



Avaliação do perfil de resistência de *Klebsiella pneumoniae* frente ao peptídeo

BotrAMP 14

Autor: Gabriel Cidade Feitosa

Orientador: Octávio Luiz Franco

Coorientadora: Mariana Rocha Maximiano

BRASÍLIA, 2026

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Gabriel Cidade Feitosa

**Avaliação do perfil de resistência de *Klebsiella pneumoniae* frente ao
peptídeo BotrAMP 14**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular pelo programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco

**Coorientadora: Dra. Mariana Rocha
Maximiano**

BRASÍLIA, 2026

Agradecimentos

Certa vez, Ernest Hemingway disse que “Não há nada nobre em ser superior ao seu semelhante. A verdadeira nobreza é ser superior ao seu antigo eu”. Por essa razão agradeço por todos que estiveram comigo nessa difícil jornada e espero que todos tenham um futuro rico em saúde, felicidade e prosperidade.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, José e Silvia, que sempre me apoiaram e fizeram de tudo, com amor, para que eu seguisse meus objetivos.

Agradeço, com destaque especial, ao meu melhor amigo e irmão, Pedro Henrique, que sempre foi minha sustentação e um guia para a pessoa que sou hoje.

À minha namorada e amiga, Nathalia, por sempre acreditar no meu potencial.

Aos meus braços direito e esquerdo, Nilton, Letícia e Luiz, que sempre estiveram ao meu lado, inclusive nos momentos mais desesperançosos.

Aos meus amigos Camila, Samuel, Nilton, Gustavo, Rafael, Edu, Bruno, Leonardo e João Pedro que representam o melhor que o mundo tem a oferecer em forma de bondade, honestidade, carisma e amor.

Aos meus primos, Eduardo, Carlos Augusto e Ana Paula, que sempre foram irmãos zelosos e insistem em me enxergar com olhos de grandeza.

À Mariana, que sempre foi uma amiga paciente e bondosa, mesmo com suas ameaças de *bambu*.

À Camilla Maria, que sempre foi uma irmã e um porto seguro.

À Andressa, por sua nobre gentileza e pontos de vista, que me fazem refletir.

Ao Michel e à Thuanny, por serem exemplos a serem seguidos, mesmo em meio às próprias introspecções.

Ao professor Octávio, pelas oportunidades e experiências vivenciadas ao longo dos últimos seis anos, ao lado de pessoas únicas.

À coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação, por toda a compreensão e ajuda.

Resumo

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é considerada um dos maiores desafios globais de saúde pública, sendo responsável por mais de 4 milhões de mortes em 2021 e por projeções alarmantes de 10 milhões para 2050. *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria gram-negativa oportunista frequentemente associada a infecções nosocomiais, destaca-se entre os patógenos prioritários para o desenvolvimento de novas terapias da OMS. Diante desse cenário, terapias baseadas em peptídeos antimicrobianos têm se mostrado promissoras no enfrentamento da RAM. Este estudo teve como objetivo induzir e caracterizar o perfil de resistência de *K. pneumoniae* ATCC 13883 ao peptídeo BotrAMP 14 por meio de trajetória evolutiva de 24 rodadas. Surpreendentemente, em apenas seis rodadas de exposição já puderam ser observadas 5 das 10 linhagens, nomeadas KpG 1 a 10, induzidas com sucesso à resistência, e dessas, duas, KpG 1 e 4, demonstraram notável capacidade adaptativa sob pressão seletiva, atingindo níveis de resistência estáveis de até 16 vezes superiores à concentração inibitória mínima (CIM) inicial de 4 μ M da cepa parental. As linhagens induzidas apresentaram resistência colateral, com alterações nos perfis de resistência da linhagem parental à colistina, à amicacina e às fluoroquinolonas, e a resistência colateral não foi estável após dez dias sem exposição ao agente seletivo. Além disso, foi avaliado o aumento do custo metabólico nas linhagens mais resistentes KpG 1 e 4, como sua taxa crescimento (T.C) por hora que foi retardada em até 16%, sua taxa de duplicação (T.D) aumentada em até 20% e com isso uma diminuição do crescimento máximo das bactérias em até 5% na fase log. Esses achados podem contribuir para um melhor entendimento do agente patogênico *K. pneumoniae* e para novas estratégias na batalha frente a resistência aos antimicrobianos.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana; *Klebsiella pneumoniae*; BotrAMP14; terapias alternativas.

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) is recognized as one of the greatest global public health challenges, accounting for more than 4 million deaths in 2021 and projected to cause up to 10 million deaths annually by 2050. *Klebsiella pneumoniae*, an opportunistic Gram-negative bacterium frequently associated with nosocomial infections, is among the priority pathogens identified by the World Health Organization for the development of new therapeutic strategies. In this context, therapies based on antimicrobial peptides have emerged as promising approaches to combat AMR. The present study aimed to induce and characterize the resistance profile of *K. pneumoniae* ATCC 13883 to the antimicrobial peptide BotrAMP 14 through an evolutionary trajectory comprising 24 sequential passages. Remarkably, after only six rounds of exposure, 5 out of 10 lineages (designated KpG 1–10) were successfully induced to resistance. Among these, lineages KpG 1 and KpG 4 exhibited a pronounced adaptive capacity under selective pressure, achieving stable resistance levels up to 16-fold higher than the initial minimum inhibitory concentration (MIC) of 4 μ M observed in the parental strain. The induced lineages displayed collateral resistance, with altered susceptibility profiles to colistin, amikacin, and fluoroquinolones relative to the parental strain. However, this collateral resistance was not stable after ten days in the absence of selective pressure. Additionally, an increase in metabolic cost was observed in the most resistant lineages (KpG 1 and KpG 4), as evidenced by a reduction in growth rate (up to 16% decrease per hour), an increase in doubling time (up to 20%), and a consequent reduction of up to 5% in maximum bacterial growth during the logarithmic phase. These findings contribute to a deeper understanding of the pathogenic behavior of *K. pneumoniae* and may inform the development of novel strategies to address antimicrobial resistance.

Keywords: antimicrobial peptide; antimicrobial resistance; *Klebsiella pneumoniae*; BotrAMP 14; alternative therapies.

SUMÁRIO.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	10
1.2 <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	14
1.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	18
1.4 TRATAMENTOS DE INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	20
1.5 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	22
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 CONFIRMAÇÃO DO PEPTÍDEO BOTRAMP14 POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	27
3.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	27
3.3 TRAJETÓRIA EVOLUTIVA DA <i>K. PNEUMONIAE</i>	28
3.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA RESISTÊNCIA INDUZIDA	29
3.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BIOLÓGICA	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 CONFIRMAÇÃO DO PEPTÍDEO BOTRAMP 14 POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	31
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	32
4.3 TRAJETÓRIA EVOLUTIVA DA <i>K. PNEUMONIAE</i>	34
4.4 RESISTÊNCIA CRUZADA	37
4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS RESISTÊNCIAS ADQUIRIDAS PELAS CEPAS BACTERIANAS	41
4.6 CAPACIDADE BIOLÓGICA (<i>FITNESS</i>)	44
5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFERÊNCIAS.....	49
7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	57

Lista de figuras

Figura 1. Linha do tempo mostrando 38 classes de antimicrobianos, com o tempo de desenvolvimento (laranja) e o tempo até o surgimento do primeiro caso clínico resistente (azul). Imagem adaptada de (Stennett et al., 2022).

Figura 2. Distribuição regional das mortes relacionadas à *Klebsiella pneumoniae* resistente à antimicrobianos em 2021. Figura referente à Tabela 1 acima (Naghavi et al., 2024).

Figura 3. Atualização da Lista Bacteriana de Prioridade Patogênica 2024, agrupando 15 famílias de patógenos em 3 grupos, Crítico, Alta Prioridade e Média Prioridade. Traduzido de (WHO, 2024, 2025).

Figura 4. Atualização da Lista Bacteriana de Prioridade Patogênica (BPPL) em 2024, ranqueando todos os 24 patógenos resistentes à antimicrobianos de relevância clínica (WHO, 2024, 2025).

Figura 5. Estruturas e mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos. A. Ilustração dos tipos de estruturas dos peptídeos antimicrobianos. B. Ilustração dos mecanismos de ação na membrana. Adaptado e traduzido de (Oliveira Júnior et al., 2025).

Figura 6. Espectro de massa do peptídeo sintetizado, gerado no equipamento MALDI-ToF, no modo de ionização positiva, usando o ácido α -cianocinâmico como matriz.

Figura 7. Concentração inibitória mínima do BotrAMP 14 frente à cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 em concentrações de 32 a 1 μ M.

Figura 8. Trajetória evolutiva ao longo de seis rodadas, totalizando 24 dias, das linhagens de *Klebsiella pneumoniae* (KpG 1 a KpG 10) submetidas a concentrações crescentes do peptídeo BotrAMP 14, iniciando em 2 μ M e alcançando 15 μ M, com incrementos a cada quatro dias.

Figura 9. Avaliação de resistência cruzada por CIM das cepas de *K. pneumoniae* (KpG 1, 4 e controle) submetidas a concentrações de 1 a 128 μ M de BotrAMP 14 e CrotAMP 14; também de 1 a 64 μ M de colistina.

Figura 10. Avaliação de resistência cruzada por CIM das cepas de *K. pneumoniae* (KpG 1 e 4) submetidas a concentrações de 1 a 128 μ M de BotrAMP 14, CotrAMP 14 e colistina.

Figura 11. Avaliação da capacidade biológica das cepas de *K. pneumoniae*, diferença em porcentagem na notação do fitness da KpG 1 e 4 em comparação a parental. A.A.C: Área Abaixo da Curva (log), T.C: Taxa de Crescimento (h), T.L: Tempo de fase Lag (h) e T.D: Tempo de Duplicação (h).

Lista de tabelas

Tabela 1. As 10 combinações mais mortais entre patógenos e antimicrobianos, pela carga atribuída de resistência antimicrobiana, separadas por super-regiões, em 2021, tabela adaptada de Naghavi *et al.* (2024). (i) Todas as células apresentam o total de mortes atribuídas à RAM em 2021 no canto inferior direito e em ordem decrescente de cima para baixo, (ii) Todas as colunas indicam a superregião, (iii) As cores das células são definidas pela taxa de variação anualizada de 1990 a 2021.

Tabela 2. Avaliação da resistência cruzada por difusão em disco das cepas de *K. pneumoniae* (KpG 1, 4 e parental) a antimicrobianos de relevância clínica. Os resultados são expressos pelo diâmetro em milímetros (mm) e pela legenda de (R) para resistente em amarelo, (S) para sensível em azul (BrCAST, 2025).

Tabela 3. Avaliação da resistência cruzada por difusão em disco das cepas de *K. pneumoniae* (KpG 1, 4 e parental) a antimicrobianos de relevância clínica. Os resultados são expressos pelo diâmetro em milímetros (mm) e pela legenda de (R) para resistente em amarelo, (S) para sensível em azul (BrCAST, 2025).

Tabela 4. Avaliação da capacidade biológica das cepas de *K. pneumoniae* (KpG 1, 4 e parental) com A.A.C: Área Abaixo da Curva (log), T.C: Taxa de Crescimento (h), T.L: Tempo de fase Lag (h) e T.D: Tempo de Duplicação (h). Em A, as cepas C1, KpG 1 e KpG 4 são comparadas à cepa parental. Os isolados resistentes KpG 1 e KpG 4 foram comparados ao grupo controle C1. Os isolados KpG 1 e KpG 4 são comparados entre si. Os parâmetros marcados com asterisco (*) apresentam diferença estatisticamente significativa com confiança de 99%. Os isolados destacados, sublinhados e em negrito constituem o referencial comparativo.

1. Introdução

1.1 Antimicrobianos e resistência a antimicrobianos

Os antimicrobianos foram introduzidos como a grande descoberta no início do século 20 e com eles, além de tratar doenças infecciosas, também foram possíveis procedimentos invasivos que exigem imunossupressão como tratamentos de câncer, transplantes de órgãos e grandes cirurgias (Hutchings et al., 2019; Stennett et al., 2022). No entanto, o uso inadequado e excessivo de agentes antimicrobianos faz com que esses recursos percam a eficácia e por sua vez, diminuam as opções de tratamento, sendo comparado à “tragédia dos comuns”, na qual indivíduos de uma comunidade esgotam recursos limitados (WHO, 2017).

Por outro lado, a resistência aos antimicrobianos (RAM), que pode ser desenvolvida a partir da exposição das bactérias à agentes antimicrobianos, podendo desencadear mutações em resposta antimicrobianos, tornando infecções bacterianas mais difíceis de tratar e aumentando o risco de disseminação e mortalidade (WHO, 2023). A resistência é definida como a capacidade das bactérias de sobreviver aos efeitos de antimicrobianos em concentrações terapêuticas (Murray et al., 2022). Esse fenômeno é um problema crescente em todo o mundo, ameaçando a eficácia de tratamentos de doenças infecciosas para as quais os antimicrobianos foram originalmente desenvolvidos (Figura 1) (Stennett et al., 2022; Volkov, 2024).

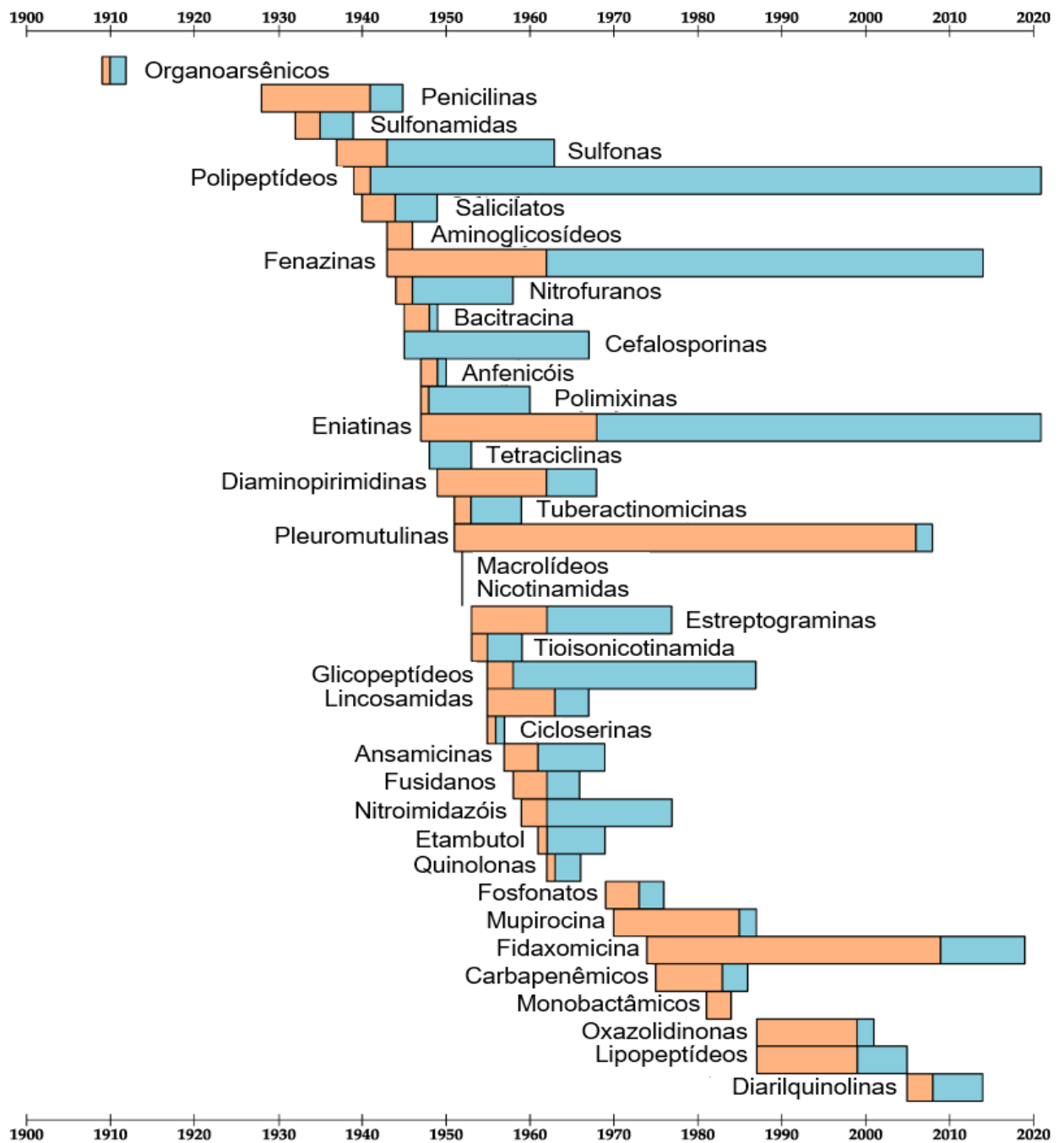


Figura 1. Linha do tempo mostrando 38 classes de antimicrobianos, com o tempo de desenvolvimento (laranja) e o tempo até o surgimento do primeiro caso clínico resistente (azul).

Imagem adaptada de (Stennett et al., 2022).

A OMS alertou que a humanidade está ficando sem opções, diante do aumento global de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e da disseminação de mecanismos de resistência (Ugwu et al., 2020; Zhu et al., 2022).

Assim, infecções antes tratáveis, como pneumonia e tuberculose, estão se dirigindo para um futuro em que deixarão de ser tratáveis (Ahmed et al., 2024). A perspectiva de uma era pós-antibiótica, em que infecções comuns ou ferimentos leves podem, novamente, levar à morte, é real (WHO, 2023). Desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1929 (Letek, 1928), a resistência vem crescendo rapidamente (Naghavi et al., 2024).

Em 2021, estimou-se que 4,71 milhões de mortes estiveram associadas à resistência bacteriana aos antimicrobianos, das quais 1,14 milhões foram diretamente atribuíveis a este fator. Entre 1990 e 2021, observou-se mundialmente uma queda superior a 50% na mortalidade por resistência entre crianças menores de 5 anos, enquanto adultos com 70 anos ou mais apresentaram aumento superior a 80% (Naghavi et al., 2024). A bactéria *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, é membro do grupo de bactérias com mais alto risco nomeado ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp* e *Escherichia coli*) pela OMS e está entre bactérias gram-negativas que demonstrou um dos maiores crescimentos globais (Naghavi et al., 2024). Projeções para 2050 indicam até 8,22 milhões de mortes associadas à resistência antimicrobiana (RAM), com maior impacto no sul da Ásia, América Latina e Caribe, em concordância com o cenário da (Tabela 1) (Naghavi et al., 2024).

	Global	Europa Central, Europa Oriental e Ásia Central	Países de alta renda	América Latina e Caribe	África do Norte e Oriente Médio	Sul Asiático	Sudeste e Oeste Asiáticos e Oceania	África subsaariana
1	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina 130 000	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina 7700	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina 31 000	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina 9240	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina 8160	<i>Acinetobacter baumannii</i> Carbapenêmicos 28 300	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina 38 200	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Carbapenêmicos 11 300
2	<i>Acinetobacter baumannii</i> Carbapenêmicos 78 100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Carbapenêmicos 3680	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Carbapenêmicos 6540	<i>Acinetobacter baumannii</i> Carbapenêmicos 5970	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Carbapenêmicos 6250	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina 25 600	<i>Acinetobacter baumannii</i> Carbapenêmicos 21 800	<i>Acinetobacter baumannii</i> Carbapenêmicos 9690
3	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Carbapenêmicos 71 600	<i>Acinetobacter baumannii</i> Carbapenêmicos 3580	<i>Staphylococcus aureus</i> Fluoroquinolonas 5790	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Carbapenêmicos 5170	<i>Acinetobacter baumannii</i> Carbapenêmicos 4900	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Carbapenêmicos 22 800	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Carbapenêmicos 17 200	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina 9610
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Carbapenêmicos 45 600	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Carbapenêmicos 3370	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Carbapenêmicos 5560	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Carbapenêmicos 4870	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Carbapenêmicos 3330	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Resistência à multi drogas excluindo as de amplo espectro 22 000	<i>Acinetobacter baumannii</i> Fluoroquinolonas 12 000	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Resistência à multi drogas excluindo as de amplo espectro 8270
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenêmicos 45 600	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenêmicos 2700	<i>Staphylococcus aureus</i> Macrolídeos 5000	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenêmicos 3800	<i>Acinetobacter baumannii</i> Fluoroquinolonas 2700	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenêmicos 21 400	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Carbapenêmicos 11 000	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3ª geração cefalosporinas 8200
6	<i>Acinetobacter baumannii</i> Fluoroquinolonas 45 000	<i>Escherichia coli</i> Fluoroquinolonas 2360	<i>Escherichia coli</i> Fluoroquinolonas 4760	<i>Acinetobacter baumannii</i> Fluoroquinolonas 3380	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenêmicos 2240	<i>Acinetobacter baumannii</i> Fluoroquinolonas 15 600	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenêmicos 8300	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Fluoroquinolonas 7550
7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Resistência à multi drogas excluindo as de amplo espectro 36 400	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Fluoroquinolonas 2350	<i>Escherichia coli</i> Aminopenicilina 4450	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Fluoroquinolonas 3100	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Fluoroquinolonas 1810	<i>Escherichia coli</i> Carbapenêmicos 15 300	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 3ª geração cefalosporinas 8110	<i>Acinetobacter baumannii</i> Fluoroquinolonas 6810
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Fluoroquinolonas 36 000	<i>Escherichia coli</i> 3ª geração cefalosporinas 2170	<i>Acinetobacter baumannii</i> Carbapenêmicos 3870	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Aminoglicosídeos 2530	<i>Escherichia coli</i> 3ª geração cefalosporinas 1710	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Fluoroquinolonas 11 600	<i>Escherichia coli</i> 3ª geração cefalosporinas 7980	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Trimethoprim-Sulfamethoxazol 6740
9	<i>Escherichia coli</i> Fluoroquinolonas 34 100	<i>Acinetobacter baumannii</i> Fluoroquinolonas 2100	<i>Escherichia coli</i> β-Lactâmicos e inibidores β-Lactamases 3820	<i>Escherichia coli</i> Fluoroquinolonas 2490	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Aminoglicosídeos 1500	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Carbapenêmicos 11 200	<i>Staphylococcus aureus</i> Macrolídeos 7620	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Aminoglicosídeos 6470
10	<i>Escherichia coli</i> 3ª geração cefalosporinas 33100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Fluoroquinolonas 1930	<i>Enterococcus faecium</i> Vancomicina 3550	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Fluoroquinolonas 2140	<i>Escherichia coli</i> Fluoroquinolonas 1440	<i>Escherichia coli</i> Fluoroquinolonas 10500	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Macrolídeos 7620	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 3ª geração cefalosporinas 6320

Taxa de variação anualizada (1990-2021)
 -3.0% to <-1.5% -0.5% to <0.5% 1.5% to <3.0% ≥5.0%
 -1.5% to <-0.5% 0.5% to <1.5% 3% to <5.0%

Tabela 1. As 10 combinações entre patógenos e resistência à antimicrobianos mais mortíferas antimicrobianos, separadas por super-regiões em 2021, tabela adaptada de (Naghavi et al., 2024). Todas as células apresentam o total de mortes atribuídas à RAM em 2021 no canto inferior direito e em ordem decrescente de cima para baixo, (todas as colunas indicam a super-região, as cores das células são definidas pela taxa de variação anualizada de 1990 a 2021.

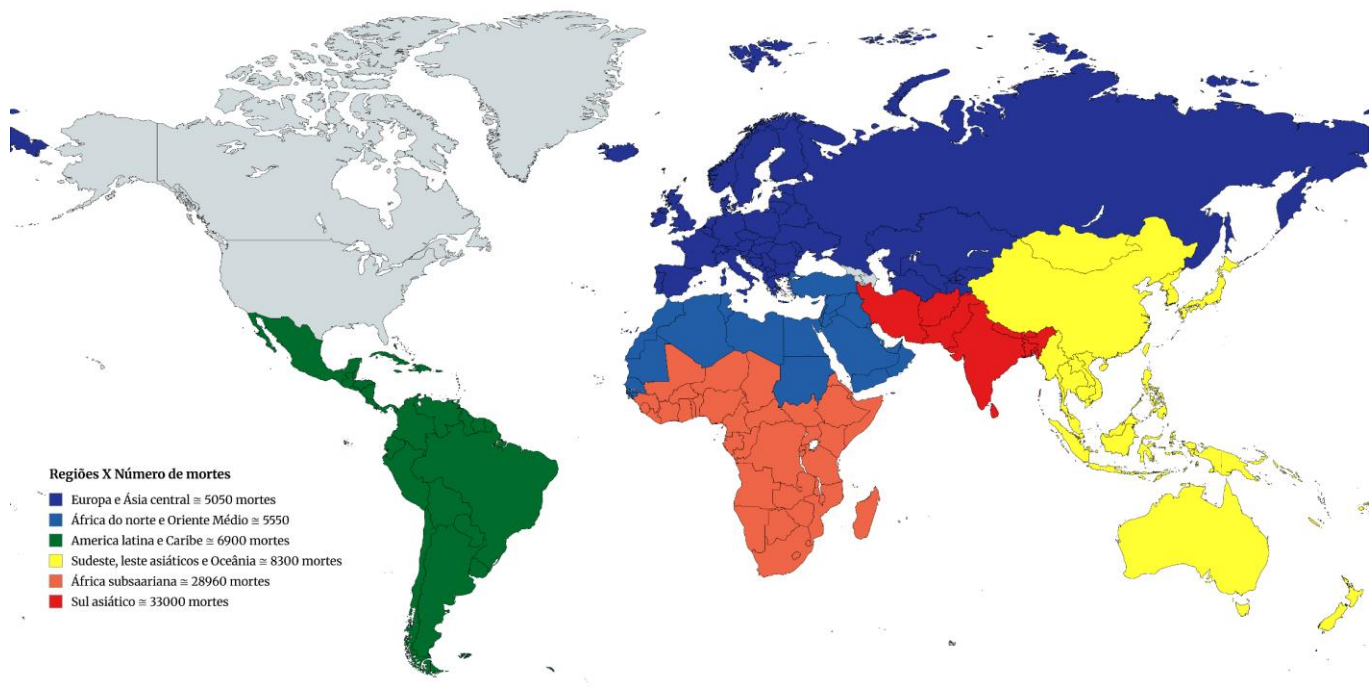


Figura 2. Distribuição regional das mortes relacionadas à *Klebsiella pneumoniae* resistente à antimicrobianos em 2021. Figura referente à Tabela 1 acima (Naghavi et al., 2024).

Cenários futuros indicam que até 92 milhões de mortes podem ser evitadas com melhorias no cuidado de infecções graves e acesso a antimicrobianos, sendo 11,1 milhões evitáveis com o desenvolvimento de novos medicamentos contra bactérias gram-negativas (Naghavi et al., 2024).

1.2 *Klebsiella pneumoniae*

A fim de munir com orientação os formuladores de políticas públicas, autoridades nacionais de saúde e outros envolvidos em pesquisa e desenvolvimento a OMS sintetizou em 2017 e atualizou em 2024 um documento nomeado “*WHO Bacterial Priority Pathogens List (BPPL)*” ou a “Lista Bacteriana de Prioridade Patogênica – em tradução livre” (WHO, 2024).

Nesse documento foram analisadas 15 famílias de patógenos resistentes a antimicrobianos e alocadas em grupos de crítica, alta e média prioridade (Figura 2) (WHO, 2024). Dentre essas bactérias *K. pneumoniae* foi enquadrada no grupo crítico e lidera o ranque na lista de prioridades subindo da 5ª para a 1ª colocação (Figura 3) (WHO, 2024, 2025).

K. pneumoniae é uma bactéria patogênica gram-negativa, de morfologia bacilar, pertencente à ordem das *Enterobacterales*. Trata-se de um microrganismo ubíquo no ambiente, capaz de colonizar e infectar diversos hospedeiros, incluindo plantas e animais. Em seres humanos, é normalmente isolada de diferentes sítios anatômicos, como a cavidade oral, pele, trato gastrointestinal, trato urinário e trato respiratório (Ernst et al., 2020; Holt et al., 2015). *Klebsiella* sp. é considerada uma bactéria oportunista, que afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos. Constitui um dos principais agentes etiológicos de pneumonia IRAS e, entre crianças menores de cinco anos, foi um dos patógenos com maior número de mortes atribuíveis à resistência antimicrobiana em 2021, juntamente com *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli* (Ernst et al., 2020; Naghavi et al., 2024).

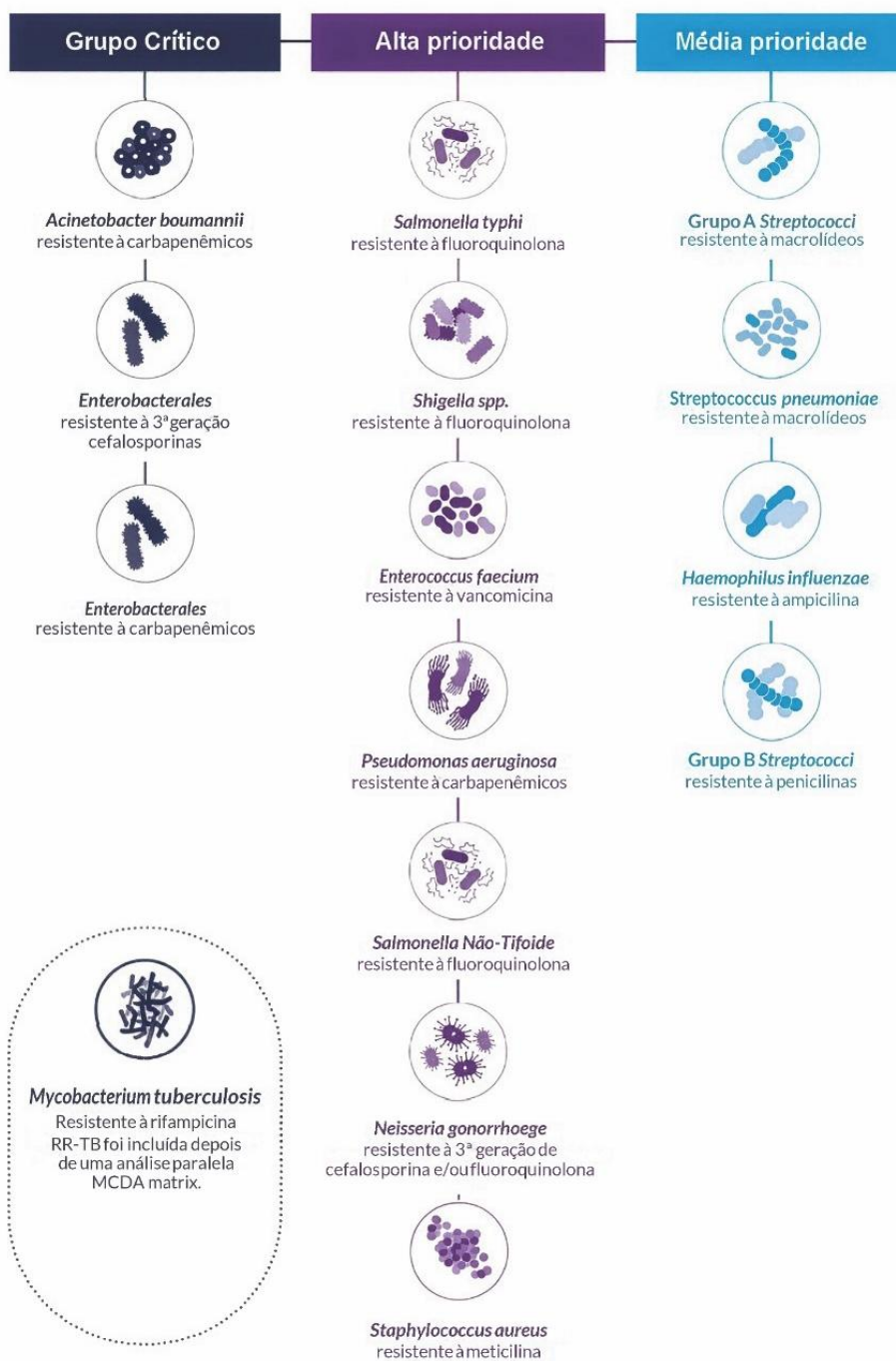


Figura 3. Atualização da Lista Bacteriana de Prioridade Patogênica 2024, agrupando 15 famílias de patógenos em 3 grupos, Crítico, Alta Prioridade e Média Prioridade. Traduzido de (WHO, 2024, 2025).

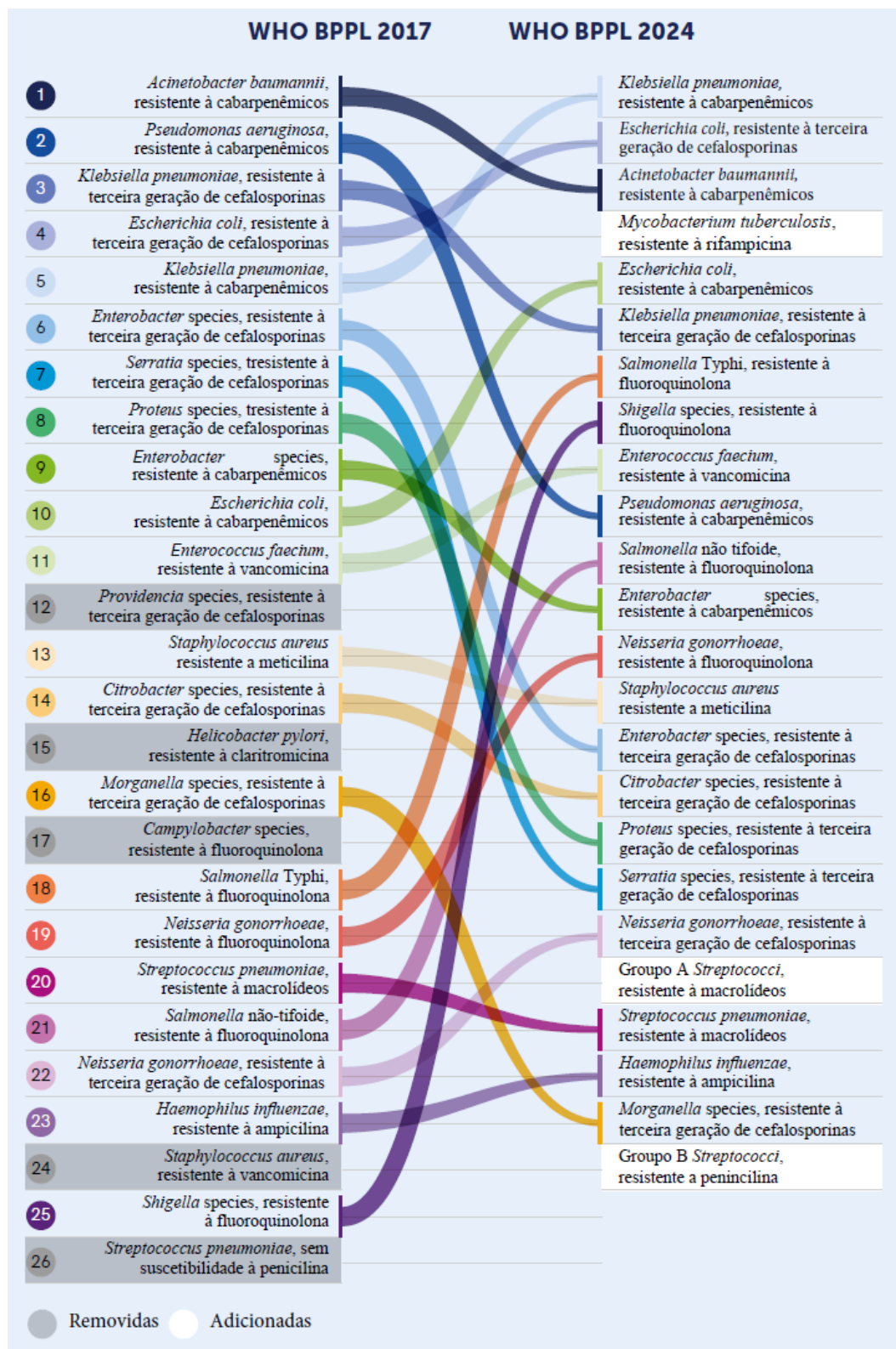


Figura 4. Atualização da Lista Bacteriana de Prioridade Patogênica (BPPL) em 2024, ranqueando todos os 24 patógenos resistentes à antimicrobianos de relevância clínica (WHO, 2024, 2025).

A *K. pneumoniae* é microrganismo que apresenta um genoma acessório extenso, composto por plasmídeos e por loci gênicos localizados no cromossomo. Com base nas características desse genoma acessório, as cepas da espécie podem ser classificadas em três principais grupos: oportunistas, hipervirulentas (hv) e multirresistentes (MDR) (Martin & Bachman, 2018). A emergência e disseminação das cepas multirresistentes constituem um desafio urgente no estudo de *K. pneumoniae*, especialmente no contexto hospitalar (Navon-Venezia et al., 2017). A resistência observada nessas cepas está fortemente associada à presença de genes de resistência a antimicrobianos (GRAs), frequentemente codificados por plasmídeos. Por meio desses elementos genéticos móveis e de outros mecanismos de transferência horizontal, *K. pneumoniae* continua a adquirir e acumular GRAs, ampliando sua capacidade de adaptação frente às terapias antimicrobianas disponíveis (Navon-Venezia et al., 2017).

1.3 Mecanismos de resistência em *Klebsiella pneumoniae*

Com o advento do uso crescente de antimicrobianos, *K. pneumoniae* passou a representar uma das principais causas de infecções hospitalares associadas à assistência à saúde, sendo também um dos quatro patógenos vinculados a combinações patógeno-fármaco que resultaram em um aumento superior a 25.000 mortes atribuíveis por ano, no período de 1990 a 2021 (Naghavi et al., 2024). A bactéria *K. pneumoniae* também pode ser comumente encontrada em ambientes compartilhados entre humanos e animais (Bidewell et al., 2018; Franklin-Alming et al., 2021). Assim é facilitado a co-disseminação na presença de fatores de RAM e ampliando o risco à saúde humana (Calland et al., 2023; Hetland et al., 2025). Em escala global, em 2021, aproximadamente 45.600 óbitos foram atribuídos à resistência antimicrobiana causada por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, enquanto, no mesmo período, cerca de 36.000 mortes estiveram relacionadas à resistência dessa bactéria às fluoroquinolonas. Desses totais,

aproximadamente 3.800 e 3.100 óbitos, respectivamente, foram registrados na região composta pela América Latina e Caribe (Naghavi et al., 2024).

Diversos fatores têm sido apontados como responsáveis pela disseminação da RAM, entre os quais se destacam o uso inadequado de antimicrobianos, tanto na área da saúde quanto na agropecuária e veterinária, além da escassez de novos fármacos ou terapias eficazes para o enfrentamento dessa ameaça (Volkov, 2024; WHO, 2022; WOA, 2025). Por estar frequentemente presente nesses ambientes, *K. pneumoniae* é constantemente exposta a diversos antimicrobianos, essa condição favorece o surgimento de mutações adicionais e uma ampla gama de GRAs presentes em seus cromossomos e em plasmídeos, os quais também evoluem e se diversificam continuamente (Navon-Venezia et al., 2017).

Com extensivos trabalhos frente a necessidade de compreensão dos mecanismos que aferem essas resistências, podem ser citados vários genes atrelados ao sucesso dessa bactéria em se adaptar principalmente em ambiente IRAS, como por exemplo (i) inativação enzimática por meio da produção de β -lactamases e carbapenemases, *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* que são genes clássicos atrelados à resistência da classe dos β -lactâmicos com sua incidência e impacto receberam a nomenclatura ESBL (em inglês *extended spectrum β -lactamases*) ao aferir atividade contra um espectro de β -lactâmicos, assim como cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos (Huang et al., 2025; Lee et al., 2021; Pu et al., 2023).; (ii) atividade aumentada de bombas de efluxo *tetA*, *tetD*, *oqxA* e *oqxB*, conseqüentemente contra fluoroquinolonas e tetraciclina (Geetha et al., 2020; Huang et al., 2025; Lee et al., 2021; Pu et al., 2023); e (iii) modificações estruturais de proteínas da membrana externa como as alterações na expressão dos genes *ompK*, sendo traduzidos em porinas variantes e conferindo resistência à aminoglicosídeos e carbapenêmicos (Lee et al., 2021; Pu et al., 2023).

Não limitados a isso, também há ocorrência dos genes *bla_{CTX-M}* atrelados a transposons (Tn) e plasmídeos que estão intrinsecamente ligados à transferência lateral de genes (TLG)

(Ikhimiukor et al., 2024). A capacidade da *K. pneumoniae* de incorporar genes de resistência à EGMs, por plasmídeos transferíveis, como *IncII* que é o plasmídeo de maior incidência atrelado a genes de carbapenemases e ESBL, permitiu um novo horizonte na versatilidade da bactéria culminando no surgimento e na propagação das cepas resistentes permitindo a ocupação dos primeiro e sexto lugares no ranque de prioridade pela Organização Mundial da Saúde (OMS), *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e a 3ª geração de cefalosporinas (β -lactâmicos) respectivamente (Figura3) (WHO, 2024; Zhou et al., 2023).

Neste cenário, *K. pneumoniae*, por apresentar todos esses aparatos à disposição e essa natureza tenaz, apresenta resistências ESBLs e carbapenemases. Essas resistências aumentaram nas últimas décadas para 60,4% e 50,6% respectivamente em 2809 genomas testados, assim como β -lactâmicos, quinolonas e fosfomicinas sempre estáveis em 80% ou mais (Huang et al., 2025). No entanto a resistência à polimixinas (polimixina B e colistina) se manteve em níveis baixos, cerca de 0 a 3,4%, assim carregando a alcunha uma das últimas alternativas contra infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (Huang et al., 2025).

1.4 Tratamentos de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae*

O manejo das infecções causadas por *K. pneumoniae* requer tanto o controle adequado do foco infeccioso quanto a administração de terapia antibiótica eficaz. A duração do tratamento varia, geralmente, entre duas e seis semanas, dependendo do local acometido, da extensão da infecção, do antimicrobiano utilizado e do perfil do patógeno (CPPAS, 2024; Phd et al., 2012; Shon et al., 2013).

Dessa forma, a escolha empírica da terapia antimicrobiana deve levar em consideração tanto o sítio da infecção quanto os perfis locais de resistência aos antimicrobianos (Russo & Marr, 2019). A terapia deve ser posteriormente ajustada com base nos resultados de sensibilidade *in vitro* obtidos dos isolados clínicos (CPPAS, 2024). Em situações de

endoftalmite (infecção ocular), por exemplo, recomenda-se a administração de aplicações injetáveis antibióticas intravítreas (Durand, 2017).

Os estudos observam um aumento na prevalência de cepas hipervirulentas multirresistentes (hvKp), o que pode estar relacionado ao aumento das infecções associadas à assistência à saúde. Esse cenário agrava o desafio terapêutico, considerando-se a elevada morbidade associada a essas infecções (Gu et al., 2018; Li et al., 2018; Marr & Russo, 2019). Entre as opções que podem ser consideradas estão ceftazidima/avibactam, meropenem/vaborbactam, imipenem/relebactam, eravaciclina, plazomicina, cefiderocol e colistina, no caso do Brasil, polimixina B (Pouch & Patel, 2019; Russo & Marr, 2019). No entanto, essas alternativas devem ser utilizadas com acompanhamento especializado, uma vez que muitas delas não são eficazes contra metalo- β -lactamases enzimas que conferem resistência aos carbapenêmicos e, além disso, a maioria desses agentes ainda não foi avaliada de forma sistemática para o tratamento de infecções por cepas resistentes a carbapenêmicos e todas podem estar sujeitas a perfis de resistência (Pouch & Patel, 2019; Russo & Marr, 2019).

Dito isso, formas alternativas de enfrentamento a esses microrganismos são cada vez mais necessárias, como a concentração na descoberta de novos compostos que atuem sobre sistemas bacterianos, tais como a transdução de sinal, reguladores, virulência ou permeabilização da membrana bacteriana. Embora a maioria das terapias alternativas não promova a eliminação direta dos microrganismos, ao interferirem nos mecanismos de patogênese bacteriana, podem reduzir significativamente a virulência (Wang et al., 2020). Nessas condições, bactérias com virulência atenuada tornam-se mais suscetíveis à eliminação pelo sistema imunológico do hospedeiro ou à ação de antimicrobianos convencionais (Wang et al., 2020). Dessa maneira, o desenvolvimento de trabalhos e produtos sobre combinações de agentes antimicrobianos torna-se viável e necessário.

Assim, os peptídeos antimicrobianos (PAMs), também conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro, têm ganhado destaque como potenciais terapias alternativas, devido à sua eficácia imunomoduladora e à capacidade de atuar tanto isoladamente quanto em testes de combinação com antimicrobianos (Gonçalves et al., 2025). Dito isso, antimicrobianos como a colistina, também conhecida por polimixina E e a polimixina B, que são agentes pensados a base de peptídeos, tem a alcunha de antimicrobianos de último recurso contra bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *K. pneumoniae* e compreendem agentes antimicrobianos lipopeptídico cíclico não ribossomal pertencente à classe dos peptídeos catiônicos (Fernández-García, 2024; Mondal et al., 2024a).

1.5 Peptídeos antimicrobianos

Os PAMs são pequenas proteínas, que variam entre 6 e 50 aminoácidos, produzidas em diferentes tecidos e tipos celulares e são amplamente distribuídas na natureza, geralmente com caráter catiônico e estrutura anfipática, composta por domínios hidrofóbicos e hidrofílicos segregados em solução e podem ser considerados candidatos promissores a antimicrobianos do futuro (Lewies et al., 2019; Oliveira Júnior et al., 2025; Raheem & Straus, 2019). As propriedades que os definem também permitem desempenho de papéis essenciais na defesa do hospedeiro contra uma variedade de patógenos por sua interação com as membranas celulares de microrganismos, promovendo desestabilização da membrana e consequente morte celular (Oliveira Júnior et al., 2025).

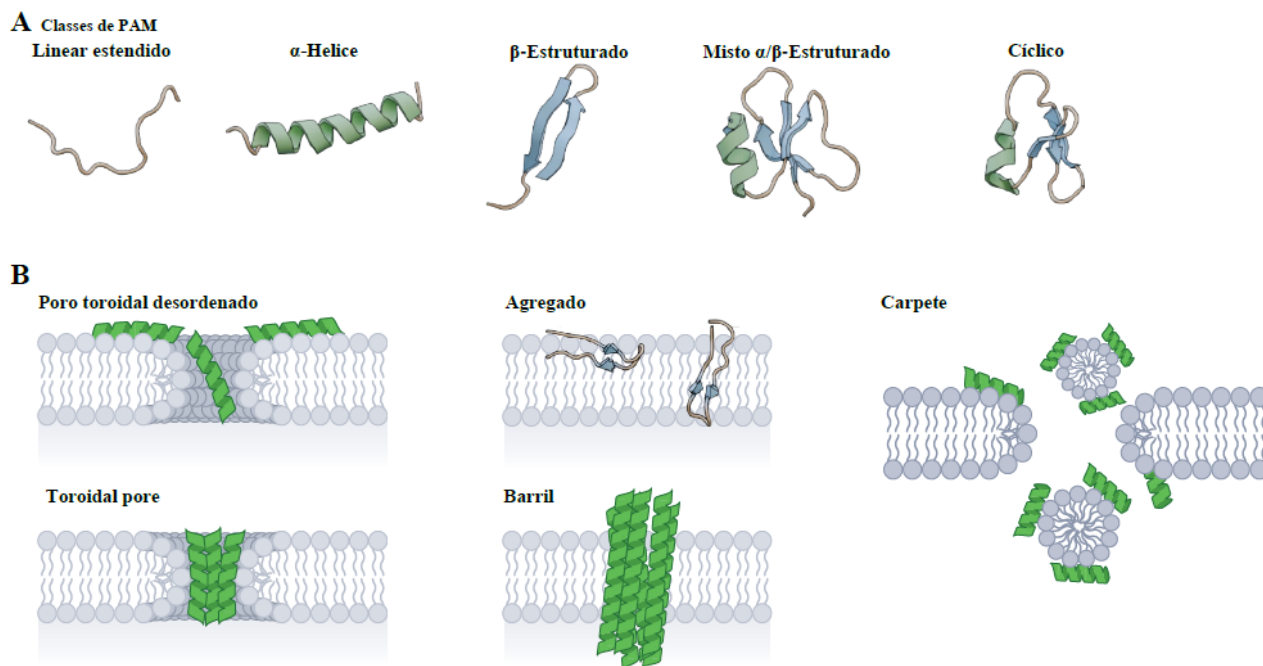


Figura 5. Estruturas e mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos. A. Ilustração dos tipos de estruturas dos peptídeos antimicrobianos. B. Ilustração dos mecanismos de ação na membrana. Adaptado e traduzido de (Oliveira Júnior et al., 2025).

Geralmente organizados em três formas de interagir com a membrana, os PAMs (Figura 4B), sendo o modelo do poro em barril, que descreve a formação de poros verticais através da membrana, nos quais hélices α anfipáticas dos peptídeos antimicrobianos se organizam em agregados de formato de barril (Oliveira Júnior et al., 2025; Zhang et al., 2021). Esses agregados formam canais transmembranares orientados e permeáveis à água (Oliveira Júnior et al., 2025; Zhang et al., 2021). De maneira semelhante, a formação de poros também pode ocorrer segundo o modelo do poro toroidal (Oliveira Júnior et al., 2025; Zhang et al., 2021). Nesse caso, várias moléculas de PAMs interagem com as partes polares dos lipídios, formando uma estrutura contínua que conecta as folhas interna e externa da bicamada lipídica, resultando em poros igualmente permeáveis à água (Oliveira Júnior et al., 2025; Zhang et al., 2021). Também há o

modelo de carpete, que apresenta um mecanismo distinto: os PAMs se alinham paralelamente à superfície da membrana, interagindo com as cabeças de fosfolipídios e distribuindo-se em carpete (Oliveira Júnior et al., 2025; Zhang et al., 2021). À medida que a concentração de peptídeos atinge um limiar crítico, a estrutura da membrana entra em colapso, gerando defeitos e desintegrando-se em micelas (Oliveira Júnior et al., 2025; Zhang et al., 2021).

Os PAMs se apresentam em diversas conformações estruturais que são diretamente associadas às suas funções (Oliveira Júnior et al., 2025). Essas estruturas podem ser (1) lineares estendidas, que são flexíveis, não possuem estruturas secundárias fixas e têm sua ação antimicrobiana baseada em interações com a membrana e na formação de poros, assim comprometendo funções essenciais (Hsu et al., 2005; Koehbach & Craik, 2019; Oliveira Júnior et al., 2025; Sneideris et al., 2023); (2) estruturadas em hélice, são anfipáticas (uma face hidrofílica e outra hidrofóbica), as interações de sua porção hidrofílica com a membrana permitem feixes que formam poros e as regiões hidrofóbicas interagem com os núcleos lipídicos e facilitando a ruptura da membrana (Alzain et al., 2025).

Há peptídeos mistos entre α -hélice e folhas- β sendo principalmente atreladas à atividade antimicrobiana (Alzain et al., 2025; Erdem Büyükkiraz & Kesmen, 2022; Oliveira Júnior et al., 2025); (3) Estruturado em β , são estruturados por folhas- β conectadas por pontes de dissulfeto essenciais para a estabilidade da estrutura e tem sua interação com a membrana também mediada pelas das folhas- β com a membrana formando poros (Alzain et al., 2025; Koehbach & Craik, 2019; Oliveira Júnior et al., 2025); e (4) as formações topográficas, os “cíclicos” são uma classe interessante de peptídeos sintéticos ligados em uma formação entre o C- e N-terminais, “*head to tail* ou cabeça à calda”, por pontes de dissulfeto ou tioéter, que fornecem a essas estruturas uma proteção extra a degradação (Figura 4 A)(Alzain et al., 2025; Koehbach & Craik, 2019; Oliveira Júnior et al., 2025).

A diversidade de PAMs ativos contra cepas resistentes de *K. pneumoniae* tem incentivado sua introdução como novos agentes antimicrobianos para superar a resistência (de Souza et al., 2022). Entretanto, os PAMs também podem estar suscetíveis à capacidade bacteriana de desenvolver resistência, incluindo a de reduzir a interação com os PAMs. As bactérias podem produzir vesículas de membrana externa, polímeros e biofilmes, junto a esses mecanismos também há modificações de carga de membrana, que são o mecanismo mais frequente observado (Gunn et al., 2000; Kim et al., 2018). Essa capacidade de sobrepujar os PAMs também pode ser atribuída à proficiência bacteriana de promover modificações moleculares na membrana, como alterações nos lipopolissacarídeos (LPS), alterações no caráter elétrico da membrana, que pode ficar menos negativo, mitigando a interação com PAMs, de natureza catiônica (Gunn et al., 2000; Nuri et al., 2015).

Nesse contexto, sob a perspectiva de avaliar o perfil de resistência bacteriana induzida frente a um candidato de último recurso, o peptídeo BotrAMP 14 sintetizado por meio de desenho racional, constituído por 14 resíduos de aminoácidos e estrutura em α -hélice com carga +8. Esse peptídeo é derivado da batroxidina, uma molécula significativamente maior, composta por 37 resíduos de aminoácidos, extraída da toxina de *Bothrops atrox*, serpente nativa do Brasil. Assim, o BotrAMP 14 apresenta atividade antimicrobiana contra diversas bactérias, incluindo contra isolados de *K. pneumoniae* (Oliveira et al., 2020). Testado contra as bactérias *E.coli*, *K.pneumoniae* e *S.aureus*, o peptídeo BotrAMP 14 apresentou atividade antimicrobiana em concentrações baixas, os isolados de *K. pneumoniae* estiveram entre os melhores números de concentração inibitória, com desempenhos de concentrações inibitórias mínimas de 6,2 μ M (Oliveira et al., 2020). Dito isso, esse trabalho propôs-se a avaliar a interação, por meio da trajetória evolutiva, da bactéria *K. pneumoniae* com o peptídeo BotrAMP14.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Compreender o perfil de resistência da bactéria *K. pneumoniae* à alternativa terapêutica do peptídeo BotrAMP 14.

2.2 Objetivos Específicos

- Confirmação do peptídeo BotrAMP14 por espectrometria de massa;
- Estabelecer padrões de crescimento bacteriano e as concentrações inibitórias mínimas;
- Induzir, em cepas de *Klebsiella pneumoniae*, um perfil de resistência a peptídeos.
- Avaliar a estabilidade do perfil de resistência bacteriana adquirido;
- Avaliar, em *Klebsiella pneumoniae*, a resistência cruzada entre antimicrobianos e peptídeos antimicrobianos.
- Observar a diferença no perfil de crescimento da cepa bacteriana parental em relação às linhagens induzidas à resistência.

3. Material e Métodos

3.1 Confirmação do peptídeo BotrAMP14 por espectrometria de massa

O peptídeo BotrAMP 14 foi sintetizado pela empresa AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento LTDA a partir da estratégia F-moc, com o uso de 9-fluorenilmetilcarbonila como protetor do grupo amino, foram obtidos peptídeos com alta pureza (> 95%). As massas moleculares e o grau de pureza dos peptídeos sintetizados foram fornecidos pela empresa contratada. A confirmação dos peptídeos cíclicos foi realizada por espectrometria de massas, em que a massa observada deve ser dois íons a menos do que a massa monoisotópica calculada, devido à redução que ocorre nas cisteínas na formação de pontes dissulfeto. Após a síntese, os peptídeos foram diluídos em água ultrapura e confirmados quanto à massa molecular e pureza por espectrometria de massas MALDI-ToF UltraFlex III (Bruker Daltonics, Alemanha), equipada com o laser *Smart Beam™*, controlada pelo software Flexcontrol 3.0. A análise foi realizada por meio do método refletido positivo. O equipamento foi calibrado com o calibrador externo Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics. As amostras foram preparadas em placa de MALDI em proporção de 1:3, com a matriz sendo uma solução de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg. mL⁻¹) em 50% de acetonitrila, 49,7% (v:v) de água ultrapura e 0,3% (v:v) de TFA) (Witherell et al., 2021).

3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizado o ensaio de microdiluição em placa de 96 poços seguindo protocolo do BrCAST (2025) com modificações. Primeiramente, três colônias recém cultivadas em ágar Muller Hinton foram inoculadas em 5 mL de caldo Muller Hinton e colocadas em incubadora shaker a 37°C a 200 rpm, até atingir uma densidade óptica (DO 600) equivalente a 0,5 da escala de McFarland o que representa 1×10^8 UFC.mL⁻¹. Além disso, foi realizada diluições seriadas de BotrAMP 14 de forma a obter

50 µL de cada diluição nos poços da microplaca em triplicata. Em seguida, foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana ajustada ($\sim 1 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹) em cada poço da microplaca contendo os antimicrobianos diluídos, obtendo-se uma concentração bacteriana final de $\sim 5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹. As placas foram então incubadas em incubadora shaker durante 24 h a 80 rpm, e o crescimento bacteriano foi verificado mediante a leitura da DO 600 no leitor de microplacas (Bio-tek PowerWave HT, EUA), com o auxílio do software Gen5 2.0. Durante o ensaio, foi realizado também controle de crescimento bacteriano no meio Muller Hinton triplicatas e poços contendo apenas meio de cultura para confirmação da esterilidade e um controle de atividade antimicrobiana com Colistina (BrCAST, 2025).

3.3 Trajetória Evolutiva da *K. pneumoniae*

Para induzir resistência ao peptídeo BotrAMP 14, a bactéria *K. pneumoniae* foi cultivada em ágar Muller Hinton foi colocada em 5 mL de caldo Muller Hinton e colocadas em incubadora shaker a 37°C a 200 rpm, até atingir uma densidade óptica (DO 600) equivalente a 0,5 da escala de McFarland o que representa 1×10^8 UFC.mL⁻¹. Em seguida, foram inoculados 1 µL da suspensão bacteriana ajustada ($\sim 1 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹) e cultivadas 10 linhagens da bactéria em placas de 96 poços, contendo 99 µL de meio *Mueller-Hinton* caldo suplementado com o peptídeo BotrAMP14. As culturas foram iniciadas com a concentração correspondente à metade da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo (2 µM). A cada quatro dias, a concentração do peptídeo era aumentada em 50% até atingir 15 µM. Diariamente, 1 µL de cada linhagem foi transferido para um novo poço contendo 99 µL do meio Muller Hinton com a nova concentração do peptídeo (BrCAST, 2025; de Souza et al., 2026; Hughes & Andersson, 2025).

3.4 Avaliação da Estabilidade da Resistência Induzida

Para a realização do teste de estabilidade, dez linhagens foram induzidas, nomeadas KPG para controle experimental. Dessas, duas, as persistiram até o limite de concentrações propostas, as linhagens KpG I, KpG IV e a linhagem parental *K. pneumoniae* (ATCC13882) foram inoculadas (1 μL da suspensão bacteriana ajustada a $\sim 1 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), em triplicata, em placas de 96 poços contendo 99 μL de caldo Mueller-Hinton. As culturas foram mantidas sob incubação a 37 °C, a 80 RPM e, a cada 24 h, 1 μL de cada poço foi transferido para um novo poço, contendo 99 μL de meio fresco. Esse procedimento foi repetido por 10 passagens consecutivas (Hughes & Andersson, 2025).

3.5 Avaliação da Resistência Cruzada Frente a Outros Antimicrobianos

Para o teste de resistência cruzada tanto as linhagens resistentes KpG 1 e 4, quanto a parental foram pré-inoculadas em 5 mL de caldo Muller Hinton incubadas em incubadora shaker a 37°C a 200 rpm, até atingir uma densidade óptica (DO 600) equivalente a 0,5 da escala de McFarland o que representa $1 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Então para o perfil de antibiograma as bactérias foram plaqueadas e testadas contra uma bateria de antimicrobianos, sendo AMP - Ampicilina 10, AMI - Amicacina 30, CFZ - Cifazolina 30, CFE - Cefalexina 30, CIP - Ciprofloxacina 05, MPM - Meropenem 10 e TIG - Tigeciclina 15 em discos para conferir um perfil de antibiograma e CIMs para atestar resistência contra colistina, BotrAMP 14 e CotrAMP 14 (BrCAST, 2025).

3.6 Avaliação da Capacidade Biológica

Para a realização do teste de capacidade biológica (*fitness*), foram selecionadas as seguintes cepas bacterianas: a cepa parental, uma cepa controle de placa, que é um clone da parental, KpG 1 e KpG 4. Primeiramente essas três colônias recém cultivadas em ágar Muller

Hinton foram inoculadas em 5 mL de caldo Muller Hinton e colocadas em incubadora shaker a 37°C a 200 rpm, até atingir uma densidade óptica (DO 600) equivalente a 0,5 da escala de McFarland o que representa 1×10^8 UFC.mL⁻¹. Em seguida, 50 µL da suspensão bacteriana são adicionados a 50 µL de caldo Mueller-Hinton, que foram distribuídos aleatoriamente em uma placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 h, com leituras de absorbância realizadas a cada 30 minutos no leitor EON, utilizando o software GEN5 para aquisição dos dados. Ao término da incubação, os dados gerados serão processados pelo software AMiGA (Midani et al., 2021), que analisará as curvas de crescimento bacteriano. Esse processamento permitiu a comparação entre as cepas induzidas (KpG 1 e KpG 4), a cepa controle e a cepa parental, sendo que a cepa controle é um controle de placa para notar alterações de *fitnees* decorrentes do manuseio da bactéria, com base em parâmetros específicos. Entre os aspectos avaliados, estão a capacidade de carga (K), que representa o crescimento máximo que o ambiente é capaz de sustentar, e a área sob a curva (AUC), que expressa o crescimento total observado ao longo do tempo. Também serão analisados a taxa máxima de crescimento (r), correspondente à maior velocidade de multiplicação celular, e o tempo de duplicação, que indica o intervalo necessário para que a população bacteriana dobre de tamanho durante a fase exponencial. Além disso, o software calcula o tempo de latência, ou seja, o período decorrido até o início do crescimento após a inoculação; a taxa máxima de morte, que se refere à velocidade de declínio da população após atingir o pico de crescimento; a morte total, entendida como a perda completa da biomassa; e, por fim, o tempo de adaptação, definido como o intervalo necessário para que a população bacteriana inicie o crescimento (Hughes & Andersson, 2025).

4. Resultados e Discussão

4.1 Confirmação do peptídeo BotrAMP 14 por espectrometria de massa

A síntese do peptídeo foi analisada e sua sequência confirmada por espectrometria de massa, a fim de assegurar a confiabilidade dos ensaios biológicos. O processo de identificação de moléculas por espectrometria de massas, realizado por MALDI-ToF (*Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization – Time of Flight*), é um processo de ionização a laser assistida por matriz e, na atualidade, é amplamente utilizado como técnica analítica em microbiologia, identificação de biomarcadores e proteômica (Andreadi et al., 2025; Li et al., 2022a). A massa esperada do peptídeo BotrAMP 14 sintetizado é de 1957,46. O espectro obtido (Figura 5) apresentou uma massa de 1957,58, com diferença de 0,12, que pode ter se originado no momento da ionização do peptídeo durante o teste (Li et al., 2022b).

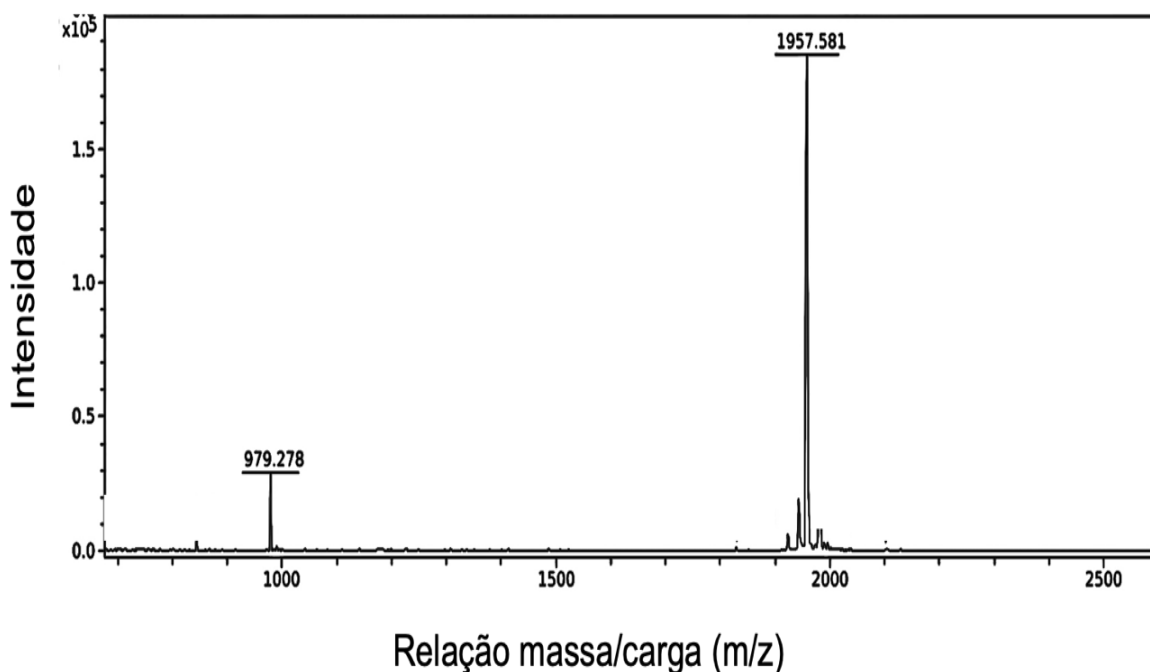


Figura 6. Espectro de massa do peptídeo sintetizado, gerado no equipamento MALDI-ToF, no modo de ionização positiva, usando o ácido α -cianocinâmico como matriz.

BotrAMP14 é um peptídeo α -hélice de carga +8, derivado da batroxicidina, que por meio de desenho racional sofreu uma redução de 20 aminoácidos (a.a) em sua composição, saindo de 34 para 14 aminoácidos, mantendo somente o necessário da estrutura para atividade antimicrobiana, que pode ser atrelada a propensão para formar α -hélice em ambientes de membrana, assim como as interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e pontes salinas (Oliveira et al., 2020; Pérez-Peinado et al., 2018).

4.2 Determinação da concentração inibitória mínima

Para a análise do perfil de resistência da *K. pneumoniae* frente ao peptídeo BotrAMP 14 foi necessário estabelecer um CIM antes de submeter a bactéria a uma trajetória evolutiva, usando como referência induções da literatura (Hughes & Andersson, 2025; Janssen et al., 2021; Xie et al., 2025). Pois as bactérias podem apresentar resistência fenotípica a antimicrobianos, como bombas de efluxo e membranas externas impermeáveis que são características funcionais e estruturais, respectivamente, podendo interferir na determinação capacidade antimicrobiana do agente testado (BrCAST, 2025; Lee et al., 2021; Mora-Ochomogo & Lohans, 2021). Assim como resistência adaptativa que são respostas transitórias reversíveis a fatores de estresse exercidos pelo meio, como privação de nutrientes e concentrações subinibitórias de agentes antimicrobianos (Mora-Ochomogo & Lohans, 2021; Motta et al., 2015). Além da capacidade de transferir genes horizontalmente e da mutação de cromossomos (Ikhimiukor et al., 2024; Mora-Ochomogo & Lohans, 2021; Motta et al., 2015). Antes da trajetória evolutiva, os primeiros testes de micro diluição em placas de 96 poços para determinar o nível de sensibilidade da bactéria, medido pela concentração inibitória mínima (CIM) pré-trajetória mostraram que o perfil inicial de *K. pneumoniae* foi de CIM= 4 μ M do peptídeo antimicrobiano BotrAMP14 e sensível à colistina com CIM= 2 μ M (Figura 6).

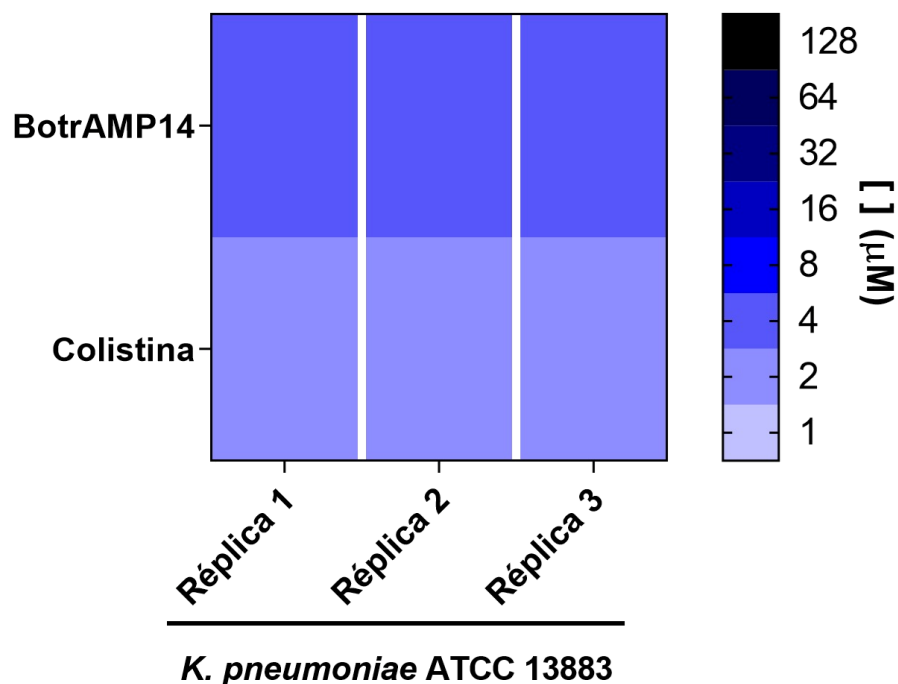


Figura 7. Concentração inibitória mínima do BotrAMP14 frente à cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 em concentrações de 32 a 1 μM .

Os resultados obtidos condizem com os achados na literatura, que mostraram atividade do peptídeo contra isolados de *E. coli* ATCC 25922 e KpC+, com CIM= 3,1 μM e 1,5 μM , respectivamente, *S. aureus* ATCC 25923 e CI, com CIM= 12,5 μM e 3,1 μM , respectivamente e *K. pneumoniae* ATCC 13822 e CI 1445333 com CIM= 6,2 μM em ambas (Oliveira et al., 2020). Estudos recentes avaliavam atividade de BotrAMP14 contra *S. aureus* Aurora, cepa de interesse veterinário (relacionada à mastite bovina), e mostrou que o peptídeo apresenta CIM= 4 μM (Nieto-Marín et al., 2025). Enquanto atividade observada do peptídeo contra o isolado clínico de *K. pneumoniae* (Kp03) mostrou CIM= 4 μM , a atividade de colistina apresentou CIM= 2 μM (BrCAST, 2025; de Souza et al., 2026).

Uma vez determinada a concentração de inibição, foi possível também determinar a concentração subinibitória para o início da trajetória evolutiva, 2 μM , (1/2 CIM), com o

objetivo de progredir o estresse da bactéria contra o peptídeo em concentrações escalonadas com um aumento de metade do estresse anterior (se a primeira concentração é $X \mu\text{M}$, logo, $X + X/2 =$ próxima concentração) afim de ver seu comportamento e capacidade de adquirir resistência ao antimicrobiano (de Souza et al., 2026; Hughes & Andersson, 2025; Yu et al., 2025a).

4.3 Trajetória Evolutiva da *K. pneumoniae*

A partir da cepa parental de *K. pneumoniae*, 10 linhagens foram induzidas à resistência por trajetórias evolutivas independentes, utilizando concentrações subinibitórias crescentes de BotrAMP 14 a partir de $2 \mu\text{M}$ (Figura 8). Ao longo do tempo, observaram-se variações na sobrevivência das diferentes linhagens. Os resultados revelaram que, apenas 20%, duas delas (KpG 1 e KpG 4) mantiveram-se viáveis diante de todos os aumentos sucessivos na concentração do PAM, até o limite de quatro vezes o valor da CIM no término da 24ª passagem (Figura 8).

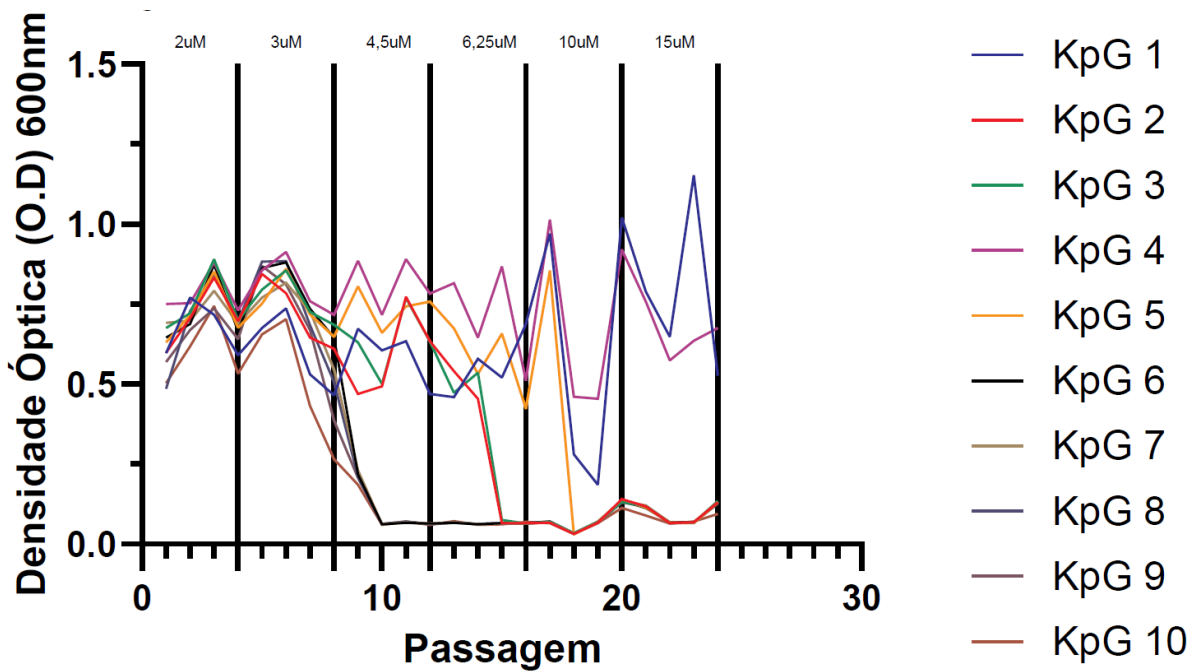


Figura 8. Trajetória evolutiva ao longo de seis rodadas, totalizando 24 dias, das linhagens de *Klebsiella pneumoniae* (KpG 1 a KpG 10) submetidas a concentrações crescentes do peptídeo BotrAMP 14, iniciando em 2 μ M e alcançando 15 μ M, com incrementos a cada quatro dias.

A partir dos dados obtidos, o resultado observado apresentou dissonância outros trabalhos da literatura, que apresentam trajetórias de peptídeos com até 120 gerações em até 60 dias tendo aquisições lentas de resistência bacteriana (Spohn et al., 2019; Yu et al., 2025a). Outros trabalhos na literatura utilizaram como parâmetro o limite de crescimento da bactéria frente ao antimicrobiano, mas devido ao crescimento da *K. pneumoniae* (ATCC13883) mesmo depois de 24 passagens e também por alcançar a marca de quatro vezes o valor da concentração inibitória inicial, foi decidido por não prosseguir com os aumentos (Petersen et al., 2025; Xie et al., 2025).

Os resultados obtidos mostram a capacidade da bactéria em desenvolver mecanismos de resistência frente a PAMs, mesmo com suas ações em múltiplos alvos, e reafirma o lugar de

destaque da *K. pneumoniae* dentre os mais importantes agentes patogênicos objetos de estudo na atualidade (Oliveira Júnior et al., 2025; Spohn et al., 2019; WHO, 2025). Essa desenvoltura em sobrepujar os PAMs também pode ser atribuída à diversos mecanismos, como modificações moleculares na membrana, como alterações nos lipopolissacarídeos (LPS), que alteram o caráter elétrico da membrana, que podem ficar menos negativas, mitigando a interação com PAMs, de natureza catiônica (Gunn et al., 2000; Nuri et al., 2015; Oliveira Júnior et al., 2025). Além disso, outras maneiras estratégicas executadas pelas bactérias envolvem a redução do acesso ao seu alvo por produção de vesículas de membrana externa e biofilmes, que interagem com os PAMs no lugar das membranas (Kim et al., 2018).

Dito isso, as primeiras linhagens que não resistiram ao desafio imposto ao peptídeo foram KpG 6, 7, 8, 9 e 10, que não sobreviveram à concentração de 4,5 μM de BotrAMP 14 (passagem 10, Figura 7), que apresenta a marca de CIM original da bactéria parental (Figura 6). A possível morte foi atrelada à redução da densidade óptica ($D_{600} = 0,005$). Subsequentemente, foi possível observar a morte das linhagens KpG 2 e 3 na concentração de 6,25 μM do peptídeo (passagem 15, Figura 8). A linhagem KpG 5 apresentou morte na concentração = 10 μM , as linhagens KpG 2, 3 e 5 sucumbiram a pressão seletiva imposta pelo PAM, nessa altura 80% das linhagens não resistiu ao teste (passagem 18, Figura 8). Os dados contrapõem parte da literatura, na qual os PAMs sobressaem frente antimicrobianos com elevada eficiência antimicrobiana ao ponto de protelar a aquisição de resistência (Yu et al., 2025a). Assim, mesmo em baixas concentrações, as linhagens mutantes KpG 1, 2, 3, 4 e 5 podem ser consideradas resistentes, conforme a definição da OMS, segundo a qual microrganismos são considerados resistentes quando ultrapassam as concentrações de inibição iniciais. Alguns fatores importantes que podem determinar o sucesso de sobrevivência de mutantes resistentes (Hughes & Andersson, 2017, 2025; Lofton et al., 2013). Incluindo o nível de resistência, fator esse determinado por CIM ou halos em discos de difusão, entretanto tem

um grande espectro de variações dependendo do mecanismo de resistência e das condições sob as quais essa resistência é medida; capacidade ou aptidão biológica (*fitness*), determinados por parâmetros de crescimento e sobrevivência; e a pressão seletiva, sendo o fator mais difícil de determinar e incorporar à modelos preditivos fora de ambiente laboratorial (Hughes & Andersson, 2017, 2025; Lofton et al., 2013).

Após a indução à resistência, pela trajetória evolutiva, foram realizados testes de resistência cruzada, por meio de CIM e de discos de difusão (Figura 9 e Tabela 2 respectivamente). Afim de avaliar as capacidades das linhagens induzidas de sobreviverem à influência de outros agentes antimicrobianos conhecidos na clínica e para observar as novas capacidades de *K. pneumoniae* frente ao peptídeo BotrAMP14, a bactéria foi testada, novamente, contra novas concentrações do peptídeo ao qual foi induzida e outros antimicrobianos, o peptídeo CrotAMP 14 derivado da crotalicidina e aos antimicrobianos colistina, ampicilina, amicacina, cefazolina, cefalexina, ciprofloxacina, estreptomicina, meropenem e tigeciclina.

4.4 Resistência Cruzada

A cepa parental demonstrou um aumento passando para uma CIM = 8 uM, que pode ser atribuído a intemperes do estresse do microrganismo ao manejo constante (BrCAST, 2025; EUCAST, 2019). No entanto, as linhagens mais resistentes obtidas (Figura 8) foram avaliadas quanto às novas capacidades de sobrevivência frente ao peptídeo BotrAMP 14 em comparação com a parental. De maneira surpreendente a linhagem KpG 1 apresentou uma CIM = 32 µM, enquanto a KpG 4 apresentou CIM = 64 µM, aumentos de 4 e 8 vezes maiores que os valores iniciais respectivamente, mostrando um aumento expressivo na resistência, quando comparada aos primeiros testes.

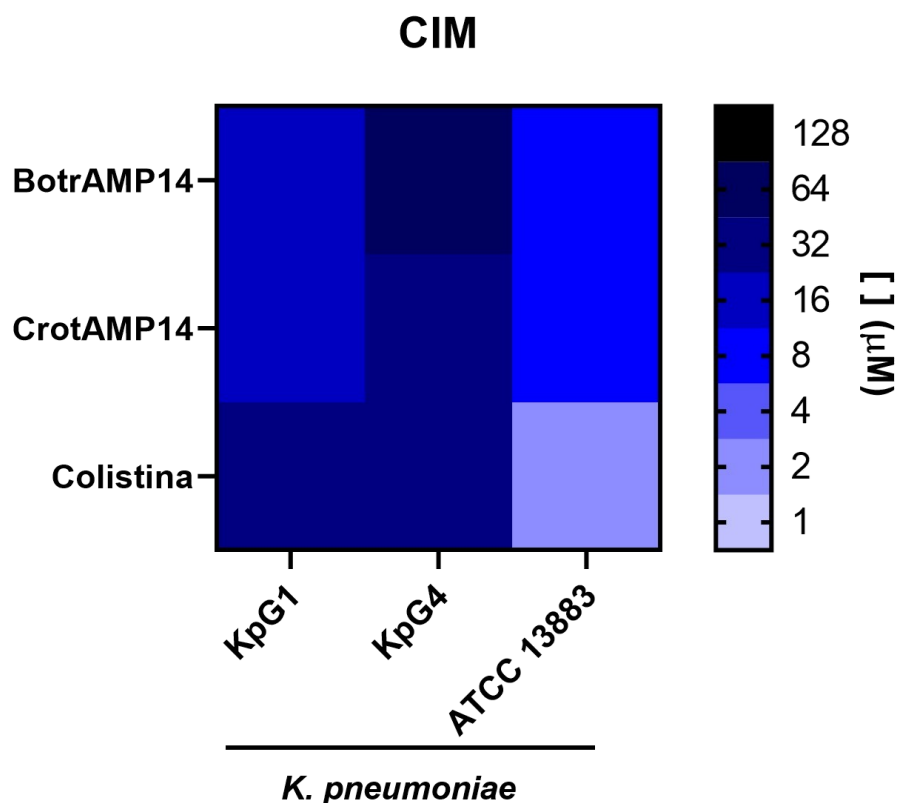


Figura 9. Avaliação de resistência cruzada por micro diluição das cepas de *K. pneumoniae* (KpG 1, 4 e controle) submetidas a concentrações de 1 a 128 μM de BotrAMP 14 e CrotAMP 14; também de 1 a 64 μM de colistina.

Já para o teste de resistência cruzada por microdiluição, foram realizados testes com CrotAMP 14, um peptídeo sintético derivado da crotalicidina e alterado por desenho racional, assim como com BotrAMP 14, para maximizar a eficiência antimicrobiana, e com colistina, um antibiótico baseado em peptídeo. Os resultados obtidos revelaram que a capacidade testada da linhagem parental foi de CIM = 2 μM para colistina = 8 μM para os peptídeos desenhados racionalmente. As cepas resistentes KpG 1 e 4 foram resilientes ao CrotAMP 14 (Figura 9), com aumento de suas CIMs para 16 e 32 μM , respectivamente. Também foram capazes de sobreviver a uma concentração de 32 μM de colistina, um aumento de 16 vezes em relação ao CIM inicial, um aumento também significativo. Tendo em vista as similaridades fundamentais

naturais de composição, tamanho e de carga entre a colistina e os peptídeos desenhados CrotAMP 14 e BotrAMP 14 (Mirshekar et al., 2024; Oliveira Júnior et al., 2025; Poirel et al., 2015). Pois, tanto BotrAMP 14, CrotAMP 14 e a colistina se ligam diretamente às superfícies bacterianas e desencadeiam eventos de perturbação da membrana em bactérias gram-negativas (Mondal et al., 2024b; Oliveira et al., 2020; Velkov et al., 2013).

Os demais antimicrobianos foram avaliados por testes de difusão em disco, e foi possível observar um perfil singular da parental, ao ser sensível à ciprofloxacina (fluoroquinolona), à amicacina (aminoglicosídeo), à tigeciclina (gliciciclinas) e ao meropenem (carbapenêmico - β -lactâmico), e resistente à ampicilina (penicilina - β -lactâmico), ciprofloxacina e cefalexina (cefalosporinas - β -lactâmico). Uma vez que a *K. pneumoniae* pode ser considerada quase universalmente resistente à β -lactâmicos, talvez essas resistências possam ser atrelada à essa capacidade inata da bactéria em carregar genes como *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTMX-M}, que conferem resistência de amplo espectro à β -lactâmicos e podendo ter como exceção os carbapenêmicos, uma vez que essa é classe geralmente relacionados aos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{OXA} (Ghazawi et al., 2025; Lee et al., 2021; Niu et al., 2024; Yang et al., 2023).

Já para as linhagens KpG 1 e 4 induzidas à resistência houveram aquisições de resistência à aminoglicosídeos, carbapenêmicos e gliciciclinas nas duas linhagens, podendo ter relação com genes *Aac3*, *Aac6*, *AadA*, *Aph3-IA* e *Arm* para resistência à aminoglicosídeos; *bla*_{KPC} e *bla*_{OXA} para carbapenêmicos; mecanismos que geram resistência à tigeciclina ainda não foram totalmente elucidados, no entanto genes mutantes do *tet*_A (5R, V55M, I75V, T84A, S201A, F202S, V203F) já foram descritos na literatura relacionados à resistência com tigeciclina (Chirabhundhu et al., 2024; Lee et al., 2021). Em comparação à parental, também há a manutenção nas resistências a penicilinas e cefalosporinas, tendo como uma única divergência nos perfis das linhagens resistentes, a aquisição de resistência à ciprofloxacina na

KpG 4 geralmente relacionados aos genes *Qnr* e *Gyr A* (Tabela 2), demonstrando uma resistência cruzada pós-indução ao peptídeo (Lee et al., 2021; Mirzaii et al., 2018).

Antimicrobianos	Parental	KpG 1	KpG 4
AMP - Ampicilina 10 µg	0 - R	0 - R	0 - R
AMI - Amicacina 30 µg	18 - S	0 - R	0 - R
CFZ - Cifazolina 30 µg	0 - R	0 - R	0 - R
CFE - Cefalexina 30 µg	0 - R	0 - R	0 - R
CIP - Ciprofloxacina 05 µg	23 - S	22 - S	0 - R
MPM - Meropenem 10 µg	16 - S	12 - R	13 - R
TIG - Tigeciclina 15 µg	18 - S	16 - R	10 - R

Tabela 2. Avaliação de resistência cruzada por difusão de disco das cepas de *K. pneumoniae* (KpG 1, 4 e parental) contra antimicrobianos de relevância clínica. Os resultados são expressos pelo diâmetro em milímetros (mm), e pela legenda de (R) para resistente em amarelo, (S) para sensível em azul (BrCAST, 2025).

Mesmo com esses dados alarmantes acerca da capacidade bacteriana, esses microrganismos não são imortais, algumas alternativas utilizadas de tratamento fora a administração de novos compostos, também podem ser terapia combinada, que é amplamente utilizada em contextos clínicos, especialmente no tratamento de organismos multirresistentes,

terapia antibiótica alternada, que em estratégia combinatória que envolve a rotação programada de diferentes antimicrobianos (Ma et al., 2023).

Uma vez estabelecido o novo perfil de resistência das linhagens KpG 1 e 4 foi levantado a questão de durabilidade dessa resistência. A fim de responder essa questão, esses microrganismos foram expostos à um teste de estabilidade e após 10 dias consecutivos recultivando as cepas em placas de 96 poços com meio MH sem aditivos foram refeitos os perfis de resistência dessas bactérias por discos de difusão.

4.5 Avaliação da estabilidade das resistências adquiridas pelas cepas bacterianas

A sensibilidade colateral pode ocorrer durante a evolução da resistência aos antimicrobianos, e experimentos evolutivos em larga escala realizados em laboratório têm sido conduzidos para delinear essas sensibilidades colaterais entre diversas classes de antimicrobianos (Chowdhury & Findlay, 2023; Ma et al., 2023).

Para checar o nível de estabilidade do perfil de resistência pós-trajetória e seus possíveis efeitos colaterais, foram realizados inóculos de 18 h das linhagens resistentes em placas de 96 poços, semeados por 10 dias sem o estímulo estressante do peptídeo, e todos os testes antimicrobianos foram realizados novamente. Em consonância com outros trabalhos em que as linhagens induzidas de *K. pneumoniae* mantiveram seus perfis resistentes aos agentes de estímulo estressante (de Souza et al., 2026). Após a retirada do estímulo, o perfil de resistência dos isolados induzidos mudou completamente. As linhagens KpG 1 e KpG 4 ainda demonstraram resistência frente ao BotrAMP 14, mesmo diminuída, ficou em 8 μ M em KpG 1 e 32 μ M em KpG 4, ao mesmo tempo em que houve um aumento expressivo para CotrAMP 14, que passou de 16 μ M em KpG 1 e 32 μ M em KpG4 para 64 μ M em ambas, e para a

colistina, que se persistiu em 64 μM em ambas as linhagens induzidas (de Souza et al., 2026; Oliveira et al., 2020).

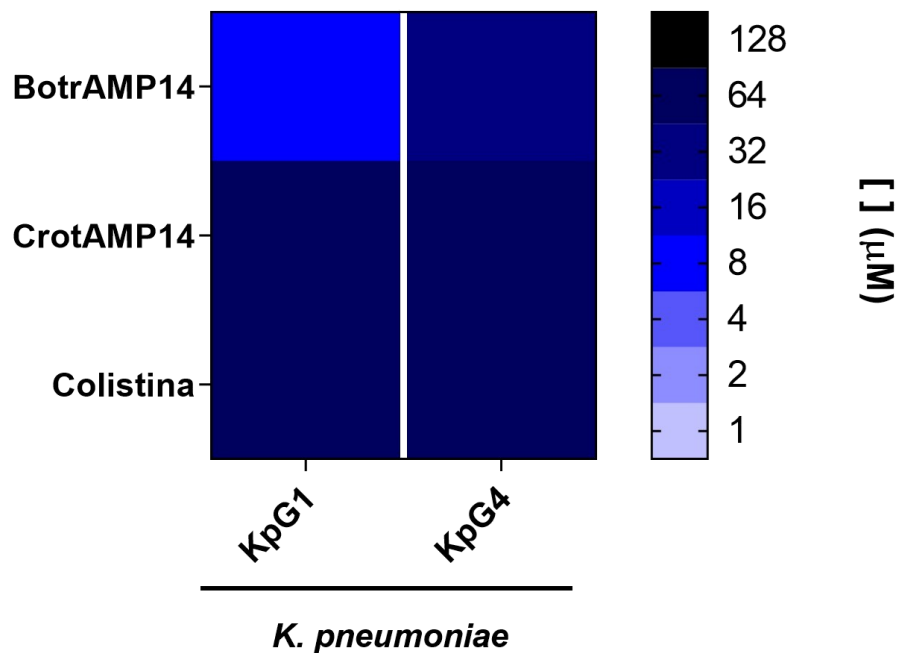


Figura 10. Avaliação de resistência cruzada por micro diluição das cepas de *K. pneumoniae* (KpG 1 e 4) submetidas a concentrações de 1 a 128 μM de BotrAMP 14, CotrAMP 14 e colistina.

Assim, para os resultados obtidos a partir dos testes discos de difusão mostraram alterações em 6 classes de antimicrobianos, sensibilidade colateral à aminoglicosídeos, carbapenêmicos cefalosporinas, fluoroquinolonas e gliciciclinas, mantendo somente sua capacidade inata de resistir à ampicilina (BrCAST, 2025; Mirzaii et al., 2018; Yang et al., 2023).

Antimicrobianos	Parental	KpG 1	KpG 4
AMP - Ampicilina 10 µg	0 - R	0 - R	0 - R
AMI - Amicacina 30 µg	18 - S	19 - S	18 - S
CFZ - Cifazolina 30 µg	0 - R	19 - S	18 - S
CFE - Cefalexina 30 µg	0 - R	15 - S	17 - S
CIP - Ciprofloxacina 05 µg	23 - S	25 - S	22 - S
MPM - Meropenem 10 µg	16 - S	25 - S	25 - S
TIG - Tigeciclina 15 µg	18 - S	18 - S	17 - S

Tabela 3. Avaliação de sensibilidade colateral por difusão em disco das cepas de *K. pneumoniae* (KpG 1, 4 e parental) contra antimicrobianos de relevância clínica. Os resultados são expressos pelo diâmetro em milímetros (mm), e pela legenda de (R) para resistente em amarelo, (S) para sensível em azul (BrCAST, 2025).

No contexto clínico, a disseminação epidêmica da resistência bacteriana tem limitado de forma severa a efetividade da terapia antibiótica na clínica (Yu et al., 2025a). Assim, uma vez que a velocidade de desenvolvimento de novos fármacos é muito inferior à evolução bacteriana, e conseqüentemente a aquisição de resistência aos antimicrobianos, terapias baseadas em sensibilidade colateral também constituem uma solução promissora para o

combate à resistência antimicrobiana (Yu et al., 2025a). Pois a existência de déficits na capacidade ou aptidão biológica (*fitness*) decorrentes da evolução da resistência a um antibiótico inicial podem prejudicar a capacidade das bactérias de se adaptarem a antimicrobianos subsequentes (Chowdhury & Findlay, 2023).

Neste contexto, os dados obtidos neste estudo, juntamente com os dados presentes na literatura, sugerem que os custos de *fitness* associados à resistência aos antimicrobianos impactam diretamente o crescimento bacteriano, tendo, assim, um ônus para esses microrganismos. Interessantemente, esses ônus de crescimento podem ser explorados para retardar a evolução da resistência (de Souza et al., 2026; Yu et al., 2025a).

4.6 Capacidade biológica (*fitness*)

Os custos de *fitness* podem estar relacionados às respostas aos déficits metabólicos inespecíficos. Dessa maneira é possível a medir o *fitness* com base na competição entre as linhagens de interesse ou também na comparação estimativa de parâmetros para o crescimento bacteriano (Chowdhury & Findlay, 2023; Ma et al., 2023; Yu et al., 2025b). Assim, foram realizados testes comparativos de capacidade biológica (*fitness*) entre as linhagens parental, um controle de placa (C1), KpG 1 e 4 para notar os possíveis custos metabólicos da indução à resistência (Tabela 4), todos esses dados foram posteriormente processados pelo *software* AMiGA (Midani et al., 2021). Para isso, as cepas resistentes, controle e parental foram cultivadas sem suplementação de antibiótico por 24 h e foram realizadas leituras de D.O. a 600 nm a cada 30 minutos. As leituras obtidas foram submetidas ao *software* AMiGA, que realiza comparações quantitativas entre os dados das populações fornecidas.

A

Cepa	AAC (log)	T.C	T.L	T.D
<u>Parental</u>	<u>16.331</u>	<u>2.094</u>	<u>0.651</u>	<u>0.331</u>
C1	15.690*	2.035	0.684	0.341
KpG 1	15.470*	1.755*	0.698	0.395*
KpG 4	15.732*	1.746*	0.583	0.398*

Tabela 4. Avaliação da capacidade biológica das cepas de *K. pneumoniae* (KpG 1, 4 e parental) com A.A.C: Área Abaixo da Curva (log), T.C: Taxa de Crescimento (h), T.L: Tempo de fase Lag (h) e T.D: Tempo de Duplicação (h). Em A as cepas C1, KpG 1 e KpG 4 são comparadas com a Parental. B os isolados resistentes KpG 1 e KpG 4 foram comparados com o grupo controle C1. C os isolados KpG 1 e KpG 4 são comparados entre si. Os parâmetros marcados com asterisco (*) têm diferença estatística com confiança de 99%. Os isolados destacados sublinhados e em negrito são o referencial comparativo.

Os resultados obtidos mostram, a área abaixo da curva de crescimento (AAC), que quantifica o total de crescimento da comunidade microbiana ao longo do tempo observado, a taxa de crescimento (T.C), que quantifica o pico do crescimento em hora, por fim, o tempo de fase Lag (T.L), tempo necessário para a comunidade bacteriana começar o crescimento exponencial, e o tempo de duplicação (T.D) é o tempo necessário para a comunidade bacteriana dobrar de tamanho (Chowdhury & Findlay, 2023; Midani et al., 2021).

A partir dos dados, foi possível verificar que o crescimento total das linhagens resistentes diminuiu em 5,27% para a KpG 1 e 3,66% para a KpG4 em relação ao da parental dado pela AAC, assim como também tiveram sua capacidade máxima de crescimento mais baixa do que a parental em 16,18% para KpG 1 e 16,61% para a KpG 4 dado pela diferença de T.C, além de que o tempo de duplicação (T.D) das linhagens resistentes é também significativamente maior sendo 19,33% para a KpG 1 e 20,24% para KpG 4 (Figura 11), assim

foi possível observar que as linhagens resistentes tiveram um aumento significativo de custo metabólico. O tempo de fase lag T.L não deve diferença estatística (tabela 4). O *fitness* relativo da maioria das linhagens evoluídas sob pressão de antimicrobianos e de AMPs é inferior à da linhagem original, sugerindo a existência de custos associados à evolução da resistência (Chowdhury & Findlay, 2023; Yu et al., 2025b).

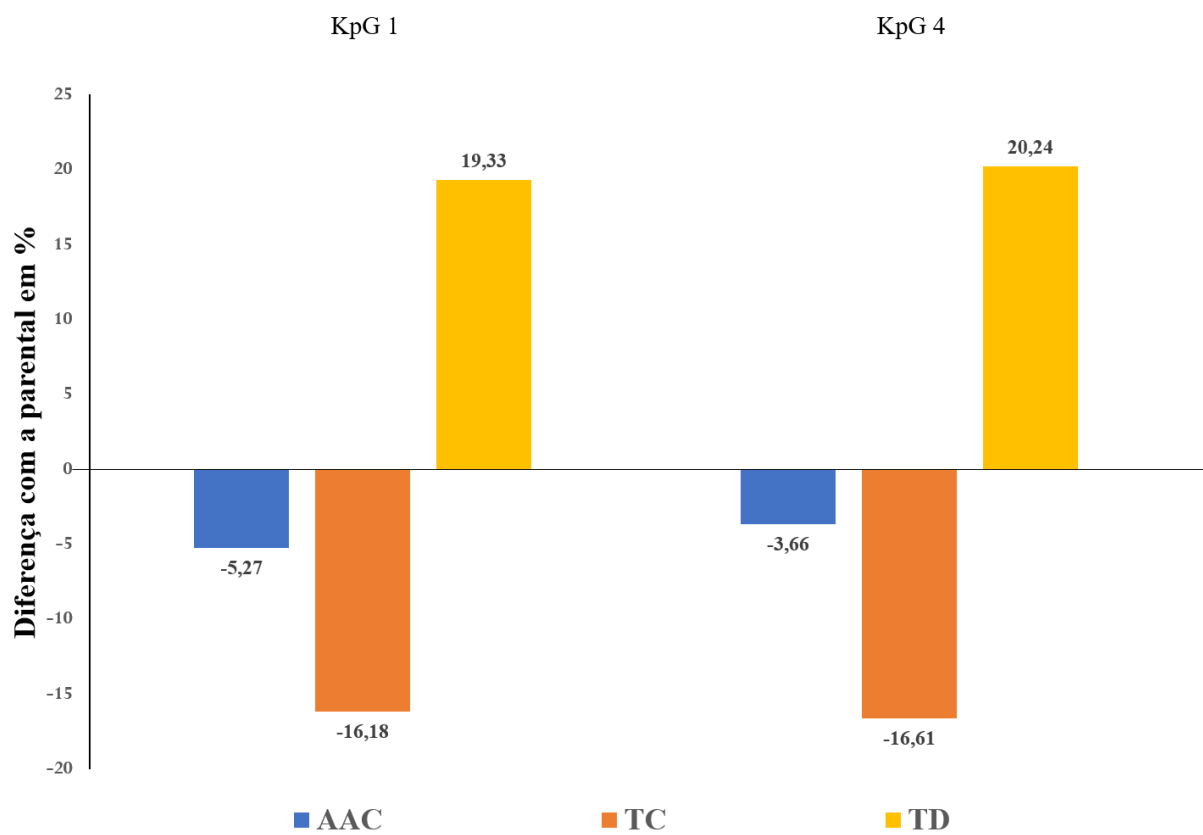


Figura 11. Avaliação da capacidade biológica das cepas de *K. pneumoniae*, diferença em porcentagem na notação do *fitness* da KpG 1 e 4 em comparação a parental. A.A.C: Área Abaixo da Curva (log), T.C: Taxa de Crescimento (h), T.L: Tempo de fase Lag (h) e T.D: Tempo de Duplicação (h).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o peptídeo antimicrobiano BotrAMP14 apresenta atividade inicial contra a bactéria *K.pneumoniae* de CIM= 4 μ M. Após a indução da resistência (24 passagens) atingiu CIM= 64 μ M, mantendo a estabilidade de resistência mesmo depois do período de 10 dias. Durante o período de indução foi observada resistência cruzada à antimicrobianos e outros PAMs. Entretanto a aquisição dessas resistências mostrou um custo metabólico associado ao crescimento bacteriano o que pode estar relacionado a perda de resistência após o período de estabilidade.

5. Conclusões

Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 obteve resistência induzida com sucesso frente ao peptídeo BotrAMP 14;

As linhagens KpG 1 e KpG 4 apresentaram aumentos nos valores de CIM de 4 e 8 vezes maiores que os valores iniciais, respectivamente;

Após a indução à resistência, as linhagens ainda demonstravam sensibilidade a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, gliciciclinas e ao meropenem (carbapenêmico).

As linhagens KpG 1 e KpG 4 não demonstraram sensibilidade compensatória ao manter sua capacidade inata de resistência a β -lactâmicos não carbapenêmicos;

Ambas as linhagens apresentaram resistência induzida estável contra PAMs, mesmo na ausência do agente seletivo;

As linhagens KpG 1 e KpG 4 apresentaram resistência colateral não estável até 24 rodadas de trajetória evolutiva;

As linhagens apresentaram sensibilidade colateral a β -lactâmicos cefalosporinas após a retirada do agente seletivo;

Ambas as linhagens avaliadas apresentaram compensação colateral à aquisição de resistência demonstrada por aumento do custo metabólico;

Considerando a velocidade com que os mecanismos de resistência foram adquiridos, é necessário ressaltar a importância de monitorar e compreender esses processos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas frente a esse patógeno.

6. Referências

- Ahmed, S. K., Hussein, S., Qurbani, K., Ibrahim, R. H., Fareeq, A., Mahmood, K. A., & Mohamed, M. G. (2024). Antimicrobial resistance: impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, 2, 100081. <https://doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100081>
- Alzain, M., Daghistani, H., Shamrani, T., Almoghrabi, Y., Daghistani, Y., Alharbi, O. S., Sait, A. M., Mufrih, M., Alhazmi, W., Alqarni, M. A., Saleh, B. H., Zubair, M. A., Juma, N. A., Niyazi, H. A., Niyazi, H. A., Halabi, W. S., Altalhi, R., Kazmi, I., Altayb, H. N., ... Alfadil, A. (2025). Antimicrobial peptides: mechanisms, applications, and therapeutic potential. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 18, pp. 4385–4426). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S514825>
- Andreadi, A., Tsivelekidou, E., Dermitzakis, I., Theotokis, P., Gargani, S., Meditskou, S., & Manthou, M. E. (2025). Innovations in MALDI-TOF mass spectrometry: bridging modern diagnostics and historical insights. In *Open Life Sciences* (Vol. 20, Number 1). Walter de Gruyter gmbh. <https://doi.org/10.1515/biol-2025-1136>
- Bidewell, C. A., Williamson, S. M., Rogers, J., Tang, Y., Ellis, R. J., Petrovska, L., & abuoun, M. (2018). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* subspecies pneumoniae as a cause of septicaemia in pigs in England. *Plos ONE*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191958>
- Brcast. (2025). Tabela pontos de corte clinico breast.
- Calland, J. K., Haukka, K., Kpordze, S. W., Brusah, A., Corbella, M., Merla, C., Samuelsen, Ø., Feil, E. J., Sasser, D., Karikari, A. B., Saba, C. K. S., Thorpe, H. A., & Corander, J. (2023). Population structure and antimicrobial resistance among *Klebsiella* isolates sampled from human, animal, and environmental sources in Ghana: a cross-sectional genomic One Health study. *The Lancet Microbe*, 4(11), e943–e952. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00208-2)
- Chirabhundhu, N., Luk-In, S., Phuadraksa, T., Wichit, S., Chatsuwat, T., Wannigama, D. L., & Yainoy, S. (2024). Occurrence and mechanisms of tigecycline resistance in carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Thailand. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55705-2>
- Chowdhury, F. R., & Findlay, B. L. (2023). Fitness costs of antibiotic resistance impede the evolution of resistance to other antibiotics. *ACS Infectious Diseases*, 9(10), 1834–1845. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00156>
- CPPAS, S.-D. (2024). Protocolo de tratamento antimicrobiano contra bactérias gram-negativas multirresistentes.
- De Souza, C. M., da Silva, Á. P., Júnior, N. G. O., Martínez, O. F., & Franco, O. L. (2022). Peptides as a therapeutic strategy against *Klebsiella pneumoniae*. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 43, Number 4, pp. 335–348). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.12.006>

De Souza, C. M., Lee, A., Martínez, O. F., Ning, K., da Costa, M. C., Maximiano, M. R., Feitosa, G. C., Neiva, Y., Campos, M., Ramada, M., Alencar, S., Hancock, R. E. W., & Franco, O. L. (2026). Rapid adaptive evolution under combination therapy in *Klebsiella pneumoniae*. *ACS Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5c00934>

Durand, M. L. (2017). Bacterial and fungal endophthalmitis. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 30, Number 3, pp. 597–613). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00113-16>

Erdem Büyükkiraz, M., & Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (amps): A promising class of antimicrobial compounds. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 132, Number 3, pp. 1573–1596). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jam.15314>

Ernst, C. M., Braxton, J. R., Rodriguez-Osorio, C. A., Zagieboylo, A. P., Li, L., Pironti, A., Manson, A. L., Nair, A. V., Benson, M., Cummins, K., Clatworthy, A. E., Earl, A. M., Cosimi, L. A., & Hung, D. T. (2020). Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Medicine*, 26(5), 705–711. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0825-4>

EUCAST. (2019). Redefinição das categorias dos testes de sensibilidade S, I e R. [Www.eucast.org](http://www.eucast.org)

Fernández-García, M. (2024). Understanding the evolutionary potential of mcr-1: growing evidence on costless colistin resistance. In *The Lancet Microbe* (Vol. 5, Number 8). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(24\)00111-3](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(24)00111-3)

Franklin-Alming, F. V., Kaspersen, H., Hetland, M. A. K., Bakksjø, R. J., Nesse, L. L., Leangapichart, T., Löhr, I. H., Telke, A. A., & Sunde, M. (2021). Exploring *Klebsiella pneumoniae* in healthy poultry reveals high genetic diversity, good biofilm-forming abilities and higher prevalence in turkeys Than Broilers. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.725414>

Geetha, P. V., Aishwarya, K. V. L., Mariappan, S., & Sekar, U. (2020). Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Laboratory Physicians*, 12(02), 121–125. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1716478>

Ghazawi, A., Elbediwi, M., Pal, T., Sonnevend, A., Manzoor, A., Habib, I., Al-Marzooq, F., Senok, A., Poirel, L., & Khan, M. (2025). Comparative genomic study of bla_{kpc-2}-carrying multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Arab Emirates. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-29427-y>

Gonçalves, R. M., Monges, B. E. D., Oshiro, K. G. N., Cândido, E. De S., Pimentel, J. P. F., Franco, O. L., & Cardoso, M. H. (2025). Advantages and challenges of using antimicrobial peptides in synergism with antibiotics for treating multidrug-resistant bacteria. In *ACS Infectious Diseases* (Vol. 11, Number 2, pp. 323–334). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00702>

Gu, D., Dong, N., Zheng, Z., Lin, D., Huang, M., Wang, L., Chan, E. W. C., Shu, L., Yu, J., Zhang, R., & Chen, S. (2018). A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30489-9)

Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K., & Miller, S. I. (2000). Genetic and Functional Analysis of a pmra-pmrB-Regulated Locus Necessary for Lipopolysaccharide Modification, Antimicrobial Peptide Resistance, and Oral Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 68, Number 11). <https://journals.asm.org/journal/iai>

Hetland, M. A. K., Winkler, M. A., Kaspersen, H. P., Håkonsholm, F., Bakksjø, R. J., Bernhoff, E., Delgado-Blas, J. F., Brisse, S., Correia, A., Fostervold, A., Lam, M. M. C., Lunestad, B. T., Marathe, N. P., Raffelsberger, N., Samuelsen, Ø., Sunde, M., Sundsfjord, A., Urdahl, A. M., Wick, R. R., ... Holt, K. E. (2025). A genome-wide One Health study of *Klebsiella pneumoniae* in Norway reveals overlapping populations but few recent transmission events across reservoirs. *Genome Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-025-01466-0>

Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T. R., Hsu, L. Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M. B., Edwards, D. J., Van Nguyen, K., Nguyen, T. V., Dao, T. T., ... Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), E3574–E3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>

Hsu, C. H., Chen, C., Jou, M. L., Lee, A. Y. L., Lin, Y. C., Yu, Y. P., Huang, W. T., & Wu, S. H. (2005). Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: Evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic Acids Research*, 33(13), 4053–4064. <https://doi.org/10.1093/nar/gki725>

Huang, X., Yao, X., Hou, Y., Zhang, D., Xie, R., Shi, C., Shang, Y., Bi, H., Song, W., Hua, L., Li, C., Chen, H., Wu, B., & Peng, Z. (2025). Global trends of antimicrobial resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* from different host sources. *Communications Medicine*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s43856-025-01112-1>

Hughes, D., & Andersson, D. I. (2017). Evolutionary Trajectories to antibiotic resistance. 38, 9. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816>

Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 51, pp. 72–80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>

Ikhimiukor, O. O., Zac Soligno, N. I., Akintayo, I. J., Marcovici, M. M., Souza, S. S. R., Workman, A., Martin, I. W., & Andam, C. P. (2024). Clonal background and routes of plasmid transmission underlie antimicrobial resistance features of bloodstream *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51374-x>

Janssen, A. B., Doorduyn, D. J., Mills, G., Rogers, M. R. C., Bonten, M. J. M., Rooijackers, S. H. M., Willems, R. J. L., Bengoechea, J. A., & van Schaik, W. (2021). Evolution of colistin resistance in the *Klebsiella pneumoniae* complex follows multiple evolutionary trajectories with variable effects on fitness and virulence characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01958-20>

Kim, S. W., Park, S. Bin, Im, S. P., Lee, J. S., Jung, J. W., Gong, T. W., Lazarte, J. M. S., Kim, J., Seo, J. S., Kim, J. H., Song, J. W., Jung, H. S., Kim, G. J., Lee, Y. J., Lim, S. K., & Jung, T.

S. (2018). Outer membrane vesicles from β -lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of β -lactam-susceptible *E. coli* in the presence of β -lactam antibiotics. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23656-0>

Koehbach, J., & Craik, D. J. (2019). The vast structural diversity of antimicrobial peptides. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 40, Number 7, pp. 517–528). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.04.012>

Lee, A. H. Y., Porto, W. F., de Faria, C., Dias, S. C., Alencar, S. A., Pickard, D. J., Hancock, R. E. W., & Franco, O. L. (2021). Genomic insights into the diversity, virulence and resistance of *Klebsiella pneumoniae* extensively drug resistant clinical isolates. *Microbial Genomics*, 7(8). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000613>

Letek, M. (1928). Alexander Fleming, The discoverer of the antibiotic effects of penicillin.

Lewies, A., Du Plessis, L. H., & Wentzel, J. F. (2019). Antimicrobial peptides: the achilles' heel of antibiotic resistance? *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 370–381. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9465-0>

Li, D., Yi, J., Han, G., & Qiao, L. (2022a). MALDI-TOF mass spectrometry in clinical analysis and research. In *ACS Measurement Science Au* (Vol. 2, Number 5, pp. 385–404). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00019>

Li, J., Ren, J., Wang, W., Wang, G., Gu, G., Wu, X., Wang, Y., Huang, M., & Li, J. (2018). Risk factors and clinical outcomes of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced bloodstream infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37(4), 679–689. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3160-z>

Lofton, H., Pranting, M., Thulin, E., & Andersson, D. I. (2013). Mechanisms and Fitness Costs of Resistance to Antimicrobial Peptides LL-37, CNY100HL and Wheat Germ Histones. *Plos ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068875>

Ma, X., Xi, W., Yang, D., Zhao, L., Yu, W., He, Y., Ni, W., & Gao, Z. (2023). Collateral sensitivity between tetracyclines and aminoglycosides constrains resistance evolution in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Drug Resistance Updates*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100961>

Marr, C. M., & Russo, T. A. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new public health threat. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 17, Number 2, pp. 71–73). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1555470>

Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Number JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>

Midani, F. S., Collins, J., & Britton, R. A. (2021). Amiga: software for automated analysis of microbial growth assays. *Msystems*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/msystems.00508-21>

Mirshekar, M., Zadeh, R. G., Moghadam, M. T., Shahbazi, S., & Masjedjan Jazi, F. (2024). Upregulation of pmra, pmrb, pmrc, phoq, phop, and arnt genes contributing to resistance to

colistin in superbug *Klebsiella pneumoniae* isolates from human clinical samples in Tehran, Iran. *New Microbes and New Infections*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2024.101275>

Mirzaii, M., Jamshidi, S., Zamanzadeh, M., Marashifard, M., Malek Hosseini, S. A. A., Haeili, M., Jahanbin, F., Mansouri, F., Darban-Sarokhalil, D., & Khoramrooz, S. S. (2018). Determination of gyra and parC mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinary tract infection in Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.04.017>

Mondal, A. H., Khare, K., Saxena, P., Debnath, P., Mukhopadhyay, K., & Yadav, D. (2024a). A review on colistin resistance: an antibiotic of last resort. in microorganisms (Vol. 12, Number 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040772>

Mondal, A. H., Khare, K., Saxena, P., Debnath, P., Mukhopadhyay, K., & Yadav, D. (2024b). A review on colistin resistance: an antibiotic of last resort. In *Microorganisms* (Vol. 12, Number 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040772>

Mora-Ochomogo, M., & Lohans, C. T. (2021). B-Lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: From covalent inhibitors to substrates. In *RSC Medicinal Chemistry* (Vol. 12, Number 10, pp. 1623–1639). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d1md00200g>

Motta, S. S., Cluzel, P., & Aldana, M. (2015). Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. *Plos ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118464>

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., mcmanigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Robles Aguilar, G., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., ... Murray, C. J. L. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 404(10459), 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)

Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, Number 3, pp. 252–275). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>

Nieto-Marín, V., Fernandez-Soliz, I. A., Arboleda Valencia, J. W., Pletzer, D., Buccini, D. F., & Franco, O. L. (2025). Cell-Derived nanocarriers of apoptotic bodies with an antimicrobial peptide for targeting intracellular *S. aureus* infections. *ACS Applied Bio Materials*, 8(11), 9875–9892. <https://doi.org/10.1021/acsabm.5c01222>

Niu, H., Gu, J., & Zhang, Y. (2024). bacterial persisters: molecular mechanisms and therapeutic development. in signal transduction and targeted therapy (Vol. 9, Number 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01866-5>

Nuri, R., Shprung, T., & Shai, Y. (2015). Defensive remodeling: How bacterial surface properties and biofilm formation promote resistance to antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(11), 3089–3100. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.05.022>

Oliveira Júnior, N. G., Souza, C. M., Buccini, D. F., Cardoso, M. H., & Franco, O. L. (2025). Antimicrobial peptides: structure, functions and translational applications. In *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01200-y>

Oliveira, N. G. J., Cardoso, M. H., Velikova, N., Giesbers, M., Wells, J. M., Rezende, T. M. B., de Vries, R., & Franco, O. L. (2020). Physicochemical-guided design of cathelicidin-derived peptides generates membrane active variants with therapeutic potential. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66164-w>

Pérez-Peinado, C., Dias, S. A., Domingues, M. M., Benfield, A. H., Freire, J. M., Rádís-Baptista, G., Gaspar, D., Castanho, M. A. R. B., Craik, D. J., Henriques, S. T., Veiga, A. S., & Andreu, D. (2018). Mechanisms of bacterial membrane permeabilization by crotalicidin (Ctn) and its fragment Ctn(15–34), antimicrobial peptides from rattlesnake venom. *Journal of Biological Chemistry*, 293(5), 1536–1549. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000125>

Petersen, S., Diricks, M., Utpatel, C., Schulenburg, H., & Merker, M. (2025). Evolution of beta-lactam resistance causes fitness reductions and several cases of collateral sensitivities in the human pathogen *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.00576-25>

Phd, S., Yeh, K.-M., Lin, J.-C., Chang, F.-Y., Chang, F.-Y., Siu, L. K., Yeh, K.-M., Lin, J.-C., & Fung, C.-P. (2012). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. In *National Health Research Institutes* (Vol. 12). www.thelancet.com/infection

Poirel, L., Jayol, A., Bontron, S., Villegas, M. V., Ozdamar, M., Türkoglu, S., & Nordmann, P. (2015). The mgrb gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(1), 75–80. <https://doi.org/10.1093/jac/dku323>

Pouch, S. M., & Patel, G. (2019). Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections in solid organ transplant recipients—Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical Transplantation*, 33(9). <https://doi.org/10.1111/ctr.13594>

Pu, D., Zhao, J., Chang, K., Zhuo, X., & Cao, B. (2023). “Superbugs” with hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*: the rise of such emerging nosocomial pathogens in China. In *Science Bulletin* (Vol. 68, Number 21, pp. 2658–2670). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2023.09.040>

Raheem, N., & Straus, S. K. (2019). Mechanisms of action for antimicrobial peptides with antibacterial and antibiofilm functions. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02866>

Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 2019 May 15;32(3):e00001-19. doi: 10.1128/CMR.00001-19.

Shon, A. S., Bajwa, R. P. S., & Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. Virulence, 4(2), 107–118. <https://doi.org/10.4161/viru.22718>

Sneideris, T., Erkamp, N. A., Ausserwöger, H., Saar, K. L., Welsh, T. J., Qian, D., Katsuya-Gaviria, K., Johncock, M. L. L. Y., Krainer, G., Borodavka, A., & Knowles, T. P. J. (2023). Targeting nucleic acid phase transitions as a mechanism of action for antimicrobial peptides. Nature Communications, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42374-4>

Spohn, R., Daruka, L., Lázár, V., Martins, A., Vidovics, F., Grézal, G., Méhi, O., Kintses, B., Számel, M., Jangir, P. K., Csörgő, B., Györkei, Á., Bódi, Z., Faragó, A., Bodai, L., Földesi, I., Kata, D., Maróti, G., Pap, B., ... Pál, C. (2019). Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. Nature Communications, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12364-6>

Stennett, H. L., Back, C. R., & Race, P. R. (2022). Derivation of a precise and consistent timeline for antibiotic Development. Antibiotics, 11(9). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091237>

Ugwu, M. C., Shariff, M., Nnajide, C. M., Beri, K., Okezie, U. M., Iroha, I. R., & Esimone, C. O. (2020). Phenotypic and molecular characterization of β -lactamases among enterobacterial uropathogens in southeastern Nigeria. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5843904>

Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., & Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: New insights into an 'old class of antibiotics. Future Microbiology, 8(6), 711–724. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.39>

Volkov, S. (2024). WHO List of medically important antimicrobials a risk management tool for mitigating antimicrobial resistance due to non-human use. <https://iris.who.int/>.

Wang, C. H., Hsieh, Y. H., Powers, Z. M., & Kao, C. Y. (2020). Defeating antibiotic-resistant bacteria: Exploring alternative therapies for a post-antibiotic era. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 21, Number 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21031061>

WHO. (2017). Drug-resistant infections a threat to our Economic Future. www.worldbank.org

WHO. (2022). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (glass) report.

WHO. (2023, November). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

WHO. (2024). WHO _ Bacterial priority pathogens list 2024.

WHO. (2025). Analysis of antibacterial agents in clinical and preclinical development Overview and analysis 2025. <https://iris.who.int/>.

Witherell, K. S., Price, J., Bandaranayake, A. D., Olson, J., & Call, D. R. (2021). *In vitro* activity of antimicrobial peptide CDP-B11 alone and in combination with colistin against colistin-resistant and multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81140-8>

WOAH. (2025). Annual Report on Antimicrobial Agents Intended for Use in Animals. 9th Report. <https://doi.org/10.20506/woah.3584>

Xie, P., Liu, J., Feng, Y., Zhao, T., Niu, W., Fang, Y., Zhang, X., Zhao, X., Wang, F., & Yuan, X. (2025). Evolution and characteristics of tetracycline resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, 13(7). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03398-24>

Yang, M., Liu, D., Li, X., Xiao, C., Mao, Y., He, J., Feng, J., & Wang, L. (2023). Characterizations of blactx-M-14 and blactx-M-64 in a clinical isolate of *Escherichia coli* from China. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1158659>

Yu, F., Wang, D., Zhang, H., Wang, Z., & Liu, Y. (2025a). Evolutionary trajectory of bacterial resistance to antibiotics and antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Msystems*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/msystems.01700-24>

Yu, F., Wang, D., Zhang, H., Wang, Z., & Liu, Y. (2025b). Evolutionary trajectory of bacterial resistance to antibiotics and antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Msystems*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/msystems.01700-24>

Zhang, S., Ma, M., Shao, Z., Zhang, J., Fu, L., Li, X., Fang, W., & Gao, L. (2021). Structure and formation mechanism of antimicrobial peptides temporin b-and l-induced tubular membrane protrusion. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20). <https://doi.org/10.3390/ijms222011015>

Zhou, Y., Yang, Y., Li, X., Tian, D., Ai, W., Wang, W., Wang, B., Kreiswirth, B. N., Yu, F., Chen, L., & Jiang, X. (2023). Exploiting a conjugative endogenous CRISPR-Cas3 system to tackle multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ebiomedicine*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104445>

Zhu, Y., Huang, W. E., & Yang, Q. (2022). Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 15, pp. 735–746). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S345574>

7. Produção científica



Open Access

This article is licensed under [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

<http://pubs.acs.org/journal/acsodf>

Article

Anti-Staphy Peptides Rationally Designed from Cry10Aa Bacterial Protein

Thuanny Borba Rios, Mariana Rocha Maximiano, Fabiano Cavalcanti Fernandes, Gabriella Cavalcante Amorim, William Farias Porto, Danieli Fernanda Buccini, Valentina Nieto Marín, Gabriel Cidade Feitosa, Carlos Daniel Pereira Freitas, Juliana Bueno Barra, Antonio Alonso, Maria Fátima Grossi de Sá, Luciano Morais Lião,* and Octávio Luiz Franco*

Cite This: *ACS Omega* 2024, 9, 29159–29174

Read Online

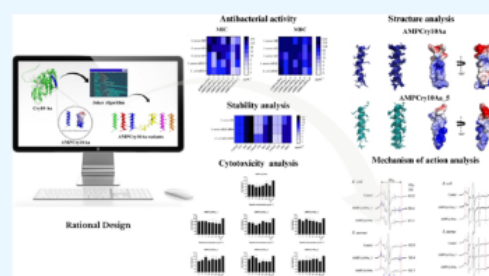
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Bacterial infections pose a significant threat to human health, constituting a major challenge for healthcare systems. Antibiotic resistance is particularly concerning in the context of treating staphylococcal infections. In addressing this challenge, antimicrobial peptides (AMPs), characterized by their hydrophobic and cationic properties, unique mechanism of action, and remarkable bactericidal and immunomodulatory capabilities, emerge as promising alternatives to conventional antibiotics for tackling bacterial multidrug resistance. This study focuses on the Cry10Aa protein as a template for generating AMPs due to its membrane-penetrating ability. Leveraging the Joker algorithm, six peptide variants were derived from α -helix 3 of Cry10Aa, known for its interaction with lipid bilayers. In vitro, antimicrobial assays determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) required for inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Time-kill kinetics were performed using the parental peptide AMPCry10Aa, as well as AMPCry10Aa_1 and AMPCry10Aa_5, against *E. coli* ATCC, *S. aureus* 111 and *S. aureus* ATCC strains showing that AMPCry10Aa_1 and AMPCry10Aa_5 peptides can completely reduce the initial bacterial load with less than 2 h of incubation. AMPCry10Aa_1 and AMPCry10Aa_5 present stability in human serum and activity maintenance up to 37 °C. Cytotoxicity assays, conducted using the MTT method, revealed that all of the tested peptides exhibited cell viability >50% (IC50). The study also encompassed evaluations of the structure and physical-chemical properties. The three-dimensional structures of AMPCry10Aa and AMPCry10Aa_5 were determined through nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, indicating the adoption of α -helical segments. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy elucidated the mechanism of action, demonstrating that AMPCry10Aa_5 enters the outer membranes of *E. coli* and *S. aureus*, causing substantial increases in lipid fluidity, while AMPCry10Aa slightly increases lipid fluidity in *E. coli*. In conclusion, the results obtained underscore the potential of Cry10Aa as a source for developing antimicrobial peptides as alternatives to conventional antibiotics, offering a promising avenue in the battle against antibiotic resistance.



INTRODUCTION

Bacterial infections, due to their rising occurrence and dissemination, pose a hazard to human health and a severe concern for healthcare systems.¹ Emerging and re-emerging infectious diseases have been identified as one of the greatest public health issues in the last three decades, and despite modern health care, bacterial infectious diseases remain one of the leading causes of global mortality.²

Staphylococcus aureus is a Gram-positive opportunistic pathogen responsible for several diseases, ranging from skin infections and abscesses to much more severe endocarditis, osteomyelitis, pneumonia, meningitis, and sepsis.^{3–5} Resistance to currently used antibiotics, such as methicillin, vancomycin,

daptomycin, and linezolid, is a serious issue in staphylococcal infection treatment.^{6–8} Antimicrobial resistance is a natural phenomenon produced by exposure of microorganisms to antibiotic molecules and has been treated as one of the greatest threats to public health in the 21st century.^{9,10} Selective pressure

Received: September 26, 2023

Revised: June 3, 2024

Accepted: June 5, 2024

Published: June 19, 2024



ACS Publications

© 2024 The Authors. Published by American Chemical Society

29159

<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07455>
ACS Omega 2024, 9, 29159–29174

See <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> for options on how to legitimately share published articles.



Contents lists available at ScienceDirect

Sensing and Bio-Sensing Research

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

Nanosensors for animal infectious disease detection

Thuanny Borba Rios^{a,b}, Mariana Rocha Maximiano^{a,b}, Gabriel Cidade Feitosa^b,
Martin Malmsten^{c,d}, Octávio Luiz Franco^{a,b,*}

^a S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

^c Department of Pharmacy, University of Copenhagen, DK-2100 Copenhagen, Denmark

^d Physical Chemistry 1, University of Lund, S-221 00 Lund, Sweden

ARTICLE INFO

Keywords:

Agribusiness
Animal health
Diagnostic
Immunosensors
Nanoparticles
Nanosensors
Nanotechnology
Peptides

ABSTRACT

Infectious diseases in farm animals triggered by pathogenic microorganisms affect the health and well-being of livestock and human populations. Pathogen detection is an important step for the successful diagnosis, treatment and control of infectious diseases in animals. Pathogens that persist in the poultry and livestock industries can be responsible for more than 70% of emerging infections. Thus, rapid diagnostic tools are extremely important. In recent years, nanotechnology has emerged as a great opportunity to tackle this challenge and to develop fast, accurate and economical diagnostics for the detection of pathogens. Various nanostructures, due to the presence of unique characteristics shown in nanomaterials, have already been applied in biodiagnostics to detect specific molecular targets, including pathogen detection. In this context, this review focuses on the application, role and challenges of nanosensors in detecting disease-causing pathogens in agriculture. Several nanostructures are investigated for their utility in providing innovative solutions for pathogen detection in farm animals. This comprehensive examination seeks to unravel the intricate nanosensors landscape, shedding some light on their role in advancing diagnostic capabilities within the agricultural domain. By elucidating the challenges inherent in their application, the review contributes to the ongoing discourse on harnessing nanotechnology for the detection and management of infectious diseases in livestock, ultimately paving the way for developments in veterinary diagnostics.

1. Introduction

Mirroring the immense increase in the world population, the demand for animal origin food products is increasing and projected to double by 2050 [1]. This increase in demand for food points toward an imbalance in relation to supply, which must be addressed if food supply and security is to be preserved [2]. Even temporary interruptions in animal production can have severe consequences, triggering a cascade of harmful events and impairing the supply balance of animal-based proteins for the human population [3,4]. In this scenario, infectious agents that can cause animal diseases are the ones which pose the largest threat to the stability of world production systems [5,6] and can impact animal welfare, reducing potential production and cost-effectiveness, in addition to having potential environmental and biodiversity consequences worldwide [7,8].

Pathogens can cause infectious diseases that display symptoms with onsets ranging from minutes to hours or even days after the original infection [9,10]. These infections can spread to healthy animals from an affected animal or vector [9]. Correct and efficient diagnosis of disorders is further precluded by the complexity and diversity of disease-causing microorganisms, as well as by the lengthy incubation periods of some of these agents prior to the onset of disease symptoms. Adding to this, a wide range of pathogens cause diseases, including bacteria, viruses, fungi, protozoa, parasitic worms, and prions, with bacteria having the greatest influence on the animal food supply chain [9]. Bacterial infections can present a threat to human and animal health and are one of the most common causes of death worldwide due to an increasing incidence and spread [11]. Bacterial infections were shown to be responsible for 7.7 million fatalities in 2019, which equates to one-eighth of all global deaths and elevates bacterial infections to the

* Corresponding author at: Universidade Católica de Brasília, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, SGAN 916N – Av. W5 – Campus II – Modulo C, Brasília-DF, Brazil.

E-mail address: ocfranco@gmail.com (O.L. Franco).

<https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2024.100622>

Received 26 September 2023; Received in revised form 24 December 2023; Accepted 1 February 2024

Available online 4 February 2024

2214-1804/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Unlocking Nature's Shield: The Promising Potential of CRISPRa in Amplifying Antimicrobial Peptide Expression in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Mariana Rocha Maximiano, Lucas José de Sousa, Gabriel Cidade Feitosa, Maria Eduarda Melo Lopes, Brisa Ortega, Raquel dos Santos Madeiro, Fabiano Touzjian Pinheiro Kohlrausch Távora, Bruna Medeiros Pereira, Osmundo Brilhante de Oliveira Neto, Cirano José Ulhôa, Ana Cristina Miranda Brasileiro, Francisco José Lima Aragão, Angela Mehta,* and Octávio Luiz Franco*

Cite This: *ACS Omega* 2025, 10, 5909–5918

Read Online

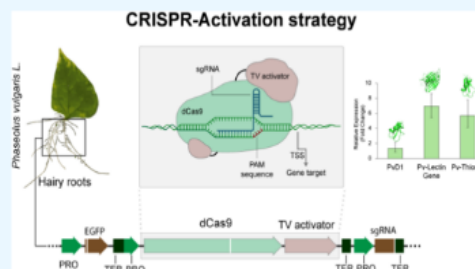
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: This study proposes using the CRISPR transcriptional activation strategy to modulate the expression of genes encoding defense proteins and antimicrobial peptides (AMPs) in *Phaseolus vulgaris*. Three genes (PvD1, Pv-thionin, and Pv-lectin) were selected and targeted by the CRISPR–dCas9–TV-mediated transcriptional activation complex in the *P. vulgaris* L. hairy root. RT-qPCR investigated their activation efficiency. The eGFP-positive transgenic hairy roots exhibit enhanced expression of targeted genes compared to that of control roots. A moderate increase of 1.37-fold in PvD1 gene expression was observed in transgenic hairy roots, while 6.97-fold (Pv-lectin) and 5.70-fold (Pv-thionin) increases were observed. Importantly, no off-target effects of sgRNAs were detected, ensuring the precision and safety of the CRISPR–dCas9–TV strategy. The present article is a proof-of-concept study, and it has succeeded in demonstrating the efficiency of the CRISPR–dCas9–TV strategy in modulating the expression of target genes in *P. vulgaris*, paving the way for an alternative approach to protecting such essential crop plants.



1. INTRODUCTION

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) can source numerous human nutrients, including proteins, carbohydrates, and minerals.¹ According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), global common bean production in the form of dry seeds was around 27.7 million tons in 2021.² Nonetheless, diseases caused by phytopathogens have led to severe grain yield losses worldwide.³ Throughout evolution, plants have coevolved with a wide range of phytopathogens that are currently responsible for essential diseases in common beans. These include several bacteria, such as *Clavibacter michiganensis* (bacterial leaf yellowing of bean),⁴ *Curtobacterium flaccumfaciens* (bacterial wilt),⁵ *Erwinia chrysanthemi* (soft rot disease),^{6,7} *Pseudomonas syringae* (halo blight disease),⁸ and *Xanthomonas* spp. (common bacterial blight),⁹ and fungi such as *Fusarium solani* (Fusarium root rot), *Macrophomina phaseolina* (charcoal rot of bean), *Rhizoctonia solani* (Rhizoctonia root rot), and *Sclerotinia sclerotiorum* (white mold).¹⁰

Plant–pathogen interactions may result in refined plant defense mechanisms, which include physical barriers, phytohormone signaling, and polypeptide compound synthesis. The physical barriers, such as waxy cuticular layers and trichomes,

can make initial phytopathogen infection more difficult.¹¹ The signaling of defense-related phytohormone pathways, including ethylene (ET), salicylic acid (SA), and jasmonic acid (JA), and the complex crosstalk between these pathways play a direct role in the regulation of pathogen resistance responses in plants.¹² Moreover, the synthesis of polypeptide compounds can initiate immune response cascades through signal transduction and processes of pathogen recognition.¹³ Among such polypeptides synthesized in response to biotic stresses are the antimicrobial peptides (AMPs) and proteins, which may establish general chemical barriers, acting as the primary line of defense against phytopathogens.^{4,14,15}

Recent studies have been reinforcing the importance of antimicrobial peptides (AMPs) in plant defense mechanisms.^{4,16–19} Studies also examined the structure, biological function, and transgenic applications of defensins and thionins,

Received: October 28, 2024

Revised: January 13, 2025

Accepted: January 22, 2025

Published: February 6, 2025



Rapid Adaptive Evolution under Combination Therapy in *Klebsiella pneumoniae*

Camila Maurmann de Souza, Amy Lee, Osmel Fleitas Martínez, Kevin Ning, Mylena Cardoso da Costa, Mariana Rocha Maximiano, Gabriel Cidade Feitosa, Yasmim Neiva, Marcelo Campos, Marcelo Ramada, Sérgio Alencar, Robert E. W. Hancock, and Octávio Luiz Franco*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsnfecdis.5c00934>

Read Online

ACCESS |

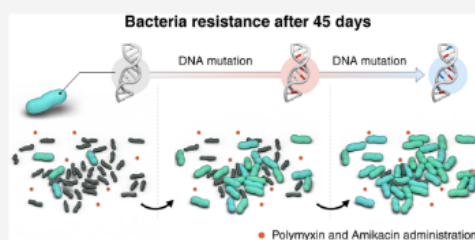
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: *Klebsiella pneumoniae* poses a substantial health concern worldwide, with high mortality often associated with its elevated resistance levels. Combination antibiotic therapies have emerged as a viable strategy for addressing infections caused by these highly resistant pathogens, yet the evolutionary routes to resistance under such regimens remain poorly understood. Here, we investigated how resistance can emerge during exposure to combination therapy by conducting an in vitro evolutionary experiment with a clinical *K. pneumoniae* KPC-producing isolate (KP03, Brazil), which was initially susceptible to both amikacin and polymyxin B (AmkPol). While the combination therapy displayed an additive effect in vitro, subinhibitory exposure rapidly drove resistance. In three independent lineages, bacteria tolerated concentrations nearly 10-fold (polymyxin B) and 5-fold (amikacin) above EuCAST breakpoints, with MICs reaching 128–256 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ after 45 passages. These high resistance levels persisted for at least 10 days without selective pressure, although resistance lineages exhibited measurable fitness costs. Whole-genome sequencing revealed diverse mutations affecting *lapB*, *phoP*, *rho*, *smbA*, *mlaA*, and *asmA*, while transcriptomics analysis showed upregulation of the *arm* operon and the *aphA* alongside with downregulation of envelope- and efflux-associated genes. Cross-resistance was also observed against colistin and certain antimicrobial peptides, raising concern for treatment options beyond the AmkPol combination. Although combination therapy represents an important treatment strategy, our findings demonstrate that *K. pneumoniae* can rapidly evolve stable, high-level resistance under combination therapy, highlighting the need for a deeper understanding of how such regimens influence resistance development and the continued need to develop novel antibiotic strategies.

KEYWORDS: *K. pneumoniae*, infectious disease, genomics, antibiotic resistance, bacteria, evolution



The rising mortality associated with antimicrobial resistance has become a major global health concern, with an estimated 1.27 million deaths reported in 2019 alone.¹ Among the pathogens of critical priority, *K. pneumoniae* stands out due to its extensive repertoire of resistance mechanisms, the worldwide dissemination of high-risk clones, and mortality rates that can reach up to 50%.^{2,3} Given the limited availability of effective therapies and the ability of *K. pneumoniae* to cause infections that are difficult to treat, combination therapy has emerged as a commonly employed strategy in recent years.⁴ This approach, defined as the simultaneous use of two or more antimicrobial agents, seeks to enhance bactericidal activity, improve efficacy against resistant strains, and suppress or at least delay the emergence of resistance.^{5,6}

Numerous antimicrobial combinations have been explored to improve the treatment of *K. pneumoniae*, representing a key strategy given the limitations of monotherapy.⁷ Among the combinations investigated, the combination of amikacin and

polymyxin B has shown favorable in vitro activity and improved clinical outcomes in hospitalized patients.^{8,9} Polymyxins are commonly used in combination therapies against Gram-negative pathogens, including *K. pneumoniae*, to overcome antimicrobial resistance.^{10–12} Polymyxin B, a cyclic lipopeptide differing from colistin by a single amino acid, primarily disrupts the outer membrane by binding lipopolysaccharides and displacing divalent cations, with additional effects involving respiratory chain inhibition and reactive oxygen species generation.^{13,14} Amikacin, in contrast, is an

Received: October 22, 2025

Revised: January 25, 2026

Accepted: January 28, 2026