



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE BIOMEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

EMANUELA SILVA DE ARAÚJO

**EFEITO DA FLUOXETINA SOBRE *Burkholderia pseudomallei* NA FORMA
PLANCTÔNICA E DE BIOFILMES**

FORTALEZA

2023

EMANUELA SILVA DE ARAÚJO

**EFEITO DA FLUOXETINA SOBRE *Burkholderia pseudomallei* NA FORMA
PLANCTÔNICA E DE BIOFILMES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia. Área de concentração: Bacteriologia.

Orientador: Prof. Dra Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

Coorientador: Prof. Dra. Gláucia Morgana de Melo Guedes

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A688e Araújo, Emanuela Silva de.
Efeito da fluoxetina sobre *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica e de biofilmes / Emanuela
Silva de Araújo. – 2023.
61 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

Coorientação: Profa. Dra. Gláucia Morgana de Melo Guedes.

1. *Burkholderia pseudomallei*. 2. Fluoxetina. 3. Biofilmes. 4. Antimicrobianos. I. Título.

CDD 616.9

EMANUELA SILVA DE ARAÚJO

**EFEITO DA FLUOXETINA SOBRE *Burkholderia pseudomallei* NA FORMA
PLANCTÔNICA E DE BIOFILMES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia. Área de concentração: Bacteriologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita
Centro Universitário Christus (Unichristus)

A Deus.

À minha família.

AGRADECIMENTO

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), por me conceder o espaço para a pesquisa e os meus experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) pela oportunidade de aprender novos conhecimentos.

À Prof^a. Dra. Débora Castelo Branco, por toda paciência, confiança e pela excelente orientação.

À Prof^a Dra. Gláucia Morgana, pela coorientação, ensinamentos e incentivos.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Ulisses de Pádua e Prof. Dr. Felipe Pantoja pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A Deus que iluminou meu caminho durante essa caminhada.

Aos meus pais Maria das Graças e José Lopes, que estão sempre ao meu lado, me guiando e apoiando em todas as situações.

A minha esposa Késia Veras Costa Ribeiro, pessoa com quem amo partilhar a vida. Com você tenho me sentido mais viva de verdade. Sua presença significou segurança e certeza para que eu não desistisse dessa caminhada. Foi ótimo ser sua parceira de NB3 e sua ajuda foi essencial para que esse trabalho desse certo.

À Prof.^a Dra. Morgana Barboza, pela amizade e por todos os ensinamentos ao longo do mestrado.

Aos amigos do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GRAMM), Vínicius, Alyne, Ana Carla, Rodrigo Guedes, Ivan, Bruno, Carliane e Crister pelas reflexões, críticas, sugestões recebidas e companheirismo, além de contribuir para a construção desse trabalho.

“Não importa o que aconteça, continue a nadar” (Walters & Graham)

RESUMO

A melioidose, causada pela bactéria *Burkholderia pseudomallei*, é uma doença de grande importância para a saúde pública. *B. pseudomallei*, quando em biofilmes tende a ter uma maior resistência aos antibióticos, resultando na cronicidade das infecções. Com isso, estudos têm sido realizados com o intuito de identificar compostos que interfiram na dinâmica dos biofilmes. Dessa forma, esse estudo se propôs a avaliar o efeito *in vitro* da droga cloridrato de fluoxetina (FLU) sobre o crescimento planctônico e de biofilme de *B. pseudomallei* e sobre a sensibilidade antimicrobiana dessa bactéria. A sensibilidade planctônica à FLU, isolada e combinada com os antimicrobianos, foi avaliada pelo teste de microdiluição em caldo. Foram investigados os efeitos da FLU sobre a formação dos biofilmes e sobre biofilmes maduros por meio da avaliação da biomassa pela técnica de coloração por cristal violeta e da atividade metabólica do biofilme determinada com resazurina. A concentração inibitória mínima (CIM) da FLU foi de 19,53 – 312,5 µg/mL. Quando combinada com os antimicrobianos, houve aumento significativo na CIM para meropenem (MER), não alterando as CIMs das outras drogas. A FLU alterou a biomassa do biofilme em formação na concentração de CIM/4, enquanto no biofilme maduro houve uma redução ($P < 0,05$) 23 e 30% nas concentrações de 625 e 1250 µg/mL, respectivamente. A FLU erradicou os biofilmes de *B. pseudomallei*, apresentando valores de concentrações eliminatórias mínimas do biofilme (CEMB) nas concentrações de 1250 - 2500 µg/mL. Quanto às drogas antimicrobianas, não foram encontrados valores de CEMB para AMC e os intervalos de CEMB para MER foram 16 – 256 µg/mL e > 256 µg/mL para doxiciclina (DOX). Quando utilizada na concentração de CIM (19,53 – 312,5 µg/mL), a FLU não reduziu os valores de CEMB para AMC, MER e DOX contra biofilmes maduros de *B. pseudomallei*, porém quando utilizada na concentração de CEMB/4 (312,5 e 625 µg/mL), houve redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) para todas as combinações testadas nos biofilmes maduros de *B. pseudomallei*. A FLU inibe o crescimento planctônico de *B. pseudomallei*, mata os biofilmes em formação e maduro, além de sensibilizá-los as drogas AMC, MER e DOX.

Palavras-chave: *Burkholderia pseudomallei*. Fluoxetina. Biofilmes. Antimicrobianos.

ABSTRACT

Melioidosis, caused by *Burkholderia pseudomallei* bacteria, is a disease of great importance to public health. *B. pseudomallei*, when in biofilms, tends to be more resistant to antibiotics, resulting in chronic infections. Thus, studies have been conducted in order to identify compounds that interfere with the dynamics of biofilms. Thus, studies have been conducted in order to identify compounds that interfere with the dynamics of biofilms. Thus, this study aimed to evaluate the in vitro effect of fluoxetine hydrochloride (FLU) on the planktonic and biofilm growth of *B. pseudomallei* and on the antimicrobial susceptibility of these bacteria. The planktonic sensitivity to FLU alone and in combination with antimicrobials was evaluated by the broth microdilution test. The effects of FLU on growing biofilm and on mature biofilms were investigated by evaluating the biomass by crystal violet staining technique and the metabolic activity of the biofilm determined with resazurin. The minimum inhibitory concentration (MIC) of FLU was 19.53 - 312.5 µg/mL. When combined with the antimicrobials, there was a significant increase in the MIC for meropenem (MER), while not changing the MICs of the other drugs. FLU altered the biomass of the growing biofilm at the concentration of MIC/4, while in the mature biofilm there was a reduction ($P < 0.05$) 23 and 30% at concentrations of 625 and 1250 µg/mL, respectively. FLU eradicated the biofilms of *B. pseudomallei*, showing minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) values at concentrations of 1250 - 2500 µg/mL. As for the antimicrobial drugs, no MBEC values were found for AMC and the MBEC ranges for MER were 16 - 256 µg/mL and >256 µg/mL for doxycycline (DOX). When used at MIC concentration (19.53 - 312.5 µg/mL), FLU did not reduce the MBEC values for AMC, MER and DOX against mature biofilms of *Burkholderia pseudomallei*, but when used at MBEC/4 concentration (312.5 and 625 µg/mL), there was a statistically significant reduction ($P < 0.05$) for all combinations tested on mature biofilms of *B. pseudomallei*. FLU inhibits planktonic growth of *B. pseudomallei*, kills growing biofilms and mature biofilms, and sensitizes them to AMC, MER and DOX drugs.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*. Fluoxetine. Biofilms. Antimicrobials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição global da melioidose	15
Figura 2 –	Distribuição dos casos de melioidose por município no Ceará	17
Figura 3 –	Frequência de casos confirmados de melioidose por ano de notificação	18
Figura 4 –	Coloração de Gram demonstrando a estrutura de “alfinete de segurança”...	19
Figura 5 –	Morfologia da colônia de <i>B. pseudomallei</i> em ágar Ashdown	20
Figura 6 –	Modos de transmissão e prevenção da melioidose	21
Figura 7 –	Patogênese da melioidose	23
Figura 8 –	Manifestações clínicas da melioidose	24
Figura 9 –	Modelo esquemático das cinco etapas do desenvolvimento do biofilme	28
Figura 10 –	Efeito da fluoxetina (FLU) no biofilme em formação de <i>B. pseudomallei</i> ..	40
Figura 11 –	Efeitos da fluoxetina no biofilme maduro de <i>B. pseudomallei</i>	41
Figura 12 –	Análise da microscopia confocal da FLU na formação do biofilme e biofilme maduro de <i>B. pseudomallei</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aspectos favoráveis ao desenvolvimento de <i>B. pseudomallei</i>	18
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Concentrações inibitórias (CIMs) e concentrações eliminatórias mínimas de biofilme (CEMBs) para fluoxetina (FLU), amoxicilina-clavulanato (AMC), meropenem (MER) e doxiciclina (DOX) contra <i>B. pseudomallei</i> (n=16)	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHLs	<i>N</i> -acil homoserina lactonas
AMC	Amoxicilina-Clavulanato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CEMB	Concentração Eliminatória Mínima do Biofilme
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOX	Doxiciclina
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
FLU	Fluoxetina
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
IL-6	Interleucina-6
ISRS	Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina
LAPERE	Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes
LPS	Lipopolissacarídeos
MER	Meropenem
MG	Média Geométrica
MH	Mueller Hinton
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão Salina-Fosfato
PHB	Polihidroxibutirato
QS	<i>Quorum sensing</i>
RNA16S	Ácido Ribonucleico Ribossômico 16S
T2SS	Sistema de Secreção do Tipo II
T3SS	Sistema de Secreção do Tipo III
T5SS	Sistema de Secreção do Tipo V
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por Mililitro
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Panorama histórico da melioidose	14
2.2	Aspectos epidemiológicos	15
2.3	Agente etiológico	18
2.4	Transmissão e prevenção	20
2.5	Fisiopatologia e fatores de virulência	21
2.6	Manifestações clínicas e fatores de risco	23
2.7	Tratamento	25
2.8	Resistência a antibióticos em <i>B. pseudomallei</i>	26
2.8.1	<i>Biofilmes</i>	27
2.8.2	<i>Fluoxetina como uma alternativa terapêutica?</i>	29
3	HIPÓTESES	32
4	OBJETIVO GERAL / OBJETIVO ESPECÍFICO	32
4.1	Objetivos gerais	32
4.2	Objetivos específicos	32
5	METODOLOGIA	33
5.1	Isolados bacterianos	33
5.2	Determinação da concentração inibitória mínima da fluoxetina e dos antimicrobianos utilizados no tratamento da melioidose	33
5.3	Efeito da fluoxetina combinada com agentes antimicrobianos na forma planctônica de <i>B. pseudomallei</i>	34
5.4	Efeito da fluoxetina na formação do biofilme de <i>B. pseudomallei</i>	34
5.5	Efeito da fluoxetina e dos antimicrobianos nos biofilmes maduros de <i>B. pseudomallei</i>	35
5.6	Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes em formação e maduro de <i>B. pseudomallei</i> expostos a fluoxetina	36
5.7	Efeito da fluoxetina sobre a sensibilidade de biofilmes de <i>B. pseudomallei</i> para antimicrobianos utilizados para tratar a melioidose	36
5.8	Análise estatística	37
6	RESULTADOS	38

6.1	Concentração inibitória mínima da fluoxetina e drogas antimicrobianas utilizadas no tratamento da melioidose	38
6.2	Efeito da fluoxetina combinada com agentes antimicrobianos na forma planctônica de <i>B. pseudomallei</i>	38
6.3	Efeito da fluoxetina na formação de biofilme por <i>B. pseudomallei</i>	40
6.4	Efeito da fluoxetina e dos antimicrobianos no biofilme maduro de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	40
6.5	Análise da microscopia confocal da fluoxetina em biofilmes em formação e maduro de <i>B. pseudomallei</i>	41
6.6	Efeito da fluoxetina sobre a sensibilidade de biofilmes de <i>B. pseudomallei</i> para antimicrobianos utilizados para tratar a melioidose	42
7	DISCUSSÃO	43
8	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A melioidose, causada pela bactéria *Burkholderia pseudomallei*, é uma doença de grande importância para a saúde pública no Sudeste da Ásia e Norte da Austrália, onde é hiperendêmica, podendo alcançar uma incidência anual de 2000 casos e uma taxa de letalidade de 40%. No Brasil, a melioidose é descrita principalmente no Estado do Ceará, com mais de 90% dos casos no país, o que resultou na inclusão desse estado na lista de regiões endêmicas para a melioidose. Além do Ceará, há registro isolado da doença nos estados de Mato Grosso e Alagoas. *B. pseudomallei* é intrinsecamente resistente a muitos antibióticos e, mais recentemente, vem desenvolvendo resistência aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da melioidose, principalmente, quando se apresenta na forma de biofilme.

A formação de biofilmes é um importante fator de virulência para *B. pseudomallei*, pois confere à bactéria uma maior resistência aos mecanismos efetores do sistema imunológico, visto que o sistema imune é capaz de neutralizar células persistentes na forma planctônica, porém devido a essa proteção conferida pela arquitetura do biofilme, após, a pausa do tratamento com drogas antimicrobianas, as células persistentes retomam seu crescimento no biofilme, causando recidiva da doença.

Estudos têm sido realizados com o intuito de identificar compostos que interferem na dinâmica de biofilmes microbianos, podendo ajudar no tratamento da melioidose. As drogas psicotrópicas demonstraram ter atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos. Algumas dessas drogas, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) são conhecidos por atuar como inibidores de bomba de efluxo.

Nesse contexto, o cloridrato de fluoxetina (FLU) é um dos principais antidepressivos da classe dos ISRSs, usado geralmente para a maioria dos transtornos de ansiedade. Foi relatada que a FLU possui atividade contra *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Corynebacterium urealyticum*, *Proteus mirabilis*, *Lactobacillus salivarius*, *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à meticilina. No entanto, pouco se sabe sobre a atividade dessa droga contra *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica e de biofilme. Diante disso, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito in vitro do composto cloridrato de fluoxetina sobre o crescimento planctônico e de biofilme de *B. pseudomallei* e sobre a sensibilidade antimicrobiana dessa bactéria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama histórico da melioidose

Em 1912, o patologista Alfred Whitmore e seu assistente Krishnaswami descreveram casos de uma doença séptica, recentemente observada. Alguns casos fatais eram de viciados em morfina e os achados da autópsia foram caracterizados por consolidação caseosa generalizada dos pulmões, classicamente com abscessos no fígado, baço, rim e tecidos subcutâneos. Whitmore notou que o bacilo isolado dos pulmões e outros órgãos era semelhante ao causador do mormo (*Burkholderia mallei*), exceto pelo fato de apresentar motilidade. Com isso, como se tratava de um agente desconhecido que causava infecções pulmonares fatais, Whitmore denominou de *Bacillus pseudomallei* para o agente (WHITMORE; KRISNASWAMI, 1912; WHITMORE, 1913).

Em 1921, Stanton e Fletcher (1921) reconheceram a semelhança entre os agentes isolados e, então, denominaram a doença de melioidose, baseado em uma derivação do grego *melis* (doença de jumentos) e *eidos* (semelhante). Desde o momento em que o organismo etiológico foi identificado pela primeira vez, ele foi renomeado várias vezes: *Bacillus whitmori*, *Malleomyces pseudomallei*, *Loefflerella pseudomallei*, *Pfeifferella whitmori*. Após vários nomes, a bactéria foi denominada de *Pseudomonas pseudomallei*, por apresentar características fenotípicas semelhantes a *Pseudomonas* (LEELARASAMEE; BOVORNKITTI, 1989). Porém, somente em 1992, a bactéria foi reclassificada recebendo o nome de *Burkholderia pseudomallei*, devido à diferenciação das sequências de ácido ribonucleico ribossômico 16S (RNA16S), valores de homologia de ácido desoxirribonucleico (DNA)-DNA, composição de lipídeos e ácidos graxos (YABUUCHI et al., 1992). O novo gênero recebeu o nome do microbiologista norte-americano Walter Burkholder, que, em 1949, descreveu pela primeira vez a *Burkholderia cepacia* (CURRIE, 2003).

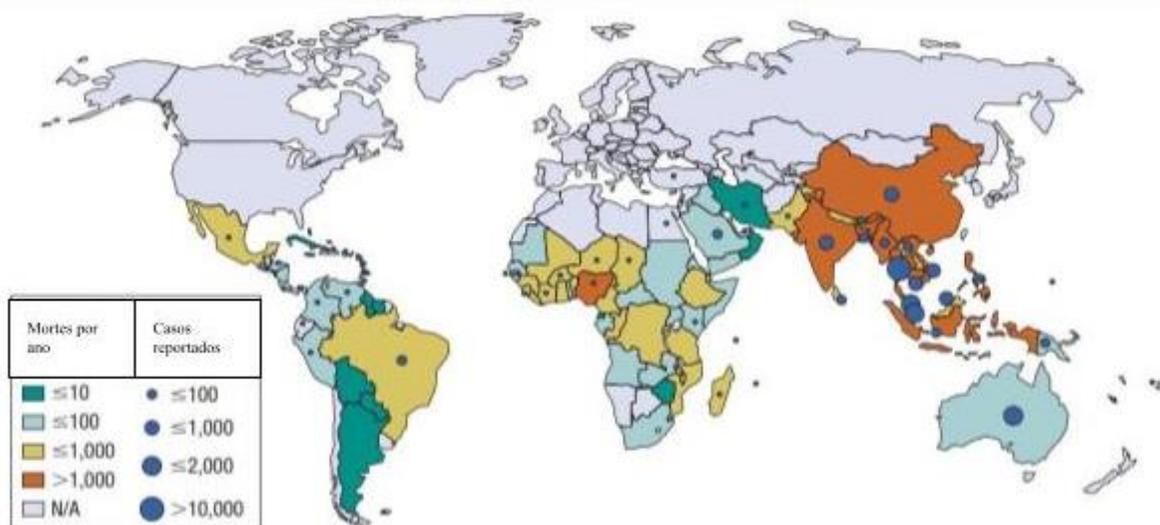
Em 1973, 343 casos de melioidose foram reportados em soldados americanos devido à exposição ambiental aos aerossóis da *B. pseudomallei*, através de feridas e queimaduras contaminadas por inalação da poeira gerada pela movimentação das hélices dos helicópteros (GOSHORN, 1987). Em 2002, a *Burkholderia pseudomallei* foi classificada na categoria B como agente potencial de bioterrorismo e em 2012 foi categorizada como agente de nível 1, devido ao risco de ocorrer propagação da doença (*Centers for Disease Control*, 2012). Em 2017, houve o sequenciamento de todo o genoma para mapear a distribuição geográfica da *B. pseudomallei*, que apontou que a Austrália é o reservatório inicial da doença (WIERSINGA et al., 2018).

2.2 Aspectos epidemiológicos

B. pseudomallei é um organismo saprófita ambiental, predominantemente encontrado no solo úmido, raízes de plantas, águas superficiais e subterrâneas em regiões tropicais e subtropicais (FONG et al., 2021). É endêmica no sudoeste da Ásia e norte da Austrália, embora relatos crescentes tenham surgido na América do Sul e no subcontinente indiano (VELUSAMY; MUHI, 2020). A taxa de incidência estimada varia de país para país: 41,7 por 100.000 pessoas-ano na Austrália e 21,3 por 100.000 pessoas-ano na Tailândia, sendo essas regiões hiperendêmicas para a melioidose, com picos sazonais da doença nas estações úmidas (CURRIE, 2015; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016). Em julho de 2020, mais de 35.000 casos humanos foram relatados globalmente (CHOWDHURY et al., 2022).

B. pseudomallei foi originada na Austrália e a dispersão no sudeste da Ásia ocorreu durante um período glacial, no qual, a distribuição do organismo foi influenciada pela migração humana (PEARSON et al., 2009; BAKER et al., 2013). A melioidose é endêmica em aproximadamente 46 países, mas subnotificada e é provavelmente endêmica em outros 33 países que ainda não relataram casos autóctones (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016; ALMOG et al., 2016). A figura 1 mostra a distribuição global de *B. pseudomallei*, mortalidade estimada e casos relatados de melioidose. As estimativas atuais baseadas em um estudo de modelagem sugerem que todos os anos, há cerca de 165.000 casos a nível mundial e estima-se que 54% sejam fatais (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016).

Figura 1. Distribuição global da melioidose



Fonte: WHITE (2020).

A melioidose na Austrália foi descrita primeiro em ovinos em 1949 e posteriormente em humanos em 1950 (COTTEW, 1950; RIMINGTON, 1962). Estudos epidemiológicos australianos relataram uma incidência média anual de 19,6 casos por 100.000 habitantes, variando de 5,4 a 41,7 durante eventos climáticos no território norte (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016). Um período de chuvas acima da média no território norte, resultou nas maiores incidências anuais documentadas no mundo, com 50,2 casos por 100.000 habitantes e 102,4 na população indígena (PARAMESWARAN et al., 2012). Na Tailândia, a melioidose é subnotificada, devido à falta de recursos no diagnóstico e dados epidemiológicos incompletos (TRAKULSOMBOON et al., 1999; HINJOY et al., 2018). Um estudo realizado no nordeste da Tailândia demonstrou um pico de incidência de 21,3 por 100.000 habitantes em 2006 e uma média de 12,7 por ano no período de 1997 a 2006 (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010).

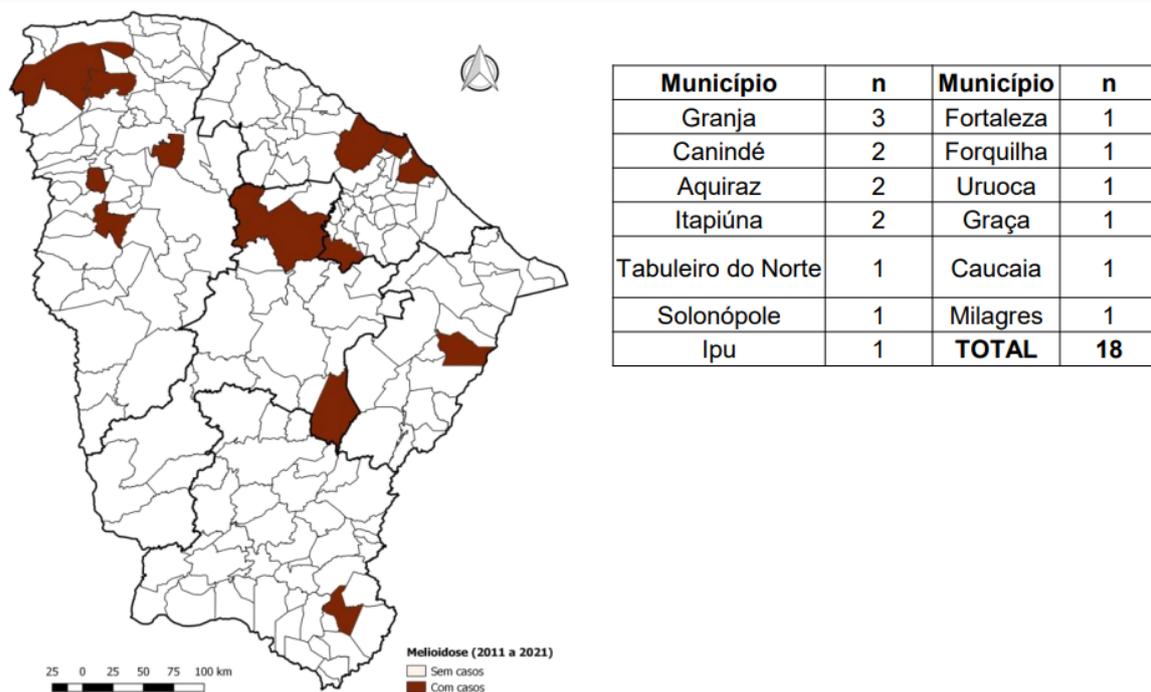
Em Bangladesh, foram relatados apenas 14 casos de melioidose de 1988 a 2016 (TIPRE et al., 2018). Na Índia, a maioria dos estados relatou casos confirmados de melioidose. De 1991 a 2018, 583 casos foram notificados, com a região sul de Karnataka e Tamil Nadu representando quase 80% desses casos (GOPALAKRISHNAN et al., 2013; MUKHOPADHYAY et al., 2018).

Nas Américas, cinco países da América do Sul relataram casos comprovados de melioidose: Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Peru (FONG et al., 2021). Atualmente, o Brasil responde por dois terços dos casos de melioidose na América do Sul (BENOIT et al., 2015). O nordeste do Brasil relatou o primeiro caso comprovado de melioidose em março de 2003, no município de Tejuçuoca, estado do Ceará, quando um surto ocorreu em quatro irmãos, no entanto três das crianças morreram devido a falência de múltiplos órgãos, após exposição a água contaminada durante um banho numa barragem (ROLIM et al., 2005). Em 2007, um caso da doença também foi relatado em uma paciente de 17 anos, com fibrose cística, que vivia no Mato Grosso do Sul. Essa paciente foi diagnosticada com melioidose na forma pulmonar (BARTH et al., 2007). Em janeiro de 2010, em Alagoas, o primeiro caso foi confirmado (CIEVS, 2010).

A incidência anual estimada na América do Sul é de 1200 casos e 500 mortes, porém a verdadeira incidência é incerta, pois o Ceará, é o único estado com notificação compulsória de casos desde 2005, e poucos laboratórios nessa região identificaram *B. pseudomallei* (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016; ROLIM et al., 2018). Novos casos da doença vêm sendo detectados no Ceará, onde, de janeiro de 2011 a junho de 2021, dos 34 casos

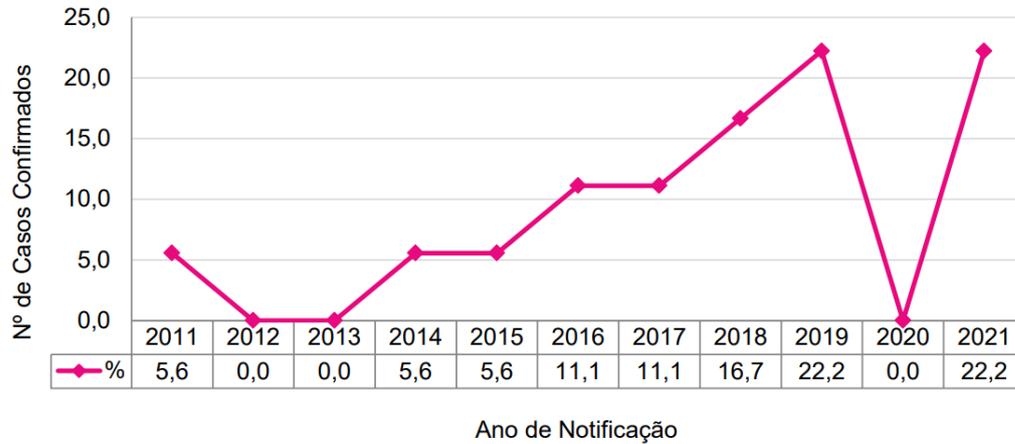
notificados, 18 (52,9%) foram confirmados em 13 diferentes municípios. Destes, a maior frequência de registros foi em Granja (3; 16,7%). Canindé, Aquiraz e Itapiúna contabilizaram dois casos (11,1%) cada um. Outros municípios, como Tabuleiro do Norte, Solonópole, Ipu, Fortaleza, Forquilha, Uruoca, Graça, Caucaia e Milagres notificaram apenas um (1; 5,5%) caso (Figura 2).

Figura 2. Distribuição dos casos de melioidose por município no Ceará.



Fonte: SESA, 2021. Legenda: Em branco: sem casos notificados e em marrom: casos notificados por município.

Nesse período, foi observado uma tendência crescente de 2015 a 2019, passando de 5,6% em 2015 para 22,2% em 2019. Não houve registros nos anos de 2012, 2013 e 2020. Em 2021, a tendência voltou a crescer, com quatro (22,2%) casos distribuídos nos municípios de Itapiúna, Caucaia e Milagres (Figura 3) (SESA, 2021).

Figura 3. Frequência de casos confirmados de melioidose por ano de notificação.

Fonte: SESA, 2021.

Diversos fatores climáticos como temperatura, pH, chuvas, raios UV e composição física, química e biológica do solo influenciam a distribuição, proliferação e sobrevivência da *B. pseudomallei* no solo cearense (Tabela 1), pois essa bactéria sobrevive na ausência de nutrientes, solos ácidos e com baixo teor de água (SESA, 2017).

Tabela 1. Aspectos favoráveis ao desenvolvimento de *B. pseudomallei*.

Localização	Região tropical e subtropical entre Latitude 20° N e 20°S da linha do Equador
Tipo de solo	Principalmente argiloso com elevados teores de nutrientes, ácidos (pH entre 4 e 5) e superficiais (média de 30cm de profundidade)
Pluviosidade	Chuvas nas últimas 24h. Em áreas endêmicas 75% a 85% dos casos se manifestam na estação chuvosa com ventos fortes
Clima	Tropical quente e semi-árido
Umidade	Solos úmidos (umidade acima de 40%)
Temperatura	22°C a 40°C (intervalo ótimo para o desenvolvimento da bactéria)
Declividade	Terrenos situados em locais de maior declividade
Vegetação	Preferência por áreas desmatadas recentemente e por determinados tipos de culturas plantadas (leguminosas). Locais sombreados são mais propícios à bactéria.
Saneamento	Áreas sem saneamento, falhas no processo de tratamento da água nos sistemas de abastecimento, esgotos sem tratamento, vazamentos e reúso inadequado.
Atividade	Atividades humanas (ocupacionais e de lazer) e presença de animais

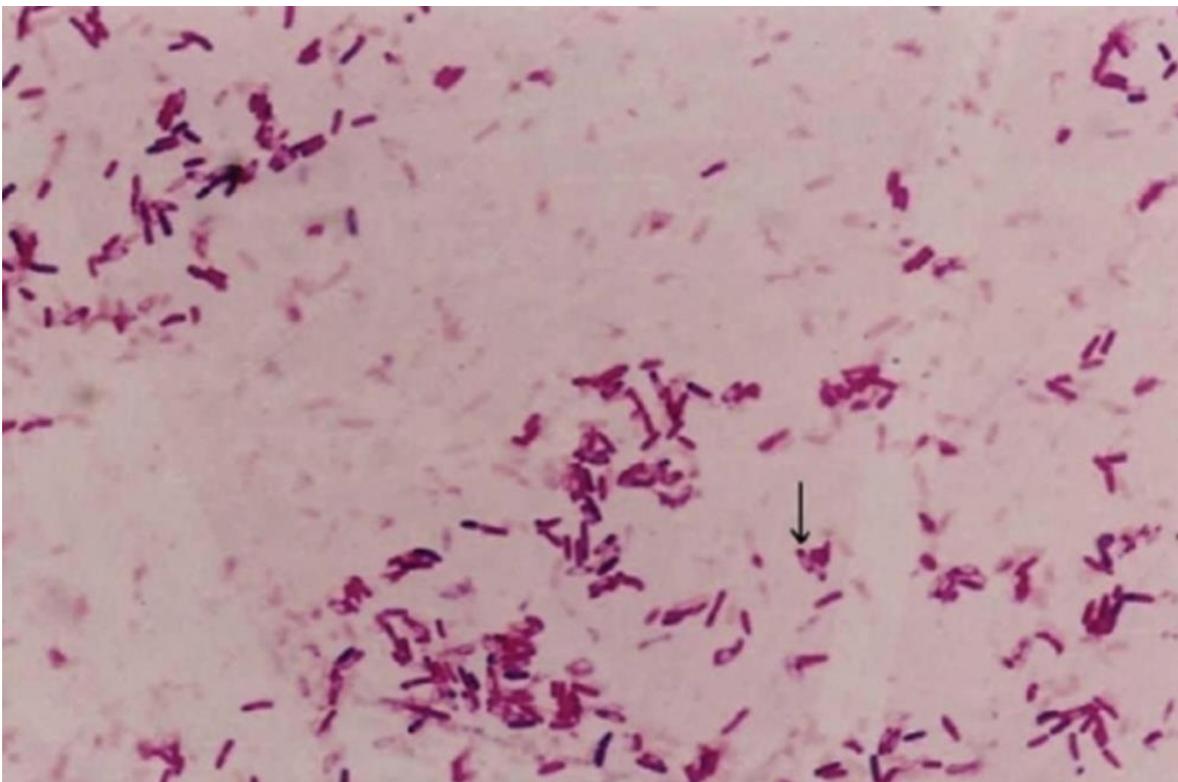
Fonte: SESA, 2008.

2.3 Agente etiológico

B. pseudomallei está classificado taxonomicamente em Reino Bacteria, Filo Proteobacteria, Ordem Burkholderiales, Família Burkholderiaceae, Gênero *Burkholderia* e Espécie *Burkholderia pseudomallei* (SCHOCH et al, 2020). *B. pseudomallei* é um bacilo

Gram-negativo, possui cápsula polissacarídica, móvel, com um flagelo polar, aeróbio e não esporulado. É oxidase positiva pelo teste de citocromo oxidase, ligeiramente curvo e mede aproximadamente 0,5 a 1 μm de largura. Apresenta coloração bipolar devido a sua vacuolização central, e muitas vezes essa estrutura se assemelha a “alfinete de segurança” (Figura 4), essa característica deve-se ao acúmulo central de grânulos de polihidroxibutirato (PHB), que não retêm os reagentes de coloração (RECKSEIDLER-ZENTENO; DE VINNEY; WOODS, 2005; INGLIS; SAGRIPANTI, 2006).

Figura 4. Coloração de Gram demonstrando a estrutura de “alfinete de segurança”.



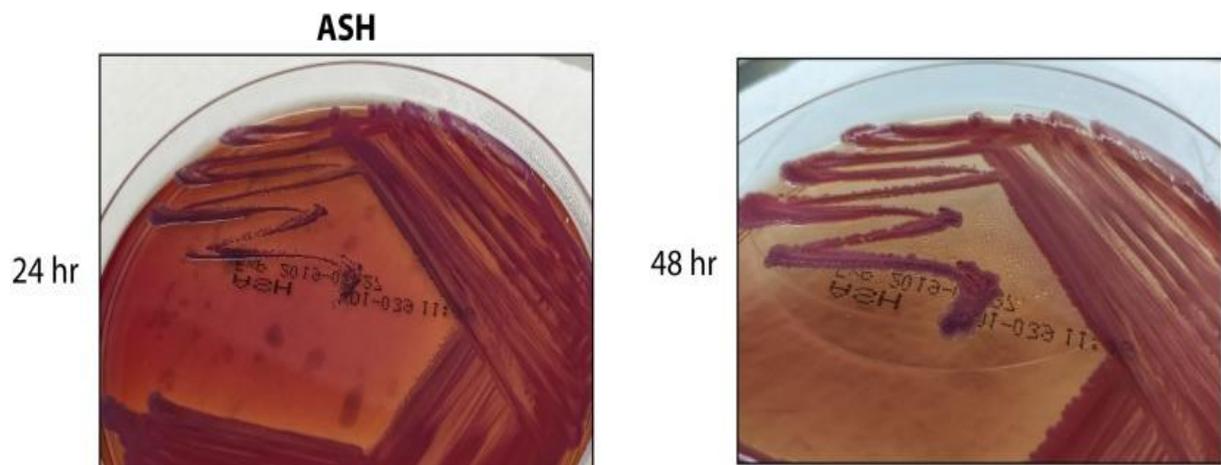
Fonte: Prof.^a Luciana Cangussu. Legenda: A seta indica o bacilo vacuolizado na porção central. Ampliação de 100x. Link: <https://www.luciacangussu.bio.br/atlas/burkolderia-pseudomallei/>

O genoma de *B. pseudomallei* é um dos maiores genomas bacterianos até agora sequenciados. Compreende 7,24 Mb, divididos desigualmente entre dois cromossomos circulares (4,07 Mb e 3,17 Mb) (CHEWAPREECHA et al., 2017). *B. pseudomallei*, como muitas bactérias do solo, é um organismo difícil de matar: pode sobreviver em água triplamente destilada durante décadas, é resistente às defensas complementares e lisossômicas e aos peptídeos catiônicos, além de produzir proteases, lipase, lecitinase, catalase, peroxidase, hemolisinas e sideróforos (WIERSINGA et al., 2018). O organismo

crece bem em ágar MacConkey, ágar sangue e ágar chocolate. O isolamento aprimorado de *B. pseudomallei* de locais com microbiota normal pode ser obtido usando o meio seletivo Ashdown que contém ágar tripticase de soja, vermelho neutro, cristal violeta e gentamicina (GILAD; SCHWARTZ; AMSALEM, 2007). O diagnóstico laboratorial da melioidose pode ser difícil. Muitas vezes, a bactéria não é prontamente isolada de espécimes clínicos e pode não ser identificada corretamente quando isolada. Além de ser descartada como um contaminante da cultura ou erroneamente identificado como *Pseudomonas* spp. Quando amostras clínicas ou ambientais não estéreis são cultivadas (LAU et al., 2015).

A morfologia da colônia nas primeiras 24 a 48 h de crescimento em ágar sangue revela colônias lisas e cremosas (HEMARAJATA et al., 2016). No ágar Ashdown (Figura 5), as colônias são pontuais, planas, secas e roxas e podem ser enrugadas (EDLER et al., 2017). *B. pseudomallei* é negativo para indol, vermelho de metila negativo, negativo para Voges-Proskauer e negativo para sulfeto de hidrogênio (H₂S). A característica no ágar tríplice ferro-açúcar é ácida-alkalina com produção de gás (HEMARAJATA et al., 2016).

Figura 5. Morfologia da colônia de *B. pseudomallei* em ágar Ashdown.



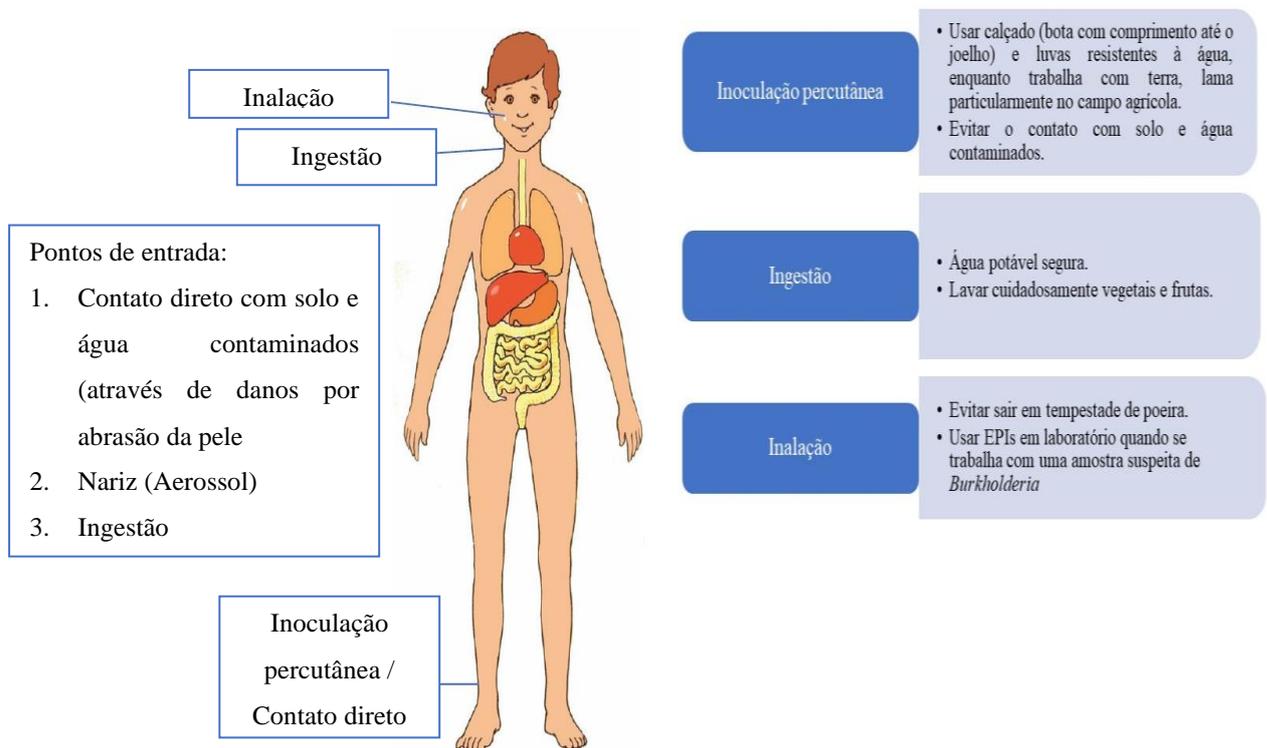
Fonte: GASSIEP; ARMSTRONG; NORTON, 2020. Legenda: À esquerda, são mostradas as culturas com 24 h de incubação e, à direita, as culturas com 48 h.

2.4 Transmissão e prevenção

A transmissão (Figura 6) geralmente é ambiental e pode ser adquirida de três formas: por inoculação percutânea através de lesões cutâneas após exposição a solos ou água contaminada, aquisição por inalação de aerossóis ou aspiração que geralmente ocorre após chuvas intensas e tempestades e por ingestão de água contaminada que é clinicamente relevante em áreas endêmicas, particularmente de água potável não clorada

(CHAKRAVORTY; HEATH 2019). A incidência da doença aumenta durante a estação chuvosa, quando os arroseiros têm contato regular e prolongado com solo ou água contaminados, e, com isso os trabalhadores agrícolas por não usarem roupas de proteção, sofrem ferimentos leves e repetidos e adquirem a doença (LIMMATHUROTSAKUL; PEACOCK, 2011).

Figura 6. Modos de transmissão e prevenção da melioidose.



Fonte: Adaptado de MOHAPATRA; MISHRA (2022).

Outras formas de transmissão, foram relatadas. Dois casos adquiridos em laboratório, um associado à sonicação fora de um capuz de segurança e outros após o derramamento de organismos durante a centrifugação (SCHLECH et al., 1981; GREEN; TUFFNELL, 1968). Transmissão pessoa a pessoa, tanto em um irmão de uma criança com fibrose cística quanto uma possível transmissão sexual de um militar para sua parceira também foram relatados (HOLLAND et al., 2002; MCCORMICK et al., 1975). Relatos de casos neonatais sugerem transmissão perinatal e um caso foi atribuído a leite materno com cultura positiva, além de transmissão vertical que foi comprovada em apenas uma ocasião em humanos (HALDER et

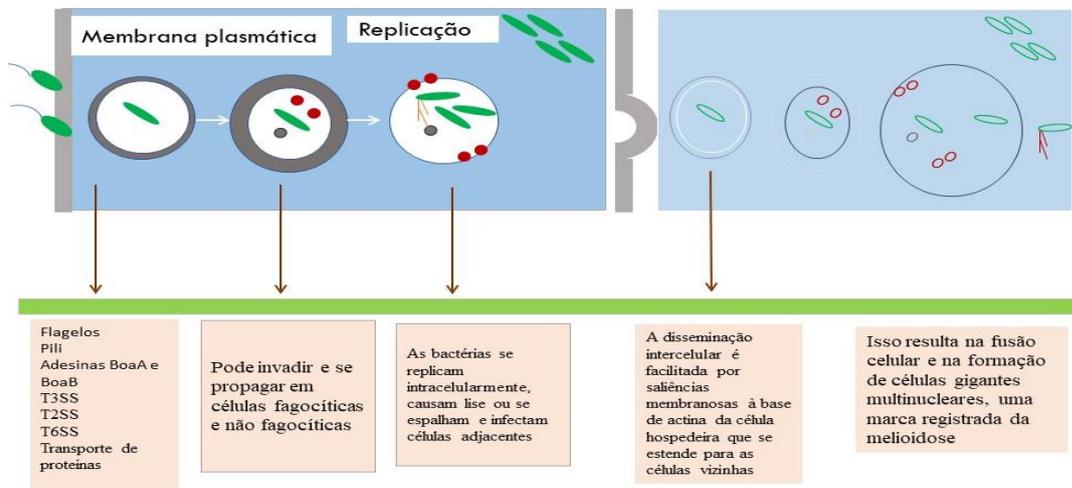
al., 1998; LUMBIGANON et al., 1988; PUNYAGUPTA, 1989; RALPH; MCBRIDE; CURRIE, 2004; ABBINK; ORENDI; BEAUFORT, 2001).

2.5 Fisiopatologia e fatores de virulência

B. pseudomallei primeiro entra e se replica nas células epiteliais da superfície da mucosa ou da pele rompida (Figura 7), dependendo da via de entrada, e, depois se espalha para os diversos tipos de células (KOSHY, 2020). A entrada na célula é auxiliada por flagelos, pili tipo IV e adesinas BoaA e BoaB. O microrganismo possui múltiplos sistemas de secreção, o sistema de secreção tipo III (T3SS), T2SS e T6SS, que são aparatos evolutivos que permitem o transporte de proteínas através das membranas celulares em resposta ao ambiente, e, portanto, à invasão da célula hospedeira (WIERSINGA et al., 2018).

B. pseudomallei pode invadir e se propagar em células fagocíticas e não fagocíticas (SANGSRI et al., 2020), as bactérias se replicam intracelularmente, causam lise ou se espalham e infectam células adjacentes. Após a endocitose, *B. pseudomallei* pode ser visto em vesículas endocíticas e posteriormente no citoplasma onde se replica. As vesículas então se fundem com os lisossomos e acidificam rapidamente (ALLWOOD et al., 2011). A morte bacteriana é mediada por espécies reativas de oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio (KOSHY, 2020).

A disseminação intercelular de *B. pseudomallei* é facilitada por saliências membranosas à base de actina da célula hospedeira que se estende para as células vizinhas (SRINON et al., 2019). Isso resulta na fusão celular e na formação de células gigantes multinucleares, uma marca registrada da melioidose. Além disso, o microrganismo pode entrar diretamente na corrente sanguínea e infectar células apresentadoras de antígenos, causando bacteremia e sepse. A entrada no sistema linfático contribui para a disseminação para locais secundários (WIERSINGA et al., 2018).

Figura 7. Patogênese da melioidose

Fonte: Próprio autor.

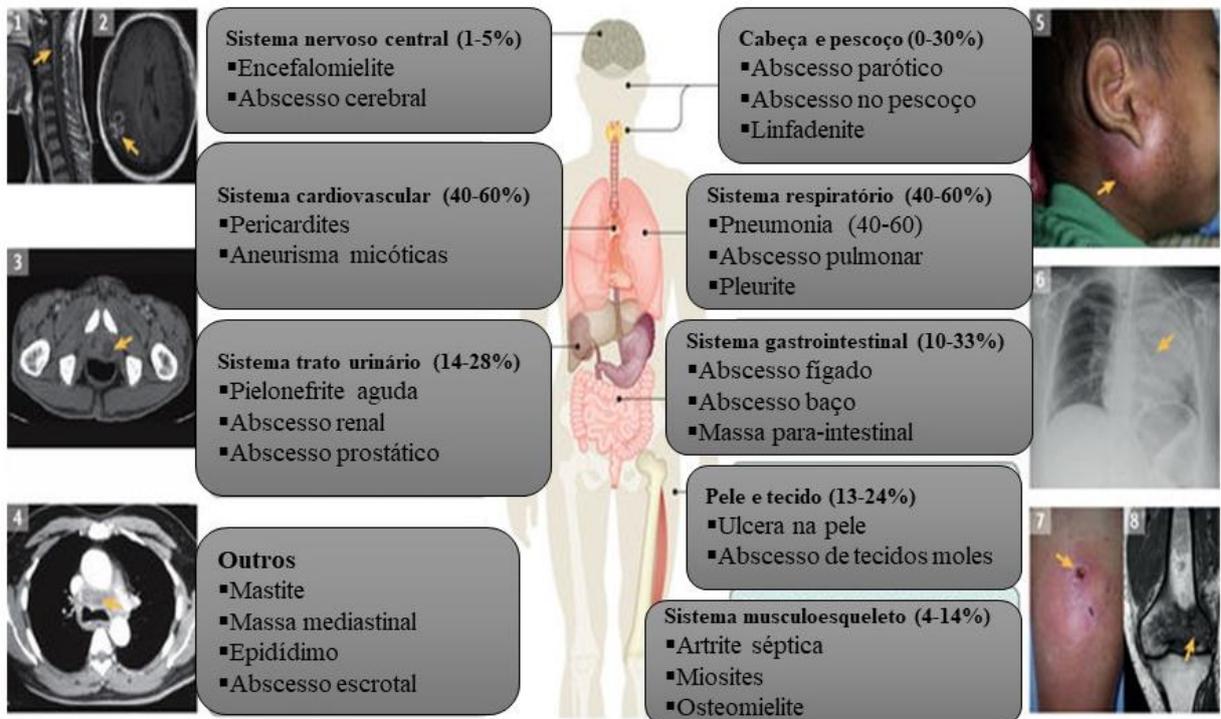
B. pseudomallei produz um polissacarídeo capsular extracelular, que atua bloqueando o acesso do receptor-1 do complemento dos fagócitos ao complemento C3b depositado na superfície bacteriana (RECKSEIDLER; DEVINNEY; WOODS, 2005). O lipopolissacarídeo (LPS) de *B. pseudomallei* é resistente a defensinas lisossômicas e peptídeos catiônicos, permitindo a sobrevivência no soro humano e dentro dos fagócitos (ADLER et al., 2009). Além disso, *B. pseudomallei* possui outros fatores de virulência, como sideróforos, fosfolipase C e formação de biofilme, que são dependentes parcialmente de uma bomba de efluxo de múltiplas drogas em *B. pseudomallei* que também é conhecida por ser responsável por conferir resistência antimicrobiana a aminoglicosídeos e macrolídeos (CHAN; CHUA, 2005). *Quorum sensing* (QS) é um sistema de comunicação dependente da densidade celular em bactérias Gram-negativas que utiliza *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs) para a coordenação da expressão gênica (KLAUS et al., 2018). Acredita-se que os biofilmes bacterianos sejam um local ideal para a ativação de QS, pois é nessa fase que as populações naturais estão em suas maiores densidades celulares (SAWASDIDOLN et al., 2010). Outro fator de virulência relevante para a patogênese de *B. pseudomallei* é a formação de biofilme, pois confere maior proteção às bactérias que o compõe, tornando-as mais resistentes às adversidades do meio que as cerca (SAWASDIDOLN et al., 2010).

2.6 Manifestações clínicas e fatores de risco

A melioidose afeta predominantemente pessoas com contato regular com solo e água. O período de incubação é de 1 a 21 dias (média de 9 dias), provavelmente depende de fatores como virulência da cepa, via de transmissão e fatores de risco do hospedeiro (WIERSINGA et

al., 2018). As manifestações clínicas (Figura 8) da melioidose são diversas e podem variar de uma doença séptica fulminante aguda a melioidose crônica, com duração dos sintomas maior que dois meses (KHIANGTE et al., 2019). Pneumonia e bacteremia são consideradas características da melioidose aguda. A melioidose crônica é caracterizada pela presença de abscessos profundos, muitas vezes, semelhante a tuberculose (KOSHY, 2020). Os abscessos tendem a ser múltiplos e geralmente ocorrem no baço, próstata, fígado e rins (HUSON et al., 2020). Uma diferença notável na apresentação clínica entre pacientes é uma parotidite supurativa em 40% dos casos de melioidose em crianças na Tailândia e Camboja, porém é extremamente rara na Austrália (PAGNARITH et al., 2010). Na Austrália, a melioidose prostática está presente em cerca de 20% dos pacientes do sexo masculino e melioidose neurológica manifesta-se como encefalite do tronco cerebral, muitas vezes com paralisia cranial ou como mielite com fraqueza motora periférica (CURRIE; WARD; CHENG, 2010). Cerca de um quarto das recidivas são devidas à reinfeção, sendo o restante devido à recaída a partir de um foco de infecção persistente (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2006).

Figura 8. Manifestações clínicas da melioidose



Fonte: Adaptado de Wiersinga et al (2018).

Vários fatores de risco para o desenvolvimento da melioidose foram definidos, como, pessoas acima de 45 anos, sexo masculino, devido ao maior risco de exposição ambiental, uso

excessivo de álcool, talassemia, doença renal, doença pulmonar crônica e malignidades, porém a diabetes mellitus é o principal fator de risco subjacente para o desenvolvimento da melioidose (KOSHY, 2020). Pacientes com diabetes mellitus possuíam uma alta incidência de melioidose, com até 60% dos pacientes tendo diabetes tipo 2 preexistente ou diagnosticado recentemente (MORRIS et al., 2012). A ocorrência da melioidose com diabetes mellitus pode estar associada à imunidade inata deficiente de pacientes diabéticos e ao mau controle glicêmico (CHOWDHURY et al., 2022). Acredita-se que os pacientes diabéticos sejam menos capazes de matar ou inativar *B. pseudomallei*, que pode ser desencadeado devido à fagocitose prejudicada de *B. pseudomallei*, à migração reduzida em resposta à interleucina-8 (IL-8) e à incapacidade de retardar a apoptose/necrose (CHANHAMROEN et al., 2009).

O uso prolongado de esteroides, incluindo remédios fitoterápicos contendo esteroide, e a imunossupressão também podem predispor os indivíduos à infecção (CHENG; CURRIE, 2005). Um estudo australiano demonstrou que a doença pulmonar obstrutiva crônica e o consumo de kava, uma planta medicinal, e álcool também foram implicados na melioidose (CURRIE; WARD; CHENG, 2010). A melioidose em adultos sem fatores de risco geralmente ocorre naqueles que foram expostos a alta carga bacteriana, por exemplo, por aspiração de águas superficiais (WIERNsingA et al., 2018).

2.7 Tratamento

O diagnóstico precoce e o início da terapia antimicrobiana específica para *B. pseudomallei* são cruciais para o tratamento da melioidose, devido à rápida progressão da doença e à propensão de *B. pseudomallei* para estabelecer infecções latentes, a terapia da melioidose é feita de duas formas e demorada (MARIAPPAN et al., 2021). *B. pseudomallei* é sensível a alguns β -lactâmicos, como ceftazidima, meropenem, imipenem e amoxicilina-clavulanato, embora a atividade bactericida dessas drogas varie, e é quase sempre sensível a doxiciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim, embora esses agentes possuam apenas atividade bacteriostática (CROWE et al., 2014). No entanto, *B. pseudomallei* é resistente à penicilina, ampicilina, cefalosporinas de primeira e segunda geração, gentamicina, tobramicina, estreptomicina e macrolídeos (CAMARGO et al., 2020).

Com isso, a terapia antimicrobiana consiste na fase inicial intensiva, que visa impedir a morte do paciente por sepse, e na subsequente fase de erradicação, cujo objetivo é erradicar qualquer bactéria residual, minimizando o risco de infecção recorrente. A terapia intensiva inicial deve durar no mínimo 10 a 14 dias e consiste em ceftazidima (em hospitais)

intravenosa, a cada seis horas ou meropenem (em unidades de terapia intensiva) intravenoso a cada oito horas (SULLIVAN et al., 2020).

Após a terapia intensiva inicial, a terapia de erradicação subsequente com antibióticos orais é recomendada para prevenir o agravamento da doença ou a recaída e dura geralmente por 12 semanas. Sulfametoxazol-trimetoprim é o agente preferido para terapia de erradicação, e amoxicilina-clavulanato ou doxiciclina na segunda escolha (TAPIA; SANCHEZ-VILLAMIL; TORRES, 2019). Porém, amoxicilina-clavulanato tem sido usado como medicação alternativa para crianças e mulheres grávidas (CURRIE, 2015).

2.8 Resistência a antibióticos em *B. pseudomallei*

O arsenal limitado de agentes antimicrobianos disponíveis para a terapia de melioidose é principalmente devido à resistência intrínseca de *B. pseudomallei* a muitos antibacterianos. Os mecanismos documentados para *B. pseudomallei* variam de exclusão da célula devido a problemas de permeabilidade concedidos por constituintes do envelope celular bacteriano, sítios-alvos alterados, que em casos raros podem incluir deleção do alvo e formação de biofilme (SCHWEIZER, 2012). Na literatura já foi relatado que existem casos de resistência aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da melioidose, como ceftazidima e amoxicilina-clavulanato, que são mediadas pela produção de β -lactamases (RHOLL et al., 2011; SAROVICH et al., 2012).

Esse mecanismo de resistência tem bastante relevância, visto que é o único modo de clivagem dos antibióticos β -lactâmicos, até então descrito para *B. pseudomallei* (BANDEIRA et al., 2013). Outra forma de resistência, é a incompatibilidade química entre as drogas e os componentes fisiológicos da parede celular, por exemplo, o LPS contribui para a resistência intrínseca de alto nível à polimixina B em *B. pseudomallei*, principalmente devido à modificação do lipídio A pela 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (NOVEM et al., 2009).

Outra forma de limitar o contato com a droga ocorre pela expressão de bombas de efluxo. Nas bactérias Gram-negativas, as bombas monocomponentes transportam seus substratos através da membrana citoplasmática e as bombas multicomponentes abrangem todo o envelope celular e expõem seus substratos para o meio externo (SCHWEIZER, 2012). Devido ao fato de que o efluxo de drogas é mais eficaz em bactérias com permeabilidade de membrana externa reduzida (NIKAIDO; PAGÈS, 2012), são as bombas de efluxo da família RND que mais contribuem para a resistência intrínseca e adquirida em bactérias Gram-negativas (SCHWEIZER, 2012). A *B. pseudomallei* codifica múltiplas bombas de efluxo

pertencentes à família RND, porém apenas três delas foram caracterizadas detalhadamente, sendo essas, AmrAB-OprA, BpeAB-OprB e BpeEF-OprC (CHAN; CHUA, 2005; HAYDEN et al., 2012). AmrAB-OprA foi a primeira bomba de efluxo caracterizada em *B. pseudomallei* (MOORE et al., 1999). É responsável pela resistência intrínseca aos aminoglicosídeos e macrolídeos. BpeAB-OprB é a bomba de efluxo que utiliza como substratos os macrolídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e, em menor extensão, cloranfenicol; a resistência atualmente relatada à sulfametoxazol/trimetoprim é atribuída a ação da bomba BpeEF-OprC (SCOFFONE et al., 2021).

Além da expressão de bombas de efluxo, as cepas de *B. pseudomallei*, também podem apresentar resistência conferida pela formação de biofilme (ADLER et al., 2013). Essa habilidade é um fator agravante, uma vez que proporciona um ambiente favorável ao crescimento do patógeno (HØIBY et al., 2010).

2.8.1 Biofilmes

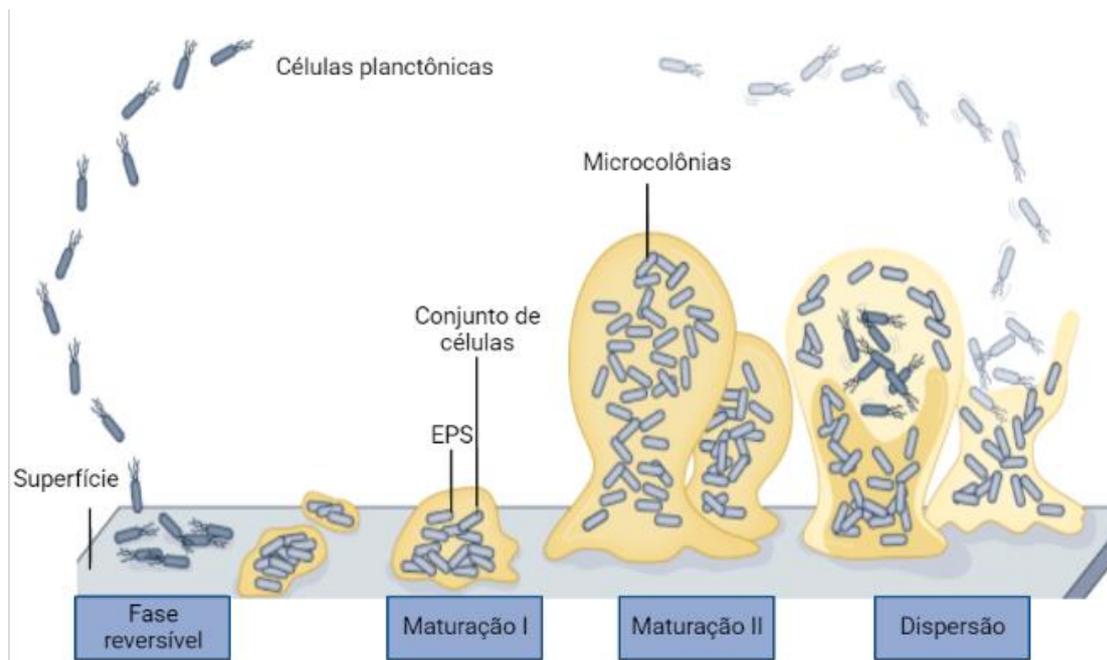
As bactérias formam biofilmes como parte de seus mecanismos de sobrevivência e, portanto, os biofilmes são onipresentes na natureza, podendo se desenvolver em praticamente todas as superfícies bióticas e abióticas, proporcionando a sobrevivência em condições adversas (PERCIVAL; ALICE; COCHRANE, 2011). Já em 1683, Antoni van Leeuwenhoek observou e descreveu biofilmes usando seu microscópio primitivo em matéria de seus próprios dentes. Porém, em 1970, Nils Hoiby observou uma ligação entre a etiologia de uma infecção persistente e agregados de bactérias em pacientes com fibrose cística (HØIBY, 2017). Os biofilmes bacterianos são aglomerados de bactérias que estão ligados a uma superfície e/ou uns aos outros e embutidos em uma matriz polimérica extracelular. Essa matriz consiste em substâncias como proteínas, polissacarídeos, eDNA e água. Dentro do biofilme, as bactérias se adaptam à anóxia ambiental e à limitação de nutrientes, exibindo um metabolismo alterado, expressão gênica e produção de proteínas, o que pode levar a uma taxa metabólica mais baixa e reduzida de divisão celular. Além disso, essas adaptações tornam as bactérias mais resistentes à terapia antimicrobiana, inativando os alvos antimicrobianos ou reduzindo os requisitos para a função celular na qual os antimicrobianos interferem (MOSER et al., 2017).

Os biofilmes são ubíquos, podendo se desenvolver em praticamente todas as superfícies bióticas e abióticas, proporcionando a sobrevivência a condições adversas (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A formação do biofilme (Figura 9) é complexa,

controlado por vários fatores físicos, químicos e biológicos (KUMAR et al., 2017). A primeira fase consiste nas células planctônicas que se aproximam da superfície sólida por fluido ou motilidade. Nessa fase, a adesão é mediada por interação hidrofóbica e por forças de Van der Waals. Adicionalmente, nessa fase, para auxiliar na fixação, *B. pseudomallei* possui pili tipo IV e fímbrias que medeiam adesão célula-a-célula, dificultando assim a remoção do biofilme (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2014). Depois que ocorre a ligação de microrganismos a uma superfície biótica ou abiótica e essa ligação se torna estável, inicia-se um processo de multiplicação e divisão de células microbianas, iniciado por meio de sinalização química específica dentro das substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Esse processo leva à formação de microcolônias que, por fim, tornam-se protegidas das adversidades do meio em que se encontram (JAMAL et al., 2018).

No desenvolvimento de microcolônias dentro do biofilme maduro, as substâncias poliméricas extracelulares continuam a ser formadas juntamente com canais de água e poros. Dessa forma, o objetivo desses canais é distribuir nutrientes importantes e remover resíduos das comunidades de microcolônias do biofilme (PERCIVAL et al., 2012). Após o biofilme atingir a sua densidade máxima e o ambiente não for mais propício, ocorre a dispersão do biofilme na forma planctônica para colonizar novos ambientes e formar novos biofilmes (JAMAL et al., 2018).

Figura 9. Modelo esquemático das cinco etapas do desenvolvimento do biofilme.



Fonte: Adaptado de SAUER et al., 2022.

B. pseudomallei tem a capacidade de formar biofilme e esses biofilmes atuam como uma barreira de difusão para agentes antimicrobianos, que leva a uma diminuição nas concentrações de antibióticos em seus alvos (PIBALPAKDEE et al., 2012). Além disso, a formação de biofilme e LPS de *B. pseudomallei* estão associados à melioidose recidivante (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2014). Sawasdidoln et al. (2010) descobriram que o cultivo de várias cepas de *B. pseudomallei* em condições de formação de biofilme pode induzir a bactéria a ser resistente a antibióticos comumente usados para regimes de tratamento da melioidose. Nessa perspectiva o reposicionamento de fármacos tem sido uma alternativa para combater infecções causadas por microrganismos resistentes, como *Burkholderia pseudomallei*, principalmente, quando associadas ao crescimento de biofilmes.

2.8.2 Fluoxetina como uma alternativa terapêutica para melioidose?

Alguns compostos medicinais são utilizados para a terapia de doenças não infecciosas e possuem propriedades antimicrobianas, os quais são conhecidos como “não-antibióticos” e, eventualmente, alcançam o status de droga antimicrobiana (KRUSZEWSKA; ZAREBA; TYSKI, 2004). Esses compostos auxiliares possuem mecanismos antimicrobianos, devido a sua capacidade de inibir o efluxo do antibiótico antes dele agir no seu alvo pretendido. Por exemplo, vários estudos demonstraram o efeito antimicrobiano de drogas pertencentes à classe dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), como fluoxetina, sertralina, clorpromazina, que são utilizados para o tratamento da ansiedade e transtorno depressivo, sendo usados como farmacoterapia de primeira linha devido à sua segurança, eficácia e tolerabilidade (MACEDO et al., 2017). Os ISRS são drogas que, em humanos, atuam modificando o comportamento da 5-OH-triptamina (serotonina) no espaço da sinapse.

A fluoxetina é classificada como um ISRS, embora também atue em receptores de membrana de outros neurotransmissores (ZUO et al., 2012) e exerce seus efeitos bloqueando a recaptação de serotonina nos neurônios serotoninérgicos pré-sinápticos, bloqueando a proteína transportadora de recaptação localizada no terminal pré-sináptico (SOHEL; SHUTTER; MOLLA, 2022). Em 1988, a fluoxetina foi introduzida no uso clínico para o tratamento de pacientes com depressão. Desde então, a fluoxetina se tornou o antidepressivo mais amplamente prescrito do mundo. Nos anos seguintes, foi aprovado para uso no tratamento de pacientes com transtorno obsessivo compulsivo e bulimia nervosa (ROSSI; BARRACO; DONDA, 2004). É bem absorvido após administração oral, com picos de

concentração plasmática observados após 6 a 8 horas. A fluoxetina apresenta alguns efeitos adversos como, insônia, náusea, diarreia, anorexia, sonolência. A maioria desses efeitos são imediatos e desaparecem com o tempo, o que pode ser dependente da dose e do tempo de uso (SOHEL; SHUTTER; MOLLA, 2022).

Muitos estudos mostram que essas drogas têm efeito antimicrobiano, atribuindo grande parte da sua atividade à supressão das bombas de efluxo (MCGOVERN; HAMLIN; WINTER, 2019; BOTTEGA et al., 2020; CALDARA; MARMIROLI, 2021). Com isso, alguns trabalhos relataram a ação da fluoxetina nos humanos correlacionando com a sua atividade antimicrobiana. A fluoxetina, foi relatada como um antimicrobiano para as bactérias, de forma que o tratamento de cepas de MRSA com fluoxetina promoveu mudanças na integridade da membrana plasmática e possivelmente atuou em sítios específicos próximo do DNA celular, levando à morte por apoptose (NETO et al., 2019). A fluoxetina teve um efeito antibacteriano significativo e um potencial modulador da atividade antimicrobiana contra bactérias multi-resistentes, como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (SOUSA et al., 2018).

Para os fungos, a fluoxetina teve atividade antifúngica *in vitro* contra cepas de *Candida* spp., além de ter ação contra a viabilidade do biofilme (SILVA et al., 2017). Ademais, a fluoxetina mostrou sinergia em combinação com os azólicos contra *C. albicans* resistentes, ambos *in vitro* e *in vivo* (GU et al., 2016). Adicionalmente, a fluoxetina demonstrou atividade contra vírus. De fato, essa droga foi capaz de inibir o RNA viral e as proteínas do *Coxsackievirus* (ZUO et al., 2012). Outrossim, mostrou ser benéfica contra infecções por COVID-19 (ALTAY et al., 2020), reduzindo os riscos de intubação e morte (HOERTEL, 2021; CREEDEN et al., 2021).

Alguns mecanismos antimicrobianos já foram propostos para a fluoxetina como, inibição do crescimento celular, promove a despolarização e danos na membrana, diminui a atividade metabólica dos biofilmes maduros, possui interação sinérgica com azóis e antibióticos, desregula a atividade das fosfolipases, inibe o crescimento bacteriano e reduz a síntese de RNA viral e proteínas (ZUO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014; GU et al., 2016; SOUSA et al., 2018; MORAES; FERREIRA-PEREIRA, 2019; FOLETTTO et al., 2020; TEKINTAS et al., 2020).

Algumas vantagens do sinergismo entre medicamentos são a menor possibilidade de um patógeno desenvolver resistência na combinação de dois ou mais compostos do que a encontrada num único medicamento. Do mesmo modo, a atividade antimicrobiana dos

medicamentos combinados é maior do que a utilização individual do agente, para além de um aumento do espectro de cobertura (VAZQUEZ-GRANDE; KUMAR, 2015). Diante disso, o trabalho se propôs a analisar a atividade inibitória da fluoxetina contra *B. pseudomallei* em crescimento planctônico e de biofilme, bem como avaliar se o composto potencializou os antimicrobianos utilizados no tratamento da melioidose.

3 HIPÓTESES

- A fluoxetina inibe o crescimento planctônico da bactéria *B. pseudomallei*.
- A fluoxetina erradica os biofilmes maduros e em formação de cepas de *B. pseudomallei*.
- A fluoxetina potencializa o efeito dos antimicrobianos utilizados para o tratamento da melioidose.

4. OBJETIVO GERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vitro* do cloridrato de fluoxetina sobre o crescimento planctônico, a dinâmica de formação de biofilmes e a sensibilidade antimicrobiana de *B. pseudomallei*.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da fluoxetina e dos antimicrobianos amoxicilina-clavulanato, meropenem e doxiciclina isolados ou combinados contra *B. pseudomallei* na forma planctônica.
2. Avaliar o efeito *in vitro* da fluoxetina sobre a formação de biofilmes e sobre biofilmes maduros de *B. pseudomallei*.
3. Avaliar a interação entre fluoxetina e os antimicrobianos amoxicilina-clavulanato (AMC), meropenem (MER) e doxiciclina (DOX) contra biofilmes maduros de *B. pseudomallei*.

5. METODOLOGIA

5.1 Isolados bacterianos

Foram utilizadas, em todas as etapas desse estudo, dezesseis cepas (16) de *B. pseudomallei*, oito clínicas e oito ambientais, isoladas no estado do Ceará. Todas as cepas pertenciam à coleção do LAPERE, que foram identificadas previamente por método bioquímico, no equipamento VITEK2® e através do sequenciamento da região 16S do RNA (BRILHANTE et al., 2012a, b). Após isso, as cepas foram retiradas dos estoques e recuperadas em caldo BHI. Para isso, os experimentos foram realizados em cabine de fluxo laminar II/B2, acondicionada no laboratório de nível de Biossegurança 3, onde há instalações físicas necessárias, procedimentos e normas que asseguram a contenção biológica deste microrganismo.

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima da fluoxetina e dos antimicrobianos utilizados no tratamento da melioidose

O teste de sensibilidade com *B. pseudomallei* na forma planctônica foi realizado para determinar a CIM da FLU, AMC, MER e DOX. Além disso, foi realizada a associação dos antimicrobianos com a FLU na forma planctônica de *B. pseudomallei* para analisar a sua interação. Para isso, foi utilizado a microdiluição em caldo Mueller-Hinton (MH), em placas de 96 poços de fundo “U”, conforme preconizado pelo documento M100-S28 (CLSI, 2020). As cepas foram inicialmente cultivadas em caldo BHI a 37 °C durante 48 horas. Após esse período, os inóculos bacterianos foram preparados em solução salina estéril, atingindo uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland, e diluídos em caldo Mueller Hinton a uma concentração final de 5×10^5 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

FLU foi testada num intervalo de concentração de 9,76 - 5000 µg/mL. Os antimicrobianos foram avaliados nas seguintes concentrações: 0,125/0,06 - 64/32 µg/mL para AMC (*Sigma Aldrich, Brazil*) e 0,03 - 16 µg/mL para MER (*Sigma Aldrich, Brazil*) e DOX (*Sigma Aldrich, Brazil*). As placas foram inicialmente preenchidas com 100 µL do caldo MH. Em seguida, foram adicionados 100 µL de cada droga somente na primeira coluna. A partir dessa concentração inicial, foi realizada a microdiluição com o auxílio de uma pipeta multicanal, homogeneizando e retirando 100 µL da coluna 1 até a coluna 10. Posteriormente, foram retirados 100 µL da coluna 10 e transferidos para a coluna 12, a qual foi utilizada como controle de esterilidade. Após isso, 100 µL do inóculo preparado anteriormente foi adicionado

em todos os poços até a coluna 11, a qual foi utilizada como controle de crescimento. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas.

Após 24 horas, foi realizada a leitura visual da CIM, que foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento do microrganismo comparado ao controle de crescimento. Para o controle das drogas, foi utilizada a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

5.3 Efeito da fluoxetina combinada com agentes antimicrobianos na forma planctônica de *B. pseudomallei*

Para a combinação da FLU com as drogas antimicrobianas contra *B. pseudomallei* na forma planctônica, foi adicionado ao caldo Mueller Hinton a concentração de CIM/2 (9,76 - 156,25 µg/mL) de FLU e o ensaio foi realizado de acordo com o CLSI, conforme descrito na seção 5.2. As drogas antimicrobianas foram avaliadas no mesmo intervalo de concentração usado no ensaio de sensibilidade planctônica, conforme descrito anteriormente. As CIMs foram definidas como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento visual do microrganismo, após 24 horas de incubação. As CIMs obtidas para cada droga antimicrobiana em combinação com a FLU foram comparadas àquelas obtidas para os antimicrobianos isoladamente (SIDRIM et al., 2020).

5.4 Efeito da fluoxetina na formação do biofilme de *B. pseudomallei*

A formação do biofilme foi realizada em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, utilizando caldo BHI enriquecido com glicose a 1% e inóculo bacteriano com turvação 6 na escala de McFarland, em uma proporção meio de cultura:inóculo de 1:7 (v/v). Para avaliar o efeito da FLU na formação do biofilme, a droga foi incorporada ao meio de cultura em três concentrações, CIM, CIM/2 e CIM/4, com base nas CIMs obtidas contra cada isolado. Em seguida, 175 µL de meio contendo FLU nas diferentes concentrações foram adicionados aos poços das placas, e, então, 25 µL do inóculo bacteriano foram acrescentados aos poços e as placas foram incubadas a 37 °C, por 48 horas (SIDRIM et al., 2020). Após 48 horas de crescimento, 20 µL de resazurina (0,025%) foram adicionados em todos os poços para avaliar a atividade metabólica dos biofilmes (SIDRIM et al., 2020).

Posteriormente, os poços foram lavados com solução estéril de tampão salina fosfato, com intuito de remover as células não aderidas. Em seguida, a biomassa do biofilme foi quantificada pela técnica do cristal violeta, por espectrofotometria a 490 nm (SIDRIM et al.,

2020). Os testes foram realizados em triplicata, em dois momentos diferentes. Poços livres de droga foram utilizados como controle de crescimento, enquanto poços contendo somente meio de cultura foram utilizados como controle de esterilidade. O efeito da FLU sobre a formação de biofilme foi avaliado comparando a biomassa do controle de crescimento, onde havia somente meio de cultura e o microrganismo, àquela dos poços contendo meio de cultura, FLU e o microrganismo.

5.5 Efeito da fluoxetina e dos antimicrobianos nos biofilmes maduros de *B. pseudomallei*

Para avaliar o efeito da FLU sobre biofilmes de *B. pseudomallei*, a formação de biofilmes foi inicialmente induzida, com 175 µL de BHI enriquecido com glicose a 1% mais 25 µL do inóculo bacteriano na escala 6 de McFarland e incubados por 48 horas. Após 48 h de crescimento, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados uma vez com tampão salina-fosfato (PBS). Em seguida, foram adicionados 100 µL de BHI-1% glicose contendo 10 diluições seriadas de FLU (9,76 - 5000 µg/mL) e as placas foram incubadas por mais 24 horas. Posteriormente, foi avaliada a atividade metabólica com resazurina (0,025%) para determinação da concentração eliminatória mínima sobre o biofilme (CEMB), definida como a menor concentração na qual não se detectou atividade metabólica, e a biomassa foi quantificada pela técnica do cristal violeta, conforme descrito anteriormente (CASTELO-BRANCO et al., 2016; SIDRIM et al., 2020).

Os testes foram realizados em duplicata, em três momentos diferentes. Poços livres de droga foram utilizados como controle de crescimento, enquanto poços contendo somente meio de cultura foram utilizados como controle de esterilidade. O efeito da FLU no biofilme maduro foi avaliado comparando a biomassa do controle de crescimento, onde havia somente meio de cultura e microrganismo, àquela dos poços contendo meio de cultura, FLU e o microrganismo.

Para avaliar a sensibilidade dos biofilmes maduros a antimicrobianos utilizados para tratar melioidose, a formação de biofilmes foi induzida, conforme descrito acima. Após 48 h de incubação, foram adicionados 100 µL de BHI-1% glicose contendo 10 diluições seriadas de AMC (1/0,5 - 512/256 µg/mL), MER (0,5 - 256 µg/mL) e DOX (0,5 - 256 µg/mL). As placas foram incubadas por mais 24 h, em seguida foi avaliada a atividade metabólica com resazurina (0,025%) para determinar a CEMB.

5.6 Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes em formação e maduro de *B. pseudomallei* expostos a fluoxetina

O efeito da FLU na estrutura dos biofilmes em formação e maduros foi avaliado por microscopia confocal. Para tal, foram escolhidas duas cepas representativas, sendo fortes formadores de biofilme para essa análise (cepa clínica CEMM 03-6-038 e cepa ambiental CEMM 03-6-041). Os biofilmes foram cultivados em placa de poliestireno de 24 poços contendo uma lamínula de vidro (1 cm de diâmetro) no fundo da placa, utilizando a mesma metodologia descrita para a formação do biofilme, ajustando o volume total (inóculo e caldo BHI-1% glicose) para 1000 μL , mantendo a razão meio de cultura: inóculo (7:1 v/v). Para avaliar os efeitos da FLU na formação do biofilme, essas estruturas foram cultivadas na presença de FLU a 156,25 $\mu\text{g/mL}$ (CIM). Quanto aos biofilmes maduros, a FLU foi adicionada na concentração de CEMB (1250 ou 2500 $\mu\text{g/mL}$, para a cepa ambiental e clínica, respectivamente), após 48 h de crescimento do biofilme, e incubadas por mais 24 h, como descrito anteriormente. Posteriormente, as lamínulas foram colocadas em placas de Petri com fundo de lâmina, contendo corante fluorescente Live/Dead (InvitrogenTM, EUA) (200 μL). Posteriormente, os biofilmes foram avaliados sob um Microscópio Confocal Nikon C2, com uma ampliação de 600x (7 campos), a 488 nm para a detecção do corante fluorescente SYTO9, que identifica células bacterianas vivas, e 561 nm para a detecção de iodeto de propídio, que identifica células bacterianas mortas/destruídas. As imagens Z-stack foram analisadas com o software COMSTATTM e os parâmetros biomassa, espessura média da biomassa, espessura de toda a área, coeficiente de rugosidade e razão superfície-volume foram calculados para FLU expostos e não-expostos aos biofilmes (controle de crescimento) (SIDRIM et al., 2020).

5.7 Efeito da fluoxetina sobre a sensibilidade de biofilmes de *B. pseudomallei* para antimicrobianos utilizados para tratar a melioidose

Os biofilmes foram formados, conforme descrito nas seções anteriores. Após 48 h de incubação, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados uma vez com PBS. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de BHI-1% glicose contendo 10 diluições seriadas de AMC (1/0,5 – 512/256 $\mu\text{g/mL}$), MER (0,5 - 256 $\mu\text{g/mL}$) e DOX (0,5 - 256 $\mu\text{g/mL}$). Para avaliar o efeito da FLU sobre a sensibilidade antimicrobiana do biofilme, a droga foi incorporada ao BHI-1% glicose a uma concentração fixa de CIM (19,53 – 312,5 $\mu\text{g/mL}$) e CEMB/4 (312,5 e 625 $\mu\text{g/mL}$). Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C, por mais 24 h.

Posteriormente, a atividade metabólica do biofilme foi avaliada, utilizando resazurina (0,025%), visando determinar a CEMB. Finalmente, a biomassa foi quantificada pela técnica do cristal violeta. Poços livres de droga foram utilizados como controle de crescimento, enquanto poços contendo somente meio de cultura foram utilizados como controle de esterilidade. As CEMBs obtidas para cada droga antimicrobiana em combinação com fluoxetina foram comparadas às aquelas obtidas para os antimicrobianos isoladamente.

5.8 Análise estatística

Os efeitos da FLU na sensibilidade aos antimicrobianos, na formação de biofilme e no biofilme maduro foram analisados usando o teste t de Mann-Whitney para dados assimétricos e teste t não pareado para dados simétricos. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas usando o software Graphpad Prism 9.0.

6. RESULTADOS

6.1 Concentração inibitória mínima da fluoxetina e drogas antimicrobianas utilizadas no tratamento da melioidose

A FLU apresentou CIMs variando de 19,53 a 312,5 $\mu\text{g/mL}$ (média geométrica – MG = 137,20). Para os antimicrobianos, obteve-se CIM de $\geq 64/32$ $\mu\text{g/mL}$ para AMC, 1 $\mu\text{g/mL}$ (MG = 1) para MER e de 0,25 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (MG = 0,28) para DOX (Quadro 1).

6.2 Efeito da fluoxetina combinada com agentes antimicrobianos na forma planctônica de *B. pseudomallei*

Quando a FLU (CIM/2) foi combinada com os agentes antimicrobianos, houve aumento significativo ($P < 0,05$) da CIM para MER, que apresentou um intervalo de CIM de 0,03125 – 2 $\mu\text{g/mL}$ (MG = 1,139), enquanto as CIMs de AMC e DOX não sofreram alterações significativas (Quadro 1).

Quadro 1. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatórias mínimas de biofilme (CEMBs) para fluoxetina (FLU), amoxicilina-clavulanato (AMC), meropenem (MER) e doxiciclina (DOX) contra *B. pseudomallei* (n=16).

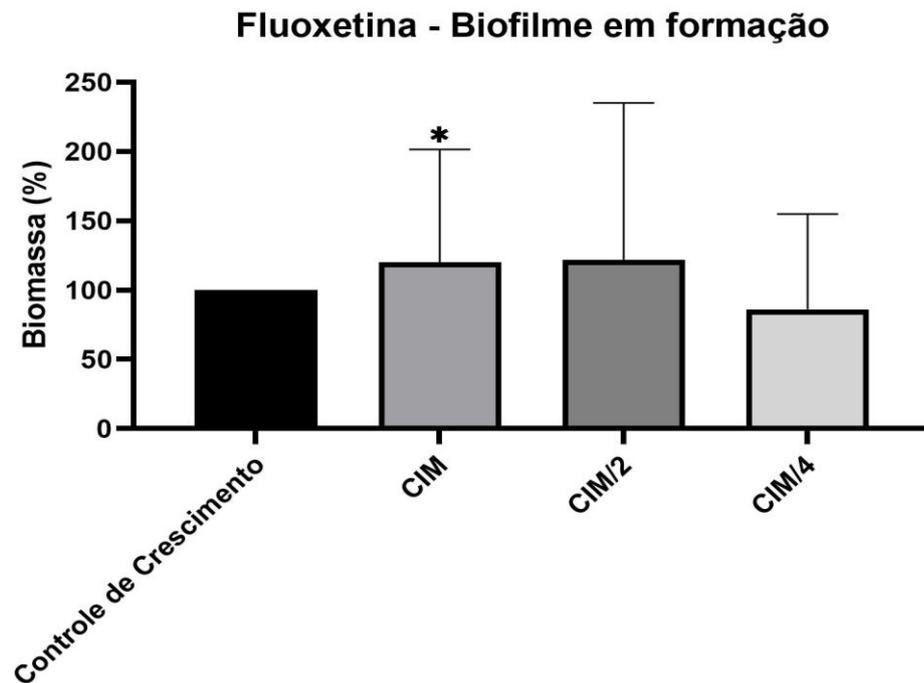
Cepas (CEMM)	Fonte	FLU (µg/mL)		AMC (µg/mL)				MER (µg/mL)				DOX (µg/mL)			
		Sozinha		Sozinha		Fluoxetina (µg/mL)		Sozinha		Fluoxetina (µg/mL)		Sozinha		Fluoxetina (µg/mL)	
		CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM/2	CEMB/4	CIM	CEMB	CIM/2	CEMB/4	CIM	CEMB	CIM/2	CEMB/4
03-6-034	CLIN	312,5	2500	64/32	>512/256	0,125/0,06	>512/256	1	> 256	0,03125	128	0,25	>256	0,03125	2
03-6-036	CLIN	156,25	2500	64/32	>512/256	>64/32	256/128	1	> 256	2	128	0,25	>256	0,125	1
03-6-038	CLIN	156,25	2500	>64/32	>512/256	>64/32	>512/256	1	> 256	2	256	0,5	>256	0,50	32
05-5-096	CLIN	156,25	2500	>64/32	>512/256	0,125/0,06	>512/256	1	256	1	128	0,5	>256	0,0625	128
05-6-089	CLIN	156,25	2500	>64/32	>512/256	0,125/0,06	32/16	1	> 256	2	256	0,5	>256	0,03125	64
05-6-091	CLIN	156,25	2500	64/32	>512/256	16/8	16/8	1	> 256	1	8	0,25	>256	0,25	2
05-6-092	CLIN	156,25	2500	64/32	>512/256	>64/32	64/32	1	> 256	2	>256	0,25	>256	0,50	>256
05-6-093	CLIN	78,12	1250	64/32	>512/256	64	64/32	1	> 256	2	2	0,25	>256	0,50	2
03-6-039	AMB	19,53	1250	64/32	>512/256	0,125/0,06	32/16	1	16	0,06250	8	0,25	256	0,03125	256
03-6-040	AMB	156,25	2500	64/32	>512/256	>64/32	1/0,5	1	> 256	2	256	0,25	>256	0,25	256
03-6-041	AMB	156,25	1250	>64/32	>512/256	>64/32	256/128	1	> 256	2	128	0,25	>256	0,25	>256
03-6-042	AMB	156,25	1250	>64/32	>512/256	>64/32	>512/256	1	> 256	2	64	0,25	256	0,25	8
06-6-043	AMB	156,25	1250	64/32	>512/256	>64/32	>512/256	1	> 256	2	>256	0,25	>256	0,25	>256
03-6-046	AMB	156,25	1250	64/32	>512/256	>64/32	>512/256	1	> 256	2	256	0,25	>256	0,25	>256
03-6-047	AMB	156,25	1250	64/32	>512/256	>64/32	>512/256	1	> 256	2	256	0,25	>256	0,50	>256
03-6-048	AMB	156,25	2500	64/32	>512/256	>64/32	256/128	1	> 256	2	8	0,25	>256	0,25	2
Média	Geométrica	137,20*	1846*	79.48/39,74*	>512/256*†	19,03/9,51	181†	1*¥	394,8†	1,139¥	83†	0,285*	469,5*†	0,177	41,5†

CLIN: Isolados Clínicos; AMB: Isolados Ambientais. *indica diferenças significativas (P<0,05) entre FLU e CIMs e CEMBs antibacterianos. †indica diferenças significativas (P<0,05) entre CEMBs de drogas antimicrobianas isoladas e combinadas com FLU. ¥indica diferenças significativas (P<0,05) entre CIMs de drogas antimicrobianas isoladas e combinadas com FLU.

6.3 Efeito da fluoxetina na formação de biofilme por *B. pseudomallei*

A FLU, aumentou a biomassa de *B. pseudomallei* em formação na concentração de CIM (Figura 10), e não alterou em nenhuma outra concentração testada. No entanto, a FLU reduziu a viabilidade do biofilme de todas as cepas nas concentrações de CIM (19,53 – 312,5) e CIM/2 (9,76 – 156,25), evidenciado pelo ensaio da resazurina.

Figura 10. Efeito da fluoxetina (FLU) no biofilme em formação de *B. pseudomallei*

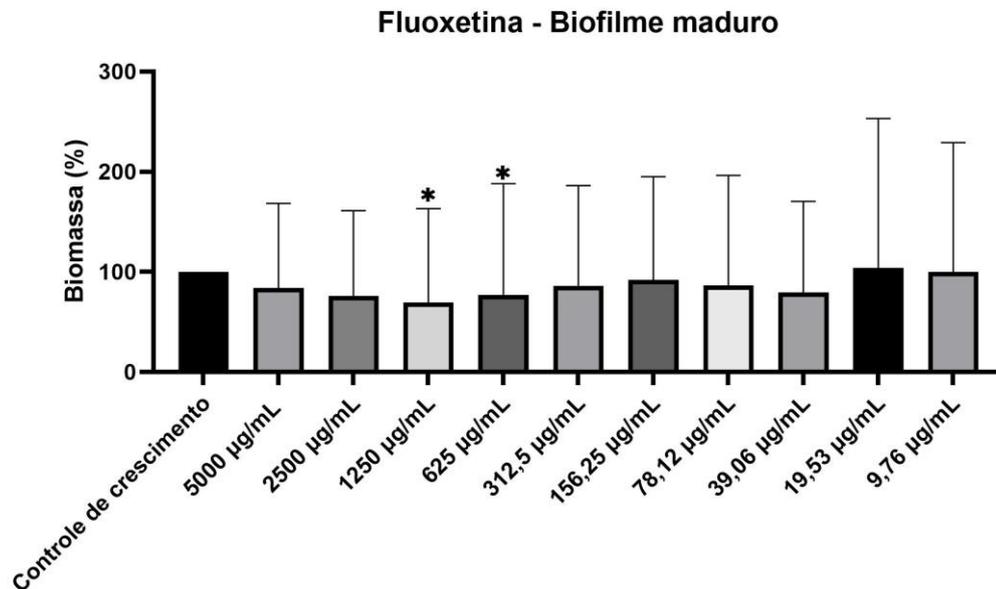


Legenda: Dados expressos como média e desvio padrão da biomassa do biofilme, medido pela técnica de coloração por cristal violeta. *indica diferença estatisticamente significativas ($P < 0,05$), quando comparado com o controle de crescimento do biofilme sem drogas.

6.4 Efeito da fluoxetina e dos antimicrobianos no biofilme maduro de *Burkholderia pseudomallei*

A FLU erradicou os biofilmes de *B. pseudomallei*, apresentando valores de CEMB variando de 1250 – 2500 $\mu\text{g/mL}$. Nas concentrações de 625 e 1250 $\mu\text{g/mL}$, houve reduções estatisticamente significativas ($P < 0,05$) na biomassa do biofilme (Figura 11). Quanto aos agentes antimicrobianos, não foram encontrados valores de CEMB para AMC e os intervalos de CEMB para MER foram 16 – $>256 \mu\text{g/mL}$ (MG = 394,8) e $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ (MG = 469,5) para DOX (Quadro 1). De maneira geral, as CEMBs da FLU e dos antimicrobianos foram significativamente ($P < 0,05$) maiores que suas respectivas CIMs.

Figura 11. Efeitos da fluoxetina no biofilme maduro de *B. pseudomallei*

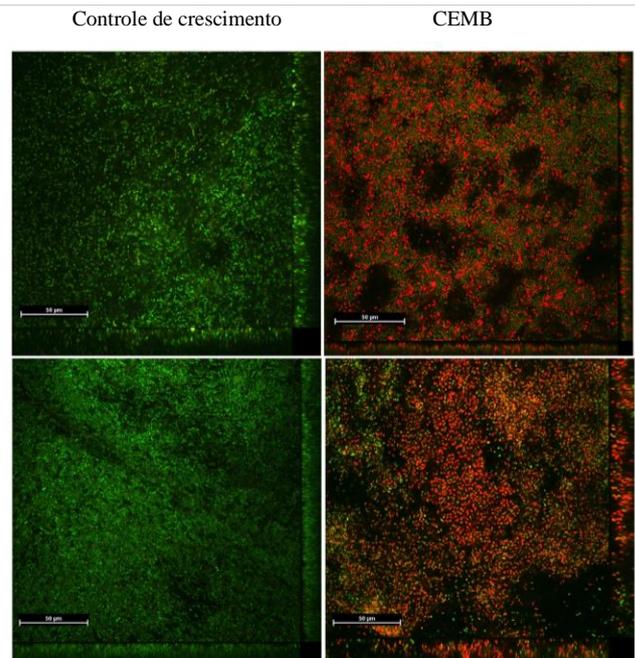
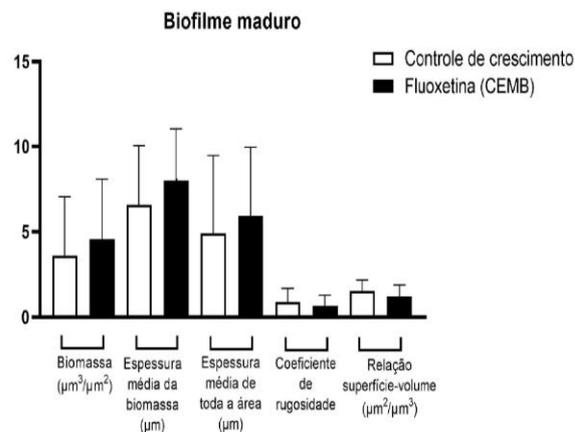
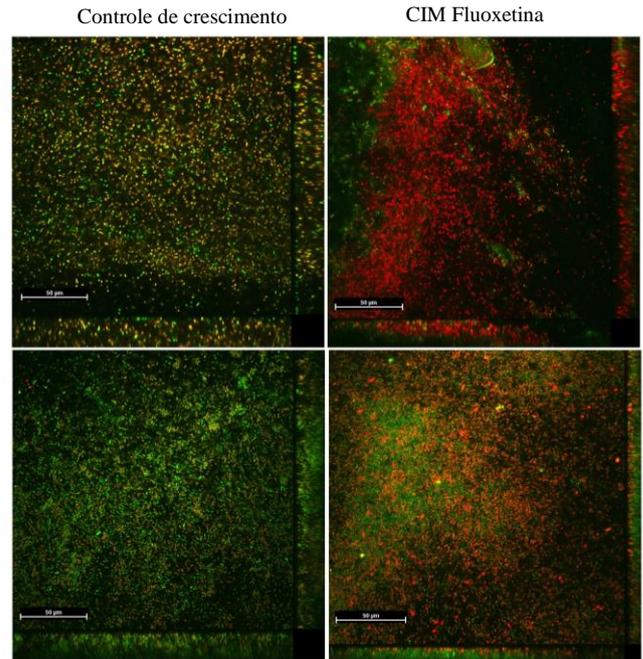
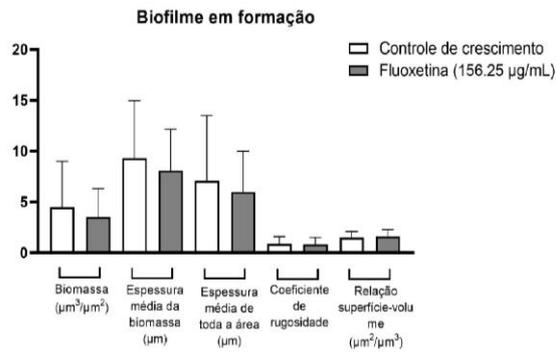


Legenda: Dados expressos como média e desvio padrão da biomassa do biofilme, medido pela técnica de coloração por cristal violeta. *indica diferença estatisticamente significativas ($P < 0,05$), quando comparado com o controle de crescimento do biofilme sem drogas.

6.5 Análise da microscopia confocal da fluoxetina em biofilmes em formação e maduro de *B. pseudomallei*

Na análise do biofilme por microscopia confocal utilizando Live/Dead, não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações testadas tanto no biofilme em formação como no biofilme maduro quando comparado ao controle de crescimento (Figura 12). Foi demonstrado que a FLU reduziu a viabilidade do biofilme no CIM e CEMB4, sem perturbar a estrutura do biofilme.

Figura 12. Análise da microscopia confocal da fluoxetina na formação do biofilme e biofilme maduro de *B. pseudomallei*



Legenda: À esquerda os dados apresentados das cepas BP6 e 041 e estão representadas como média e desvio padrão, utilizando o teste t de Mann Whitney. E à direita, imagens obtidas a partir da microscopia confocal evidenciando a presença de células verdes (SYTO9) e vermelhas (iodeto de propídio).

6.6 Efeito da fluoxetina sobre a sensibilidade de biofilmes de *B. pseudomallei* para antimicrobianos utilizados para tratar a melioidose

Quando as drogas foram combinadas com a FLU, na concentração de CIM (19,53 – 312,5 µg/mL) não houve redução de CEMB para AMC, MER e DOX. Contudo, na concentração de CEMB/4 (312,5 ou 625 µg/mL), a FLU levou a reduções estatisticamente significativas de CEMB para AMC (P=0,0008), MER (P<0,0001) e DOX (P=0,0004).

7. DISCUSSÃO

Os biofilmes microbianos são comunidades complexas de bactérias ligadas a uma superfície, envoltas por uma matriz extracelular polimérica composta, principalmente, por polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA (MUHAMMAD et al., 2020). Os microrganismos formam biofilme para aumentar sua capacidade de sobrevivência em condições de stress, tais como exposição à radiação ultravioleta (UV), escassez de nutrientes, pH e temperaturas elevadas e altas concentrações de sal (YIN et al. 2019). *B. pseudomallei* é intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos e é capaz de formar biofilmes, aumentando a sua tolerância às drogas antimicrobianas. Um estudo demonstrou que infecções por *B. pseudomallei* apresentam altas taxas de recidiva em comparação com outras infecções bacterianas, que podem ser relacionados com a capacidade de formação de biofilme dessa espécie bacteriana (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2014).

Diante disso, o reposicionamento de fármacos tem sido descrito como uma estratégia eficaz para superar os mecanismos de resistência antimicrobianas (HADERA et al. 2018). FLU, por exemplo, é uma droga psicotrópica que também apresenta atividade antimicrobiana, ao inibir bombas de efluxo, altera a permeabilidade da membrana e danifica o DNA bacteriano (DAS; BASAK; ROY, 2017; SOUSA et al., 2018; NETO et al., 2019). A extrusão de drogas por bombas de efluxo tem sido relatada como o principal mecanismo de resistência antimicrobiana em *B. pseudomallei*, afetando a maioria das classes de antibióticos, devido à sinergia entre a redução da permeabilidade e o aumento do efluxo (SCHWEIZER et al., 2012). Além disso, as bombas de efluxo estão ativamente envolvidas na formação e manutenção do biofilme, uma vez que contribuem para a extrusão de moléculas de *quorum sensing*, desintoxicação celular, entre outras funções. Assim, a utilização de FLU para superar a tolerância antimicrobiana do biofilme de *B. pseudomallei* parece ser uma estratégia promissora.

Na presente pesquisa, primeiramente foi avaliado o efeito da FLU no crescimento planctônico e na sensibilidade antimicrobiana de *B. pseudomallei*, demonstrando que esse composto inibe o crescimento bacteriano, em concentrações que variam entre 19,53 – 312,5 µg/mL. Na literatura já foi relatada a atividade inibitória da FLU em cepas ATCC e resistentes de *Staphylococcus aureus* apresentando uma CIM de 256 e 102 µg/mL, respectivamente. Quanto a *Pseudomonas aeruginosa*, a CIM de fluoxetina foi de 161 µg/mL, tanto para cepas ATCC quanto para cepas resistentes, enquanto contra ATCC e cepas resistentes de *E. coli*, a CIM de fluoxetina foi de 102 µg/mL (SOUSA et al., 2018). Foletto et

al. (2020), descreveram CIMs de FLU variando de 32 a 256 µg/mL contra *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus epidermidis*. Ademais, foram observados CIMs de 256 µg/mL contra *P. mirabilis* (NZAKIZWANAYO et al., 2017). Em outro estudo, a FLU teve ação contra *Candida* spp., com CIMs variando de 9,8 - 625 µg/mL, ligeiramente superior às encontradas no presente estudo (OLIVEIRA et al., 2014). Os valores de CIM de FLU contra *B. pseudomallei* corroboram com os relatos prévios contra os demais microrganismos.

Quanto à combinação da FLU com as drogas antimicrobianas contra a forma planctônica de *B. pseudomallei*, observou-se que FLU aumentou significativamente as CIMs do MER, enquanto não alterou significativamente as CIMs de AMC e DOX. Os mecanismos pelos quais a FLU atua sobre os microrganismos permanecem desconhecidos, embora já se saiba que a inibição das bombas de efluxo seja o mecanismo proposto a partir de estudos com células humanas (MUNOZ-BELLIDO; MUNOZ-CRIADO; GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2000). Essa possível inibição da síntese da parede celular pode resultar na competição com o MER, diminuindo a sua atividade antibacteriana.

Foram também avaliados os efeitos da FLU nas diferentes fases de crescimento do biofilme de *B. pseudomallei*. Nas fases iniciais de formação de biofilmes, observou-se que a FLU aumentou a biomassa do biofilme no CIM, enquanto não interferiu com a biomassa nas demais concentrações testadas (CIM/2 e CIM/4). As presentes descobertas diferem de Tekintas *et al.* (2020), que relataram que a FLU, em concentrações subinibitórias, alterou a biomassa do biofilme de *Candida* spp. Por outro lado, a FLU no CIM e CIM/2 matou biofilmes crescentes de *B. pseudomallei*, enquanto aumentava sua biomassa. A razão para estas descobertas permanece desconhecida, mas as células de biofilme em formação expostas a FLU parecem compactadas, como demonstrado por análises por microscopia confocal, o que pode indicar desidratação da matriz, levando ao aumento da absorvância de cristal violeta, daí o aumento da biomassa.

Quanto aos biofilmes maduros, observou-se que a FLU erradicou os biofilmes de *B. pseudomallei* nas concentrações de 1250 - 2500 µg/mL e reduziu estatisticamente a biomassa desses biofilmes apenas nas concentrações de 1250 e 625 µg/mL. A FLU parece mais eficaz em prejudicar o metabolismo do biofilme e não em reduzir a biomassa dos biofilmes maduros, como foi relatado para espécies de *Candida* (OLIVEIRA et al., 2018) e demonstrado pela análise por microscopia confocal, que revelou uma estrutura de biofilme espessa, semelhante ao controle de crescimento, com um grande número de células mortas. A

FLU possui características lipofílicas que podem justificar a ruptura da biomassa, permitindo que as moléculas da droga penetrem no biofilme, destruindo a sua matriz e afetando a sua viabilidade.

Além de erradicar biofilmes maduros de *B. pseudomallei*, FLU, no CEMB/4, também potencializou a atividade antibiótica da AMC, MER e DOX, possivelmente perturbando a estrutura do biofilme e expondo as células bacterianas às drogas. Outrossim, os IRSSs prejudicam muitos processos de biossíntese microbiana e são, portanto, sugeridos para interferir com processos metabólicos básicos, relacionados ou não com a absorção de substâncias (MUNOZ-BELLIDO; MUNOZ-CRIADO; GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2000).

A interação sinérgica entre a FLU e outros antimicrobianos foi demonstrada contra espécies de *Candida* em combinação com antifúngicos azólicos, e, também contra *P. aeruginosa* e *E. coli* em combinação com gentamicina e eritromicina, demonstrando que a FLU pode modular seletivamente a atividade dos antimicrobianos clinicamente utilizados (CHARLES et al., 2017; SOUSA et al., 2018). Além disso, a FLU inibe a produção de interleucina-6 (IL-6) e óxido nítrico (NO), que são induzidos pelo LPS de bactérias Gram-negativas (LIU et al., 2011; CHARLES et al., 2017).

O estudo demonstrou que a FLU inibe o crescimento planctônico, erradica biofilmes em formação e maduros de *B. pseudomallei*, e torna-os mais sensíveis à AMC, MER e DOX. Essas descobertas sugerem o reposicionamento do fármaco como uma abordagem promissora para combater os microrganismos. Assim, mais estudos avaliando a aplicabilidade desse medicamento contra *Burkholderia pseudomallei* são necessários.

8. CONCLUSÃO

- Fluoxetina inibe o crescimento planctônico de *B. pseudomallei*
- As drogas antimicrobianas inibem o crescimento de *B. pseudomallei* na forma planctônica.
- A fluoxetina erradica os biofilmes em formação e os biofilmes maduros de *B. pseudomallei*.
- A fluoxetina potencializa a atividade dos antimicrobianos geralmente utilizados no tratamento da melioidose contra biofilmes maduros.

REFERÊNCIAS

- ABBINK, F. C.; ORENDI, J. M.; BEAUFORT, A. J. Mother-to-child transmission of *Burkholderia pseudomallei*. *The New England Journal of Medicine*, v. 344, p. 1171-1172, 2001.
- ADLER, N. R. L.; GOVAN, B.; CULLINANE, M.; HARPER, M.; ADLER, B.; BOYCE, J. D. The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis: how does *Burkholderia pseudomallei* cause disease?. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 33, p. 1079-1099, 2009.
- ADLER, N. R. L.; DEAN, R. E.; SAINT, R. J.; STEVENS, M. P.; PRIOR, J. L.; ATKINS, T. P.; GALYOV, E. E. Identification of a predicted trimeric autotransporter adhesin required for biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS One*, v. 8, n. 11, 2013.
- ALLWOOD, E. M.; DEVENISH, R. J.; PRESCOTT, M.; ADLER, B.; BOYCE, J. D. Strategies for intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Frontiers in Microbiology*, v. 2, n. 170, 2011.
- ALMOG, Y.; YAGEL, Y.; GEFFEN, Y.; YAGUPSKY, P. A *Burkholderia pseudomallei* infection imported from Eritrea to Israel. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 5, p. 997-998, 2016.
- ALTAY, O.; MOHAMMADI, E.; LAM, S.; TURKEZ, H.; BOREN, J.; NIELSEN, J.; UHLEN, M.; MARDINOGLU, A. Current status of COVID-19 therapies and drug repositioning applications. *iScience*, v. 23, n. 7, 2020.
- BAKER, A.; MAYO, M.; OWENS, L.; BURGESS, G.; NORTON, R.; MCBRIDE, W. J.; CURRIE, B. J.; WARNER, J. Biogeography of *Burkholderia pseudomallei* in the Torres Strait Islands of Northern Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 8, p. 2520-2525, 2013.
- BANDEIRA, T. J. P. G.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; MOREIRA, C. A.; CORDEIRO, R. A.; RIBEIRO, J. F.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; SIDRIM, J. J. C. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical and environmental strains of *Burkholderia pseudomallei* from Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 42, n. 4, p. 375-377, 2013.
- BARTH, A. L.; SILVA, F. A. A.; HOFFMAN, A.; VIEIRA, M. I.; ZAVASCKI, A. P.; FERREIRA, A. G.; JUNIOR, L. G. C.; ALBANO, R. M.; MARQUES, E. A. Cystic fibrosis patient with *Burkholderia pseudomallei* infection acquired in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 12, p. 4077-4080, 2007.
- BENOIT, T. J.; BLANEY, D. D.; GEE, J. E.; ELROD, M. G.; HOFFMASTER, A. R.; DOKER, T. J.; BOWER, W. A.; WALKER, H. T.; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Melioidosis cases and selected reports of occupational exposures to *Burkholderia pseudomallei* - United States, 2008 - 2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*, v. 5, p. 1-9, 2015.

BOTTEGA, A.; SERAFIN, M.; ROSA, T.; FOLETTI, V.; MACHADO, C.; COELHO, S.; MAINARDI, A.; HORNER, R. Antimicrobial, and antineoplastic properties of sertraline. *American Journal of Therapeutics*, v. 27, n. 6, p. 632-635, 2020.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. *Second Edition*, v. 2, p. 41-79, 2005.

BRILHANTE, R. S. N.; BANDEIRA, T. J. P. G.; CORDEIRO, R. A.; GRANGEIRO, T. B.; LIMA, R. A. C.; RIBEIRO, J. F.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; RODRIGUES, J. L. N.; COELHO, I. C. B.; MAGALHÃES, F. G.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Clinical-epidemiological features of 13 cases of melioidosis in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, p. 3349-3352, 2012a.

BRILHANTE, R. S. N.; VALENTE, L. G. A.; ROCHA, M. F. G.; BANDEIRA, T. J. P. G.; CORDEIRO, R. A.; LIMA, R. A. C.; LEITE, J. J. G.; RIBEIRO, J. F.; PEREIRA, J. F.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C. Sesquiterpene farnesol contributes to increased susceptibility to β -lactams in strains of *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 2198-2200, 2012b.

CALDARA, M.; MARMIROLI, N. Antimicrobial properties of antidepressants and antipsychotics – possibilities and implications. *Pharmaceuticals*, v. 14, n. 9, 2021.

CAMARGO, N.; CASADIEGO, G. K.; FERNANDEZ, D. A.; MILLAN, L. V.; HERNANDEZ, A. K.; VARGAS, S.; RIOS, R.; MARIN-OSORIO, A.; SALCEDO, S.; RODRIGUEZ, D. L.; BAYUELO-CHARRIS, I. V.; ARIAS, C. A.; DIAZ, L.; REYES, J. A young diabetic patient with sepsis after gardening. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 7, n. 5, 2020.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; RIELLO, G. B.; VASCONCELOS, D. C.; GUEDES, G. M. M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. *Journal of Applied Microbiology*, v. 120, p. 600-606, 2016.

CEARÁ, Secretaria da Saúde do Estado. Guia de Vigilância da Melioidose, 50 p. 2017.

Centers for Disease Control and Prevention. Possession, use, and transfer of select agents and toxins; *Biennial review. Final rule. Federation register*, v. 77, p. 61083-61115, 2012.

CHAKRAVORTY, A.; HEATH, C. Melioidosis: an update review. *Australian Journal of General Practice*, v. 48, n. 5, p. 327-332, 2019.

CHAN, Y. Y.; CHUA, K. L. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 14, p. 4707-4719, 2005.

CHANCHAMROEN, S.; KEWCHAROENWONG, C.; SUSANENGAT, W.; ATO, M.; LERTMEMONGKOLCHAI, G. Human polymorphonuclear neutrophil responses to *Burkholderia pseudomallei* in healthy and diabetic subjects. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 1, p. 456-463, 2009.

CHARLES, E.; HAMMADI, M.; KISCHEL, P.; DELCROIX, V.; DEMAUREX, N.; CASTELBOU, C.; VACHER, A. M.; DEVIN, A.; DUCRET, T.; NUNES, P.; VACHER, P. The antidepressant fluoxetine induces necrosis by energy depletion and mitochondrial calcium overload. *Oncotarget*, v. 8, n. 2, p. 3181-3196, 2017.

CHENG, A. C.; CURRIE, B. J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, p. 383-416, 2005.

CHEWAPREECHA, C.; HOLDEN, M. T. G.; VEKALA, M.; VALIMAKI, N.; YANG, Z.; HARRIS, S. R.; MATHER, A. E.; TUANYOK, A.; SMET, B. D.; HELLO, S. L.; BIZET, C.; MAYO, M.; WUTHIEKANUN, V.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; PHETSOUVANH, R.; SPRATT, B. G.; CORANDER, J.; KEIM, P.; DOUGAN, G.; DANCE, D. A. B.; CURRIE, B. J.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J. Global and regional dissemination and evolution of *Burkholderia pseudomallei*. *Nature Microbiology*, v. 2, 2017.

CHOWDHURY, S.; BARAI, L.; AFROZE, S. R.; GHOSH, P. K.; AFROZ, F.; RAHMAN, H.; GHOSH, S.; HOSSAIN, M. B.; RAHMAN, M. Z.; DAS, P.; RAHIM, M. A. The epidemiology of melioidosis and its association with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Pathogens*, v. 11, 2022.

CIEVS (2010) *Boletim cievs*. Estado de Alagoas.

CLSI. 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Standards. **CLSI document M100-S30**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

COTTEW, G. S. Melioidosis in sheep in Queensland: A description of the causal organism. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, v. 28, n. 6, p. 677-683, 1950.

CREEDEN, J. F.; IMAMI, A. S.; EBY, H. M.; GILLMAN, C.; BECKER, K. N.; REIGLE, J.; ANDARI, E.; PAN, Z. K.; O'DONOVAN, S. M.; MCCULLUMSMITH, R. E.; MCCULLUMSMITH, C. B. Fluoxetine as an anti-inflammatory therapy in SARS-CoV-2 infection. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 138, 2021.

CROWE, A.; MCMAHON, N.; CURRIE, B. J.; BAIRD, R. W. Current antimicrobial susceptibility of first episode melioidosis *Burkholderia pseudomallei* isolates from the Northern Territory, Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 44, n. 2, p. 160-162, 2014.

CURRIE, B. J. Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travelers returned from endemic regions. *European Respiratory Journal*, v. 22, p. 542-550, 2003.

CURRIE, B. J. Melioidosis: evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 36, n. 1, p. 111-125, 2015.

CURRIE, B. J.; WARD, L.; CHENG, A. C. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, p. 900-909, 2010.

DAS, S.; BASAK, R.; ROY, S. Screening of antimicrobial effect of some non-antibiotics (anti-hypertensive) against some selected microorganisms. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science*, v. 4, n. 3, p. 1068-1079, 2017.

EDLER, C.; DERSCHUM, H.; KOHLER, M.; NEUBAUER, H.; FRICKMANN, H.; HAGEN, R. M. Comparison of mast *Burkholderia cepacia*, Ashdown + gentamicin, and *Burkholderia pseudomallei* selective agar for the selective growth of *Burkholderia* spp. *European Journal of Microbiology and Immunology*, v. 7, n. 1, p. 15-36, 2017.

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

FOLETTI, V. S.; SERAFIN, M. B.; BOTTEGA, A.; ROSA, T. F.; MACHADO, C. S.; COELHO, S. S.; HORNER, R. Repositioning of fluoxetine and paroxetine: study of potential antibacterial activity and its combination with ciprofloxacin. *Medicinal Chemistry Research*, v. 29, p. 556-563, 2020.

FONG, J. H.; PILLAI, N.; YAP, C. G.; JAHAN, N. K. Incidences, case fatality rates and epidemiology of melioidosis worldwide: a review paper. *Open Access Library Journal*, v. 8, n. 6, 2021.

GASSIEP, I.; ARMSTRONG, M.; NORTON, R. Human melioidosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 33, n. 2, 2020.

GILAD, J.; SCHWARTZ, D.; AMSALEM, Y. Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *International Journal of Biomedical Science*, v. 3, n. 3, p. 144-152, 2007.

GOPALAKRISHNAN, R.; SURESHKUMAR, D.; THIRUNARAYAN, M. A.; RAMASUBRAMANIAN, V. Melioidosis: an emerging infection in India. *The Journal of the Association of Physicians of India*, v. 61, n. 9, p. 612-614, 2013.

GOSHORN, R. K. Recrudescence pulmonary melioidosis. A case report involving the so-called 'Vietnamese time bomb'. *Indiana Medicine: The Journal of the Indiana State Medical Association*, v. 80, p. 247-249, 1987.

GREEN, R. N.; TUFFNELL, P. G. Laboratory acquired melioidosis. *The American Journal of Medicine*, v. 44, p. 599-605, 1968.

GU, W.; GUO, D.; ZHANG, L.; XU, D.; SUN, S. The synergistic effect of azoles and fluoxetine against resistant *Candida albicans* strains is attributed to attenuating fungal virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 10, p. 6179-6188, 2016.

HADERA, M.; MEHARI, S.; BASHA, N. S.; AMHA, N. D.; BERHANE, Y. Study on antimicrobial potential of selected non-antibiotics and its interaction with conventional antibiotics. *Pharmaceutical and Biosciences Journal*, v. 6, n. 1, 2018.

HALDER, D.; ZAINAL, N.; WAH, C. M.; HAQ, J. A. Neonatal meningitis and septicaemia caused by *Burkholderia pseudomallei*. *Annals of Tropical Paediatrics*, v. 18, p. 161-164, 1998.

HAYDEN, H. S.; LIM, R.; BRITTNACHER, M. J.; SIMS, E. H.; RAMAGE, E. R.; FONG, C.; WU, Z.; CRIST, E.; CHANG, J.; ZHOU, Y.; RADEY, M.; ROHMER, L.; HAUGEN, E.; GILLET, W.; WUTHIEKANUN, V.; PEACOCK, S. J.; KAUL, R.; MILLER, S. I.; MANOIL, C.; JACOBS, M. A. Evolution of *Burkholderia pseudomallei* in recurrent melioidosis. *PLoS One*, v. 7, n. 5, 2012.

HEMARAJATA, P.; BAGHDADI, J. D.; HOFFMAN, R.; HUMPHRIES, R. M. *Burkholderia pseudomallei*: challenges for the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 54, n. 12, p. 2866-2873, 2016.

HINJOY, S.; HANTRAKUN, V.; KONGYU, S.; KAEWRAKMUK, J.; WANGRANGSIMAKUL, T.; JITSURONK, S.; SAENGCHUN, W.; BHENGSR, S.; AKARACHOTPONG, T.; THAMTHITIWAT, S.; SANGWICHIAN, O.; ANUNNATSIRI, S.; SERMSWAN, R. W.; LERTMEMONGKOLCHAI, G.; THARINJAROEN, C. S.; PREECHASUTH, K.; UDPAUN, R.; CHUENSOMBUT, P.; WARANYASIRIKUL, N.; ANUDIT, C.; NARENPIKAK, S.; JUTRAKUL, Y.; TEPARRUKUL, P.; TEERAWATTANASOOK, N.; THANVISEJ, K.; SUPHAN, A.; SUK BUT, P.; PLODDI, K.; SIRICHOTIRAT, P.; CHIEWCHANYON, B.; RUKSEREE, K.; HONGSUWAN, M.; WONGSUWAN, G.; SUNTHORNSUT, P.; WUTHIEKANUN, V.; SACHAPHIMUKH, S.; WANNAPINI, P.; CHIERAKUL, W.; CHEWAPREECHA, C.; THAI PADUNGPANIT, J.; CHANTRATITA, N.; KORBSRISATE, S.; TAUNYOK, A.; DUNACHIE, S.; PALITTAPONGARNPIM, P.; SIRISINHA, S.; KITPHATI, R.; IAMSIRITHAWORN, S.; CHAOWAGUL, W.; CHETCHOTISAK, P.; WHISTLER, T.; WONGRATANACHEEWIN, S.; LIMMATHUROTSAKUL, D. Melioidosis in Thailand: Present and future. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 3, n. 2, 2015.

HOERTEL, N. Do the selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine and fluvoxamine reduce mortality among patients with COVID-19? *JAMA Network Open*, v. 4, n. 11, 2021.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, p. 322-332, 2010.

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, v. 125, n. 4, p. 272-275, 2017.

HOLLAND, D. J.; WESLEY, A.; DRINKOVIC, D.; CURRIE, B. J. Cystic fibrosis and *Burkholderia pseudomallei*: an emerging problem?. *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, n. 12, p. 138-140, 2002.

HUSON, M. A. M.; KLING, K.; CHANKONGSIN, S.; PHONGLUXA, K.; KEOLUANGKHOT, V.; NEWTON, P. N.; DANCE, D.; HELLER, T.; NEUMAYR, A. Point-of-care ultrasound in the diagnosis of melioidosis in Laos. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, n. 2, p. 675-678, 2020.

- INGLIS, T. J. J.; SAGRIPANTI, J. L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 11, p. 6865-6875, 2006.
- INGLIS, T. J. J. The treatment of melioidosis. *Pharmaceuticals*, v. 3, n. 5, p. 1296-1303, 2010.
- JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018.
- KHIANGTE, H. L.; VIMALA, L. R.; VEERARAGHAVAN, B.; YESUDHASON, B. L.; KARUPPUSAMI, R. Can the imaging manifestations of melioidosis prognosticate the clinical outcome? A 6-year retrospective study. *Insights into Imaging*, v. 10, n. 17, 2019.
- KLAUS, J. R.; DEAY, J.; NEUENSWANDER, B.; HURSH, W.; GAO, Z.; BOUDDHARA, T.; WILLIAMS, T. D.; DOUGLAS, J.; MONIZE, K.; MARTINS, P.; MAJERCZYK, C.; SEYEDSAYAMDOST, M. R.; PETERSON, B. R.; RIVERA, M.; CHANDLER, J. R. Malleilactone is a *Burkholderia pseudomallei* virulence factor regulated by antibiotics and quorum sensing. *Journal of Bacteriology*, v. 200, n. 14, p. 8-18, 2018.
- KOSHY, M. Melioidosis: an emerging infection in India. *Current Medical Issues*, v. 18, n. 2, p. 94-97, 2020.
- KRUSZEWSKA, H.; ZAREBA, T.; TYSKI, S. Examination of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v. 61, p. 18-21, 2004.
- KUMAR, A.; ALAM, A.; RANI, M.; EHTESHAM, N. Z.; HASNAIN, S. E. Biofilms: survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 307, n. 8, p. 481-489, 2017.
- LAU, S. K. P.; SRIDHAR, S.; HO, C. C.; CHOW, W. N.; LEE, K. C.; LAM, C. W.; YUEN, K. Y.; WOO, P. C. Y. Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present, and future. *Experimental Biology and Medicine*, v. 240, n. 6, p. 742-751, 2015.
- LEELARASAMEE, A.; BOVORNKITTI, S. Melioidosis: review and update. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 11, p. 413-425, 1989.
- LIMMATHUROTSAKUL, D.; CHAOWAGUL, W.; CHIERAKUL, W.; STEPNIEWSKA, K.; MAHARJAN, B.; WUTHIEKANUN, V.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J.; PEACOCK, S. J. Risk factors for recurrent melioidosis in northeast Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, n. 8, p. 979-986, 2006.
- LIMMATHUROTSAKUL, D.; WONGRATANACHEEWIN, S.; TEERAWATTANASOOK, N.; WONGSUVAN, G.; CHAISUKSANT, S.; CHETCHOTISAKD, P.; CHAOWAGUL, W.; DAY, N. P. J.; PEACOCK, S. J. Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 1113-1117, 2010.

LIMMATHUROTSAKUL, D.; PEACOCK, S. J. Melioidosis: a clinical overview. *British Medical Bulletin*, v. 99, p. 125-139, 2011.

LIMMATHUROTSAKUL, D.; HOLDEN, M. T. G.; COUPLAND, P.; PRICE, E. P.; CHANTRATITA, N.; WUTHIEKANUN, V.; AMORNCHAI, P.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J. Microevolution of *Burkholderia pseudomallei* during an acute infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, p. 3418-3421, 2014.

LIMMATHUROTSAKUL, D.; GOLDING, N.; DANCE, D. A.; MESSINA, J. P.; PIGOTT, D. M.; MOYES, C. L.; ROLIM, D. B.; BERTHERAT, E.; DAY, N. P.; PEACOCK, S. J.; HAY, S. I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nature Microbiology*, v. 1, n. 1, 2016.

LIU, D.; WANG, Z.; LIU, S.; WANG, F.; ZHAO, S.; HAO, A. Anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide (LPS) – stimulated microglial cells. *Neuropharmacology*, v. 61, n. 4, p. 592-599, 2011.

LUMBIGANON, P.; PENGSAK, K.; PUAPERMPOONSIRI, S.; PUAPAIROJ, A. Neonatal melioidosis: a report of 5 cases. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 7, p. 634-639, 1988.

MACEDO, D.; FILHO, A. J. M. C.; SOUSA, C. N. S.; QUEVEDO, J.; BARICHELLO, T.; JÚNIOR, H. V. N.; LUCENA, D. F. Antidepressants, antimicrobials, or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. *Journal of Affective Disorders*, v. 208, p. 22-32, 2017.

MARIAPPAN, V.; VELLASAMY, K. M.; BARATHAN, M.; GIRIJA, A. S. S.; SHANKAR, E. M.; VADIVELU, J. Hijacking of the host's immune surveillance radars by *Burkholderia pseudomallei*. *Frontiers in Immunology*, v. 12, 2021.

MCCORMICK, J. B.; SEXTON, D. J.; MCMURRAY, J. G.; CAREY, E.; HAYES, P.; FELDMAN, R. A. Human-to-human transmission of *Pseudomonas pseudomallei*. *Annals of Internal Medicine*, v. 83, p. 512-513, 1975.

MCGOVERN, A. S.; HAMLIN, A. S.; WINTER, G. A review of the antimicrobial side of antidepressants and its putative implications on the gut microbiome. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, v. 53, n. 12, p. 1151-1166, 2019.

MOHAPATRA, P. R.; MISHRA, B. Prevention of melioidosis. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, v. 11, n. 9, p. 4981-4986, 2022.

MOORE, R. A.; DESHAZER, D.; RECKSEIDLER, S.; WEISSMAN, A.; WOODS, D. E. Efflux-mediated aminoglycoside, and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 3, p. 465-470, 1999.

MORAES, D. C.; FERREIRA-PEREIRA, A. Insights on the anticandidal activity of non-antifungal drugs. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 29, n. 3, p. 253-259, 2019.

- MORRIS, J.; WILLIAMS, N.; RUSH, C.; GOVAN, B.; SANGLA, K.; NORTON, R.; KETHEESAN, N. *Burkholderia pseudomallei* triggers altered inflammatory profiles in a whole-blood model of type 2 diabetes-melioidosis comorbidity. *Infection and Immunity*, v. 80, n. 6, p. 2089-2099, 2012.
- MOSER, C.; PEDERSEN, H. T.; LERCHE, C. J.; KOLPEN, M.; LINE, L.; THOMSEN, K.; HØIBY, N.; JENSEN, P. O. Biofilms and host response – helpful or harmful. *APMIS*, v. 125, n. 4, p. 320-338, 2017.
- MUHAMMAD, M. H.; IDRIS, A. L.; FAN, X.; GUO, Y.; YU, Y.; JIN, X.; QIU, J.; GUAN, X.; HUANG, T. Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in Microbiology*, 2020.
- MUKHOPADHYAY, C.; SHAW, T.; VARGHESE, G. M.; DANCE, D. A. B. Melioidosis in South Asia (India, Nepal, Pakistan, Bhutan, and Afghanistan). *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 3, n. 2, 2018.
- MUNNOZ-BELLIDO, J. L.; MUNOZ-CRIADO, S.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs selective serotonin reuptake inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 14, n. 3, p. 177-180, 2000.
- SCHOCH, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020.
- NETO, J. B. A.; JOSINO, M. A. A.; SILVA, C. R.; CAMPOS, R. S.; NASCIMENTO, F. B. S. A.; SAMPAIO, L. S.; SÁ, L. G. A. V.; CARNEIRO, I. S.; BARROSO, F. D. D.; SILVA, L. J.; MESQUITA, J. R. L.; CAVALCANTI, B. C.; MORAES, M. O.; JÚNIOR, H. V. N. A mechanistic approach to the in-vitro resistance modulating effects of fluoxetine against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial Pathogens*, v. 127, p. 335-340, 2019.
- NIKAIDO, H.; PAGÈS, J. M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p. 340-363, 2012.
- NOVEM, V.; SHUI, G.; WANG, D.; BENDT, A. K.; SIM, S. H.; LIU, Y.; THONG, T. W.; SIVALINGAM, S. P.; OOI, E. E.; WENK, M. R.; TAN, G. Structural and biological diversity of lipopolysaccharides from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 16, n. 10, p. 1420-1428, 2009.
- NZAKIZWANAYO, J.; SCAVONE, P.; JAMSHIDI, S.; HAWTHORNE, J. A.; PELLING, H.; DEDI, C.; SALVAGE, J. P.; HIND, C. K.; GUPPY, F. M.; BARNES, L. M.; PATEL, B. A.; RAHMAN, K. M.; SUTTON, M. J.; JONES, B. V. Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by *Proteus mirabilis*. *Scientific Reports*, v. 7, n. 12222, p. 1-14, 2017.
- OLIVEIRA, A. S.; GASPAR, C. A.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A. Anti-*Candida* activity of fluoxetine alone and combined with fluconazole: a synergistic action against fluconazole-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 7, 2014.

PAGNARITH, Y.; KUMAR, V.; THAIPADUNGPANIT, J.; WUTHIEKANUN, V.; AMORNCHAI, P.; SIN, L.; DAY, N. P.; PEACOCK, S. J. Emergence of pediatric melioidosis in Siem Reap, Cambodia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 1106-1112, 2010.

PARAMESWARAN, U.; BAIRD, R. W.; WARD, L. M.; CURRIE, B. J. Melioidosis at Royal Darwin Hospital in the big 2009-2010 wet season: comparison with the preceding 20 years. *The Medical Journal of Australia*, v. 196, p. 345-348, 2012.

PEARSON, T.; GIFFARD, P.; BECKSTROM-STERMBERG, S.; AUERBACH, R.; HORNSTRA, H.; TUANYOK, A.; PRICE, E. P.; GLASS, M. B.; LEADEM, B.; BECKSTROM-STERMBERG, J. S.; ALLAN, G. J.; FOSTER, J. T.; WAGNER, D. M.; OKINAKA, R. T.; SIM, S. H.; PEARSON, O.; WU, Z.; CHANG, J.; KAUL, R.; HOFFMASTER, A. R.; BRETTIN, T. S.; ROBISON, R. A.; MAYO, M.; GEE, J. E.; KEIM, P. Phylogeographic reconstruction of a bacterial species with high levels of lateral gene transfer. *BMC Biology*, v. 7, n. 78, 2009.

PERCIVAL, S. L.; ALICE, J. G.; COCHRANE, C. A. Introduction to biofilms. *Biofilms and Veterinary Medicine*, v. 6, p. 111-128, 2011.

PERCIVAL, S. L.; HILL, K. E.; WILLIAMS, D. W.; HOOPER, S. J.; THOMAS, D. W.; COSTERTON, J. W. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair and Regeneration*, v. 20, n. 5, p. 647-657, 2012.

PIBALPAKDEE, P.; WONGRATANACHEEWIN, S.; TAWEECHAISUPAPONG, S.; NIUMSUP, P. R. Diffusion and activity of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 39, n. 4, p. 356-359, 2012.

PUNYAGUPTA, S. S. Melioidosis: Review of 686 cases and presentation of a new clinical classification. *Bangkok Medical Publisher*, p. 217-229, 1989.

RALPH, A.; MCBRIDE, J.; CURRIE, B. J. Transmission of *Burkholderia pseudomallei* via breast milk in northern Australia. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 23, n. 12, p. 1169-1171, 2004.

RECKSEIDLER-ZENTENO, S. L.; DEVINNEY, R.; WOODS, D. E. The capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* contributes to survival in serum by reducing complement factor C3b deposition. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 1106-1115, 2005.

RHOLL, D. A.; PAPP-WALLACE, K. M.; TOMARAS, A. P.; VASIL, M. L.; BONOMO, R. A.; SCHWEIZER, H. P. Molecular investigation of PenA-mediated β -lactam resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Frontiers in Microbiology*, v. 2, n. 139, 2011.

RIMINGTON, R. A. Melioidosis in North Queensland. *The Medical Journal of Australia*, v. 1, n. 2, p. 50-53, 1962.

ROLIM, D. B.; VILAR, D. C. F. L.; SOUSA, A. Q.; MIRALLES, I. S.; OLIVEIRA, D. C. A.; HARNETT, G.; O'REILLY, L.; HOWARD, K.; SAMPSON, I.; INGLIS, T. J. J.

Melioidosis, northeastern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 9, p. 1458-1460, 2005.

ROLIM, D. B.; LIMA, R. X. R.; RIBEIRO, A. K. C.; COLARES, R. M.; LIMA, L. D. Q.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; MONTÚFAR, F. E.; DANCE, D. A. B. Melioidosis in South America. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 3, n. 2, 2018.

ROSSI, A.; BARRACO, A.; DONDA, P. Fluoxetine: a review on evidence based medicine. *Annals of General Hospital Psychiatry*, v. 3, n. 1, 2004.

SANGSRI, T.; SAIPROM, N.; TUBSUWAN, A.; MONK, P.; PARTRIDGE, L. J.; CHANTRATITA, N. Tetraspanins are involved in *Burkholderia pseudomallei*-induced cell-to-cell fusion of phagocytic and non-phagocytic cells. *Scientific Reports*, v. 10, n. 17972, 2020.

SAROVICH, D. S.; PRICE, E. P.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; COOK, J. M.; SCHULZE, A. T. V.; WOLKEN, S. R.; KEIM, P.; PEACOCK, S. J.; PEARSON, T. Development of ceftazidime resistance in an acute *Burkholderia pseudomallei* infection. *Infection and Drug Resistance*, v. 5, p. 129-132, 2012.

SAUER, K.; STOODLEY, P.; GOERES, D. M.; HALL-STOODLER, L.; BURMOLLE, M.; STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, p. 608-620, 2022.

SAWASDIDOLN, C.; TAWEECHASUPAPONG, S.; SERMSWAN, R. W.; TATTAWASART, U.; TUNGPRADABKUL, S.; WONGRATANACHEEWIN, S. Growing *Burkholderia pseudomallei* in biofilm stimulating conditions significantly induces antimicrobial resistance. *PLoS One*, v. 5: e9196, 2010.

SCHLECH 3rd, W. F.; TURCHIK, J. B.; WESTLAKE JR, R. E.; KLEIN, G. C.; BAND, J. D.; WEAVER, R. E. Laboratory-acquired infection with *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis). *The New England Journal of Medicine*, v. 305, p. 1133-1135, 1981.

SCHWEIZER, H. P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiol*, v. 7, p. 1389-1399, 2012.

SCOFFONE, V. C.; TRESPIDI, G.; BARBIERI, G.; IRUDAL, S.; PERRIN, E.; BURONI, S. Role of RND efflux pumps in drug resistance of cystic fibrosis pathogens. *Antibiotics*, v. 10, n. 7, 2021.

SESA (2008) *Informe Ambiental MELIOIDOSE* no 3.

SESA (2021) Nota Técnica – Vigilância da Melioidose.

SIDRIM, J. J. C.; OCADAQUE, C. J.; AMANDO, B. R.; GUEDES, G. M. M.; COSTA, C. L.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. Rhamnolipid enhances *Burkholderia pseudomallei* biofilm susceptibility, disassembly and production of virulence factors. *Future Microbiology*, v. 15, p. 1109-1121, 2020.

- SILVA, R. A. C.; SILVA, C. R.; NETO, J. B. A.; SILVA, A. R.; CAMPOS, R. S.; SAMPAIO, L. S.; NASCIMENTO, F. B. S. A.; GASPAR, B. S.; FONSECA, S. G. C.; JOSINO, M. A. A.; GRANGEIRO, T. B.; GASPAR, D. M.; LUCENA, D. F.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; JÚNIOR, H. V. N. In vitro anti-*Candida* activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. *Microbial Pathogens*, v. 107, p. 341-348, 2017.
- SOHEL, A. J.; SHUTTER, M. C.; MOLLA, M. Fluoxetine. *StatPearls [Internet]*, 2022.
- SOUSA, A. K.; ROCHA, J. E.; SOUZA, T. G.; FREITAS, T. S.; RIBEIRO-FILHO, J.; COUTINHO, H. D. M. New roles of fluoxetine in pharmacology: antibacterial effect and modulation of antibiotic activity. *Microbial Pathogenesis*, v. 123, p. 368-371, 2018.
- SRINON, V.; CHAIWATTANARUNGRUENPAISAN, S.; KORBSRISATE, S.; STEVENS, J. M. *Burkholderia pseudomallei* BimC is required for actin-based motility, intracellular survival, and virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, n. 63, 2019.
- STANTON, A. T.; FLETCHER, M. D. KANAGARAYER, L. M. S. Two cases of melioidosis. *Journal of hygiene*, v. 23, p. 2-18, 1921.
- SULLIVAN, R. P.; MARSHALL, C. S.; ANSTEY, N. M.; WARD, L.; CURRIE, B. J. 2020 Review and revision of the 2015 Darwin melioidosis treatment guideline; paradigm drift not shift. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2020.
- TAPIA, D.; SANCHEZ-VILLAMIL, J. I.; TORRES, A. G. Emerging role of biologics for the treatment of melioidosis and glanders. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 19, n. 12, p. 1319-1332, 2019.
- TEKINTAS, Y.; TEMEL, A.; ATES, A.; ERAÇ, B.; METIN, D. Y.; POLAT, S. H.; LIMONCU, M. H. Antifungal and antibiofilm activities of selective serotonin reuptake inhibitors alone and in combination with fluconazole. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 17, n. 6, p. 667-672, 2020.
- TIPRE, M.; KINGSLEY, P. V.; SMITH, T.; LEADER, M.; SATHIAKUMAR, N. Melioidosis in India and Bangladesh: a review of case reports. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 11, n. 5, p. 320-329, 2018.
- TRAKULSOMBOON, S.; VUDDHAKUL, V.; THARAVICHITKUL, P.; NA-GNAM, N.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; THAMLIKITKUL, V. Epidemiology of arabinose assimilation in *Burkholderia pseudomallei* isolated from patients and soil in Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 30, n. 4, p. 756-759, 1999.
- VAZQUEZ-GRANDE, G.; KUMAR, A. Optimizing antimicrobial therapy of sepsis and septic shock: focus on antibiotic combination therapy. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 36, n. 1, p. 154-166, 2015.
- VELUSAMY, R.; MUHI, S. Melioidosis and the heart: a systematic review. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 5, n. 3, 2020.

WHITE, N. J. Melioidosis and glanders. *In*: RYAN, E. T.; SOLOMON, T.; ENDY, T. P.; HILL, D. R.; ARONSON, N. E. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. Tenth Edition.** USA: Elsevier, 2020, p. 619-622.

WHITMORE, A.; KRISHNASWAMI, C. S. A hitherto undescribed infective disease in Rangoon. *The Indian Medical Gazette*, v. 47, n. 7, p. 262-267, 1912.

WHITMORE, A. An account of a glanders-like disease occurring in Rangoon. *Journal of Hygiene*, v. 13, p. 1-34, 1913.

WIERSINGA, W. J.; VIRK, H. S.; TORRES, A. G.; CURRIE, B. J.; PEACOCK, S. J.; DANCE, D. A. B.; LIMMATHUROTSAKUL, D. Melioidosis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, 17107, 2018.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YIN, W.; WANG, Y.; LIU, L.; HE, J. Biofilms: the microbial "protective clothing" in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 14, 2019.

ZUO, J.; QUINN, K. Q.; KYE, S.; COOPER, P.; DAMOISEAUX, R.; KROGSTAD, P. Fluoxetine is a potent inhibitor of Cocksackievirus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 9, 2012.