



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

KÉSIA VERAS COSTA RIBEIRO

EFEITO IN VITRO DO QUELANTE DE FERRO DEFERIPRONA SOBRE
***Burkholderia pseudomallei* NA FORMA PLANCTÔNICA E DE BIOFILMES**

FORTALEZA

2022

KÉSIA VERAS COSTA RIBEIRO

**EFEITO IN VITRO DO QUELANTE DE FERRO DEFERIPRONA 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 Médica. Área de concentração: Bacteriologia.

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

Coorientador: Prof^a. Dra. Gláucia Morgana de Melo Guedes.

FORTALEZA

2022

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)

R369e Ribeiro, Késia Veras Costa.
Efeito in vitro do quelante de ferro deferiprona sobre *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica e de biofilmes. / Késia Veras Costa Ribeiro. – 2022.
64 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia .

Coorientação: Prof. Dr. Gláucia Morgana de Melo Guedes.

1. *Burkholderia pseudomallei*. 2. Deferiprona. 3. Quelante de ferro. 4. Biofilmes. I. Título.

CDD 616.9

KÉSIA VERAS COSTA RIBEIRO

**EFEITO IN VITRO DO QUELANTE DE FERRO DEFERIPRONA 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 Médica. 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. Pedro Filho Noronha de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

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. Pedro Filho Noronha de Souza e Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A Deus que iluminou meu caminho durante essa caminhada.

Aos meus pais Francisca Gerarda Veras Costa e José Pereira Filho, que estão sempre ao meu lado, me guiando e apoiando em todas as situações.

A minha esposa Emanuela Silva de Araújo, 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.

A minha irmã, Priscilla Costa Ribeiro, minha sobrinha Pietra Costa Barreto de Freitas, meu cunhado Lucas Barreto de Freitas, minha sogra Maria das Graças Ramos da Silva, meu sogro José Lopes de Araújo e minha madrinha Adriana Neves Alves que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até essa etapa de minha vida.

À Prof.^a Dra. Cecília Leite Costa, por me mostrar esse mundo maravilhoso que é a microbiologia.

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 e Carliane pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas, além de contribuir para a construção desse trabalho.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.” (Carl Sagan)

RESUMO

Burkholderia pseudomallei é um patógeno oportunista de origem ambiental que causa a doença melioidose. Já foi demonstrado que a disponibilidade de ferro favorece alguns processos dessa bactéria, como a formação de biofilmes. Dessa forma, esse estudo se propôs a avaliar o efeito do quelante de ferro deferiprona (DFP) sobre a sensibilidade antimicrobiana e a formação e manutenção de biofilmes. A sensibilidade planctônica à DFP isolada e combinada com as drogas foi avaliada pelo teste de microdiluição em caldo, investigação dos efeitos da DFP sobre a formação dos biofilmes, avaliando sua biomassa através da técnica por cristal violeta e a atividade metabólica do biofilme maduro determinada com resazurina. A concentração inibitória mínima (CIM) da DFP foi de 4 – 64 µg/mL. Quando combinada com os antimicrobianos, houve redução no CIM para amoxicilina/clavulanato (AMC) e meropenem (MER). A DFP reduziu ($P < 0,05$) a biomassa do biofilme em formação em 21 e 12% nas concentrações referentes a CIM e CIM/2, respectivamente, enquanto no biofilme maduro houve uma redução ($P < 0,05$) 47%, 59%, 52% e 30% nas concentrações de 512, 256, 128 e 64 µg/mL, respectivamente. A DFP não erradicou os biofilmes de *B. pseudomallei*, não apresentando valores de concentrações eliminatórias mínimas do biofilme (CEMB) nas concentrações testadas. Quanto às drogas antibacterianas, não foram encontrados valores de CEMB para AMC e os intervalos de CEMB para MER foram 16 – 512 µg/mL e 256 – 512 para doxiciclina (DOX). Quando utilizada na concentração de 256 µg/mL, a DFP não reduziu os valores de CEMB para AMC, MER e DOX contra biofilmes maduros de *B. pseudomallei*. A DFP inibe o crescimento planctônico de *B. pseudomallei*, potencializa o efeito de β -lactâmicos contra a bactéria na forma planctônica e reduz a biomassa de biofilmes em formação e de biofilmes maduros, sem, no entanto, erradicar biofilmes maduros de *B. pseudomallei*, nem os sensibilizar às drogas AMC, MER e DOX.

Palavras-chave: *Burkholderia pseudomallei*. Deferiprona. Quelante de ferro. Biofilmes.

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei is an opportunistic pathogen with environmental origin causing melioidosis disease. It has already been demonstrated that the availability of iron favors some processes of this bacterium, such as the formation of biofilms. Thus, this study aimed to evaluate the effect of the iron chelator deferiprone (DFP) on antimicrobial sensitivity and the formation and maintenance of biofilms. The planktonic sensitivity to DFP alone and combined with the drugs was evaluated by the broth microdilution test, investigation of the effects of DFP on the formation of biofilms, evaluating its biomass through the crystal violet technique and the metabolic activity of the mature biofilm determined with resazurin. The minimal inhibitory concentration (MIC) of DFP was 4 – 64 µg/mL. Combined with antimicrobials, there was a reduction in MIC for amoxicillin/clavulanate (AMC) and meropenem (MER). DFP reduced ($P<0.05$) the biomass of the growing biofilm by 21 and 12% at MIC and MIC/2, respectively, while in the mature biofilm there was a reduction ($P<0.05$) by 47%, 59%, 52% and 30% at concentrations of 512, 256, 128 and 64 µg/mL, respectively. The DFP did not eradicate the biofilms of *B. pseudomallei*, not showing values of minimum eliminatory concentrations of the biofilm (MBEC) in the concentrations tested. As for antibacterial drugs, no MBEC values were found for AMC and the MBEC ranges for MER were 16 – 512 µg/mL and 256 – 512 µg/mL for doxycycline (DOX). When used at a concentration of 256 µg/mL, DFP did not reduce MBEC values for AMC, MER, and DOX against mature biofilms of *B. pseudomallei*. DFP inhibits the planktonic growth of *B. pseudomallei* potentiates the effect β -lactams against the bacteria in the planktonic form and reduces the biomass of biofilms in formation and of mature biofilms, without, however, eradicate mature biofilms of *B. pseudomallei*, nor sensitize them to AMC, MER, and DOX drugs.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*. Deferiprone. Iron chelator. Biofilms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – História da melioidose	19
Figura 2 – Distribuição global da melioidose	20
Figura 3 – Distribuição dos casos de melioidose por município de ocorrência, Ceará (N=18)	21
Figura 4 – Esfregaço de colônia corado pelo Gram (100x)	22
Figura 5 – História natural da infecção por <i>Burkholderia pseudomallei</i>	26
Figura 6 – Fases da formação do biofilme	31
Figura 7 – Efeitos da deferiprona sobre a formação de biofilmes por <i>Burkholderia pseudomallei</i>	42
Figura 8 – Análise da microscopia confocal da deferiprona em formação de biofilme e biofilme maduro de <i>B. pseudomallei</i> utilizando o software COMSTAT™	44
Figura 9 – Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal de biofilmes de <i>B. pseudomallei</i> em formação e maduro após exposição a deferiprona	45
Figura 10– Efeito da deferiprona sobre biofilmes maduros de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores de virulência identificados de <i>B. pseudomallei</i>	28
Tabela 2 – Cepas de <i>B. pseudomallei</i> utilizadas na pesquisa	36
Tabela 3 – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatórias mínimas de biofilmes (CEMBs) de drogas antibacterianas isoladas e combinadas com deferiprona contra cepas de <i>B. pseudomallei</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHL	N-acil-homoserina lactonas
AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BPSA	Ágar seletivo para <i>B. pseudomallei</i>
CEMB	Concentração eliminatória mínima do biofilme
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DFP	Deferiprona
DOX	Doxiciclina
EPS	Substância extracelular polimérica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe	Ferro
Fe ²⁺	Ferro ferrosol
Fe ³⁺	Ferro férrico
GRAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
IHA	Hemaglutinação indireta
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LAPERE	Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI-	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
TOF	
MER	Meropenem
MG	Média geométrica
MH	Mueller Hinton
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPGMM	Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo
SXT	Sulfametoxazol-Trimetoprima
T2SS	Sistema de secreção do tipo II
T3SS	Sistema de secreção do tipo III

T5SS	Sistema de secreção do tipo V
T6SS	Sistema de secreção do tipo VI
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Aspectos históricos da melioidose	18
2.2	Epidemiologia	20
2.3	Agente etiológico	21
2.4	Transmissão e fatores de risco	23
2.5	Mecanismos fisiopatológicos e manifestações clínicas da melioidose	24
2.6	Fatores de virulência	27
2.6.1	<i>Biofilmes</i>	28
2.7	Tratamento	31
2.7.1	<i>Quelante de ferro: Deferiprona</i>	32
3	HIPÓTESES	35
4	OBJETIVO GERAL/OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4.1	Objetivo geral	35
4.2	Objetivos específicos	35
5	METODOLOGIA	36
5.1	Local de estudo	36
5.2	Cepas bacterianas	36
5.3	Drogas antimicrobianas e quelante de ferro	36
5.4	Preparo do inóculo para o teste de sensibilidade	37
5.4.1	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do quelante de ferro deferiprona e dos antimicrobianos contra isolados de Burkholderia pseudomallei</i>	37
5.4.2	<i>Efeito do quelante de ferro sobre a formação de biofilme</i>	38
5.4.3	<i>Efeito da deferiprona sobre biofilmes maduros de B. pseudomallei</i>	38
5.4.4	<i>Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes em formação e maduro de B. pseudomallei expostos ao composto deferiprona</i>	39
5.4.5	<i>Efeito da deferiprona sobre a sensibilidade antimicrobiana de biofilmes de Burkholderia pseudomallei</i>	40
5.5	Análise estatística	40

6	RESULTADOS	41
6.1	Sensibilidade de <i>B. pseudomallei</i> à deferiprona e aos antimicrobianos	41
6.1.1	<i>Efeito da deferiprona sobre a formação do biofilme</i>	43
6.1.2	<i>Análise da microscopia confocal da deferiprona em biofilmes em formação e maduro de <i>B. pseudomallei</i></i>	43
6.1.3	<i>Efeito da deferiprona e dos antimicrobianos sobre biofilmes maduros de <i>Burkholderia pseudomallei</i></i>	46
7	DISCUSSÃO	47
8	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Burkholderia pseudomallei é um bacilo Gram-negativo, saprófita, podendo ser encontrado em abundância no solo e água da superfície, particularmente no sudeste da Ásia, no norte da Austrália e no nordeste do Brasil. Esse patógeno oportunista é agente causador da melioidose, uma doença de humanos e animais que foi inicialmente descrita em 1912 por Whitmore e Krishnaswami. A melioidose pode ser adquirida por inalação, ingestão ou inoculação, apresentando diversas manifestações clínicas, sendo considerada uma grande “mimetizadora” por se assemelhar com outras infecções de natureza aguda ou crônica, como por exemplo, sepse, pneumonia, tuberculose, resultando em atrasos e erros no diagnóstico.

Essa bactéria possui uma alta resistência intrínseca a muitos antibióticos, incluindo, cefalosporinas de terceira geração, penicilinas, rifamicinas, macrolídeos, quinolonas e aminoglicosídeos. Diante disso, as drogas usadas para tratar melioidose são limitadas e incluem ceftazidima e/ou imipenem, amoxicilina-ácido clavulânico e a combinação de sulfametoxazol-trimetoprim e doxiciclina. Devido à sua resistência, alta taxa de mortalidade, ausência de vacinas, infecção por via aérea e tratamento eficaz, *B. pseudomallei* é classificado como um patógeno de classe de risco três e considerado um agente de bioterrorismo.

Além da resistência intrínseca, esse patógeno tem a capacidade de formar biofilme, contribuindo para o aumento da persistência dessa bactéria no ambiente. Além disso, o biofilme, está associado à recidivas em pacientes com melioidose, devido à reativação das bactérias contidas no biofilme que resistem aos antimicrobianos. Sabe-se que alguns fatores favorecem a formação de biofilmes, como elevadas concentrações de ferro, alta osmolaridade e baixas temperaturas. Devido à limitação de drogas efetivas contra *B. pseudomallei* e à dificuldade de erradicação de biofilmes desse patógeno, compostos com atividade antibiofilme têm sido investigados, visando controlar a formação de biofilmes por essa bactéria.

Nesse contexto, a restrição de ferro parece ser uma estratégia interessante, uma vez que a carência desse metal essencial ao metabolismo microbiano limita o crescimento de bactérias *in vivo* e *in vitro*. A restrição do ferro pode ser alcançada por meio da utilização de quelantes que podem potencializar a atividade de antibacterianos, destruindo biofilmes. A deferiprona (1,2-dimetil-3-hidroxipiridin-4-ona) é um quelante de ferro bidentado, sintético, aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e usado no tratamento da talassemia, mas não se conhece o efeito de quelantes de ferro sobre *B. pseudomallei*.

Em vista disso, o estudo se propôs a avaliar o efeito *in vitro* do quelante de ferro deferiprona sobre o crescimento de *B. pseudomallei* na forma planctônica e de biofilme, bem como sobre a sensibilidade dessa bactéria a antimicrobianos utilizados no tratamento da melioidose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

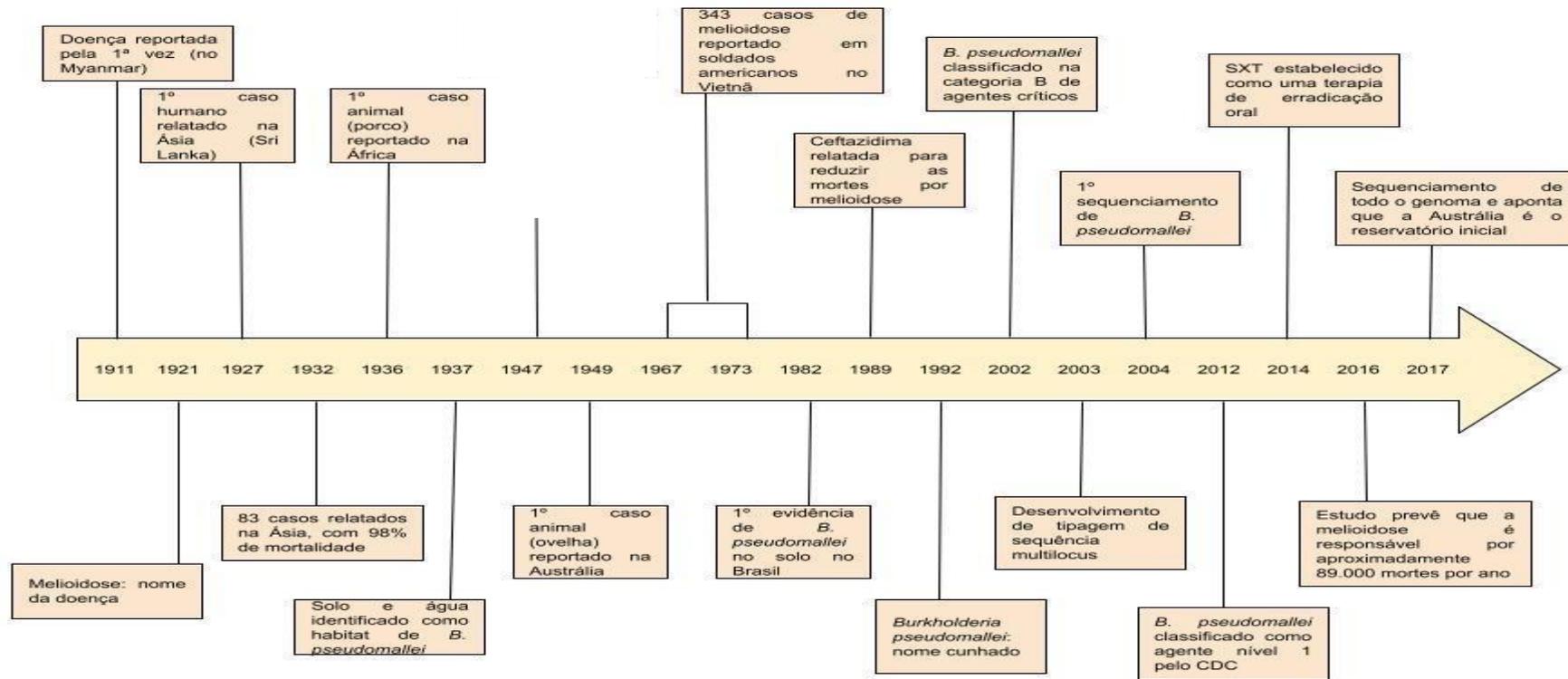
2.1 Aspectos históricos da melioidose

Em 1912, o médico Alfred Whitmore e seu assistente Krishnaswami, descreveram uma doença séptica, que mais tarde seria chamada de melioidose, como uma doença que se assemelhava ao mormo, entre indivíduos viciados em morfina, na cidade de Rangoon, em Myanmar. No entanto, os pacientes não tinham histórico de exposição a equinos e a morfologia da colônia do microrganismo *Burkholderia mallei* era semelhante, porém, o bacilo isolado era móvel (WHITMORE; KRISHNASWAMI, 1912). Whitmore demonstrou que os postulados de Koch poderiam ser cumpridos e propôs o nome de *Bacillus pseudomallei*, através do isolamento dessa bactéria em porquinhos-da-índia (WHITMORE, 1913) (Figura 1).

Posteriormente, Stanton, Fletcher e Kanagarayer, em 1921, propôs o nome melioidose, do grego “melis” (cinomose de jumentos) e “eidos” (semelhança), com base em casos ocorridos na Malásia em humanos e animais (STANTON; FLETCHER; KANAGARAYER, 1921). Essa bactéria foi denominada como *Pfeifferella whitmori*, *Pfeifferella pseudomallei*, *Malleomyces pseudomallei*, *Bacillus whitmore*, *Actinobacillus pseudomallei*, *Loefferella whitmori*. Por possuir características de crescimento, motilidade semelhantes a *Pseudomonas* spp., essa bactéria foi denominada de *Pseudomonas pseudomallei* (SPRAGUE; NEUBAUER, 2004). No entanto, em 1992, a bactéria foi reclassificada com base no sequenciamento da região 16S-RNA, homologia DNA-DNA e pela composição dos lipídios e ácidos graxos celulares, sendo chamada então de *Burkholderia pseudomallei*, em homenagem ao microbiologista Walter Burkholder, quem descreveu primeiramente a *Burkholderia cepacia* (YABUUCHI et al., 1992; CURRIE, 2003).

B. pseudomallei foi classificada como um agente potencial de bioterrorismo, incluído na categoria B de agentes críticos, por sua alta letalidade, falta de vacina disponível, semelhança com outras doenças, além de ser intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

Figura 1. História da melioidose



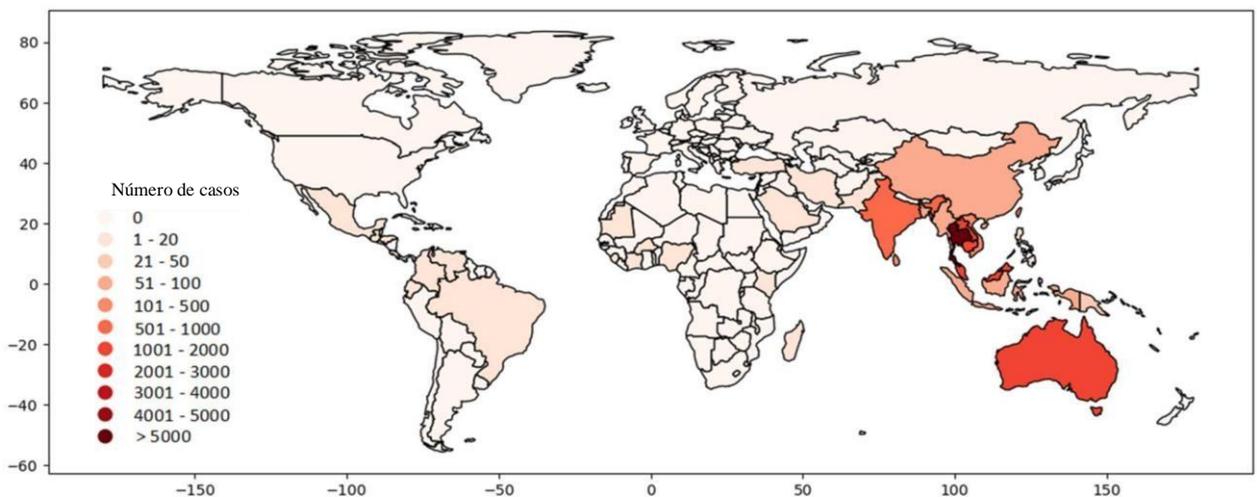
Fonte: Adaptado de WIERSINGA et al., 2018. Legenda: SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol.

2.2 Epidemiologia

B. pseudomallei é um organismo ambiental saprófita que pode ser encontrado predominantemente na rizosfera, solo úmido e águas barrentas em regiões tropicais e subtropicais (GASSIEP; ARMSTRONG; NORTON, 2020). A melioidose é considerada endêmica no sudoeste da Ásia (particularmente a Tailândia) e norte da Austrália (Figura 2) com taxas de incidência anual de 50 casos por 100.000 pessoas, embora esse microrganismo pode ser encontrado esporadicamente em outras regiões, como América Central e do Sul e África (WIERSINGA et al., 2018). A doença em humanos ocorre mais frequentemente nos indivíduos que têm contato frequente com solo e águas superficiais, como comunidades de cultivo de arroz na Tailândia e comunidades aborígenes na Austrália (MANIVANH et al., 2017).

Apesar de ser descrito pela primeira vez em 1912, na Birmânia, depois na Malásia e Singapura, Vietnã e Indonésia, a melioidose não foi documentada na Tailândia até 1955 e na Austrália até 1949, sendo os dois países com as regiões endêmicas com a maior taxa de incidência. A Tailândia possui o maior número de casos de melioidose com uma estimativa de 2000 a 3000 casos por ano (BHENGSRİ et al., 2013). A Austrália nos anos de 2009 a 2010 teve a maior incidência anual de melioidose, esse aumento foi associado as estações chuvosas acima da média, com taxa de incidência de 50,2 casos por 100.000 na população de indígenas australianos (PARAMESWARAN et al., 2012). Em julho de 2020, mais de 35.000 casos humanos foram relatados globalmente (CHOWDHURY et al., 2022).

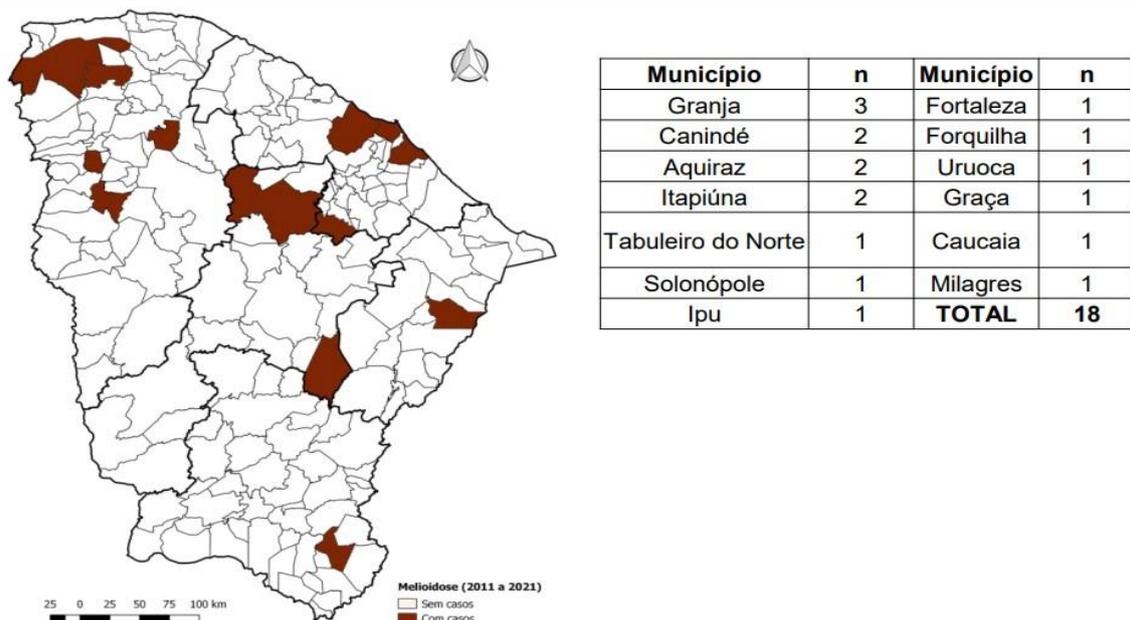
Figura 2. Distribuição global da melioidose em humanos



Fonte: CHOWDHURY et al (2022). Legenda: Os países onde a melioidose é endêmica são mostrados em vermelho.

Na América do Sul, 37 casos foram relatados de 1962 a 2015. O Brasil foi o maior responsável pelos casos relatados, com a região Nordeste apresentando 91% dos casos notificados (BENOIT et al., 2015). O primeiro caso relatado de melioidose na América do Sul, foi em 1962, no Equador, após 15 anos, a *B. pseudomallei* foi isolada por pesquisadores franceses em 1977 em solo brasileiro e peruano (GALIMAND; DODIN, 1982; DANCE, 1991). No Brasil, apenas em 2003, a melioidose foi diagnosticada pela primeira vez no município de Tejuçuoca, estado do Ceará, quando um surto ocorreu em uma família de quatro irmãos, dos quais três vieram a óbito em decorrência de sepse e pneumonia grave, após contato com água de chuva acumulada, durante banho em uma barragem (ROLIM et al., 2009). Desde 2005, a melioidose é uma doença de notificação compulsória no Ceará, segundo a Secretaria de Saúde do estado de janeiro de 2011 a junho de 2021, dos 34 casos notificados, 18 (52,9%) foram confirmados em 13 diferentes municípios do estado do Ceará (SESA, 2021) (Figura 3).

Figura 3. Distribuição dos casos de melioidose por município de ocorrência, Ceará (N=18).



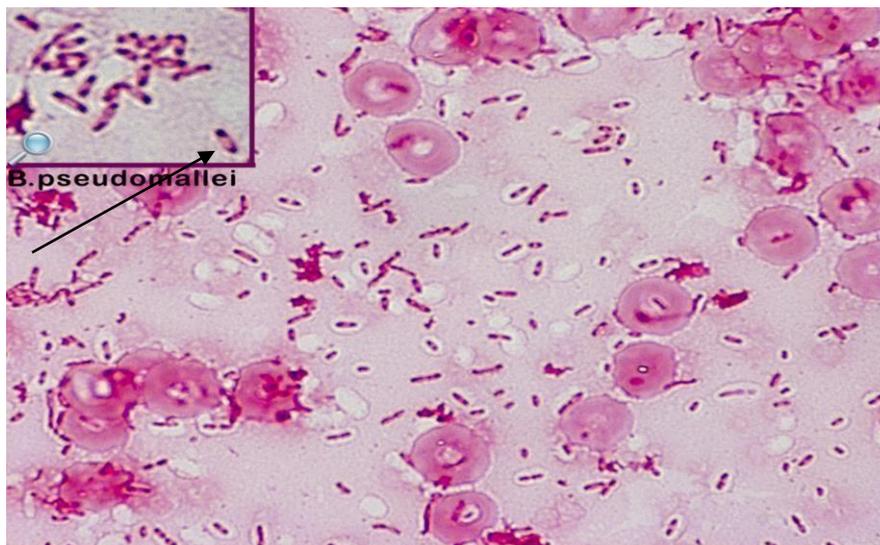
Fonte: GT Melioidose / CEVEP / COVEP / SESA, 2021. Legenda: Em branco, sem casos de melioidose, em marrom, casos confirmados.

2.3 Agente etiológico

B. pseudomallei é pertencente ao Reino Bacteria, Filo Beta Proteobacteria, Ordem Burkholderiales, Família Burkholderiaceae, Gênero *Burkholderia* e espécie *Burkholderia pseudomallei* (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Esse agente é um bacilo Gram-

negativo, móvel e não formador de esporos, que mede aproximadamente 0,5 a 1,0 μm de largura. Pode apresentar coloração bipolar devido a formação de inclusões citoplasmáticas, delgadas, conhecidas como “alfinete de segurança”. *B. pseudomallei* possui cápsula polissacarídica, que constitui um importante fator de virulência para a patogênese da doença (RECKSEIDLER-ZENTENO; DE VINNEY; WOODS, 2005) (Figura 4). *B. pseudomallei* pode crescer na maioria dos meios de cultura disponíveis, apresentando morfologias variadas dependendo do tempo de incubação, do meio de cultura utilizado e das características das cepas (KOH; TAY; PUTHUCHEARY, 2013). O genoma de *B. pseudomallei* é composto por dois cromossomos (4,04 e 3,17 pares de megabases de tamanho), o cromossomo maior carrega elementos genéticos envolvidos em funções fisiológicas centrais, enquanto o cromossomo menor carrega genes associados a funções acessórias, como adaptação a diferentes habitats (HOLDEN et al., 2004).

Figura 4. Esfregaço de colônia corado pelo Gram (100x)



Fonte: Erasmus MC, Dept. Medical Microbiology and Infectious Diseases. Legenda: A seta indica o bacilo vacuolizado na porção central com forma de “alfinete de segurança”. Link: <https://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1233>

A espécie *B. pseudomallei* não fermenta a glicose e são aeróbias, ou seja, são oxigênio-dependente como aceptor final de elétrons. Também é conhecida por crescer em anaerobiose usando nitrato ou nitrito no lugar do oxigênio (HAMAD et al., 2011). As principais características, além de reações oxidase positivas e indol negativas, crescimento em ágar MacConkey, ausência de hemólise em ágar sangue, ausência de pigmento violeta, sensíveis a amoxicilina-clavulanato (zona de inibição $\geq 18\text{mm}$ ao redor de um disco de 20/10

μg de AMC) e resistência à colistina ou polimixina B (não mostrando zona de inibição ao redor de um disco com 10 μg de colistina) (TRINH et al., 2018). As amostras devem ser manuseadas em laboratórios de nível de biossegurança 3, com o objetivo de minimizar o risco de exposição dos profissionais (GASSIEP et al., 2021).

2.4 Transmissão e fatores de risco

A melioidose é adquirida predominantemente de fontes ambientais, por meio do contato com solo ou água contaminada, podendo o microrganismo sobreviver por meses ou anos (ZHU et al., 2020). Essa capacidade incomum de sobreviver por muito tempo no ambiente pode ser destacada a partir da persistência da bactéria nas zonas endêmicas ao longo das estações secas (THOMAS; JORBES-FAULKNER, 1981). *B. pseudomallei* pode permanecer viável por até um mês em água contendo concentrações de sal de até 0,4%, tolera solos ácidos e desidratados, além de crescer em condições com estoque de ferro aumentado (ROBERTSON et al., 2010; HANTRAKUN et al., 2016).

A *Burkholderia pseudomallei* pode infectar humanos e animais, através de inalação de solo infectado, infecção cutânea por inoculação ou abrasão da pele e ingestão de água contaminada (KAEWPAN et al., 2022). A inalação foi inicialmente pensada como o principal modo de transmissão, com base no estudo de soldados americanos na guerra do Vietnã, foi observado que as tripulações de helicópteros pareciam ter uma alta incidência da doença, pois eram expostos a aerossóis gerados pela movimentação das hélices. Com base nisso e seu longo tempo de incubação, a melioidose ficou conhecida como “doença bomba-relógio” (GOSHORN, 1987).

Foi constatado que períodos chuvosos e ventos fortes estão diretamente associados a um maior número de casos, maior gravidade da doença e apresentações pneumônicas. Os casos de melioidose ocorreram em períodos de chuva em 75% e 85%, na Tailândia e Austrália, respectivamente (CURRIE; JACUPS, 2003). A transmissão percutânea, se dá através de ferimentos na pele nos produtores de arroz, sendo bem comum durante a época de plantio e colheita, quando passam a maior parte do tempo em contato direto com solo contaminado (DONG et al., 2018). A ingestão de água foi relatada em dois surtos pontuais relacionados ao suprimento de água potável, sugerindo que essa forma seja um novo veículo de transmissão do patógeno (INGLIS et al., 2000; CURRIE et al., 2001).

Algumas formas incomuns de transmissão, incluem, dois casos ocupacionais de laboratório (GREEN; TUFFNELL, 1968; SCHLECH et al., 1981), transmissão sexual de um

militar para sua esposa (MCCORMICK et al., 1975), transmissão perinatal (LUMBIGANON et al., 1988; PUNYAGUPTA, 1989; HALDER et al., 1998), um caso de transmissão vertical (ABBINK; ORENDI; BEAUFORT, 2001) e transmissão nosocomial para quatro animais que frequentaram um único consultório veterinário e foi atribuída à contaminação de uma solução injetável (CHOY et al., 2000).

O fator de risco mais comum que predispõe os indivíduos à melioidose é a diabetes mellitus, estando presente em 50% de todos os pacientes com melioidose em todo o mundo, podendo apresentar risco 12 vezes maior de desenvolver melioidose (CURRIE et al., 2004; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010). Alguns outros fatores de risco, incluem: sexo masculino, idade igual ou superior a 45 anos, consumo excessivo de álcool, doença pulmonar crônica e talassemia (causando disfunção de neutrófilos devido à sobrecarga de ferro) (CHENG; CURRIE; 2005; FONG et al., 2015). A talassemia é um defeito genético na síntese de hemoglobina, que se tornou um problema de saúde pública mundial, com isso a sobrecarga de ferro é uma complicação inevitável sofrida pelos pacientes talassêmicos devido ao número excessivo de transfusões sanguíneas (MISHRA; TIWARI, 2013). Alguns estudos sugerem que o aumento da sobrecarga de ferro e a disfunção de neutrófilos pode estar associado à melioidose (MAEGRAITH; LEITHEAD, 1964; RUCHIN et al., 2000). Suputtamongkol et al. (1999), relataram que a talassemia em adultos tailandeses foi associada a uma chance de 11 vezes maior de possuir melioidose em comparação com outros pacientes com sepse.

O tratamento com imunossupressores, incluindo esteróides, também podem predispor os indivíduos à infecção. A melioidose quando acomete adultos sem fatores de risco ocorre naqueles que foram expostos a uma alta carga bacteriana, por exemplo, inalação de águas superficiais principalmente durante a estação das monções (LIM et al., 1997).

2.5 Mecanismos fisiopatológicos e manifestações clínicas da melioidose

O período de incubação em humanos pode variar de um dia (após exposição muito alta) a vários meses ou anos (CURRIE, 2003; CHENG; CURRIE, 2005). Em um estudo, a maioria dos casos agudos tornou-se aparente em 21 dias após a exposição, com média de 9 dias (CURRIE et al., 2000a).

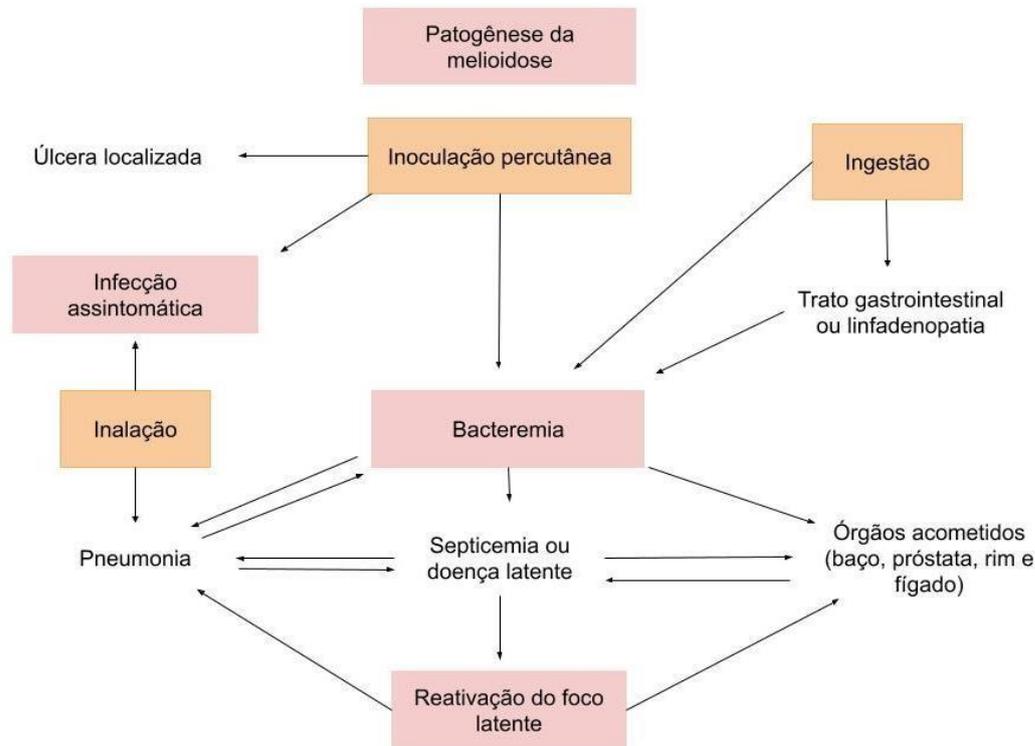
O maior intervalo já registrado foi de 62 anos, entre o aparecimento dos primeiros sintomas ao diagnóstico (NGAUY et al., 2005). *B. pseudomallei* primeiramente entra nas células epiteliais e se replica da pele rompida e então se espalha para vários tipos de células. Esse microrganismo possui múltiplos sistemas de secreção, como, o tipo III (T3SS) que serve

como um translocador de proteínas, o tipo II (T2SS) e o tipo V (T5SS) que secretam proteínas autotransportadoras, com isso, após o transporte de proteínas através das membranas celulares ocorre a invasão da célula hospedeira (STEVENS et al., 2002; SUN; GAN, 2010; CAMPOS; BYRD; COTTER, 2013; BURTNICK; BRETT; DESHAZER, 2014).

O bacilo secreta N-acil-homoserina lactonas (AHL), que são moléculas sinalizadoras envolvidas no maquinário de *quorum sensing* que é usado para coordenar ataques contra o ambiente hospedeiro e a formação de biofilme (WARD et al., 2003). As proteínas efetoras do sistema de secreção tipo III são necessárias para a invasão e escape da vesícula endocítica. A entrada na célula é auxiliada por flagelos, lipopolissacarídeos (LPS), pili tipo IV e adesinas. *B. pseudomallei* escapa da vesícula por lise da membrana usando os sistemas de secreção descritos anteriormente. Essa bactéria é capaz de sobreviver em um ambiente endocítico ácido através da resistência ao estresse oxidativo. Uma vez livre no citoplasma, *B. pseudomallei* replica, induz a formação de saliências de membrana à base de actina e pode se mover através da polimerização contínua da célula hospedeira nas extremidades polares, facilitando assim a disseminação para células vizinhas, fusão celular e formação de células gigantes multinucleadas (WIERSINGA et al., 2006; WILLCOCKS et al., 2016).

B. pseudomallei pode causar um amplo espectro de sinais e sintomas nas pessoas, variando desde manifestações cutâneas localizadas até sepse e morte (Figura 5). As infecções resultam em quadros agudos, sepse ou infecção crônica, que podem mimetizar câncer ou tuberculose (WHITE, 2003; MEUMANN et al., 2012). Infecções agudas às vezes ocorrem no local da inoculação. As lesões na pele geralmente aparecem como cinza ou branca, nodulares ou ulceradas. Os nódulos podem ser caseosos e muitas vezes são circundados por inflamação (ACHAPPA; MADI; VIDYALAKSHMI, 2016). A doença pulmonar é uma síndrome comum nas pessoas, podendo ocorrer como uma síndrome primária ou um componente da sepse, e pode desenvolver-se repentinamente ou gradualmente, após uma doença prodrômica inespecífica (FU et al., 2016; ZHAN et al., 2017).

Figura 5. História natural da infecção por *Burkholderia pseudomallei*



Fonte: Adaptado de CURRIE, 2010.

Uma vez que até 80% dos pacientes com melioidose tem um ou mais fatores de risco para a doença, tem sido sugerido que a doença deve ser considerada oportunista, ou seja, que é improvável que tenha um resultado fatal em uma pessoa saudável, desde que a infecção seja diagnosticada precocemente e os antibióticos apropriados estejam disponíveis (CURRIE; WARD; CHENG, 2010). Foi relatado em um estudo descritivo, do total de 540 pacientes na Austrália ao longo de um período de 20 anos, a característica principal foi pneumonia (51% dos pacientes), seguido de infecção geniturinária (14%), infecção de pele (13%), bacteremia (11%), artrite séptica ou osteomielite (4%) e 3% tinham envolvimento neurológico, os 4% restantes não apresentavam foco evidente de infecção (CURRIE; WARD; CHENG, 2010). Na Tailândia, 40% dos pacientes infantis apresentaram melioidose através da apresentação de parotidite supurativa (PAGNARITH et al., 2010). As taxas de mortalidade são de aproximadamente 40% na Tailândia (sendo 35% em crianças) (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010) e 14% na Austrália (CURRIE; WARD; CHENG, 2010).

No Brasil, dois pesquisadores estudaram 20 casos confirmados ou suspeitos de melioidose em crianças no Ceará, durante 1989-2019, onde as manifestações clínicas mais

frequentes foram sepse (18/20; 90%), pneumonia (18/20; 90%) e choque séptico (17/20; 85%) e no total, 45% (9/20) dos pacientes morreram (LIMA; ROLIM, 2021).

2.6 Fatores de virulência

Alguns fatores de virulência, descritos na Tabela 1, já foram propostos como envolvidos na patogênese de *B. pseudomallei*, mas a importância de cada um para a doença permanece em grande parte desconhecido. Como já abordado, o sistema de *quorum sensing* influencia todo o comportamento das populações bacterianas através da secreção de AHL (WIERSINGA et al., 2006; ESTES et al., 2010; GAMAGE et al., 2011). O genoma de *B. pseudomallei* codifica seis sistemas de secreção tipo VI (T6SS), que são implicados na virulência bacteriana, sobrevivência intracelular e competição dentro das comunidades bacterianas (SCHWARZ et al., 2010; BURTNICK et al., 2011).

O polissacarídeo capsular, LPS e dois outros polissacarídeos de superfície são fatores de virulência adicionais (WIERSINGA et al., 2006). Os flagelos são importantes para a motilidade e invasão de *B. pseudomallei* nas células hospedeiras. Há também o fator letal de *B. pseudomallei* (BPLS1549) que é semelhante ao fator necrosante citotóxico da *Escherichia coli* e interfere no início da tradução, levando à alteração do citoesqueleto de actina e, finalmente, à apoptose da célula (CRUZ-MIGONI et al., 2011). Também foi relatado que o biofilme, se presente *in vivo* durante a infecção bacteriana pode ser um importante fator de virulência, pois contribui para uma longa persistência da bactéria e conseqüentemente uma alta recidiva da doença (SAWASDIDOLN et al., 2010). Alguns estudos demonstram que o ferro é importante para a virulência de *B. pseudomallei*. Como por exemplo, a gravidade da infecção por esse microrganismo aumentou com a suplementação de ferro (AMORNRIT et al., 2012). Além disso, outro estudo demonstrou que o ferro regulou negativamente o sistema de secreção do tipo VI em *B. pseudomallei* e *B. mallei* (BURTNICK et al., 2011). Tuanyok et al. (2005), demonstraram que em hospedeiros infectados, *B. pseudomallei* é capaz de lidar com condições de restrição de ferro regulando positivamente seu sistema de aquisição de ferro e usando vias metabólicas alternativas para produção de energia. Sabe-se que *B. pseudomallei* para estabelecer uma infecção com sucesso pode ser dependente da sua capacidade de eliminar o ferro (ONG et al., 2004).

Os sideróforos também possui um papel na virulência de *B. pseudomallei*, essa bactéria produz dois sideróforos, a maleobactina e a piochelina, que é capaz de capturar o ferro das proteínas do hospedeiro transferrina e lactoferrina, permitindo que o patógeno cresça

em condições de deficiência de ferro (BUTT; THOMAS, 2017; SCHMIDT et al., 2018). A mudança de morfotipo pode ser induzida por uma variedade de estresses, incluindo restrição nutricional, choque térmico, limitação de ferro e concentrações subinibitórias (CIM/2 e CIM/4) de antibióticos (CHANTRATITA, 2007).

Tabela 1. Fatores de virulência identificados em *Burkholderia pseudomallei*

Fator de virulência	Função	Referência
Cápsula	Fixação epitelial; resistência ao complemento	Ahmed (1999); Reckseidler-Zenteno (2005)
LPS	Resistência ao complemento e defensas	DeShazer (1998); Burtnick; Woods (1999)
Flagelos	Motilidade	DeShazer (1997)
Pili	Fixação epitelial, formação de microcolônias	Essex-Lopresti (2005); Brown (2002); Boddey (2006)
<i>Quorum sensing</i>	Regulação gênica de fase estacionária, incluindo enzimas secretadas e proteína do estresse oxidativo	Valade (2004); Song (2005); Lumjiaktase (2006)
T3SS (Bsa)	Invasão e escape vacuolar	Stevens (2002; 2003); Burtnick (2008)
Mudança de morfotipo	Alteração de determinantes de superfície para alterações fenotípicas <i>in vivo</i>	Chantratita (2007)
Ferro	Aumento da gravidade da infecção	Amornrit (2012)
Biofilme	Resistência aos antimicrobianos e recidiva da doença	Sawasdidoln (2010)

Fonte: ADLER et al., 2009.

2.6.1 Biofilmes

O biofilme é uma comunidade estruturada de uma ou mais espécies de microrganismos contidas em uma matriz de substância extracelular polimérica (EPS),

contendo polissacarídeos, DNA extracelular e polipeptídeos (RICCI et al., 2019; RIZZI et al., 2019). Os biofilmes são um grande problema de saúde global por conferirem aos microrganismos resistência a antimicrobianos e ao sistema imunológico, contribuindo para a cronicidade das infecções (CIOFU; TOLKER-NIELSEN, 2019; SHARMA; MISBA; KHAN, 2019). A *B. pseudomallei* para se adaptar ao meio ambiente, tem a capacidade de formar biofilme, tornando-se uma estratégia eficaz de sobrevivência. Kamjumhol et al. (2013) propuseram que alguns fatores ambientais promovem ou suprimem a formação de biofilme de *B. pseudomallei*. Eles observaram que a presença de NaCl e Fe, em concentrações diversas, favoreceu a formação de biofilme. Comparado com outras infecções bacterianas, as infecções por *B. pseudomallei* causam uma taxa de recaída mais alta associada à formação do biofilme, além disso, esse patógeno é mais resistente quando crescem como um biofilme (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2014; SIRIJANT; SERMSWAN; WONGRATANACHEEWIN, 2016).

A formação do biofilme é comumente considerada como ocorrendo em quatro estágios principais: (1) fixação bacteriana a uma superfície, (2) formação de microcolônias, (3) maturação do biofilme e (4) dispersão (LANDINI et al., 2010). Um biofilme pode consistir em uma única espécie microbiana ou uma combinação de diferentes espécies de bactérias, fungos, protozoários que se ligam fortemente uns aos outros e a superfícies bióticas ou abióticas (RAGHUPATHI et al., 2017).

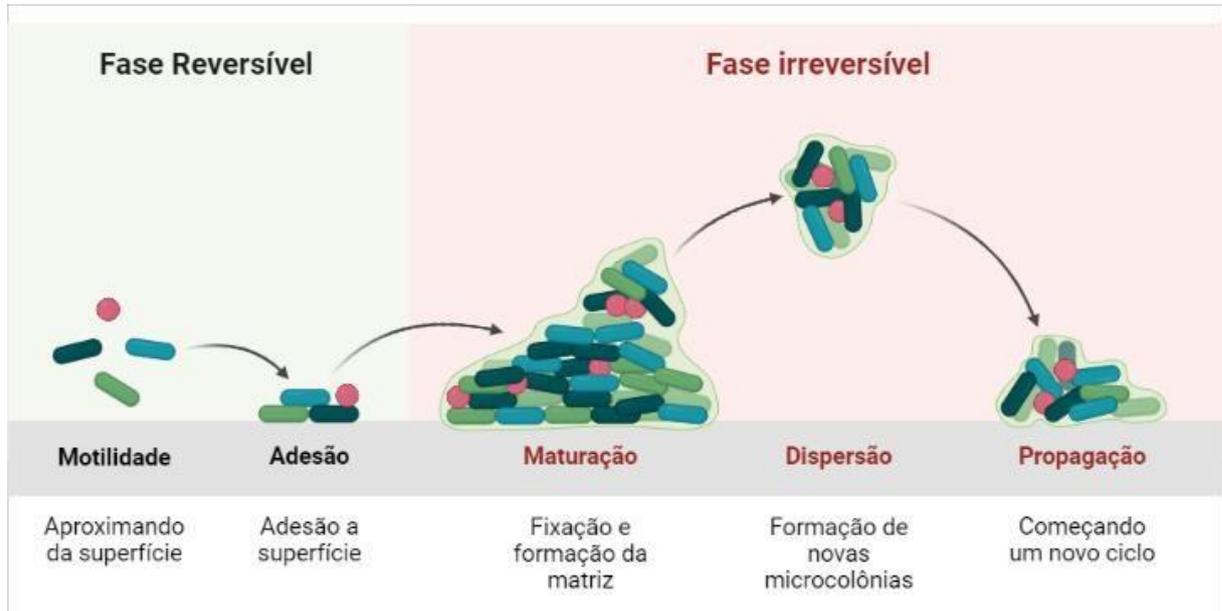
A fixação bacteriana é o primeiro passo para a formação do biofilme, que começa com a interação favorável entre algumas células planctônicas e superfícies de substrato. As bactérias devem ser transportadas para a superfície por movimento browniano, sedimentação ou convecção (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). A ligação irreversível é alcançada através dos efeitos de interações de curto alcance, como interações dipolo-dipolo, hidrogênio, ligações iônicas e covalentes e interações hidrofóbicas com envolvimento de adesões estruturais bacterianas (BOS; MEI; BUSSCHER, 1999). Nessa fase, para auxiliar na fixação *B. pseudomallei* possui pili tipo IV ou fimbrias, que interferem a adesão célula-a-célula, dificultando a remoção do biofilme (NANDI et al., 2010). Após esse processo, *B. pseudomallei* utiliza a capacidade de produzir glicocálice para estruturar o biofilme, essa cápsula facilita a ligação intercelular, gerando a formação de microcolônias (WHITE, 2003). A adesão irreversível é progredida através da produção de EPS regulado por *quorum sensing* das células bacterianas residentes. As bactérias sintetizam e secretam EPS que são um componente essencial da matriz extracelular do biofilme. O EPS pode medir tanto a coesão de

bactérias quanto a adesão de biofilmes a superfícies por meio de interações hidrofóbicas e interações de ponte de íons (FAHS et al., 2014; COSTA; RAAIJMAKERS; KURAMAE, 2018).

Na fase de maturação do biofilme, as bactérias continuam a se multiplicar dentro da matriz EPS incorporada usando os sinais de autoindutores e conduzem à formação de microcolônias e maturação de biofilmes (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010; TOYOFUKU et al., 2016). Após a formação de microcolônias e acúmulo de EPS, mudanças nas expressões gênicas são induzidas e os produtos desses genes são utilizados para a produção de EPS que atuam como “cola” biológica entre células bacterianas incorporadas (FREDERICK et al., 2011; KARIMI et al., 2015). A formação da matriz é seguida pela formação de canais cheios de água que atuam como sistemas circulatórios, transportando nutrientes para as comunidades de células e removendo produtos indesejados (GARNETT; MATTHEWS, 2012).

O processo de desprendimento do biofilme, também conhecido como dispersão, representa o processo terminal do desenvolvimento do biofilme. É considerado como uma estratégia das células bacterianas deixarem os biofilmes e continuarem outro ciclo de vida do biofilme (SINGH et al., 2017). Ou seja, a dispersão das células aderidas à superfície de biofilmes é um fenômeno naturalmente programado que permite que as células bacterianas formem novas microcolônias em outros substratos frescos em resposta a condições fisiológicas ou ambientais particulares (DÍAZ-SALAZAR et al., 2017). A dispersão é um processo complexo regulado por sinais ambientais, vias de transdução de sinal e efetores (KAPLAN, 2010). As fases de formação de biofilmes são ilustradas na figura 6. O aumento da resistência antibiótica causada pela formação do biofilme, é devido a difusão limitada de agentes antimicrobianos na matriz do biofilme, comunicação dos agentes antimicrobianos com a matriz do biofilme (polímero e células), resistência mediada por enzimas, níveis de atividade metabólica dentro do biofilme, adaptação genética, bombas de efluxo e estrutura da membrana externa (SINGH et al., 2017).

A aquisição de ferro é necessária para a formação do biofilme. Sob condições de aumento de Fe, esse metal livre pode ser transportado diretamente para a bactéria por sistemas de transporte ativo ou transportado indiretamente por meio de sideróforos. Essas condições, as bactérias podem reter a capacidade de formar biofilmes maduros. Na presença de quelantes de ferro (como deferiprona, EDTA, desferoxamina), entretanto, a disponibilidade do Fe se restringe e a formação do biofilme fica afetada (KANG; KIRIENKO, 2018).

Figura 6. Fases da formação do biofilme

Legenda: Representação esquemática da formação do biofilme. Adesão reversível: As células planctônicas vão se aderir as superfícies bióticas ou abióticas de forma aleatória. Adesão irreversível/Crescimento: Divisão celular e início da secreção da matriz extracelular polimérica, formando microcolônias e o desenvolvimento do biofilme maduro. Maturação: As células vão crescer em uma estrutura tridimensional e amadurecer. As células do biofilme vão ficar aderidas a uma superfície e vão ser resistentes a tensões mecânicas. Dispersão: Quando o ambiente não é mais propício para os biofilmes, as células vão se dispersar, formando agregados celulares ou células planctônicas, para colonizar novos ambientes e formar novos biofilmes.

2.7 Tratamento

Os antibióticos usados para o tratamento da melioidose se enquadram em duas categorias: (1) tratamento da fase de sepse e (2) terapia de erradicação. A duração da terapia de fase aguda é geralmente de 10 a 14 dias de antibióticos intravenosos, seguidos de 3 a 6 meses de antibióticos orais (PITMAN et al, 2015). As opções de tratamento da melioidose têm sido tradicionalmente limitadas, pois *B. pseudomallei* apresenta resistência a diversos antibióticos, incluindo cefalosporinas de primeira e segunda geração, penicilinas, macrolídeos e aminoglicosídeos (WHITE, 2003). Essa resistência varia de exclusão da célula devido a problemas de permeabilidade conferidos por constituintes do envelope da célula bacteriana, efluxo da célula, inativação enzimática, sítios alvo alterados (que em casos raros podem incluir deleção de alvo) (SCHWEIZER, 2012).

Em humanos, ceftazidima intravenosa, amoxicilina-ácido clavulânico e imipenem foram relatados como tratamentos eficazes para a doença aguda (WHITE, 2003). Meropenem também tem sido usado com sucesso (CHENG et al., 2004). Tratamentos orais

compreendendo cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprima, doxiciclina ou amoxicilina-clavulanato isoladamente, também se mostraram eficazes para a terapia de erradicação após o tratamento da fase aguda, sendo também utilizada em crianças e mulheres grávidas (WIERSINGA; CURRIE; PEACOCK, 2012). A doxiciclina tem sido usada isoladamente no tratamento da melioidose localizada em combinação com outros antimicrobianos para doenças sistêmicas (LEELARASAMEE; BOVORNKITTI, 1989). Um estudo na Tailândia, demonstrou que a ceftazidima foi associada a uma redução significativa na mortalidade de pacientes adultos com melioidose (WHITE et al., 1989).

Além da resistência aos antibióticos e da necessidade de um regime de tratamento extenso, um obstáculo adicional é que a recidiva da infecção ocorre em 13-23% dos pacientes, quando estão associados a formação de biofilme (SUNTORNISUT et al., 2016). Diante disso, alguns estudos demonstram que estratégias de restrição de ferro podem limitar o crescimento de bactérias *in vitro* e *in vivo* e a disponibilidade desse metal, essencial ao metabolismo bacteriano, pode ser restrita mediante a aplicação de quelantes de ferro, dificultando o crescimento bacteriano e a formação de biofilme, assim aprimorando a eficácia dos antibióticos (CORAÇA-HUBER et al., 2018).

2.7.1 Quelante de ferro: Deferiprona

O ferro é indispensável para o crescimento e virulência de praticamente todas as bactérias e fungos (CHHABRA et al., 2020). Para adquirir ferro do meio ambiente, muitos microrganismos desenvolveram métodos eficientes para sequestrar e absorver o ferro do meio (HIDER; KONG, 2010). Uma estratégia para os microrganismos obterem ferro durante a infecção de mamíferos é atingir heme e hemoglobina, portanto, várias bactérias e fungos secretam hemolisinas para lisar glóbulos vermelhos e liberar hemoglobina ou produzir proteases de hemoglobina para degradar a proteína. Outra estratégia, é a aquisição direta de ferro da transferrina e lactoferrina por alguns patógenos bacterianos como fontes de ferro. Muitas bactérias e fungos produzem sideróforos para adquirir e transportar ferro, além de aumentar o crescimento coordenando o ferro férrico (Fe^{3+}) para a absorção por microrganismos. Atividades de redução de Fe^{3+} e posterior absorção de ferro ferroso (Fe^{2+}) estão presentes em bactérias e fungos. A forma ferrosa pode existir em ambientes ácidos e sob condições de baixa oxigenação dos tecidos do corpo, e pode ser gerada por atividades de redutase associadas a células, os íons ferrosos se difundem livremente através da membrana externa das bactérias Gram-negativas (CAZAE; KRONSTAD, 2013). Em princípio, a

inibição da absorção de ferro pode ser efetuada pela introdução de agentes quelantes seletivos de ferro de alta afinidade (PATERSON et al., 2022). Ademais, para alta potência, a afinidade dos agentes quelantes pelo ferro deve ser bastante alta, permitindo que eles possam competir eficientemente com os sideróforos pelo ferro, além disso a estrutura dos quelantes deve diferir sensivelmente daquelas dos sideróforos, caso contrário, o complexo ferro-quelante será reconhecido pelos receptores ferro-sideróforo e, assim, utilizado pelo microrganismo (CHAN et al., 2009).

Os agentes quelantes são compostos orgânicos capazes de se ligar a íons metálicos para formar espécies menos tóxicas que são facilmente excretadas pelo corpo. A deferiprona (1,2-dimetil-3-hidroxipiridina-4-ona) é um quelante de ferro sintético, oral bidentado de baixo peso molecular, pertencente aos compostos do grupo 3-hidroxi-4-piridinona, que foi aprovado pela FDA para o tratamento da sobrecarga de ferro em pacientes com talassemia (GALANELLO; CAMPUS, 2009; FLORA, 2013). Alguns estudos demonstraram que a DFP inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (QIU et al., 2011; XU et al., 2011; XIE et al., 2013).

No caso das resistências bacterianas aos antimicrobianos, onde classes inteiras não são mais opções de tratamento (SPELLBERG et al., 2008), as combinações de drogas oferecem uma estratégia promissora para superar os mecanismos de resistência bacteriana e restaurar a eficácia do antibiótico. Além disso, a combinação de quelantes de ferro com antibióticos também demonstrou ter potencial clínico (VAN ASBECK et al., 1983; NEUPANE; KIM, 2010; ZHU et al., 2013).

Dada a relevância do ferro para o processo de infecção, o uso da DFP foi relatada como um forte inibidor de crescimento de patógenos humanos, como *Yersinia enterocolitica* (LESIC; FOULON; CARNIEL, 2002), *Vibrio vulnificus* (KIM et al., 2007) e estafilococos coagulase-negativos (KIM; SHIN, 2009), diminuindo a disponibilidade de ferro *in vitro*. Além disso, a DFP é capaz de inibir a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em células sanguíneas mononucleares (GEORGIU et al., 2000), e o tratamento com doses mais altas de DFP demonstrou prolongar a sobrevivência após a infecção pelo HIV (HAIDER et al., 2019). Ademais, um estudo envolvendo 45 pacientes com malária tratados com DFP mostrou recuperação do coma significativamente mais rápida e eliminação do parasita, sem efeitos adversos (SMITH; MEREMIKWU, 2003), demonstrando que esse quelante possui versatilidade como um tratamento direcionado ao hospedeiro.

Diante disso, o trabalho se propôs a analisar a atividade inibitória da deferiprona contra *B. pseudomallei* em crescimento planctônico e de biofilme, bem como avaliar se o composto teve atividade sinérgica, quando adicionado a alguns antimicrobianos usados no tratamento da melioidose.

3 HIPÓTESES

- A deferiprona inibe o crescimento planctônico da bactéria *Burkholderia pseudomallei*.
- O quelante de ferro deferiprona age contra a formação de biofilme e biofilmes maduros de *B. pseudomallei*, reduzindo sua biomassa.
- A deferiprona 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 quelante de ferro deferiprona sobre o crescimento de *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica, sobre a formação de biofilmes e sobre biofilmes maduros, além de testar esse composto associado aos antimicrobianos utilizados para o tratamento da melioidose.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da deferiprona e dos antimicrobianos amoxicilina-clavulanato, meropenem e doxiciclina isolados ou associados sobre a forma planctônica de cepas de *B. pseudomallei*.
2. Avaliar o efeito *in vitro* do quelante de ferro sobre a formação e manutenção de biofilme de *B. pseudomallei*, bem como, determinar a sensibilidade dessa bactéria aos antimicrobianos utilizados no tratamento da melioidose.
3. Analisar por microscopia confocal as alterações estruturais nos biofilmes em formação e biofilmes maduros de *B. pseudomallei* expostos ao quelante de ferro (DFP).

5. METODOLOGIA

5.1 Local de estudo

O presente estudo foi conduzido no laboratório de Biossegurança Nível 3, em cabine de fluxo laminar II/B2, pertencente ao Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes – LAPERE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.2 Cepas bacterianas

Para a realização do estudo, foram utilizadas 16 cepas de *Burkholderia pseudomallei* (oito clínicas e oito ambientais). 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). Com isso, as cepas foram retiradas dos estoques e recuperadas em caldo BHI.

Tabela 2. Cepas de *Burkholderia pseudomallei* utilizadas na pesquisa

Origem	Numeração utilizada	Numeração bacterioteca	da
Clínicas	BP2	CEMM 03-6-034	
	BP4	CEMM 03-6-036	
	BP6	CEMM 03-6-038	
	BP14	CEMM 03-5-096	
	BP16	CEMM 05-6-089	
	BP18	CEMM 05-6-091	
	BP19	CEMM 05-6-092	
	BP20	CEMM 05-6-093	
Ambientais	1.3.31A	CEMM 03-6-039	
	1.3.33B	CEMM 03-6-040	
	1.3.34B	CEMM 03-6-041	
	1.3.36A	CEMM 03-6-042	
	1.3.36B	CEMM 03-6-043	
	1.3.46A	CEMM 03-6-046	
	1.3.46B	CEMM 03-6-047	
	1.3.47B	CEMM 03-6-048	

Legenda: Relação das cepas empregadas na pesquisa, bem como a numeração de depósito na coleção do LAPERE. CEMM: Centro Especializado em Microbiologia Médica

5.3 Drogas antimicrobianas e quelante de ferro

Os antimicrobianos incluídos na pesquisa foram amoxicilina/clavulanato (AMC), meropenem (MER) e doxiciclina (DOX) utilizados para o tratamento da melioidose. O

quelante de ferro utilizado foi a deferiprona [3-Hydroxy-1,2-dimethyl-4(1*H*)-pyridone] (DFP) e todos foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Brazil. A AMC foi o único antibacteriano solubilizado em solução estéril de tampão fosfato no pH 6,0 e as demais drogas foram dissolvidas em água destilada estéril, conforme preconiza o documento M100-S28 (CLSI, 2018).

5.4 Preparo do inóculo para o teste de sensibilidade

As cepas foram cultivadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) por 48 horas a 37 °C. Após esse período os inóculos foram suspensos em 2 mL de salina estéril, a fim de obter a turvação de 0,5 na escala McFarland, que equivale aproximadamente uma concentração de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Em seguida, os inóculos foram diluídos em caldo Muller Hinton (MH) até alcançar a concentração final de 5×10^5 UFC/mL.

5.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do quelante de ferro deferiprona e dos antimicrobianos contra isolados de *Burkholderia pseudomallei*

Os testes de sensibilidade para determinar a concentração inibitória mínima, na forma planctônica, foi realizado seguindo o método de microdiluição em placa de 96 poços de fundo “U”, em caldo MH, como descrito no documento M100-S28 (CLSI, 2018). A DFP foi testada em concentrações variando de 0,5 a 256 µg/mL, para AMC 0,125/0,06 a 64/32 µg/mL, para MER e DOX foram utilizadas concentrações variando de 0,03 e 16. As placas de microdiluição de 96 poços, foram preenchidas inicialmente com 100 µL do caldo. 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. Os poços da coluna 11 foram utilizados como controle de crescimento, ou seja, meio de cultura mais o inóculo bacteriano. Após isso, 100 µL do inóculo preparado anteriormente foi adicionado em todos os poços da coluna 1 a 11. Após 24 h de incubação, foi realizada a leitura visual onde a CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano quando comparado ao controle. A cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle para todas as drogas e a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 para controle apenas do MER, pois as demais eram

intrinsecamente resistentes (CLSI, 2018). Os valores de CIM foram obtidos para determinar a concentração que seria utilizada nos ensaios de formação de biofilme. Após a determinação das CIMs das drogas isoladas, foram realizados ensaios de combinação de drogas, seguindo a metodologia de microdiluição, conforme descrito acima. A DFP foi combinada com AMC, MER ou DOX, em uma concentração fixa de MIC/2 (2 – 32 µg/mL), conforme o valor de CIM obtido contra cada cepa. As CIMs obtidas para cada droga antimicrobiana em combinação com DFP foram comparadas àquelas obtidas para os antimicrobianos isoladamente (SIDRIM et al., 2020).

5.4.2 Efeito do quelante de ferro sobre a formação de biofilme

Para a formação do biofilme, as cepas foram primeiramente repicadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C por 48h. Após o crescimento, as células foram suspensas em 2 mL de salina estéril para obter uma turvação na escala 6 de McFarland, equivalente a $1,8 \times 10^9$ UFC/mL. A formação de biofilmes foi induzida em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato contendo caldo BHI acrescido de glicose 1% (BHI-1% glicose) e utilizando uma relação inóculo:meio de cultura de 1:7 (v/v). Assim, para avaliar o efeito da DFP sobre a formação de biofilmes, a DFP foi incorporada ao caldo BHI-1% glicose de forma que as concentrações de CIM, CIM/2 e CIM/4, com base nas CIMs de DFP obtidas contra cada isolado, fossem alcançadas. Assim, 175 µL de meio contendo DFP em diferentes concentrações foram adicionados aos poços das placas de poliestireno. Em seguida, 25 µL do inóculo bacteriano foram acrescentados aos poços e as placas foram incubadas a 37 °C, por 48 h (SIDRIM et al., 2020). Após esse período, 20 µL de resazurina (0,025%) foram adicionados a todos os poços, as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C, a fim de detectar a atividade metabólica do biofilme (SIDRIM et al., 2020). Após 1 h de incubação, foi realizada a interpretação visual dos resultados. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS, a fim de remover as células não aderidas, e a biomassa dos biofilmes foi quantificada pela técnica do cristal violeta e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 490 nm (SIDRIM et al., 2020). Os testes foram realizados em triplicata, 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.

5.4.3 Efeito da deferiprona sobre biofilmes maduros de *B. pseudomallei*

Para avaliar o efeito da DFP sobre os biofilmes maduros de *B. pseudomallei*, os biofilmes foram formados, conforme metodologia citada na seção anterior. Após 48 h de crescimento, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados uma vez com PBS. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de BHI-1% glicose contendo 10 diluições seriadas de DFP (1-512 µg/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 definida como a menor concentração na qual não se observou atividade metabólica. Finalmente, a biomassa foi quantificada pela técnica do cristal violeta e lidas em espectrofotômetro na absorvância de 490 nm. 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.

5.4.4 Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes em formação e maduro de B. pseudomallei expostos ao composto deferiprona

O efeito da DFP na estrutura dos biofilmes em formação e maduros foi avaliado por microscopia confocal. Para tal, foram escolhidas duas cepas representativas para essa análise (cepa clínica BP6 e cepa ambiental 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 DFP na formação do biofilme, essas estruturas foram cultivadas na presença de DFP a 32 µg/mL (CIM/2). Quanto aos biofilmes maduros, a DFP foi adicionada a 256 µg/mL, 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 (Invitrogen™, 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 COMSTAT™ e os parâmetros biomassa, espessura média da biomassa, espessura de toda a área, coeficiente de rugosidade e razão

superfície-volume foram calculados para DFP expostos e não-expostos aos biofilmes (controle de crescimento) (SIDRIM et al., 2020).

5.4.5 Efeito da deferiprona sobre a sensibilidade antimicrobiana de biofilmes de *Burkholderia pseudomallei*

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 200 µL de BHI-1% glicose contendo 10 diluições seriadas de AMC (512/256 – 1/0,5 µg/mL), MER (256 - 0,5 µg/mL) e DOX (256 – 0,5 µg/mL). Para avaliar o efeito da DFP sobre a sensibilidade antimicrobiana do biofilme, a DFP foi incorporada ao BHI-1% glicose a uma concentração fixa de 256 µg/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, definida como a menor concentração na qual não se observou atividade metabólica.

Finalmente, a biomassa foi quantificada pela técnica do cristal violeta. 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. As CEMBs obtidas para cada droga antimicrobiana em combinação com DFP foram comparadas àquelas obtidas para os antimicrobianos isoladamente.

5.5 Análise estatística

O efeito da deferiprona sobre a sensibilidade antimicrobiana de *B. pseudomallei* nas formas planctônicas e biofilme, formação de biofilme, biofilmes maduros e os parâmetros obtidos a partir da microscopia confocal foram analisados utilizando o teste t de Mann Whitney para dados assimétricos e teste t não pareado para dados simétricos. Valores de P inferiores a 5% foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram executadas utilizando o software Graphpad Prism 9.0.

6. RESULTADOS

6.1 Sensibilidade de *B. pseudomallei* à deferiprona e aos antimicrobianos

Nas concentrações testadas, a DFP apresentou CIMs variando de 4 - 64 (média geométrica - MG = 16). Em relação aos antimicrobianos, os intervalos de CIM encontrados foram de 64/32 µg/mL para AMC em algumas cepas, 1 µg/mL (MG = 1) para MER e 0,25-0,5 µg/mL (MG = 0,28) para DOX. Quando a DFP foi combinada com as drogas antimicrobianas e testadas contra *B. pseudomallei* na forma planctônica, houve redução significativa ($P < 0,05$) do CIM para AMC e MER, que apresentaram CIMs de 64/32 µg/mL (MG = 64/32), 0,5 - 4 µg/mL (MG = 0,84), respectivamente, enquanto a DOX não sofreu redução significativa (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatórias mínimas de biofilme (CEMBs) de drogas antibacterianas isoladas e combinadas com deferiprona contra cepas de *Burkholderia pseudomallei*.

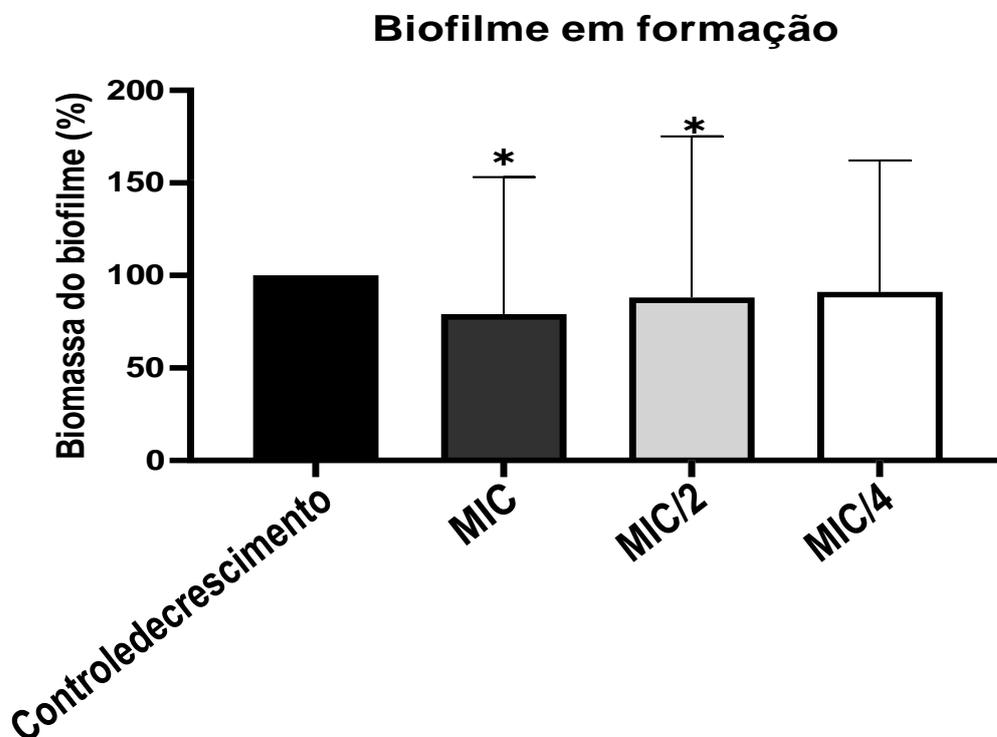
Cepa	Origem	DFP (µg/mL)		AMC (µg/mL)				MER (µg/mL)				DOX (µg/mL)			
		Sozinha		Sozinha		Deferiprona (µg/mL)		Sozinha		Deferiprona (µg/mL)		Sozinha		Deferiprona (µg/mL)	
		CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB
BP2	CLIN	8	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	0,5	> 256	0,25	> 256	0,25	> 256
BP4	CLIN	8	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	0,5	> 256	0,25	> 256	0,25	> 256
BP6	CLIN	64	> 1024	> 64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	0,5	> 256	0,5	> 256	0,25	> 256
BP14	CLIN	16	> 1024	> 64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	256	0,5	> 256	0,5	> 256	0,25	> 256
BP16	CLIN	4	> 1024	> 64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	1	> 256	0,5	> 256	0,5	> 256
BP18	CLIN	8	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	4	> 256	0,25	> 256	0,25	> 256
BP19	CLIN	16	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	0,5	> 256	0,25	> 256	0,25	> 256
BP20	CLIN	64	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	0,5	> 256	0,25	> 256	0,25	> 256
039	AMB	4	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	16	1	0,5	0,25	256	0,125	2
040	AMB	16	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	1	> 256	0,25	> 256	0,25	> 256
041	AMB	64	> 1024	> 64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	1	256	0,25	> 256	0,25	> 256
042	AMB	32	> 1024	> 64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	1	16	0,25	256	0,25	> 256
043	AMB	8	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	1	> 256	0,25	> 256	0,25	> 256
046	AMB	64	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	1	> 256	0,25	> 256	0,25	128
047	AMB	16	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	1	> 256	0,25	> 256	0,25	> 256
048	AMB	8	> 1024	64/32	> 512/256	64/32	> 512/256	1	> 256	1	> 256	0,25	> 256	0,25	32
Média	Geométrica	16	> 1024		> 512/256	64/32	> 512/256	1	394,8	0,8409		0,2847	469,5	0,25	

Notas: DFP: Deferiprona; AMC: Amoxicilina-clavulanato; MER: Meropenem; DOX: Doxiciclina; CLIN: Clínicas; AMB: Ambientais

6.1.1 Efeito da deferiprona sobre a formação do biofilme

A formação do biofilme foi induzida na presença da DFP, levando a uma diminuição média de biomassa de 21, 12 e 9% a CIM, CIM/2 e CIM/4, respectivamente. Nas concentrações de CIM e CIM/2, houve uma redução estatisticamente significativa na biomassa ($P < 0,05$) (Figura 7). No entanto, a DFP não interferiu na viabilidade do biofilme, conforme evidenciado pelo ensaio da resazurina.

Figura 7. Efeitos da deferiprona sobre a formação de biofilmes por *Burkholderia pseudomallei*



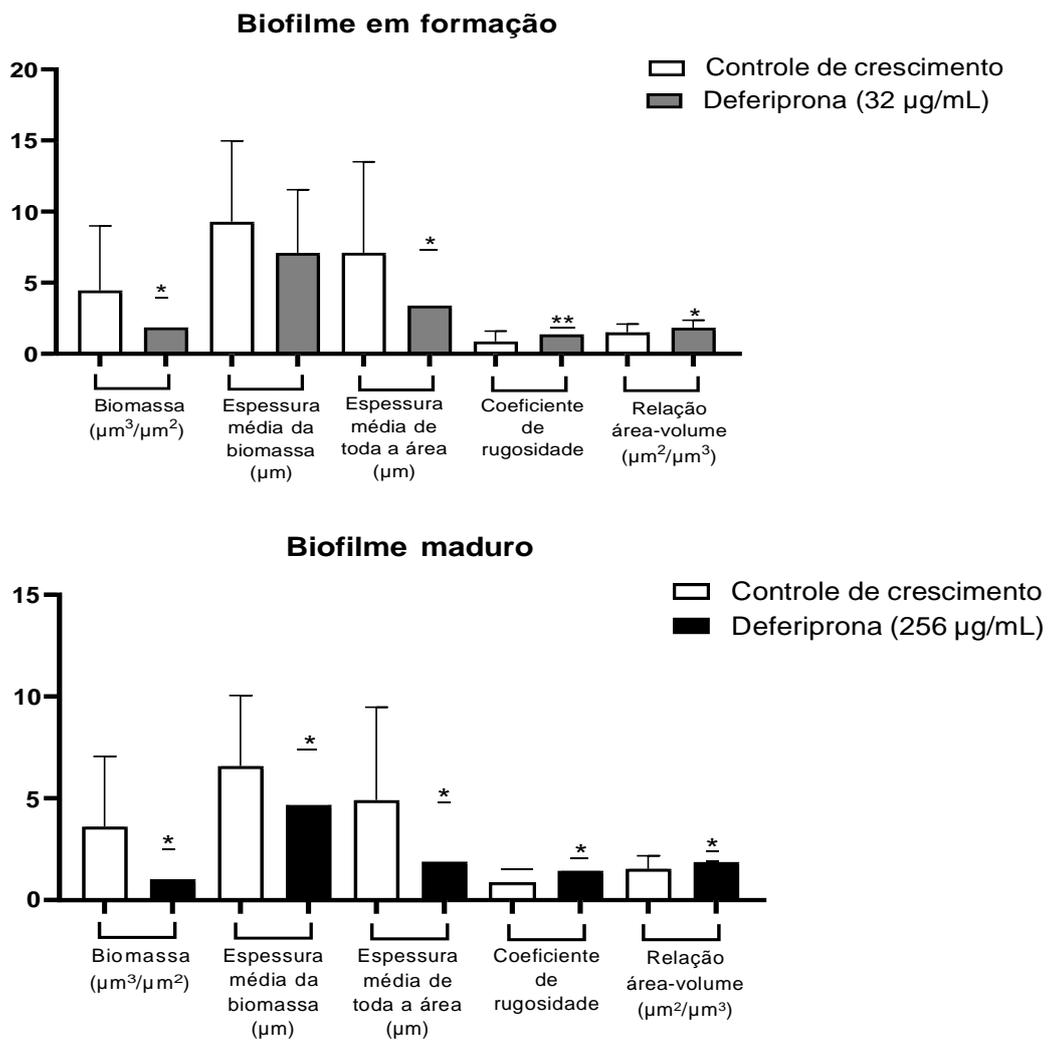
Legenda: A formação de biofilmes foi induzida em caldo BHI-1% glicose contendo três diferentes concentrações da droga (CIM, CIM/2, CIM/4). Controle de crescimento: biofilmes cultivados em meio livre de drogas. Os dados são reportados como média e desvio padrão após técnica do cristal violeta e os valores de absorbância obtidos para 16 cepas bacterianas, em ensaios realizados em triplicata, com duas réplicas biológicas. *indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os valores de absorbância obtidos para o controle de crescimento do biofilme e os valores obtidos em diferentes concentrações da deferiprona.

6.1.2 Análise da microscopia confocal da deferiprona em biofilmes em formação e maduro de *B. pseudomallei*

Análises de microscopia confocal de biofilmes em formação expostos a DFP demonstrou uma diminuição na formação de biofilme, como mostrado pela redução significativa ($P < 0,05$) na biomassa e espessura média de toda a área e aumento significativo ($P < 0,05$) no coeficiente de rugosidade e razão superfície-volume.

A maior redução de biomassa foi observada a 256 $\mu\text{g/mL}$, razão pela qual essa concentração foi utilizada para análises de microscopia confocal, demonstrando uma ruptura da estrutura do biofilme maduro (Figura 9), como mostra a redução significativa ($P < 0,05$) na biomassa, espessura média da biomassa e espessura média de toda a área e aumento significativo ($P < 0,05$) em coeficiente de rugosidade e relação superfície-volume (Figura 8).

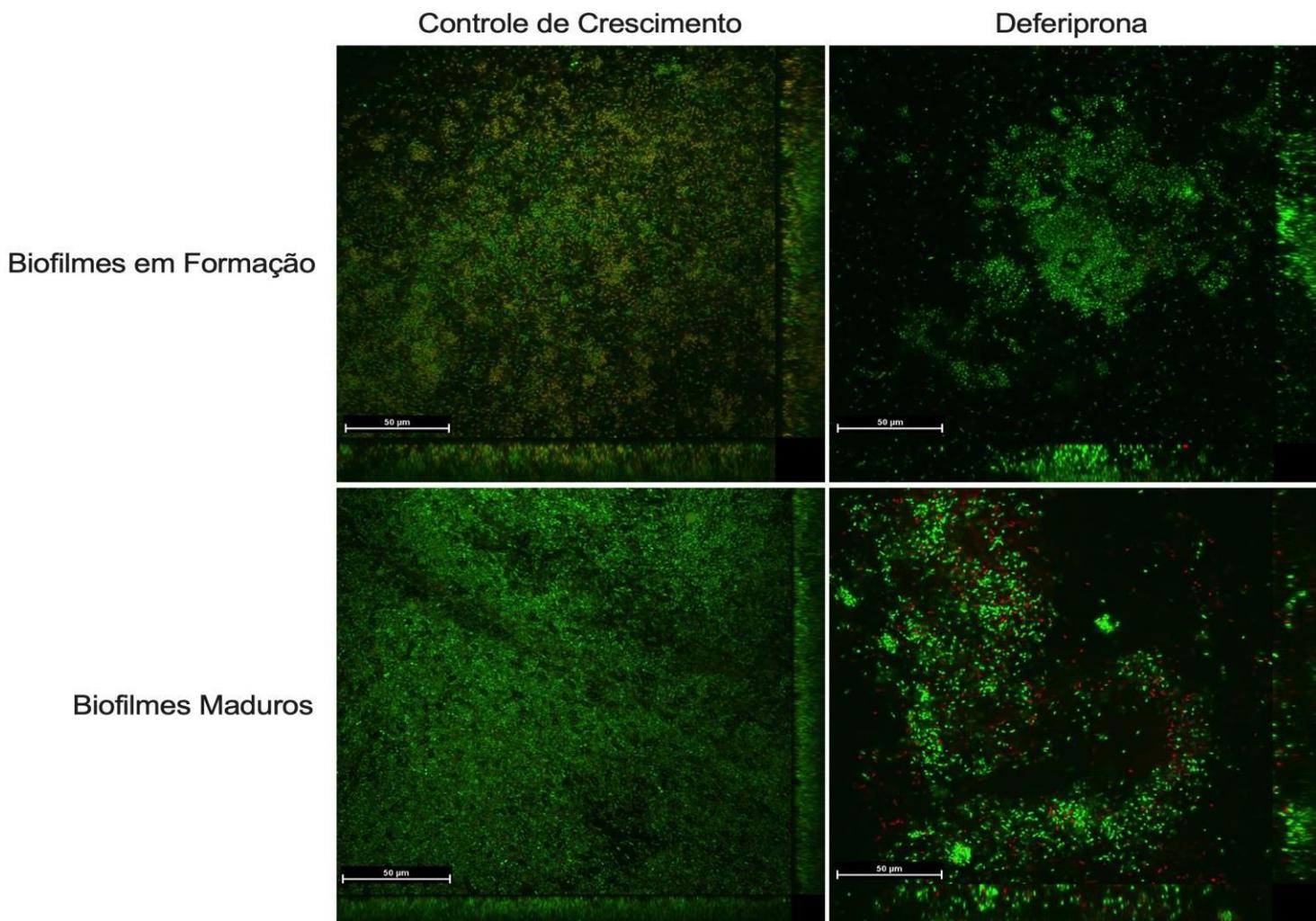
Figura 8. Análise da microscopia confocal da deferiprona em formação de biofilme e biofilme maduro de *B. pseudomallei* utilizando o software COMSTAT™.



Legenda: Biofilmes em formação: as cepas 03-6-038 e 03-6-041 foram induzidas a formar biofilmes em caldo BHI-1% glicose contendo deferiprona em CIM/2 (32 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas durante 48 h. O controle de

crescimento do biofilme foi cultivado em meio sem deferiprona. Biofilmes maduros: 48 h de biofilme maduro das cepas 03-6-038 e 03-6-041 foram expostos à deferiprona a 256 $\mu\text{g/mL}$ e incubadas por mais 24 h. O controle de crescimento do biofilme foi incubado em meio livre de deferiprona. As imagens foram adquiridas utilizando um Microscópio Confocal Nikon C2 e o fluoróforo Live DeadTM, as imagens Z-stack foram analisadas com o software COMSTATTM. *($P < 0,05$) e **($P < 0,01$) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros do biofilme obtido para a deferiprona exposta ou não exposta comparado ao controle de crescimento.

Figura 9. Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal de biofilmes de *B. pseudomallei* em formação e maduro após exposição a deferiprona.



Legenda: Biofilmes em formação: a cepa 03-6-041 foi induzida a formar biofilme em caldo BHI-1% de glicose contendo DFP a CIM/2 (32 $\mu\text{g/mL}$) e incubada durante 48 h. O controle de crescimento do biofilme foi cultivado em meio sem deferiprona. Notar a redução na biomassa do biofilme e na espessura do biofilme. Biofilmes maduros: 48 h de biofilme maduro da cepa 03-6-041 foi exposto à deferiprona a 256 $\mu\text{g/mL}$ e incubado por mais 24 h. O controle de crescimento do biofilme foi incubado em meio livre de deferiprona. Notar a redução da biomassa, espessura do biofilme e o aumento do número de células mortas/danificadas. As imagens foram adquiridas utilizando um Microscópio Confocal Nikon C2 e o fluoróforo Live DeadTM, a 488 nm para a detecção

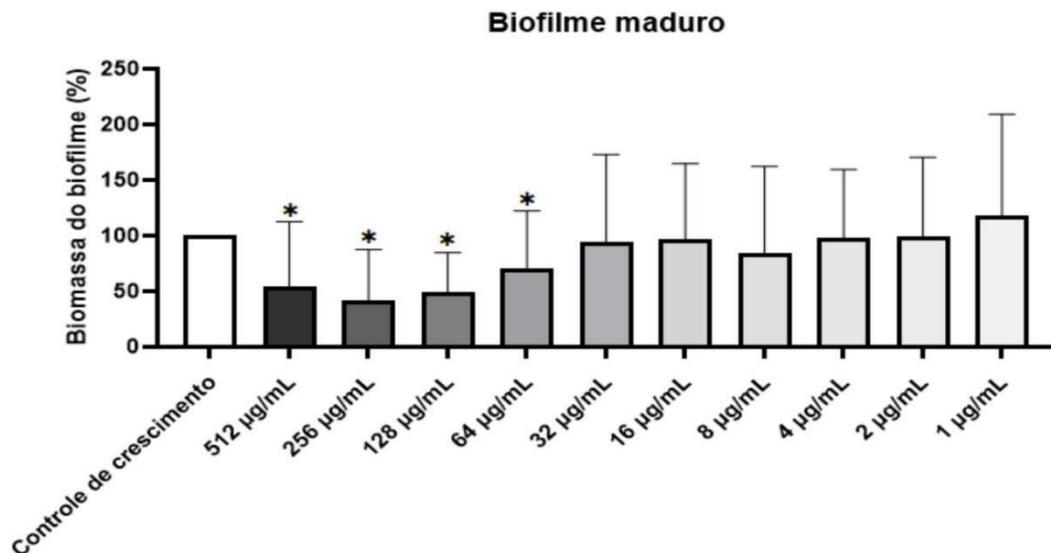
de Syto9, que identifica células bacteriana vivas (verde), e 561 nm para a detecção de iodeto de propídio, que identifica células bacterianas mortas/danificadas (vermelho). Ampliação 600x, escala de 50 μm .

6.1.3 Efeito da deferiprona e dos antimicrobianos sobre biofilmes maduros de *Burkholderia pseudomallei*

A DFP não erradicou os biofilmes de *B. pseudomallei*, não apresentando valores de CEMB nas concentrações testadas, mas causou reduções estatisticamente significativas ($P < 0,05$) na biomassa do biofilme, apresentando uma redução média de 47%, 59%, 52% e 30% nas concentrações de 512, 256, 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figure 9). Quanto às drogas antibacterianas, não foram encontrados valores de CEMB para AMC e os intervalos de CEMB para MER foram 16 – 512 $\mu\text{g/mL}$ (MG = 394,8) e 256 – 512 $\mu\text{g/mL}$ (MG = 469,5) para DOX (Tabela 3).

De maneira geral, as CEMBs da DFP e dos antimicrobianos foram significativamente ($P < 0,05$) maiores que suas respectivas CIMs. Quando utilizada na concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$, a DFP não reduziu os valores de CEMB para AMC, MER e DOX contra biofilmes maduros de *B. pseudomallei*.

Figura 10. Efeito da deferiprona sobre biofilmes maduros de *Burkholderia pseudomallei*



Legenda: Os biofilmes maduros foram cultivados em caldo BHI-1% de glicose, durante 48 h, então, expostos a diferentes concentrações de deferiprona (1-512 $\mu\text{g/mL}$) por mais 24 h. Controle de crescimento: biofilmes maduros que não foram expostos à deferiprona. *indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os valores de absorbância obtidos para o controle de crescimento do biofilme e os obtidos após a exposição a deferiprona em diferentes concentrações.

7. DISCUSSÃO

Os biofilmes são formados por comunidades microbianas inseridas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, contendo polissacarídeos extracelulares, proteínas e lipídios (XU et al., 2022). A formação de biofilme é essencial para a sobrevivência microbiana em diversos ambientes, potencialmente levando ao aumento da virulência e à maior tolerância aos antimicrobianos em comparação com as células planctônicas (PAKKULNAN et al., 2019; FLEMMING et al., 2016). Nesse contexto, a formação de biofilmes por *B. pseudomallei* limita a penetração dos antimicrobianos, diminuindo a sensibilidade às drogas de uso clínico, como meropenem, amoxicilina-clavulanato e doxiciclina (PAKKULNAN et al., 2019).

Diversos fatores podem interferir com a formação do biofilme, dentre os quais destaca-se o ferro (Fe), que é um elemento essencial que contribui para a adaptação de *B. pseudomallei* a ambientes específicos, como o solo e o hospedeiro. Como o Fe desempenha um papel como cofator de enzimas, altas concentrações desse elemento promovem, conseqüentemente, a produção de biofilme de *B. pseudomallei* (GERHARDY; SIMPSON, 2013; DUANGURAI; INDRAWATTANA; PUMIRAT, 2018). Considerando a importância do Fe, alguns estudos relatam a possibilidade de uso de quelantes de ferro como agentes terapêuticos contra diferentes microrganismos, no entanto, não se conhece o uso desses compostos contra *B. pseudomallei* (LESIC; FOULON; CARNIEL, 2002; KIM; CHIN, 2009; CHAN et al., 2009; RICHTER et al., 2017; RAMALINGAM; LEE, 2019).

Nesse contexto, optou-se por utilizar na presente pesquisa a DFP, um quelante de ferro sintético, com alta afinidade pelo Fe^{3+} , por ser rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e por ser aprovada para uso clínico para tratar a talassemia maior. A atividade antimicrobiana da DFP já foi demonstrada contra biofilmes de *Staphylococcus aureus* (RICHTER et al., 2017), quando os pesquisadores defenderam que esse composto pode atuar como uma nova estratégia antimicrobiana. A DFP, em outro estudo, também reduziu o crescimento de células planctônicas e na formação de biofilme de *Sporothrix spp.*, além disso, houve interação sinérgica com drogas antifúngicas contra esse patógeno (BRILHANTE et al., 2021).

Na presente pesquisa, primeiramente foi avaliado o efeito da DFP sobre o crescimento planctônico de *B. pseudomallei* e sua sensibilidade antimicrobiana, demonstrando que esse composto inibiu o crescimento de *B. pseudomallei* em concentrações de 4 - 64 $\mu\text{g/mL}$. Já foi relatada a atividade inibitória da DFP contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* e outros estafilococos coagulase negativos, apresentando CIM's variando de 128 a 512 µg/mL (THOMPSON et al., 2012; KIM; SHIN, 2009), valores mais elevados que aqueles encontrados contra *B. pseudomallei*. Embora a atividade antimicrobiana da DFP pareça estar relacionada a sua capacidade de quelar o ferro, Visca et al (2013) sugerem que deve haver uma toxicidade independente de quelação, uma vez que a adição de Fe reverte, mas não previne a atividade antimicrobiana em altas concentrações. Ademais, acredita-se que o baixo peso molecular da DFP favoreça a atividade antimicrobiana da droga, por facilitar o seu acesso ao citoplasma bacteriano (ZHOU et al., 2014; MA; GAO; MARESSO, 2015; EZRATY; BARRAS, 2016).

Quando combinada com as drogas antimicrobianas contra *B. pseudomallei* na forma planctônica, a DFP potencializou a atividade antimicrobiana de AMC e MER, porém não de DOX. Um estudo demonstrou que a diminuição da biodisponibilidade do Fe não teve nenhum efeito sobre a sensibilidade à doxiciclina contra cepas de *Escherichia coli*. Foi relatado também que a DOX tem atividade quelante de ferro e por isso não é potencializada quando combinada com outro quelante de ferro, levantando a hipótese que a tetraciclina ligada ao quelante não reduz a eficácia do antimicrobiano, mas diminui a eficácia do quelante (GRENIER; HUOT; MAYRAND, 2000; EZRATY; BARRAS, 2016; FAURE et al., 2021), enquanto a AMC e MER tem efeito bactericida e com isso foram potencializadas pela DFP, sugerindo que esse efeito pode ser dependente do acesso a *B. pseudomallei* ao ferro.

Quanto ao efeito da DFP sobre biofilmes em formação, observou-se que a DFP (CIM e CIM/2) reduziu a formação de biofilme de *B. pseudomallei*, conforme observado pela redução da biomassa. Esse achado de inibição da formação do biofilme pode estar associado ao fato de que a DFP limita a quantidade de Fe disponível para as células e com isso consegue inibir a formação de biofilme, pois elementos minerais são frequentemente encontrados na matriz do biofilme, no entanto, não se sabe como os íons metálicos se associam e/ou reagem com os componentes da matriz (HOUSHMANDYAR; EGGLESTON; BOLHUIS, 2021). Kang e Kirienko (2018), demonstraram que sob condições de abundância de Fe, o Fe livre pode ser transportado diretamente para a bactéria por sistemas de transporte ativo ou transportado indiretamente por meio de moléculas sequestrantes de Fe. Com isso, as bactérias retêm a capacidade de formar biofilmes maduros. Na presença de quelantes de ferro (como DFP), entretanto, a disponibilidade de Fe é restrita e a formação de biofilme fica comprometida.

Alguns estudos mostraram que o Fe regula a motilidade da superfície e promove a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e com isso estabiliza a matriz polissacarídica (SINGH, 2004; BERLUTTI et al., 2005). Além disso, a alta disponibilidade do Fe estimula a produção do exopolissacarídeo da matriz do biofilme, que, por sua vez, sequestra o ferro ferroso (Fe^{2+}), atuando como um estoque de Fe, garantindo a manutenção do biofilme de *P. aeruginosa* (YU et al., 2016). Ademais, é preciso manter um equilíbrio na obtenção de ferro para a manutenção da homeostase do biofilme, pois os íons férricos induzem a agregação e, portanto, aumentam a densidade celular, atuando como um estímulo para *P. aeruginosa* e *B. cepacia* formar biofilme (BERLUTTI et al., 2005; HARRISON; BUCKLING, 2009; SAHA et al., 2013; KANG; KIRIENKO, 2018). Nazik et al (2015), demonstraram que a DFP foi capaz de inibir a formação do biofilme por *Aspergillus fumigatus*. Brilhante et al (2021) relataram que a DFP reduziu o crescimento de células planctônicas e formação de biofilme de *Sporothrix* spp. Um estudo também demonstrou que a DFP apresentou atividade inibitória contra a adesão e a formação de biofilme por *Acinetobacter baumannii* (RAMALINGAM; LEE, 2019).

Quanto aos biofilmes maduros, observou-se que a DFP não erradicou os biofilmes de *B. pseudomallei*, mas reduziu significativamente a biomassa desses biofilmes, quando expostos a concentrações acima de 64 $\mu\text{g/mL}$, visto que a DFP limita a biodisponibilidade de Fe para as células, com isso, a falta de Fe interfere no desenvolvimento do biofilme (SMITH et al., 2013). No tocante às drogas AMC, MER e DOX, observou-se que as CEMBs foram significativamente maiores que suas respectivas CIMs, corroborando estudos anteriores (BANDEIRA et al., 2013; CASTELO-BRANCO et al., 2016; SIDRIM et al., 2017; SIDRIM et al., 2020). A menor sensibilidade antimicrobiana dos biofilmes de *B. pseudomallei* está associada às limitações de difusão de antibióticos dentro da matriz do biofilme, à alteração da permeabilidade celular, à expressão de bombas de efluxo (HENGZHUANG et al., 2013; SAWASDIDOLN et al., 2010) e à presença de β -lactamases na matriz do biofilme (HØIBY et al., 2010).

Apesar da DFP reduzir a biomassa dos biofilmes maduros de *B. pseudomallei*, essa droga não sensibilizou esses biofilmes a AMC, MER e DOX, demonstrando não haver interações sinérgicas nem aditivas entre a DFP e as drogas antimicrobianas avaliadas, levantando a hipótese que a DFP pode ter atividade inibitória ou estimuladora, através da limitação da quantidade de ferro (HOUSHMANDYAR; EGGLESTON; BOLHUIS, 2021).

8. CONCLUSÃO

A deferiprona inibe o crescimento planctônico de *B. pseudomallei*

A deferiprona potencializa o efeito de β -lactâmicos contra *B. pseudomallei* na forma planctônica.

O quelante deferiprona reduz a biomassa de biofilmes em formação e de biofilmes maduros, sem, no entanto, erradicar biofilmes maduros de *B. pseudomallei*, nem os sensibilizar às drogas AMC, MER e DOX.

A deferiprona não tem a capacidade de matar biofilmes em formação e biofilmes maduros, porém pode impactar no crescimento bacteriano, como observado por microscopia confocal.

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.
- ACHAPPA, B.; MADI, D.; VIDYALAKSHMI, K. Cutaneous melioidosis. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, v. 10, 2016.
- 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.
- AMORNIT, W.; MUANGSOMBUT, V.; WANGTEERAPRASERT, T.; KORBSRISATE, S. Elevated intracellular levels of iron in host cells promotes *Burkholderia pseudomallei* infection. *Asian Biomedicine*, v. 6, p. 465-471, 2012.
- BANDEIRA, T. J. P. G.; MOREIRA, C. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; NETO, M. P. A.; CORDEIRO, R. A.; RODRIGUES, T. J. S.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* activities of amoxicillin-clavulanate, doxycycline, ceftazidime, imipenem, and trimethoprim-sulfametoxazole against biofilm of brazilian strains of *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p. 5771-5773, 2013a.
- BENOIT, T. J.; BLANEY, D. D.; GEE, J. E.; ELROD, M. G.; HOFFMASTER, A. R.; DOKER, T. J.; BOWER, W. A.; WATKINS, 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.
- BERLUTTI, F.; MOREA, C.; BATTISTONI, A.; SARLI, S.; CIPRIANI, P. SUPERTI, F.; AMMENDOLIA, M. G.; VALENTI, P. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, v. 18, p. 661-670, 2005.
- BOS, R.; MEI, H. C. V.; BUSSCHER, H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 23, p. 179-230, 1999.
- 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.

BRILHANTE, R. S. N.; COSTA, A. C.; PEREIRA, V. S.; FERNANDES, M. R.; OLVEIRA, J. S.; RODRIGUES, A. M.; CAMARGO, Z. P.; PEREIRA-NETO, W. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of deferiprone and EDTA against *Sporothrix* spp.: effect on planktonic growth and biofilm formation. *Medical Mycology*, v. 59, p. 537-544, 2021.

BURTINICK, M. N.; BRETT, P. J.; DESHAZER, D. Proteomic analysis of the *Burkholderia pseudomallei* type II secretome reveals hydrolytic enzymes, novel proteins, and the deubiquitinase TssM. *Infection and Immunity*, v. 82, p. 3214-3226, 2014.

BURTINICK, M. N.; BRETT, P. J.; HARDING, S. V.; NGUGI, S. A.; RIBOT, W. J.; CHANTRATITA, N.; SCORPIO, A.; MILNE, T. S.; DEAN, R. E.; FRITZ, D. L.; PEACOCK, S. J.; PRIOR, J. L.; ATKINS, T. P.; DESHAZER, D. The cluster 1 type VI secretion system is a major virulence determinant in *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity*, v. 79, p. 1512-1525, 2011.

BUTT, A. T.; THOMAS, M. S. Iron acquisition mechanisms and their role in the virulence of *Burkholderia* species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, 2017.

CAMPOS, C. G.; BYRD, M. S.; COTTER, P. A. Functional characterization of *Burkholderia pseudomallei* trimeric autotransporters. *Infection and Immunity*, v. 81, p. 2788-2799, 2013.

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.

CAZAE, M.; KRONSTAD, J. W. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Front Cell Infect Microbiol*, v. 19, 2013.

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.

CHAN, G. C. F.; CHAN, S.; HO, P. L.; HA, S. Y. Effects of chelators (deferoxamine, deferiprone and deferasirox) on the growth of *Klebsiella pneumoniae* and *Aeromonas hydrophila* isolated from transfusion-dependent thalassemia patients. *Hemoglobin*, v. 33, p. 352-360, 2009.

CHANTRATITA, N.; WUTHIEKANUN, V.; BOONBUMRUNG, K.; TIYAWISUTSRI, R.; VESARATCHAVEST, M.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; CHIERAKUL, W.; WONGRATANACHEEWIN, S.; PUKRITIYAKAMEE, S.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J.; PEACOCK, S. J. Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Bacteriology*, v. 189, p. 807-817, 2007.

CHENG, A. C.; GODOY, D.; MAYO, M.; GAL, D.; SPRATT, B. G.; CURRIE, B. J. Isolates of *Burkholderia pseudomallei* from Northern Australia are distinct by multilocus sequence typing, but strain types do not correlate with clinical presentation. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 5477-5483, 2004.

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

CHHABRA, R.; SAHA, A.; CHAMANI, A.; SCHNEIDER, N.; SHAH, R.; NANJUNDAN, M. Iron pathways and iron chelation approaches in viral, microbial, and fungal infections. *Pharmaceuticals*, v. 13, 2020.

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.

CHOY, J. L.; MAYO, M.; JANMAAT, A.; CURRIE, B. J. Animal melioidosis in Australia. *Acta Tropica*, v. 74, p. 153-158, 2000.

CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 2019.

CLSI. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Standards. **CLSI document M100-S28**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CORAÇA-HUBER, D. C.; DICHTL, S.; STEIXNER, S.; NOGLER, M.; WEISS, G. Iron chelation destabilizes bacterial biofilms and potentiates the antimicrobial activity of antibiotics against coagulase-negative *Staphylococci*. *Pathogens and Disease*, v. 76, 2018.

COSTA, O. Y. A.; RAAIJMAKERS, J. M.; KURAMAE, E. E. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

CRUZ-MIGONI, A.; HAUTBERGUE, G. M.; ARTYMIUK, P. J.; BAKER, P. J.; BOKORI-BROWN, M.; CHANG, C. T.; DICKMAN, M. J.; ESSEX-LOPRESTI, A.; HARDING, S. V.; MAHADI, N. M.; MARSHALL, L. E.; MOBBS, G. W.; MOHAMED, R.; NATHAN, S.; NGUGI, S. A.; ONG, C.; OOI, W. F.; PARTRIDGE, L. J.; PHILLIPS, H. L.; RAIH, M. F.; RUZHEINIKOV, S.; SARKAR-TYSON, M.; SEDELNIKOVA, S. E.; SMITHER, S. J.; TAN, P.; TITBALL, R. W.; WILSON, S. A.; RICE, D. W. A *Burkholderia pseudomallei* toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A. *Science*, v. 334, p. 821-824, 2011.

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. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: Melioidosis and Glanders. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, p. 2869-2885, 2010.

- CURRIE, B. J.; FISHER, D. A.; HOWARD, D. M.; BURROW, J. N.; LO, D.; SELVA-NAYAGAM, S.; ANSTEY, N. M.; HUFFAM, S. E.; SNELLING, P. L.; MARKS, P. J.; STEPHENS, D. P.; LUM, G. D.; JACUPS, S. P.; KRAUSE, V. L. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, v. 31, p. 981-986, 2000a.
- CURRIE, B. J.; MAYO, M.; ANSTEY, N. M.; DONOHOE, P.; HAASE, A.; KEMP, D. J. A cluster of melioidosis cases from an endemic region is clonal and is linked to the water supply using molecular typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, p. 177-179, 2001.
- CURRIE, B. J.; JACUPS, S. P. Intensity of rainfall and severity of melioidosis, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, p. 1538-1542, 2003.
- CURRIE, B. J.; JACUPS, S. P.; CHENG, A. C.; FISHER, D. A.; ANSTEY, N. M.; HUFFAM, S. E.; KRAUSE, V. L. Melioidosis epidemiology and risk factors from a prospective whole-population study in northern Australia. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, v. 9, p. 1167-1174, 2004.
- 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.
- DANCE, D. A. Melioidosis: the tip of the iceberg? *Clin Microbiol Rev*, v. 4, p. 52-60, 1991.
- DÍAZ-SALAZAR, C.; CALERO, P.; ESPINOSA-PORTERO, R.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, A.; WIREBRAND, L.; VELASCO-DOMÍNGUEZ, M. G.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, A.; SHINGLER, V.; GOVANTES, F. The stringent response promotes biofilm dispersal in *Pseudomonas putida*. *Scientific Reports*, v. 7, 2017.
- DONG, S.; WU, L.; LONG, F.; WU, Q.; LIU, X.; PEI, H.; XU, K.; LU, Y.; WANG, Y.; LIN, Y.; XIA, Q. The prevalence and distribution of *Burkholderia pseudomallei* in rice paddy within Hainan, China. *Acta Tropica*, v. 187, p. 165-168, 2018.
- DUANGURAI, T.; INDRAWATTANA, N.; PUMIRAT, P. *Burkholderia pseudomallei* adaptation for survival in stressful conditions. *Biomed Research International*, v. 2018, 2018.
- EZRATY, B.; BARRAS, F. The 'liaisons dangereuses' between iron and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 40, p. 418-435, 2016.
- FAHS, A.; QUILÈS, F.; JAMA, D.; HUMBERT, F.; FRANCIUS, G. In situ analysis of bacterial extracellular polymeric substances from a *Pseudomonas fluorescens* biofilm by combined vibrational and single molecule force spectroscopies. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 118, p. 6702-6713, 2014.
- FAURE, M. E.; CILIBRIZZI, A.; ABBATE, V.; BRUCE, K. D.; HIDER, R. C. Effect of iron chelation on anti-pseudomonal activity of doxycycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 58, 2021.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, p. 563-575, 2016.

FLORA, S. J. S. Chelation therapy. In: FLORA, Swaran. **Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition)**. Elsevier, 2013, v. 13, p. 987-1013.

FONG, S. M.; WONG, K. J.; FUKUSHIMA, M.; YEO, T. W. Thalassemia major is a major risk factor for pediatric melioidosis in Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 60, p. 1802-1807, 2015.

FREDERICK, M. R.; KUTTLER, C.; HENSE, B. A.; EBERL, H. J. A mathematical model of quorum sensing regulated EPS production in biofilm communities. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, v. 8, 2011.

FU, Z.; LIN, Y.; WU, Q.; XIA, Q. Pediatric suppurative parotitis caused by *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 22, 2016.

GALANELLO, R.; CAMPUS, S. Deferiprone chelation therapy for thalassemia major. *Acta Haematologica*, v. 122, p. 155-164, 2009.

GALIMAND, M.; DODIN, A. Focus on melioidosis throughout the world. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, v. 75, p. 375-383, 1982.

GAMAGE, A. M.; SHUI, G.; WENK, M. R.; CHUA, K. L. *N*-Octanoylhomoserine lactone signalling mediated by the BpsI-BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology (Reading, England)*, v. 157, p. 1176-1186, 2011.

GASSIEP, I.; ARMSTRONG, M.; NORTON, R. Human melioidosis. *Clin Microbiol Rev*, v. 33, 2020.

GARNETT, J. A.; MATTHEWS, S. Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective. *Current Protein & Peptide Science*, v. 13, p. 739-755, 2012.

GEORGIU, N. A.; BRUGGEN, T. V.; OUDSHOORN, M.; NOTTET, H. S.; MARX, J. J.; VAN ASBECK, B. S. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human mononuclear blood cells by the iron chelators deferoxamine, deferiprone, and bleomycin. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 181, p. 484-490, 2000.

GERHARDY, B.; SIMPSON, G. Melioidosis and idiopathic pulmonary hemosiderosis: a cast-iron case. *Respirology Case Reports*, v. 1, p. 46-47, 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.

GRENIER, D.; HUOT, M. P.; MAYRAND, D. Iron-chelating activity of tetracyclines and its impact on the susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to these antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, p. 763-766, 2000.

HAIDER, B. A.; SPIEGELMAN, D.; HERTZMARK, E.; SANDO, D.; DUGGAN, C.; MKUBI, A.; SUDFELD, C.; ARIS, E.; CHALAMILLA, G. E.; FAWZI, W. W. Anemia, iron deficiency, and iron supplementation in relation to mortality among HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy in Tanzania. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, p. 1512-1520, 2019.

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.

HAMAD, M. A.; AUSTIN, C. R.; STEWART, A. L.; HIGGINS, M.; VÁZQUEZ-TORRES, A.; VOSKUIL, M. I. Adaptation and antibiotic tolerance of anaerobic *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 3313-3323, 2011.

HANTRAKUN, V.; RONGKARD, P.; OYUCHUA, M.; AMORNCHAI, P.; LIM, C.; WUTHIEKANUN, V.; DAY, N. P. J.; PEACOCK, S. J.; LIMMATHUROTSAKUL, D. Soil nutrient depletion is associated with the presence of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, p. 7086-7092, 2016.

HARRISON, F.; BUCKLING, A. Siderophore production and biofilm formation as linked social traits. *The ISME Journal*, v. 3, p. 632-634, 2009.

HENGZHUANG, W.; CIOFU, O.; YANG, L.; WU, H.; SONG, Z.; OLIVER, A.; HØIBY, N. High β -lactamase levels change the pharmacodynamics of β -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p. 196-204, 2013.

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, v. 27, p. 637-657, 2010.

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.

HOLDEN, M. T. G.; TITBALL, R. W.; PEACOCK, S. J.; CARDEÑO-TÁRRAGA, A. M.; ATKINS, T.; CROSSMAN, L. C.; PITT, T.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K.; BENTLEY, S. D.; SEBAIHIA, M.; THOMSON, N. R.; BASON, N.; BEACHAM, I. R.; BROOKS, K.; BROWN, K. A.; BROWN, N. F.; CHALLIS, G. L.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; CRONIN, A.; CROSSETT, B.; DAVIS, P.; DESHAZER, D.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HANCE, Z.; HAUSER, H.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KEITH, K. E.; MADDISON, M.; MOULE, S.; PRICE, C.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RUTHERFORD, K.; SANDERS, M.; SIMMONDS, M.; SONGSIVILAI, S.; STEVENS, K.; TUMAPA, S.; VESARATCHAVEST, M.; WHITEHEAD, S.; YEATS, C.; BARRELL, B. G.; OYSTON, P. C. F.; PARKHILL, J. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia*

pseudomallei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 14240-14245, 2004.

HOUSHMANDYAR, S.; EGGLESTON, I. M.; BOLHUIS, A. Biofilm-specific uptake of a 4-pyridone-based iron chelator by *Pseudomonas aeruginosa*. **BioMetals**, v. 34, p. 315-328, 2021.

INGLIS, T. J.; GARROW, S. C.; HENDERSON, M.; CLAIR, A.; SAMPSON, J.; O'REILLY, L.; CAMERON, B. *Burkholderia pseudomallei* traced to water treatment plant in Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, p. 56-59, 2000.

KAEWPAN, A.; DUANGURAI, T.; RUNGRUENKITKUN, A.; MUANGKAEW, W.; KANJANAPRUTHIPONG, T.; JITPRASUTWIT, N.; AMPAWONG, S.; SUKPHOPETCH, P.; CHANTRATITA, N.; PUMIRAT, P. *Burkholderia pseudomallei* pathogenesis in human skin fibroblasts: a Bsa type III secretion system is involved in the invasion, multinucleated giant cell formation, and cellular damage. **PLoS One**, v. 17, 2022.

KAMJUMPHOL, W.; CHAREONSUDJAI, S.; CHAREONSUDJAI, P.; WONGRATANACHEEWIN, S.; TAWEECHAISUPAPONG, S. Environmental factors affecting *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 44, p. 72-81, 2013.

KANG, D.; KIRIENKO, N. V. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology**, v. 56, p. 449-457, 2018.

KAPLAN, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **Journal of Dental Research**, v. 89, p. 205-218, 2010.

KARIMI, A.; KARIG, D.; KUMAR, A.; ARDEKANI, A. M. Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: review of microfluidic methods. **Lab Chip**, v. 15, p. 23-42, 2015.

KIM, C. M.; PARK, R. Y.; CHOI, M. H.; SUN, H. Y.; SHIN, S. H. Ferrophilic characteristics of *Vibrio vulnificus* and potential usefulness of iron chelation therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, p. 90-98, 2007.

KIM, C. M.; SHIN, S. H. Effect of iron-chelator deferiprone on the in vitro growth of staphylococci. **Journal of Korean Medical Science**, v. 24, p. 289-295, 2009.

KOH, S. F.; TAY, S. T.; PUTHUCHEARY, S. D. Colonial morphotypes and biofilm forming ability of *Burkholderia pseudomallei*. **Tropical biomedicine**, v. 30, p. 428-433, 2013.

LANDINI, P.; ANTONIANI, D.; BURGESS, J. G.; NIJLAND, R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 813-823, 2010.

LEELARASAMEE, A.; BOVORNKITTI, S. Melioidosis: review and update. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, p. 413-425, 1989.

- LESIC, B.; FOULON, J.; CARNIEL, E. Comparison of the effects of deferiprone versus deferoxamine on growth and virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 1741-1745, 2002.
- LIM, M. K.; TAN, E. H.; SOH, C. S.; CHANG, T. L. *Burkholderia pseudomallei* infection in the Singapore Armed Forces from 1987 to 1994 – an epidemiological review. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, v. 26, p. 13-17, 1997.
- 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.; 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.
- LIMA, R. X. R. L.; ROLIM, D. B. Melioidosis in children, Brazil, 1989 – 2019. *Emerging Infectious Diseases*, v. 27, p. 1705-1708, 2021.
- LUMBIGANON, P.; PENGSA, K.; PUAPERMPOONSIRI, S.; PUAPAIROJ, A. Neonatal melioidosis: a report of 5 cases. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 7, p. 634-639, 1988.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, 2010.
- MA, L.; GAO, Y.; MARESSO, A. W. *Escherichia coli* free radical-based killing mechanism driven by a unique combination of iron restriction and certain antibiotics. *Journal of Bacteriology*, v. 197, p. 3708-3719, 2015.
- MAEGRAITH, B. G.; LEITHEAD, C. S. Melioidosis: a case-report. *Lancet*, v. 18, p. 862-863, 1964.
- MANIVANH, L.; PIERRET, A.; RATTANAVONG, S.; KOUNNAVONGSA, O.; BUISSON, Y.; ELLIOT, I.; MAEGHT, J. L.; XAYYATHIP, K.; SILISOUK, J.; VONGSOUVATH, M.; PHETSOUVANH, R.; NEWTON, P. N.; LACOMBE, G.; RIBOLZI, O.; ROCHELLE-NEWALL, E.; DANCE, D. A. B. *Burkholderia pseudomallei* in a lowland rice paddy: seasonal changes and influence of soil depth and physico-chemical properties. *Scientific Reports*, v. 7, 2017.
- 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.
- MEUMANN, E. M.; CHENG, A. C.; WARD, L.; CURRIE, B. J. Clinical features and epidemiology of melioidosis pneumonia: results from a 21-year study and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, v. 54, p. 362-369, 2012.

- MISHRA, A. K.; TIWARI, A. Iron overload in beta thalassemia major and intermedia patients. *Maedica (Bucur)*, v. 8, p. 328-332, 2013.
- 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*, v. 11, 2020.
- NANDI, T.; ONG, C.; SINGH, A. P.; BODDEY, J.; ATKINS, T.; SARKAR-TYSON, M. A genomic survey of positive selection in *Burkholderia pseudomallei* provides insights into the evolution of accidental virulence. *PLoS Pathog*, v. 6, 2010.
- NAZIK, H.; PENNER, J. C.; FERREIRA, J. A.; HAAGENSEN, J. A. J.; COHEN, K.; SPORMANN, A. M.; MARTINEZ, M.; CHEN, V.; HSU, J. L.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Effects of iron chelators on the formation and development of *Aspergillus fumigatus* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, p. 6514-6520, 2015.
- NEUPANE, G. P.; KIM, D. M. In vitro time-kill activities of ciprofloxacin alone and in combination with the iron chelator deferasirox against *Vibrio vulnificus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 29, p. 407-410, 2010.
- NGAUY, V.; LEMESHEV, Y.; SADKOWSKI, L.; CRAWFORD, G. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 970-972, 2005.
- ONG, C.; OOI, C. H.; WANG, D.; CHONG, H.; NG, K. C.; RODRIGUES, F.; LEE, M. A.; TAN, P. Patterns of large-scale genomic variation in virulent and avirulent *Burkholderia* species. *Genome Res*, v. 14, p. 2295-2307, 2004.
- 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.
- PAKKULNAN, R.; ANUTRACHUN, C.; KANTHAWONG, S.; TAWEECHASUPAPONG, S.; CHAREONSUDJAI, P.; CHAREONSUDJAI, S. Extracellular DNA facilitates bacterial adhesion during *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation. *PLoS One*, v. 14, 2019.
- PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 34, p. 577-588, 2007.
- 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.
- PUNYAGUPTA, S. S. Melioidosis: Review of 686 cases and presentation of a new clinical classification. *Bangkok Medical Publisher*, p. 217-229, 1989.

- PATERSON, J. R.; BEECROFT, M. S.; MULLA, R. S.; OSMAN, D.; REEDER, N. L.; CASERTA, J. A.; YOUNG, T. R.; PETTIGREW, C. A.; DAVIES, G. E.; WILLIAMS, J. A. G.; SHARPLES, G. J. Insights into the antibacterial mechanism of action of chelating agents by selective deprivation of iron, manganese, and zinc. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 88, 2022.
- PITMAN, M. C.; LUCK, T.; MARSHALL, C. S.; ANSTEY, N. M.; WARD, L.; CURRIE, B. J. Intravenous therapy duration and outcomes in melioidosis: a new treatment paradigm. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, 2015.
- QIU, D. H.; HUANG, Z. L.; ZHOU, T.; SHEN, C.; HIDER, R. C. *In vitro* inhibition of bacterial growth by iron chelators. *FEMS Microbiology Letters*, v. 314, p. 107-111, 2011.
- RAGHUPATHI, P. K.; LIU, W.; SABBE, K.; HOUF, K.; BURMOLLE, M.; SORENSEN, S. J. Synergistic interactions within a multispecies biofilm enhance individual species protection against grazing by a pelagic protozoan. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017.
- RAMALINGAM, K.; LEE, V. Synergistic effects of nanoemulsion and deferiprone (1, 2 dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one) on multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nano Biomedicine and Engineering*, v. 11, p. 226-237, 2019.
- 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.
- RICHTER, K.; THOMAS, N.; ZHANG, G.; PRESTIDGE, C.; COENYE, T.; WORMALD, P. J.; VREUGDE, S. Deferiprone and gallium-protoporphyrin have the capacity to potentiate the activity of antibiotics in *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, 2017.
- RICCI, E.; SCHWINGHAMER, T.; FAN, D.; SMITH, D. L.; GRAVEL, V. Growth promotion of greenhouse tomatoes with *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. biofilms and planktonic cells. *Applied Soil Ecology*, v. 138, p. 61-68, 2019.
- RIZZI, A.; ROY, S.; BELLENGER, J. P.; BEAUREGARD, P. B. Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 85, 2019.
- ROBERTSON, J.; LEVY, A.; SAGRIPANTI, J. L.; INGLIS, T. J. J. The survival of *Burkholderia pseudomallei* in liquid media. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 88-94, 2010.
- ROLIM, D. B.; ROCHA, M. F. G.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; LEITÃO-JUNIOR, N. P.; INGLIS, T. J. J.; SIDRIM, J. J. C. Environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* in Ceará state, Northeastern Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 1215-1218, 2009.
- RUCHIN, P.; ROBINSON, J.; SEGASOTHY, M.; MOREY, F. Melioidosis in a patient with idiopathic pulmonary haemosiderosis resident in Central Australia. *Aust N Z J Med*, v. 30, p. 395-396, 2000.

SAHA, R.; SAHA, N.; DONOFRIO, R. S.; BESTERVELT, L. L. Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology*, v. 53, p. 303-317, 2013.

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.

SCHMIDT, I. H. E.; GILDHORN, C.; BONING, M. A. L.; KULOW, V. A.; STEINMETZ, I.; BAST, A. *Burkholderia pseudomallei* modulates host iron homeostasis to facilitate iron availability and intracellular survival. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, 2018.

SCHWARZ, S.; WEST, T. E.; BOYER, F.; CHIANG, W. C.; CARL, M. A.; HOOD, R. D.; ROHMER, L.; TOLKER-NIELSEN, T.; SKERRETT, S. J.; MOUGOUS, J. D. *Burkholderia* type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathogens*, v. 6, 2010.

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

SESA, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Nota Técnica Nº 1. Ceará, 2021.

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial resistance and Infection Control*, v. 8, 2019.

SIDRIM, J. J. C.; VASCONCELOS, D. V.; RIELLO, G. B.; GUEDES, G. M. M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G.; BRILHANTE, R. S. N. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. *Biofouling*, v. 33, p. 88-97, 2017.

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.

SINGH, P. K. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *BioMetals*, v. 17, p. 267-270, 2004.

SINGH, S.; SINGH, S. K.; CHOWDHURY, I.; SINGH, R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The Open Microbiology Journal*, v. 11, p. 53-62, 2017.

SIRIJANT, N.; SERMSWAN, R. W.; WONGRATANACHEEWIN, S. *Burkholderia pseudomallei* resistance to antibiotics in biofilm-induced conditions is related to efflux pumps. *J Med Microbiol*, v. 65, p. 1296-1306, 2016.

SMITH, H. J.; MEREMIKWU, M. Iron chelating agents for treating malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2, 2003.

SMITH, D. J.; LAMONT, I. L.; ANDERSON, G. J.; REID, D. W. Targeting iron uptake to control *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *The European Respiratory Journal*, v. 42, p. 1723-1726, 2013.

SPELLBERG, B.; GUIDOS, R.; GILBERT, D.; BRADLEY, J.; BOUCHER, H. W.; SCHELD, W. M.; BARTLETT, J. G.; JUNIOR, J. E.; Infectious Diseases Society of America. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. 155-164, 2008.

SPRAGUE, L. D.; NEUBAUER, H. Melioidosis in animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 57, p. 305-320, 2004.

STANTON, A. T.; FLETCHER, M. D. KANAGARAYER, L. M. S. Two cases of melioidosis. *Journal of hygiene*, v. 23, p. 2-18, 1921.

STEVENS, M. P.; WOOD, M. W.; TAYLOR, L. A.; MONAGHAN, P.; HAWES, P.; JONES, P. W.; WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behavior of the pathogen. *Molecular microbiology*, v. 46, p. 649-659, 2002.

SUN, G. W.; GAN, Y. H. Unraveling type III secretion systems in the highly versatile *Burkholderia pseudomallei*. *Trends in Microbiology*, v. 18, p. 561-568, 2010.

SUNTORNUT, P.; WONGSUWAN, N.; MALASIT, M.; KITPHATI, R.; MICHIE, S.; PEACOCK, S. J.; LIMMATHUROTSAKUL, D. Barriers and recommended interventions to prevent melioidosis in Northeast Thailand: a focus group study using the behavior change wheel. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, 2016.

SUPUTTAMONGKOL Y.; CHAOWAGUL W.; CHETCHOTISAKD P.; LERTPATANASUZUN N.; INTARANONGPAI S.; RUCHUTRAKOOL T.; BUDHSARAWONG D.; MOOTSİKAPUN P.; WUTHIEKANUN V.; TEERAWATASOOK N. Risk factors for melioidosis and bacteremic melioidosis. *Clin Infect Dis*, v. 29, p. 408-413, 1999.

THOMAS, A. D.; FORBES-FAULKNER, J. C. Persistence of *Pseudomonas pseudomallei* in soil. *Australian Veterinary Journal*, v. 57, p. 535-536, 1981.

THOMPSON, M. G.; COREY, B. W.; SI, Y.; CRAFT, D. W.; ZURAWSKI, D. V. Antibacterial activities of iron chelators against common nosocomial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 5419-5421, 2012.

TOYOFUKU, M.; INABA, T.; KIYOKAWA, T.; OBANA, N.; YAWATA, Y.; NOMURA, N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 80, p. 7-12, 2016.

TUANYOK, A.; KIM, H. S.; NIERMAN, W. C.; YU, Y.; DUNBAR, J.; MOORE, R. A.; BAKER, P.; TOM, M.; LING, J. M. .L.; WOODS, D. E. Genome-wide expression analysis of iron regulation in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* using DNA microarrays. *FEMS Microbiol Lett*, v. 15, p. 327-335, 2005.

VAN ASBECK, B. S.; MARCELIS, J. H.; VAN KATS, J. H.; JAARSMA, E. Y.; VERHOEF, J. Synergy between the iron chelator deferoxamine and the antimicrobial agents gentamicin, chloramphenicol, cefalothin, cefotiam and cefsulodin. *European Journal of Clinical Microbiology*, v. 2, p. 432-438, 1983.

VISCA, P.; BONCHI, C.; MINANDRI, F.; FRANGIPANI, E.; IMPERI, F. The dual personality of iron chelators: growth inhibitors or promoters? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p. 2432-2433, 2013.

WARD, J. P.; KING, J. R.; KOERBER, A. J.; CROFT, J. M.; SOCKETT, R. E.; WILLIAMS, P. Early development and quorum sensing in bacterial biofilms. *Journal of Mathematical Biology*, v. 47, p. 23-55, 2003.

WHITE, N. J.; DANCE, D. A.; CHAOWAGUL, W.; WATTANAGOON, Y.; WUTHIEKANUN, V.; PITAKWATCHARA, N. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. *Lancet*, v. 2, p. 697-701, 1989.

WHITE, N. J. Melioidosis. *Lancet*, v. 361, p. 1715-1722, 2003.

WHITMORE, A.; KRISHNASWAMI, C. S. A hitherto undescribed infective disease in Rangoon. *The Indian Medicine Gazzete*, v. 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.; CURRIE, B. J.; PEACOCK, S. J. Melioidosis. *The New England Journal of Medicine*, v. 367, p. 1035-1044, 2012.

WIERSINGA, W. J.; POLL, T. V.; WHITE, N. J.; DAY, N. P.; PEACOCK, S. J. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, p. 272-282, 2006.

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.

WILLCOCKS, S. J.; DENMAN, C. C.; ATKINS, H. S.; WREN, B. W. Intracellular replication of the well-armed pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 29, p. 94-103, 2016.

XIE, Y. Y.; LIU, M. S.; HU, P. P.; KONG, X. L.; QIU, D. H.; XU, J. L.; HIDER, R. C.; ZHOU, T. Synthesis, physico-chemical properties, and antimicrobial evaluation of a new series of iron (III) hexadentate chelators. *Medicinal Chemistry Research*, v. 22, p. 2351-2359, 2013.

XU, B.; KONG, X. L.; ZHOU, T.; QIU, D. H.; CHEN, Y. L.; LIU, M. S.; YANG, R. H.; HIDER, R. C. Synthesis, iron (III)-binding affinity and in vitro evaluation of 3-hydroxypyridin-4-one hexadentate ligands as potential antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 21, p. 6376-6380, 2011.

XU, Z.; HUANG, T.; DU, M.; SOTEYOME, T.; LAN, H.; HONG, W.; PENG, F.; FU, X.; PENG, G.; LIU, J.; KJELLERUP, B. V. Regulatory network controls microbial biofilm development, with *Candida albicans* as a representative: from adhesion to dispersal. *Bioengineered*, v. 13, p. 253-267, 2022.

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.

YU, S.; WEI, Q.; ZHAO, T.; GUO, Y.; MA, L. Z. A survival strategy for *Pseudomonas aeruginosa* that uses exopolysaccharides to sequester and store iron to stimulate Ps1-dependent biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, p. 6403-6413, 2016.

ZHAN, Y.; WU, Y.; LI, Q.; YU, A. Neuromelioidosis: a series of seven cases in Hainan province, China. *Journal of International Medical Research*, v. 45, p. 856-867, 2017.

ZHOU, Y. J.; ZHANG, M. X.; HIDER, R. C.; ZHOU, T. *In vitro* antimicrobial activity hydroxypyridinone hexadentate-based dendrimeric chelators alone and in combination with norfloxacin. *FEMS Microbiology Letters*, v. 355, p. 124-130, 2014.

ZHU, X.; CHEN, H.; LI, S.; WANG, L. C.; WU, D. R.; WANG, X. M.; CHEN, R. S.; LI, Z. J.; LIU, Z. G. Molecular characteristics of *Burkholderia pseudomallei* collected from humans in Hainan, China. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020.

ZHU, C. F.; QIU, D. H.; KONG, X. L.; HIDER, R. C.; ZHOU, T. Synthesis and in-vitro antimicrobial evaluation of a high-affinity iron chelator in combination with chloramphenicol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, p. 512-520, 2013.