Mishra, B. C. De, S. Kumar, S. Mahanty, K. Thakur, K. M. Poluri, T. K. Datta, and S. De. 2015. 'Diversity, Antimicrobial Action and Structure-Activity Relationship of Buffalo Cathelicidins', *PLoS One*, 10: e0144741.

Chaari, A., B. Mnif, M. Bahloul, F. Mahjoubi, K. Chtara, O. Turki, N. Gharbi, H. Chelly, A. Hammami, and M. Bouaziz. 2013. 'Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia: epidemiology, clinical characteristics, and prognosis factors', *Int J Infect Dis*, 17: e1225-8.

Chan, D. I., E. J. Prenner, and H. J. Vogel. 2006. 'Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action', *Biochim Biophys Acta*, 1758: 1184-202.

El-Gamal, M. I., I. Brahim, N. Hisham, R. Aladdin, H. Mohammed, and A. Bahaaeldin. 'Recent updates of carbapenem antibiotics'.

Galdiero, E., A. Siciliano, V. Maselli, R. Gesuele, M. Guida, D. Fulgione, S. Galdiero, L. Lombardi, and A. Falanga. 2016. 'An integrated study on antimicrobial activity and ecotoxicity of quantum dots and quantum dots coated with the antimicrobial peptide indolicidin', *Int J Nanomedicine*, 11: 4199-211.

Ghosh, A., R. K. Kar, J. Jana, A. Saha, B. Jana, J. Krishnamoorthy, D. Kumar, S. Ghosh, S. Chatterjee, and A. Bhunia. 2014. 'Indolicidin targets duplex DNA: structural and mechanistic insight through a combination of spectroscopy and microscopy', *ChemMedChem*, 9: 2052-8.

Giuliani, A., G. Pirri, A. Bozzi, A. Di Giulio, M. Aschi, and A. C. Rinaldi. 2008. 'Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 2450-60.

Goode, A. Auid-Orcid, V. Auid-Orcid Yeh, and Bb Auid-Orcid Bonev. 'Interactions of polymyxin B with lipopolysaccharide-containing membranes'.

Harding, C. M., S. W. Hennon, and M. F. Feldman. 2018. 'Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence', *Nat Rev Microbiol*, 16: 91-102.

Henzler Wildman, K. A., A. Lee Dk Fau - Ramamoorthy, and A. Ramamoorthy. 'Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37'.

Ibrahim, M. E. 2019. 'Prevalence of Acinetobacter baumannii in Saudi Arabia: risk factors, antimicrobial resistance patterns and mechanisms of carbapenem resistance', *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 18: 1.

Ibrahim, S., N. Al-Saryi, I. M. S. Al-Kadmy, and S. N. Aziz. 2021. 'Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals', *Mol Biol Rep*, 48: 6987-98.

Jain, M., A. Sharma, M. K. Sen, V. Rani, R. Gaind, and J. C. Suri. 2019. 'Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolates causing lower respiratory infections among ICU patients', *Microb Pathog*, 128: 75-81.

Jindal, H. M., C. F. Le, M. Y. Mohd Yusof, R. D. Velayuthan, V. S. Lee, S. M. Zain, D. M. Isa, and S. D. Sekaran. 2015. 'Antimicrobial Activity of Novel Synthetic Peptides Derived from Indolicidin and Ranalexin against *Streptococcus pneumoniae*', *PLoS One*, 10: e0128532.

Kim, S. M., J. M. Kim, B. P. Joshi, H. Cho, and K. H. Lee. 2009. 'Indolicidin-derived antimicrobial peptide analogs with greater bacterial selectivity and requirements for antibacterial and hemolytic activities', *Biochim Biophys Acta*, 1794: 185-92.

Kraus, D., and A. Peschel. 2006. 'Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides', *Curr Top Microbiol Immunol*.

Lee, C. R., J. H. Lee, M. Park, K. S. Park, I. K. Bae, Y. B. Kim, C. J. Cha, B. C. Jeong, and S. H. Lee. 2017. 'Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options', *Front Cell Infect Microbiol*, 7: 55.

Lemos, E. V., F. P. de la Hoz, T. R. Einarson, W. F. McGhan, E. Quevedo, C. Castañeda, and K. Kawai. 2014. 'Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis', *Clin Microbiol Infect*, 20: 416-23.

Lin, M. F., and C. Y. Lan. 2014. 'Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside', *World J Clin Cases*, 2: 787-814.

Mea, H. J., P. V. C. Yong, and E. H. Wong. 2021. 'An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation', *Microbiol Res*, 247: 126722.

Mirzaei, B., Z. N. Bazgir, H. R. Goli, F. Iranpour, F. Mohammadi, and R. Babaei. 2020. 'Prevalence of multi-drug resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated in clinical samples from Northeast of Iran', *BMC Res Notes*, 13: 380.

Moffatt, J. H., M. Harper, and J. D. Boyce. 'Mechanisms of Polymyxin Resistance'.

Moghaddam, M. M., F. Abolhassani, H. Babavalian, R. Mirnejad, K. Azizi Barjini, and J. Amani. 'Comparison of in vitro antibacterial activities of two cationic peptides CM15 and CM11 against five pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*'.

Nagaoka, I. Auid-Orcid, H. Tamura, and J. Auid-Orcid X. Reich. 'Therapeutic Potential of Cathelicidin Peptide LL-37, an Antimicrobial Agent, in a Murine Sepsis Model. LID - 10.3390/ijms21175973 [doi] LID - 5973'.



Nordmann, P., and L. Poirel. 2019. 'Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria', *Clin Infect Dis*, 69: S521-s28.

O'Brien, J. M., Jr., Scott K. Ali Na Fau - Aberegg, Edward Aberegg Sk Fau - Abraham, and E. Abraham. 'Sepsis'.

Papp-Wallace, K. M., Magdalena A. Endimiani A Fau - Taracila, Robert A. Taracila Ma Fau - Bonomo, and R. A. Bonomo. 'Carbapenems: past, present, and future'.

Peleg, A. Y., H. Seifert, and D. L. Paterson. 2008. 'Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen', *Clin Microbiol Rev*, 21: 538-82.

Rangel, K., T. P. G. Chagas, and S. G. De-Simone. 2021. 'Acinetobacter baumannii Infections in Times of COVID-19 Pandemic', *Pathogens*, 10.

Robbel, L., and M. A. Marahiel. 'Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery'.

Selsted, M. E., M. J. Novotny, W. L. Morris, Y. Q. Tang, W. Smith, and J. S. Cullor. 1992. 'Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils', *J Biol Chem*, 267: 4292-5.

Selsted, M. E., and A. J. Ouellette. 2005. 'Mammalian defensins in the antimicrobial immune response', *Nat Immunol*, 6: 551-7.

Sohlenkamp, C., and O. Geiger. 'Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways'.

Torrent, Marc, Pulido, David, Rivas, Luis, Andreu, and David. 2012. 'Antimicrobial Peptide Action on Parasites ', *Current Drug Targets*, 13: 1138-47.

Tran, T. B., T. Velkov, R. L. Nation, A. Forrest, B. T. Tsuji, P. J. Bergen, and J. Li. 'Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet?'.

Trimble, M. J., P. Mlynářčik, M. Kolář, and R. E. Hancock. 'Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. LID - 10.1101/cshperspect.a025288 [doi] LID - a025288'.

Velkov, T., P. E. Thompson, R. L. Nation, and J. Li. 2010. 'Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics', *J Med Chem*, 53: 1898-916.

'WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee.' in. 2017. *Guidelines for the Prevention and Control of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in Health Care Facilities* (World Health Organization. Copyright © World Health Organization 2017.: Geneva).



<http://ensaios.usf.edu.br>

Yang, C. H., P. W. Su, S. H. Moi, and L. Y. Chuang. 'Biofilm Formation in *Acinetobacter Baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. LID - 10.3390/molecules24101849 [doi] LID - 1849'.

Zarrilli, R., M. Giannouli, F. Tomasone, M. Triassi, and A. Tsakris. 2009. 'Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities', *J Infect Dev Ctries*, 3: 335-41.

Zasloff, M. 2002. 'Antimicrobial peptides of multicellular organisms', *review article*, 415: 389–95.