

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Lilian Caroliny Amorim Silva

Estudo da diminuição da sensibilidade à Polimixina B em isolados clínicos de
***Acinetobacter baumannii* geneticamente relacionados**

Recife

2022

Lilian Caroliny Amorim Silva

**Estudo da diminuição da sensibilidade à Polimixina B em isolados clínicos de
Acinetobacter baumannii geneticamente relacionados**

Tese de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Danilo Elias Xavier

Co-orientadora: Nilma Cintra Leal

Recife

2022

S586e Silva, Lilian Caroliny Amorim.

Estudo da diminuição da sensibilidade à Polimixina B em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* geneticamente relacionados / Lilian Caroliny Amorim Silva. -- 2022.

168 p. : il.color.

Orientador: Danilo Elias Xavier.

Coorientadora: Nilma Cintra Leal.

Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2022.

Bibliografia: f. 100-128.

1. Resistência à drogas. 2. *Acinetobacter baumannii*. 3. Polimixinas; 4. Antibióticos. 5. RNA-seq. I. Título.

Lilian Caroliny Amorim Silva

**Estudo da diminuição da sensibilidade à Polimixina B em isolados clínicos de
Acinetobacter baumannii geneticamente relacionados**

Tese de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 27 de Julho de 2022

BANCA EXAMINADORA

Dr. Danilo Elias Xavier
(Instituto Aggeu Magalhães - IAM)

Dr. Christian Robson de Souza Reis
(Instituto Aggeu Magalhães - IAM)

Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena
(Instituto Aggeu Magalhães - IAM)

Dra. Kamila Gaudêncio da Silva Sales
(Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN)

Dr. Vinícius Pietta Perez
(Universidade Federal da Paraíba - UFPB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu ter forças para chegar até aqui. Obrigada pela vida e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao meu marido Walter Reis, por todo companheirismo e apoio durante essa difícil caminhada, por ter sido meu porto seguro quando eu mais precisei. Nossa ligação vai muito além de tudo o que eu imaginei, obrigada por absolutamente tudo!

À minha família, em especial a meus pais e irmãs por sempre estarem ao meu lado, me lembrando constantemente quem eu sou e do que eu sou capaz de alcançar. Ver o quanto vocês se orgulham de mim me deu forças para chegar até aqui.

Aos colegas de laboratório pelo espírito de amizade sincera e colaboração sempre presente, pelas discussões produtivas, pelas conversas e risadas entre um experimento e outro e pelos bons momentos partilhados dentro e fora do laboratório.

Ao meu amigo Igor Rocha por todo companheirismo e cumplicidade, por me ouvir nos momentos difíceis e estar sempre disposto a ajudar, sua presença foi fundamental para a finalização desse ciclo.

Ao meu amigo Gabriel Faienstein por dividir comigo todas as alegrias e tristezas dentro e fora da academia durante os nossos mais de 10 anos de amizade. Estaremos sempre juntos!

Aos meus orientadores, Dr. Danilo Xavier e Dra. Nilma Leal pela disponibilidade e conhecimento transmitido.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, por toda estrutura proporcionada para que eu pudesse praticar todo o aprendizado que obtive.

Ao Serviço de Orientação Estudantil, especialmente Graça e Joselice pela sensibilidade ao executar suas funções, por terem segurado a minha mão em tantos momentos difíceis. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui!

Aos discentes deste programa de pós-graduação por todo conhecimento compartilhado.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho, eu gostaria de expressar aqui e de lhes oferecer o meu muitíssimo obrigado.

RESUMO

SILVA, Lílian Caroliny Amorim. Estudo da diminuição da sensibilidade à Polimixina B em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* geneticamente relacionados. 2022. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

A emergência da resistência a quase todos os antimicrobianos disponíveis entre isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* representa um desafio para o manejo de pacientes hospitalizados, sendo as polimixinas muitas vezes a última opção terapêutica contra infecções por esses patógenos oportunistas. No entanto, a resistência às polimixinas, anteriormente pouco relatada, vem sendo observada após o seu crescente uso na prática clínica e os mecanismos de resistência a este composto não foram completamente elucidados. O objetivo do presente estudo foi investigar os aspectos da heteroresistência e resposta adaptativa à polimixina B de isolados clínicos de *A. baumannii* intimamente relacionados epidemiologicamente, exibindo distinto perfil de susceptibilidade à polimixina. Para isso, foram realizadas análises que incluem curvas de crescimento e morte bacteriana sob diferentes condições laboratoriais e a análise dos perfis genômico e transcriptômico dos isolados avaliados. Os resultados demonstraram diferenças no fenótipo de resistência à Polimixina B entre as duas cepas clínicas estudadas, no entanto, o padrão de crescimento em condições normais ou de estresse bacteriano não diferiram entre as cepas sensível e resistente à polimixina. A análise genômica não demonstrou a presença de nenhum gene ou modificação relacionada a resistência à polimixina na cepa resistente, além disso, foi possível observar que ambos os isolados possuem os genomas idênticos, sem nenhuma diferença em sua sequência que possa justificar a discrepância no perfil de susceptibilidade. A análise transcriptômica foi realizada comparando as cepas sob diferentes condições de cultivo, na presença e ausência de polimixina, os resultados demonstraram vários genes diferencialmente expressos, envolvidos em diferentes vias biológicas, sendo em sua maioria proteínas responsáveis pela resposta a estresses e exposição à antibióticos, tais como os membros de bombas de efluxo MacA, MprA, EmrAB, EmrKY, YbhRS, AcrA, a proteína ribossômica RpmG e as topoisomerases tipo IV BacA e ParE. Os resultados reunidos neste trabalho sugerem diferentes vias pouco estudadas que podem desempenhar papéis importantes na resistência à polimixina em *A. baumannii* e destacam que a análise da expressão gênica em cepas resistentes à antibióticos pode revelar possíveis alvos no desenvolvimento de novos estudos com foco no combate à bactérias resistentes à múltiplas drogas.

Palavras-chave: Resistência à drogas; *Acinetobacter baumannii*; Polimixinas; MDR; RNA-seq; Antibióticos.

ABSTRACT

SILVA, Lílian Caroliny Amorim. Study of decreased sensitivity to Polymyxin B in genetically related clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. 2022. Thesis (PhD in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

The emergence of resistance to almost all available antimicrobials among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* represents a challenge for the management of hospitalized patients, with polymyxins often being the last therapeutic option against infections by these opportunistic pathogens. However, resistance to polymyxins, previously little reported, has been observed after its increasing use in clinical practice and the mechanisms of resistance to this compound have not been fully elucidated. The aim of the present study was to investigate aspects of heteroresistance and adaptive response to polymyxin B in closely related epidemiologically related clinical isolates of *A. baumannii*, exhibiting a distinct profile of sensitivity to polymyxin. For this, analyzes were performed that include bacterial growth and death curves under different laboratory conditions and the analysis of the genomic and transcriptomic profiles of the evaluated isolates. The results showed differences in the Polymyxin B resistance phenotype between the two clinical strains studied, however, the growth pattern under normal or bacterial stress conditions did not differ between the strains sensitive and resistant to polymyxin. The genomic analysis did not demonstrate the presence of any gene or modification related to polymyxin resistance in the resistant strain, in addition, it was possible to observe that both isolates have identical genomes, with no difference in their sequence that could justify the discrepancy in the profile of sensitivity. The transcriptomic analysis was performed comparing the strains under different culture conditions, in the presence and absence of polymyxin, the results showed a range of differentially expressed genes, involved in different biological pathways, being mostly proteins responsible for the response to stress and exposure to antibiotics, such as the efflux pump members MacA, MprA, EmrAB, EmrKY, YbhRS, AcrA, the ribosomal protein RpmG and the type IV topoisomerases BacA and ParE. The results gathered in this work suggest different understudied pathways that may play important roles in polymyxin resistance in *A. baumannii* and highlight that the analysis of gene expression in antibiotic-resistant strains may reveal possible targets in the development of new studies focused on combating this multidrug resistant bacteria.

Key-words: Drug resistance; *Acinetobacter baumannii*; Polymyxins; MDR; RNA-seq; Antibiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura da cepa ATCC 19606 de <i>A. baumannii</i>	21
Figura 2 – Número de publicações sobre polimixinas no PubMed pesquisando "polimixina" ou "colistina"	36
Figura 3 – Estrutura da Polimixina B	38
Figura 4 – Mecanismo de ação Polimixina B	40
Figura 5 – Eletroferograma utilizado para cálculo do valor de RIN das amostras analisadas através do 2100 Bioanalyzer	57
Figura 6 – Curva de crescimento das cepas clínicas I056 (PolS) e C345 (PolR) e da cepa laboratorial ATCC 19606 em meio LB	61
Figura 7 – Curva de sobrevivência com tolerância ao estresse das cepas clínicas I056 (PolS) e C345 (PolR) e da cepa laboratorial ATCC 19606 em meio LB	62
Figura 8 – Padrão de crescimento das cepas clínicas I056 (PolS) e C345 (PolR) e da cepa laboratorial ATCC 19606 relativo a Polimixina B	64
Figura 9 – Conteúdo GC/AT e escores Q20/Q30 dos genomas das cepas I056 e C345	65
Figura 10 – Distribuição dos subsistemas das cepas I056 e C435	66
Figura 11 – Proteoma predito para os isolados I056 (PolS) e C345 (PolR) utilizando a ferramenta BLASTP	68
Figura 12 – Alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas para o operon <i>lpxCAD</i> das cepas I056 e C345 utilizando o software BioEdit versão 7.2	69
Figura 13 – Alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas para o operon <i>pmrCAB</i> das cepas I056 e C345 utilizando o software BioEdit versão 7.2	70
Figura 14 – Alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas para o gene <i>lpsB</i> das cepas I056 e C345 utilizando o software BioEdit versão 7.2	71
Figura 15 – Alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas para o gene <i>lptD</i> das cepas I056 e C345 utilizando o software BioEdit versão 7.2	72
Figura 16 – Alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas para o gene <i>vacJ</i> das cepas I056 e C345 utilizando o software BioEdit versão 7.2	73
Figura 17 – Contagem de reads dos dados brutos gerados através do RNA-seq das cepas estudadas e suas replicatas biológicas	76

Figura 18 – Conteúdo GC/AT dos transcriptomas gerados através do RNA-seq das cepas estudadas e suas replicatas biológicas.....	75
Figura 19 – Escores Q20/Q30 dos transcriptomas gerados através do RNA-seq das cepas estudadas e suas replicatas biológicas.....	75
Quadro 1 – Comparações utilizadas nas análises de RNA-seq das cepas estudadas sob diferentes condições de exposição à Polimixina B.....	78
Figura 20 – Box plots e gráficos de densidade das contagens de leitura bruta do RNA-seq.....	77
Figura 21 – Análise de variação dos dados do RNA-seq realizada via PCA (Principal Component Analysis)	80
Figura 22 – MA plot (s) para as diferentes estratégias de comparação.....	82
Quadro 2 – Resultado da análise de enriquecimento funcional de categorias do Gene Ontology (GO) para comparações entre as cepas I056 (PolS) C345 (PolR).....	84
Quadro 3 – Resultado da análise de enriquecimento funcional de categorias do Gene Ontology (GO) com as cepas I056 (PolS) C345 (PolR) comparadas entre si.....	86
Quadro 4 – Genes hiperexpressos na cepa resistente C345 de <i>A. baumannii</i> relacionados à exportação transmembrana de drogas.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação das cepas das linhagens de <i>Acinetobacter baumannii</i> incluídas no presente estudo	46
Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) das cepas I056 e C345.....	61
Tabela 3 – Genes de resistência antimicrobiana detectados nos isolados I056 e C345 utilizando a ferramenta k-mer.....	69
Tabela 4 – Genes de resistência antimicrobiana detectados nos isolados I056 e C345 utilizando a ferramenta Resfinder.....	69
Tabela 5 – Genes Diferencialmente Expressos (DEG) nas diferentes condições de comparação	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
ABC	Cassete de Ligação de ATP
AHLs	Acil Homoserina Lactonas
Ata	Autotransportador Trimérico
ATCC	Coleção de Cultura Tipo Americana, do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
AU	Unidades de Absorbância
BP	Processos biológicos
CA-MHB	Caldo Müeller-Hinton cátion ajustado, do inglês <i>Cation-adjusted Müeller-Hinton Broth</i>
CAMPs	Peptídeos Antimicrobianos Catiônicos
CC	Componente celular
CCCP	Carbonil-cianeto m-clorofenilhidrazona
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
CDS	Sequências Codificantes de Proteínas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cmax	Concentração Máxima do Fármaco No Soro
CMS	Colistimetato
DEG	Genes Diferencialmente Expressos, do inglês <i>Differentially Expressed Genes</i>
D-Leu	D-leucina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D-Phe	D-fenilalanina
ESBLs	Betalactamases de Espectro Estendido
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e espécies de <i>Enterobacter</i>
EtOH	Etanol

EPIs	Inibidores de bomba de efluxo
EUCAST	Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana, do inglês <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
gDNA	DNA genômico
GO	Ontologia Genética, do inglês <i>Gene Ontology</i>
IDSA	Sociedade de Doenças Infecciosas da América
IRAS	Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde
IS	Sequência de Inserção, do inglês <i>Insertion Sequence</i>
KEGG	Enciclopédia Kyoto de genes e genomas, do inglês <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF MS	Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz Tempo de Voo
MATE	Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas
Mb	Megabase
MDR	Resistente a Múltiplas Drogas, do inglês <i>Multidrug Resistance</i>
MF	Função molecular
MFS	Superfamília Facilitadora Principal
MIC	Microdiluição em Caldo
MLST	Tipagem De Sequências Multilocus, do inglês <i>Multi-Locus Sequence Typing</i>
OMP	Proteína de Membrana Externa
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Fase de leitura aberta, do inglês <i>Open Reading Frames</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associados A Patógenos
PATRIC	Centro de Recursos de Bioinformática Bacteriana, do inglês <i>Bacterial Bioinformatics Resource Center</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pEtN	Fosfoetanolamina Transferase
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PK-PD	Índice Farmacocinético-Farmacodinâmico
PLA	Fosfolipase A

PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
PolR	Resistente a Polimixina
PolS	Susceptível a Polimixina
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
r.p.m	rotações por Minuto
rep-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase baseada na sequência repetitiva extragênica palindrômica
RIN	Número de Integridade do RNA, do inglês <i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RND	Divisão Celular de Nodulação de Resistência
rRNA	RNA ribossomal
Sec	Sistema Secretor Geral
ST	Tipo de sequência, do inglês <i>Sequence Type</i>
T2SS	Sistema de Secreção do Tipo II
T6SS	Sistema de Secreção do Tipo VI
Tat	Sistema de Transporte de Arginina
tRNA	RNA de transferência
TSA	Teste De Sensibilidade aos Antimicrobianos
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
Zur	Proteína de Regulação da Captação De Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 GÊNERO <i>Acinetobacter</i> : TAXONOMIA E HABITAT	18
2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i> : ASPECTOS GERAIS E CLÍNICOS	20
2.3 VIRULÊNCIA EM <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
2.4 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM <i>Acinetobacter baumannii</i>	29
2.5 HISTÓRICO DOS ANTIMICROBIANOS	32
2.6 POLIMIXINAS	34
2.6.1 Estrutura química e mecanismo de ação	36
2.6.2 Mecanismos de resistência à polimixina em <i>Acinetobacter baumannii</i>	40
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 METODOLOGIA	46
4.1 CEPAS BACTERIANAS	46
4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	47
4.3 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) E DA CEPA LABORATORIAL ATCC 19606	48
4.4 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO COM TOLERÂNCIA AO ESTRESSE DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) E DA CEPA LABORATORIAL ATCC 19606	49
4.5 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA RELATIVA À POLIMIXINA B	50
4.6 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA BACTERIANO DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) DE <i>Acinetobacter baumannii</i>	51
4.6.1 Extração e quantificação do DNA genômico	51
4.6.2 Preparação da biblioteca	51
4.6.3 Normalização e sequenciamento da biblioteca	53
4.6.4 Montagem e anotação dos genomas	54
4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR RNA-SEQ DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) DE <i>Acinetobacter baumannii</i>	55
4.7.1 Cultivo dos isolados	55
4.7.2 Extração do RNA	56

4.7.3 Controle de qualidade do RNA	57
4.7.4 Depleção do RNA ribossomal (rRNA)	58
4.7.5 Sequenciamento do RNA (RNA-seq)	58
4.7.6 Normalização e sequenciamento da biblioteca	60
4.7.7 Montagem e anotação dos transcriptomas	61
4.7.8 Análise de enriquecimento funcional de redes gênicas	61
4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	62
5 RESULTADOS	63
5.1 PERFIL DE SUSCEPIBILIDADE À POLIMIXINA B ENTRE OS ISOLADOS I056 E C345.....	63
5.2 CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) E DA CEPA LABORATORIAL ATCC 19606	63
5.3 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA RELATIVA À POLIMIXINA B.....	66
5.4 ANÁLISE DO GENOMA BACTERIANO DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) DE <i>Acinetobacter baumannii</i>	66
5.4.1 Conjunto de dados de sequenciamento do DNA genômico, análise de qualidade e anotação genômica.	66
5.5 ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) DE <i>Acinetobacter baumannii</i>	75
5.5.1 Qualidade das reads FASTQC	75
5.5.2 Análise do RNAseq	78
5.5.2.1 Caracterização da amostra	78
5.5.2.2 Genes Diferencialmente Expressos (DEG)	81
5.5.2.3 Análise de enriquecimento funcional (<i>Gene Ontology</i>)	83
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICES	129
APÊNDICE 1: BOX PLOTS E GRÁFICOS DE DENSIDADE DAS CONTAGENS DE LEITURA BRUTA DO RNA-SEQ PARA TODAS AS COMPARAÇÕES REALIZADAS.	129
APÊNDICE 2: ANÁLISE DE VARIAÇÃO DOS DADOS DO RNA-SEQ REALIZADA VIA PCA (<i>PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS</i>)	137

APÊNDICE 3: MA PLOT (S) PARA AS DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE COMPARAÇÃO	145
APÊNDICE 4: ACEITE DE ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	150
APÊNDICE 5: ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	151
ANEXOS	168
ANEXO 1: DECLARAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA.....	167

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um bacilo Gram-negativo aeróbico conhecido por sua capacidade de causar infecções nosocomiais severas e tem emergido como uma das principais causas de infecções associadas à assistência à saúde em todo o mundo. Sua capacidade de se adaptar em condições adversas, como ocorre no ambiente hospitalar, contribui para o desenvolvimento da resistência neste patógeno (MARAGAKIS; PERL, 2008; NWUGO et al., 2011). Esses organismos têm sido implicados em uma gama diversa de infecções em pacientes hospitalizados, especialmente pacientes com permanência prolongada em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (CONSALES et al., 2011). A expressão de fatores de virulência que permitem a infecção bacteriana e a expressão dos determinantes de resistência antimicrobiana podem ser responsáveis pela alta adaptabilidade deste organismo a condições adversas (GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008; GORDON; WAREHAM, 2010). O surgimento e disseminação de bactérias como *A. baumannii* resistentes a maior parte dos antimicrobianos disponíveis têm determinado que antimicrobianos em desuso, como as polimixinas B e E (colistina), sejam reinseridos na prática clínica, por manter sua atividade antimicrobiana frente à maioria dos bacilos Gram-negativos multirresistentes (GIRARDELLO; GALES, 2012).

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos descobertos em 1947, com potente ação sobre bactérias Gram-negativas resistentes à múltiplas drogas (MDR), no entanto, por apresentarem altas taxas de nefrotoxicidade e neurotoxicidade associadas ao seu uso prolongado, a partir da década de 1960, essas drogas foram gradativamente substituídas por outros antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos que apresentavam o mesmo espectro de atividade, sendo utilizadas como última opção terapêutica. As taxas de infecções por bactérias Gram-negativas resistentes à maioria dos antimicrobianos utilizados comumente na prática clínica vêm aumentando, restringindo cada vez mais as opções terapêuticas. Assim, durante a última década as polimixinas voltaram a ser introduzidas na prática clínica e atualmente, são classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos antimicrobianos de maior prioridade na medicina humana (CASSIR; ROLAIN; BROUQUI, 2014; GIRARDELLO; GALES, 2012; RODRIGUEZ-SANTIAGO, 2021).

No entanto, a resistência a estas drogas já foi relatada e os mecanismos envolvidos neste fenótipo não são totalmente compreendidos. Os mecanismos genéticos de resistência às polimixinas mais referidos são decorrentes de processos adaptativos e mutacionais, além de relatos recentes de determinantes da resistência à polimixina mediada por plasmídeos que são

capazes de se transferir entre espécies Gram-negativas (LENHARD et al., 2017; TRAN et al., 2016; VELKOV et al., 2013). Alguns mecanismos distintos de resistência às polimixinas foram identificados em *A. baumannii*, dentre esses os mais comuns são mutações no sistema PmrCAB, nos genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD* e a presença do gene plasmidial *mcr-1* (DAHDOUH et al., 2017). Entretanto, outros mecanismos podem estar presentes entre as cepas clínicas, pois cepas resistentes às polimixinas que não possuíam nenhum dos mecanismos conhecidos também foram relatadas.

Em estudos epidemiológicos anteriores foram isoladas cepas de *A. baumannii* com distinto perfil de susceptibilidade à polimixina e que apresentavam estreita relação epidemiológica. As cepas de *A. baumannii* I056 e C345, utilizadas no presente estudo, foram isoladas de sítios de infecção distintos do mesmo paciente e praticamente no mesmo momento. Essas cepas pertenciam ao mesmo *sequence type* (ST), porém apresentavam Concentração Inibitória Mínima (CIM) de polimixina E de 0,5 e 32 µg/mL, respectivamente. Nenhuma alteração dos determinantes genéticos sabidamente associados ao fenótipo de resistência às polimixinas em *A. baumannii*, como, o operon *pmrCAB*, e os genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD* pôde ser observado entre a cepa sensível (I056) e a cepa resistente (C345) à polimixina.

O presente estudo apresenta dados sobre os principais aspectos fenotípicos e genéticos relacionados à resistência à Polimixina B em *A. baumannii*, incluindo curvas de crescimento e morte bacteriana sob diferentes condições laboratoriais e a análise dos perfis genômico e transcriptômico dos isolados avaliados. Desta maneira, espera-se que os resultados aqui expressos possam contribuir para uma melhor compreensão acerca dos diferentes fenótipos de suscetibilidade e resistência às polimixinas em *A. baumannii*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O gênero *Acinetobacter* foi descrito inicialmente em 1911 e seus organismos classificados como sendo ambientais e não patogênicos (ALMASAUDI, 2018). São bactérias aeróbicas e não fermentadoras de glicose pertencentes à Ordem Gammaproteobacteria (BROVEDAN et al, 2020). Compreende um grupo de aproximadamente 90 espécies, no entanto, atualmente apenas 5 são associadas a doenças humanas (VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019; WONG et al, 2016)

2.1 GÊNERO *Acinetobacter*: TAXONOMIA E HABITAT

O gênero *Acinetobacter* é altamente diverso, composto por cocobacilos Gram-negativos pertencentes à família Moraxellaceae.. Podem ser encontrados em diferentes ambientes, incluindo centros hospitalares, conseqüentemente, algumas espécies de *Acinetobacter* se comportam como patógenos oportunistas em humanos, os quais são capazes de causar diferentes infecções nosocomiais. Seu sucesso como patógeno pode ser atribuído a diversos fatores, sendo os principais a capacidade de sobreviver à dessecação, formar biofilmes e aderir, colonizar e infectar células epiteliais humanas. São organismos estritamente aeróbios, não fermentadores, não ferrosos, não móveis, catalase-positivos e oxidase-negativos (AMORIM; NASCIMENTO, 2017; BROVEDAN et al, 2020; ZHAO; HU, 2012).

Até o momento, mais de 90 espécies do gênero *Acinetobacter* foram identificadas, das quais 74 espécies receberam nomes válidos. No entanto, novas espécies de *Acinetobacter* estão continuamente sendo relatadas, e o número de espécies aumenta a cada ano, com 6 novas espécies em 2017, 3 em 2018, 4 em 2019 e 9 em 2020 (QIN et al, 2021). A análise etimológica do gênero *Acinetobacter* demonstra que o prefixo “a” significa não, “kineô” refere-se a movimento e “bacter” bastão, ou seja, bastão não móvel (LPSN, 2021).

As informações a respeito do primeiro isolamento de organismos do gênero *Acinetobacter* são incertas. Os cocobacilos Gram-negativos que provavelmente eram *Acinetobacter* foram isolados primeiramente de uma amostra ambiental em 1911 pelo microbiologista holandês Martinus Willem Beijerinck e repetidamente durante a década de 1940, mas eram anteriormente categorizados como *Mima polymorpha* (agora

Acinetobacter lwoffii), *Herellea vaginicola* (agora *Acinetobacter baumannii* ou *Acinetobacter calcoaceticus*), *Bacterium anitratum*, B5W, e *Moraxella lwoffii*. O gênero *Acinetobacter* foi proposto pela primeira vez por Brisou e Prévot em 1954 com o intuito de diferenciar as espécies deste gênero dos organismos móveis presentes no gênero *Achromobacter* (ALMASAUDI, 2018). Em 1974, o gênero foi listado no Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey com a descrição de uma única espécie, *Acinetobacter calcoaceticus* (CHAN et al, 2012; MATEO-ESTRADA et al, 2019; WONG et al, 2016). A identificação das espécies de *Acinetobacter* é um desafio, a diferenciação através de métodos bioquímicos padrão e sistemas automatizados é frequentemente ineficaz, levando assim a uma identificação imprecisa. Métodos moleculares que permitem a distinção específica a nível de espécie estão disponíveis, como por exemplo, Reação em Cadeia da Polimerase baseada na sequência repetitiva extragênica palindrômica (rep-PCR), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz tempo de voo (MALDI-TOF MS) e tipagem de sequências multilocus (MLST), no entanto, não são regularmente empregados em laboratórios de diagnóstico de rotina (VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019).

Atualmente, cinco espécies de *Acinetobacter* associadas a doenças humanas (i.e. *A. baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter seifertii* e *Acinetobacter ijshoorniae*) e uma espécie de *Acinetobacter* ambiental (*Acinetobacter calcoaceticus*) compartilham um alto grau de semelhança entre si fenotipicamente e bioquimicamente, portanto, é difícil distingui-las a nível de espécie individual, sendo geralmente agrupadas juntas como o complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB). A identificação precisa dessas espécies requer o sequenciamento do gene da subunidade β da RNA polimerase, *rpoB*, e/ou do gene *gyrB* (RANI et al, 2018). Dentre as espécies componentes do complexo ACB *A. baumannii* é a mais clinicamente relevante, responsável por causar 80% das infecções enquanto *A. calcoaceticus* é considerado um organismo ambiental não patogênico isolado do solo e raramente está envolvido em doenças (VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019).

Embora existam mais de 90 espécies, a maioria dos organismos do gênero são ambientais e não patogênicos (WONG et al, 2016). *Acinetobacter* são onipresentes na natureza, são organismos saprófitos, de vida livre e encontram-se amplamente distribuídos nas mais variadas partes do mundo e em diferentes ambientes, eles podem ser facilmente recuperados do solo ou da água, e também foram encontrados com

frequência em animais e humanos. Diversos estudos relataram o isolamento desses organismos da pele de indivíduos saudáveis (LOOVEREN; GOOSSENS, 2004).

Espécies do gênero *Acinetobacter* podem suportar condições de ressecamento por longos períodos, *A. baumannii* é frequentemente isolado de equipamentos médicos reutilizáveis, como tubos de ventilação, dispositivos de monitoramento de pressão arterial, umidificadores, pias, mictórios de plástico e respirômetros, sendo também isolados da pele de profissionais de saúde, colchões, travesseiros, em todos os tipos de equipamentos de ventilação e em situações de umidade (ALMASAUDI, 2018).

Em geral, *Acinetobacter* eram encontrados apenas em ambientes úmidos, incluindo solo, lama, pântanos, lagoas, estações de tratamento de água, fazendas de peixes, águas residuais e até mesmo água do mar e a partir das décadas 60 e 70, o gênero *Acinetobacter* começou a ser relatado em hospitais. Geralmente, as espécies mais frequentemente isoladas de amostras clínicas humanas são *A. baumannii* e *Acinetobacter haemolyticus* (XIN et al, 2014). As principais áreas do corpo povoadas por esses microrganismos em pacientes hospitalizados são a pele, a orofaringe e o trato digestivo (ALMASAUDI, 2018).

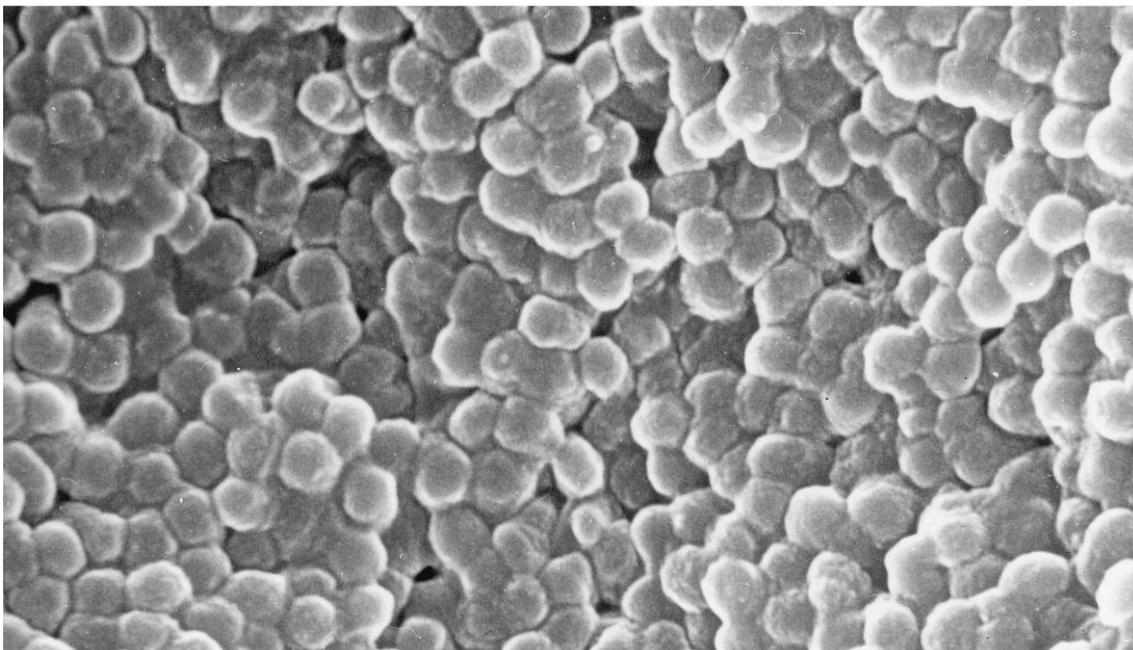
Apesar da grande importância da resistência em isolados clínicos de *Acinetobacter*, cepas ambientais muitas vezes abrigam mecanismos de resistência a antibióticos, incluindo carbapenemases e Betalactamases de Espectro Estendido (ESBLs), e podem, portanto, servir como importantes reservatórios ambientais para elementos de resistência transformando-se em cepas clinicamente relevantes. Algumas espécies clinicamente relevantes, como *A. lwoffii*, *A. nosocomialis* e *A. pittii*, foram encontradas em vegetais, carne, laticínios e pele humana. Essas cepas abrigaram extensos repertórios de resistência a antibióticos. Além disso, as cepas de *A. baumannii* que abrigam extensa resistência a antibióticos contaminaram alimentos comerciais, incluindo carne de vários tipos de gado e vegetais, sugerindo múltiplas rotas ambientais, além da via de infecção hospitalar para as populações humanas (WONG et al, 2016).

2.2 *Acinetobacter baumannii*: ASPECTOS GERAIS E CLÍNICOS

Acinetobacter baumannii é um microrganismo associado a infecções hospitalares em todo o mundo, representando o membro mais importante dentre as espécies do seu gênero. Apresenta-se sob a forma de bastonetes, medem tipicamente 1,0 a 1,5 por 1,5 a 2,5 micrômetros na fase logarítmica de crescimento, no entanto, apresenta morfologia

mais cocóide na fase estacionária (Figura 1). Normalmente formam colônias lisas, às vezes mucoides, de coloração amarelo-claro a branco-acinzentadas em meio sólido (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; LIN, LAN, 2014; WANG et al., 2014).

Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura da cepa ATCC 19606 de *A. baumannii*



Fonte: BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER (1996).

O gênero *Acinetobacter* sofreu diversas mudanças taxonômicas ao longo dos anos, e a espécie *A. baumannii* não foi formalmente designada até 1986. Isso dificulta a interpretação dos relatos anteriores de infecções por *Acinetobacter* na literatura científica e médica. No entanto, as infecções causadas por organismos agora classificados como *A. baumannii* se tornaram um problema significativo no decorrer da década de 1970. Anteriormente *A. baumannii* foi frequentemente ignorado quando isolado de amostras clínicas por ser considerado benigno, apresentando um baixo grau de patogenicidade. Entretanto, com o passar dos anos esse mesmo organismo se apresentou como uma ameaça global na área da saúde. Desde então, *A. baumannii* tem crescido gradativamente em importância como organismo patogênico, principalmente, no ambiente hospitalar. Em 2007, até 70% dos isolados em determinados locais eram resistentes a múltiplas drogas (MDR), incluindo resistência a carbapenêmicos, que antes eram considerados a chave

contra infecções por *A. baumannii* (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014; GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008; LEE et al, 2017).

Entre as espécies de *Acinetobacter*, *A. baumannii* é o membro mais importante associado a infecções adquiridas em hospitais em todo o mundo. Como muitas infecções por *A. baumannii* foram repentinamente relatadas entre veteranos e soldados que serviram no Iraque e no Afeganistão, esse patógeno também ficou conhecido como "Iraqibacter." Por ser resistente a múltiplas drogas, *A. baumannii* se espalhou por hospitais civis devido principalmente a infecção cruzada de pacientes militares feridos repatriados de zonas de guerra (LEE et al, 2017).

Acinetobacter baumannii é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos organismos ESKAPE mais graves. ESKAPE é um acrônimo para um grupo de patógenos (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) capazes de "escapar" da ação biocida de antibióticos e representar mutuamente novos paradigmas em patogênese, transmissão e resistência. *Acinetobacter baumannii* são habitantes comuns da pele humana, no entanto, a maioria das infecções por essa bactéria ocorre no trato respiratório de pacientes críticos em ambiente de UTI, se manifestando mais comumente como pneumonia associada à ventilação mecânica ou infecções da corrente sanguínea. Menos frequentemente, *A. baumannii* causa infecções na pele e tecidos moles e em locais cirúrgicos, bem como infecções do trato urinário associadas a cateter. Em todos os cenários ocorre a violação em uma barreira anatômica que permite a entrada do patógeno diretamente no local da infecção. Responde por até 20% das infecções em UTIs em todo o mundo, devido a sua capacidade de formar biofilmes resistentes e sobreviver em ambientes secos, juntamente com a resistência relatada a vários antibióticos comuns (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014b; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017; LEE et al., 2017; SHARMA et al., 2018). Sua alta taxa de participação em infecções levou a OMS a incluir esse organismo no grupo de bactérias que representam a maior ameaça à saúde humana, priorizando os esforços de pesquisa e desenvolvimento para novos tratamentos antimicrobianos (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017; LEE et al, 2017; MALLI et al, 2019; WOOD et al, 2019).

Embora *A. baumannii* seja comumente associado a infecções hospitalares, esse organismo também se encontra presente em outros ambientes, sendo isolado de uma ampla variedade de fontes e amostras ambientais, incluindo ambientes de água e aquicultura, solo, fontes alimentares variadas, animais e insetos, todos os quais podem

ser reservatórios dessa bactéria fora do ambiente hospitalar. Infecções comunitárias causadas por *A. baumannii* também foram relatadas, no entanto, até o momento, tais infecções só se manifestaram em pacientes com comorbidades subjacentes, como alcoolismo, diabetes mellitus ou outras doenças, como câncer e distúrbios pulmonares obstrutivos (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017; WOOD et al., 2019;).

As infecções causadas por *A. baumannii* representam aproximadamente 2% de todas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) nos Estados Unidos e na Europa, no entanto, essas taxas são duas vezes mais altas na Ásia e no Oriente Médio. Embora tais taxas de infecção sejam mais baixas em comparação com outros patógenos Gram-negativos, globalmente, cerca de 45% de todos os *A. baumannii* isolados são considerados *Multidrug Resistance* (MDR), essas altas taxas são quase quatro vezes superiores às observadas em outros patógenos Gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (GIAMMANCO et al., 2017; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017; LOB et al., 2016). *Acinetobacter baumannii* é intrinsecamente resistente a diversas classes de antibióticos, deixando poucas opções terapêuticas de antimicrobianos disponíveis, diante disso, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) classificaram *A. baumannii* como uma ameaça séria, levando a atividades contínuas de monitoramento e prevenção da saúde pública (CDC, 2013; LOB et al., 2016).

2.3 VIRULÊNCIA EM *Acinetobacter baumannii*

A intensa relação genética entre os membros do complexo ACB e suas semelhanças fenotípicas pode indicar que eles compartilham fatores de virulência comuns, tornando os estudos em *A. baumannii* potencialmente aplicáveis a outras espécies patogênicas de *Acinetobacter*. Esse organismo não conta com a presença clara de qualquer toxina ou determinante molecular que pode ser responsável pelo seu potencial de virulência, essa perspectiva destaca um forte potencial adaptativo e pode ser resultado da adaptação a diferentes locais do corpo humano ou estratégias patogênicas. Alguns atributos de virulência clinicamente relevantes e recentemente descritos de espécies patogênicas de *Acinetobacter* foram descritos pela primeira vez em *A. nosocomialis* e subsequentemente caracterizados em *A. baumannii* (GORDON; WAREHAM, 2010; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017; MOUBARECK; HALAT, 2020).

O potencial de virulência em *A. baumannii* é uma característica da espécie, a ampla capacidade de patogenicidade desse organismo pode depender da expressão de fatores de virulência que possibilitam a infecção bacteriana. As evidências disponíveis sugerem que a virulência dessa bactéria é provavelmente multifatorial e possivelmente através de diferentes combinações de determinantes de virulência e resistência para otimizar a adaptabilidade ao hospedeiro humano (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014a; KUO et al., 2017).

Acinetobacter baumannii tem uma capacidade notável de sobreviver em condições desfavoráveis, alguns isolados são capazes de permanecer viáveis por quase 100 dias em ambiente com baixa umidade. A resistência à dessecação, que é a capacidade de manter a viabilidade em condições secas é multifatorial e ainda não totalmente definida em *A. baumannii*. Estudos sugerem que polissacarídeos capsulares funcionam como um escudo de glicano que envolve toda a bactéria e a protege de ameaças externas, mantendo sua viabilidade em condições de baixa umidade. A composição da membrana externa de *A. baumannii* também tem sido associada à resistência a dessecação, uma cepa mutante com o lipopolissacarídeo (LPS) quimicamente alterado apresentou instabilidade na ausência de umidade, sugerindo que a fluidez da membrana externa resultante de mudanças em sua estrutura lipídica foi prejudicial a bactéria, permitindo o escape de água e nutrientes para fora da célula (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2017; MOUBARECK; HALAT, 2020).

Dentre todos os determinantes de virulência, a formação de biofilme tornou-se uma importante característica da patogênese de *A. baumannii*, essa espécie adere prontamente a superfícies biológicas e abióticas, nas quais é capaz de formar biofilmes. Esta capacidade desempenha um papel importante em causar infecções nosocomiais, devido à colonização da superfície de equipamentos hospitalares e dispositivos médicos de longa permanência, como cateteres urinários, cateteres venosos centrais, tubos endotraqueais, entre outros. Evidências mostraram que a formação de biofilme é pelo menos três vezes maior em *A. baumannii* (80-91%) do que em outras espécies de *Acinetobacter* (5-24%). Esta é uma importante característica patogênica de muitas bactérias, facilitando a colonização e contribuindo para a resistência aos medicamentos e evasão do sistema imunológico do hospedeiro in vivo (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; MOUBARECK; HALAT, 2020).

Os fatores mais comuns que podem influenciar a formação de biofilme são: disponibilidade de nutrientes, apêndices bacterianos (pili e flagelos), componentes da

superfície bacteriana (proteínas da membrana externa, adesinas), secreções macromoleculares (polissacarídeos, ácidos nucleicos, entre outros) e *quorum sensing*, que refere-se à capacidade das bactérias de detectar e responder, através da regulação gênica, à densidade celular. A adesão de *A. baumannii* mediada por pili às células epiteliais deve ser considerada a etapa inicial para a colonização e subsequente infecção do hospedeiro. A maioria dos membros dessa espécie apresenta um sistema conhecido como Csu pili, regulado pelo sistema de dois componentes BfmRS, uma rede de moléculas que influencia a expressão gênica e permite a construção de uma cápsula protetora em resposta aos antibióticos e para facilitar a fixação da célula para a formação de microcolônias que precedem o desenvolvimento completo das estruturas do biofilme (GADDY; ACTIS, 2009; GORDON; WAREHAM, 2010; LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014).

Outra via pela qual *A. baumannii* detecta sinais extracelulares e direciona a formação de biofilme é através do *quorum sensing*, um modo de comunicação entre as bactérias para manter a densidade populacional, geralmente pela produção de moléculas sinalizadoras conhecidas como autoindutores, que são compostos semelhantes a hormônios, incluindo Acil Homoserina Lactonas (AHLs), que são responsáveis por regular a motilidade, a formação de biofilme e outras características. O ciclo do *quorum sensing* em *A. baumannii* inclui o indutor AbaI, bem como seu receptor cognato AbaR. AbaI é uma proteína sensora que funciona como uma sintase autoindutora, produzindo moléculas sinalizadoras de AHL, enquanto AbaR funciona como uma proteína receptora, que ao se ligar a AHLs induz uma cascata de reações. Esta ligação desencadeia a produção de mais AHLs em um *loop* de feedback positivo, o que resulta na regulação da formação de biofilme, desempenhando um importante papel nos estágios posteriores da formação do biofilme (GADDY; ACTIS, 2009; MOUBARECK; HALAT, 2020).

As Proteínas de Membrana Externa (OMPs) também constituem um dos principais fatores de virulência em *A. baumannii*, são importantes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) em bactérias Gram-negativas, e têm um papel fundamental na interação e adaptação ambiental. OmpA é a proteína da membrana externa mais abundante em *A. baumannii*. A evidência de que OmpA contribui para a virulência foi obtida em uma triagem de mutagênese transposon aleatória que detectou mutantes de *A. baumannii* que eram deficientes em induzir apoptose em uma linha de células epiteliais da laringe humana. A proteína OmpA está envolvida na adesão e invasão de células epiteliais interagindo com a fibronectina do hospedeiro, e se ligando ao fator

H no soro humano, permitindo que *A. baumannii* sobreviva ao sistema complemento. Além disso, OmpA tem a capacidade de induzir apoptose de células eucarióticas, ligando-se às células epiteliais do hospedeiro, tendo como alvo as mitocôndrias e induzindo a morte celular através da liberação de moléculas pró-apoptóticas (LEE et al, 2017; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013; MOUBARECK; HALAT, 2020; SMANI; DOMINGUEZ-HERRERA; PACHÓN, 2013).

Além de OmpA, as células do envelope de *A. baumannii* estão associadas a muitos fatores que contribuem para a sua patogenicidade. Entre estes, destacam-se exopolissacarídeos capsulares e LPS bacteriano. O LPS bacteriano é um dos importantes fatores de virulência envolvidos em diversas etapas do processo infeccioso. O polissacarídeo-O do LPS, junto com os pili, pode promover a aderência às células hospedeiras como uma primeira etapa da colonização. Um estudo anterior relata diminuição da resistência ao soro humano e diminuição da sobrevivência no processo de infecção de tecidos moles de um mutante sem a glicosiltransferase LpsB, que resulta em um LPS altamente truncado, contendo apenas dois resíduos de carboidratos ligados ao lipídeo A (LEE et al, 2017; LUKE et al, 2010; MOUBARECK; HALAT, 2020).

Outro importante determinante da virulência de *A. baumannii* é a presença de uma cápsula ao redor da superfície bacteriana. As unidades de polissacarídeos capsulares de superfície criam uma barreira contra as condições ambientais, como dessecação e desinfecção, e reações do sistema imunológico, como fagocitose, além de proteger contra alguns antimicrobianos. Estudos anteriores relatam que mutantes com deficiência no crescimento no líquido da ascite humana não produziam um fenótipo positivo para cápsula. Esses mutantes apresentaram diminuição do crescimento tanto no soro humano quanto na ascite (acúmulo de líquido seroso na cavidade peritoneal) em comparação com a cepa do tipo selvagem. Além disso, as cepas com cápsula deficiente foram completamente eliminadas 24 horas após a infecção em um modelo de infecção de tecidos moles de rato, enquanto a infecção com a cepa parental persistiu (LEE et al, 2017; LUKE et al, 2010; MOUBARECK; HALAT, 2020; RUSSO et al 2010).

A motilidade bacteriana contribui para a capacidade infecciosa e aumento da virulência de algumas bactérias e apesar de sua tradução como “bastão não móvel” e ausência de flagelos, as cepas de *A. baumannii* são capazes de se locomover e podem se espalhar em superfícies durante a sobrevivência em ambiente hospitalar. As evidências fenotípicas e genéticas sugerem que este patógeno se move em superfícies semissólidas expressando principalmente o fenômeno da motilidade de contração. A motilidade de

contração é uma forma bem descrita de locomoção bacteriana usada por muitos gêneros de bactérias, consiste em movimentos de extensão e retração com o objetivo de empurrar as células no meio por mecanismos dependentes de pili tipo IV, que são afetados por sinais ambientais e celulares e também afetam a virulência bacteriana. Estudos anteriores comparando isolados de sangue e escarro de *A. baumannii* demonstraram que os primeiros isolados eram mais móveis, provavelmente indicando uma maior vantagem de sobrevivência no sangue (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2017; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013; MOUBARECK; HALAT, 2020).

Fosfolipases são fatores de virulência adicionais conhecidos de *A. baumannii*, são enzimas lipolíticas que catalisam a clivagem dos fosfolipídios. Sugere-se que essas enzimas contribuam para a patogênese das bactérias Gram-negativas auxiliando na lise das células hospedeiras, por meio da clivagem dos fosfolipídios presentes na membrana da célula hospedeira e pela degradação dos fosfolipídios presentes nas barreiras da mucosa para facilitar a invasão bacteriana. Três classes de fosfolipases foram definidas com base no local de clivagem, a fosfolipase A (PLA) hidrolisa os ácidos graxos do esqueleto do glicerol, enquanto a fosfolipase C (PLC) cliva o grupo de fosfolipídeos com extremidades fosforiladas. A fosfolipase D (PLD) é uma transfosfatidilase que apenas cliva o grupo principal. A degradação de fosfolipídios afeta a estabilidade das membranas da célula hospedeira e o grupo com extremidades clivadas pode interferir na sinalização celular, resultando em mudanças na resposta imune do hospedeiro (LEE et al, 2017; MOUBARECK; HALAT, 2020).

Os genomas de *A. baumannii* sequenciados até o momento demonstram a presença de dois genes putativos de PLC (A1S_0043 e A1S_2055), a inativação do gene A1S_0043 resultou em uma diminuição o efeito citotóxico de *A. baumannii* em células epiteliais em comparação com a cepa parental. Já a interrupção de um (A1S_2989) dos dois genes da PLD presentes no genoma de *A. baumannii* resulta em redução da resistência ao soro humano, diminuição da capacidade de invasão de células epiteliais e diminuição da virulência em um modelo murino de pneumonia (LEE et al, 2017; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013)

Outro fator importante que contribui para a persistência de *A. baumannii* como patógeno nosocomial é sua capacidade de capturar nutrientes do hospedeiro, incluindo ferro, manganês e zinco, adaptando-se assim ao ambiente limitado por metais imposto pelo hospedeiro. Embora o ferro seja um dos elementos mais abundantes nos sistemas ambientais e biológicos, está relativamente indisponível para as bactérias devido à sua

baixa solubilidade em condições aeróbicas e de pH neutro como bem como devido à quelação por compostos de baixo peso molecular. Para superar essa limitação de ferro, o principal mecanismo usado por *A. baumannii* para capturar ferro envolve cinco grupos de moléculas quelantes de ferro de alta qualidade, conhecidas como sideróforos, o agente quelante de ferro mais comumente conservado em *A. baumannii* é o catecol-hidroxiato sideróforo acinetobactina. A acinetobactina é um fator de virulência de *A. baumannii*, no qual a sua produção ocorre mais frequentemente em isolados de *A. baumannii* MDR do que em isolados avirulentos e a biossíntese de acinetobactina prejudicada reduz significativamente a capacidade das células de *A. baumannii* de persistirem dentro das células epiteliais e causar danos celulares e morte de animais (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2017; LEE et al, 2017; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013; MOUBARECK; HALAT, 2020).

O zinco, que é um cofator estrutural para muitas proteínas, também é essencial para a sobrevivência de *A. baumannii*. Dada a sua essencialidade para muitos patógenos bacterianos, os sistemas de mamíferos desenvolveram mecanismos de sequestro de zinco, incluindo a produção da proteína quelante de zinco calprotectina, cuja produção é fortemente induzida após infecção por *A. baumannii*. Para combater a limitação de zinco, *A. baumannii* usa um sistema de aquisição de zinco de alta afinidade (ZnuABC) que garante a captação intracelular de zinco, regulado pela proteína de regulação da captação de zinco (Zur), que funciona como um repressor transcricional que se liga a motivos de DNA conservados a montante de muitos genes regulados por zinco, bloqueando sua expressão. Assim como os sideróforos, os sistemas de utilização de zinco são alvos antimicrobianos atraentes devido à sua importância *in vivo* e à falta de sistemas homólogos em organismos eucarióticos (GORDON; WAREHAM, 2010; HARDING, HENNON, FELDMAN, 2017; LEE et al, 2017; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013; MOUBARECK; HALAT, 2020).

Da mesma forma que outros patógenos Gram-negativos, *A. baumannii* usa proteínas secretadas para facilitar a adaptação ao ambiente e ao hospedeiro. Alguns sistemas de secreção de proteínas foram identificados em *A. baumannii*. O autotransportador trimérico (Ata) foi o primeiro sistema de secreção descrito em *A. baumannii*, o Ata é importante para a adesão às matrizes extracelulares hospedeiras e aos componentes da membrana basal, além de estar implicado na formação/manutenção do biofilme e na virulência. *Acinetobacter baumannii* também possui um sistema de secreção do tipo VI (T6SS), identificado pela primeira vez em *Vibrio cholerae* e

Pseudomonas aeruginosa, muitas bactérias utilizam o T6SS para injetar proteínas efetoras, proporcionando uma vantagem de colonização durante a infecção de hospedeiros eucarióticos ou para eliminar bactérias concorrentes, tornando-se importante em infecções polimicrobianas. Em *A. baumannii*, o T6SS pode atacar outras bactérias, onde produz toxinas como nucleases, hidrolases de peptidoglicano ou toxinas ativas da membrana celular. Curiosamente, isolados clínicos com T6SS ativo são isolados em frequências mais altas de pacientes imunocomprometidos, sugerindo vantagem competitiva contra patógenos concomitantes (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2017; LEE et al, 2017; MOUBARECK; HALAT, 2020).

O sistema de secreção de *A. baumannii* descrito mais recentemente é um sistema de secreção do tipo II (T2SS), um complexo multiproteico composto por 12-15 proteínas e a secreção por T2SS é um processo de duas etapas: as proteínas alvo são primeiro translocadas para o periplasma pelo sistema secretor geral (Sec) ou pelo sistema de transporte de arginina (Tat), em seguida, as proteínas alvo são então secretadas para fora da célula através da maquinaria T2SS. Os efetores de T2SS incluem CpaA, LipA e LipH, onde LipA (que requer a presença de uma chaperona denominada LipB) e LipH são lipases essenciais para a utilização de lipídios exógenos e CpaA, que também necessita de uma chaperona, a CpaB, é uma metaloendopeptidase que degrada o fibrinogênio e o fator V em um mecanismo dependente de zinco, influenciando negativamente as vias de coagulação do sangue. O T2SS de *A. baumannii* funciona como um importante fator de virulência, secretando efetores que medeiam a colonização do pulmão e a disseminação para outros órgãos (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2017; LEE et al, 2017; MOUBARECK; HALAT, 2020).

2.4 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Acinetobacter baumannii*

A disseminação global da resistência antimicrobiana é um dos desafios mundiais do século XXI. Estima-se que até 2050, as infecções causadas por cepas resistentes levarão a 300 milhões de mortes prematuras (VRANCIANU et al, 2020). Membros do gênero *Acinetobacter* apresentam a capacidade de desenvolver resistência a novos antibióticos com extrema rapidez, além de poder adquirir determinantes de resistência identificados em outras espécies Gram-negativas clinicamente significativas, sendo a maioria dos isolados clínicos multirresistentes pertencentes a espécie *A. baumannii*. Até o início dos anos 1970, as infecções por *A. baumannii* eram tratáveis com ampicilina,

carbenicilina, gentamicina e ácido nalidíxico, tanto em monoterapia quanto em terapia combinada, no entanto altas taxas de resistência foram observadas após 1975. Com o abuso no uso de antibióticos e o aumento de testes invasivos, o problema da resistência aos antibióticos de *A. baumannii* tem se tornado cada vez mais grave. Nos últimos anos, principalmente por causa do extenso espectro de resistência aos antibióticos, *A. baumannii* foi designado como um patógeno humano de “alarme vermelho”, causando vigilância na comunidade médica. A prevalência geral de cepas multirresistentes em pacientes com pneumonia hospitalar e pneumonia associada à ventilação infectados com *A. baumannii* é estimada em 79,9%, enquanto sua mortalidade geral pode chegar a 56,2% (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018; KYRIAKIDIS et al, 2021; LIU et al, 2020; POIREL; BONNIN; NORDMANN, 2011).

A regulação positiva dos mecanismos de resistência são as principais causas de *A. baumannii* MDR. Esse patógeno possui uma variedade de elementos genéticos de resistência antimicrobiana intrínsecos e mostra alta plasticidade genômica, facilitando mutações e rearranjos genéticos rápidos, bem como a integração de determinantes externos carregados por elementos genéticos móveis. Dados demonstraram que esta espécie adquiriu e acumulou determinantes de outras espécies Gram-negativas clinicamente importantes, como espécies de *E. coli*, *S. enterica* e *P. aeruginosa* (KYRIAKIDIS et al, 2021; POIREL; BONNIN; NORDMANN, 2011; SHIN; PARK, 2017).

Acinetobacter baumannii apresenta diversos mecanismos de resistência a diferentes classes de antibióticos, incluindo betalactamases, bombas de efluxo, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, defeitos de permeabilidade e alteração dos locais de destino. Além disso, mecanismos diferentes podem trabalhar juntos contribuindo para a resistência a uma única classe de antimicrobiano (LIN; LAN, 2014; POIREL; BONNIN; NORDMANN, 2011). O acúmulo de vários mecanismos de resistência em *A. baumannii* diminui gradualmente o número de classes de antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno (LEE et al., 2017). O sequenciamento do genoma completo de uma cepa clínica proveniente da França exibindo resistência a múltiplas drogas foi capaz de detectar 88 *open reading frames* (ORFs) que codificam mecanismos de resistência. Em muitos isolados, genes resistentes a drogas são agrupados em pontos do genoma, conhecidos como ilhas de resistência de *A. baumannii* que se acumulam em regiões genéticas específicas, muitos genes de resistência a antibióticos, como *tetA* (A),

aphA1b, *aacCI* e *aadAI* podem ser encontrados nessas regiões (ESTERLY et al, 2011; SHIN; PARK, 2017).

As bactérias utilizam dois mecanismos genéticos de defesa contra os antibióticos: as mutações, que costumam interferir no mecanismo de ação do composto, e a aquisição de material genético exógeno, por meio da transferência horizontal de genes. No que diz respeito à aquisição de material exógeno, as bactérias podem adquirir e disseminar genes com papel essencial na disseminação da resistência a antibióticos, por meio de elementos genéticos móveis. Os principais mecanismos de resistência a antibióticos são enzimáticos (produção de β -lactamases) e não enzimáticos (alteração da permeabilidade da membrana, ativação de bombas de efluxo e alteração do local alvo) (VRANCIANU et al, 2020).

A produção de enzimas betalactamases, tem sido relatada como o principal mecanismo de resistência a antibióticos betalactâmicos em *A. baumannii*. Com base na homologia de sequência, as betalactamases são agrupadas em quatro classes (A, B, C e D) e todas as quatro classes foram identificadas em *A. baumannii*. Essas enzimas hidrolisam o anel betalactâmico pela quebra da ligação amida, anulando assim, a capacidade dos antibióticos de inibirem a síntese da parede celular bacteriana (LEE et al., 2017; LIN, LAN, 2014). O bombeamento de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, isto é, as bombas de efluxo também estão associadas à resistência a muitas classes diferentes de antibióticos em *A. baumannii*, dentre os sistemas de efluxo destaca-se o AdeABC, mais frequentemente relatado e que confere resistência a aminoglicosídeos, cefotaxima, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, trimetoprim e fluoroquinolonas. As proteínas transportadoras que compõem esses sistemas estão ligadas também a transportes de nutrientes importantes para a célula e essas bombas permitem ao microrganismo uma maior flexibilidade para explorar diversos ambientes e promover sua patogenicidade, além de modular sua diferenciação celular, como a formação de biofilmes (LEE et al., 2017; LIN, LAN, 2014).

Outros mecanismos de resistência encontrados em cepas de *A. baumannii* incluem a mudança na permeabilidade do envelope com a expressão reduzida de algumas porinas, como a CarO que aumentam a permeabilidade da membrana, induzindo a resistência a antibióticos. Além das proteínas da membrana externa, os componentes do envelope, como LPS e peptidoglicanos, também afetam a resistência a antibióticos de *A. baumannii*. A perda ou modificação do LPS diminui a integridade da membrana e aumenta a

resistência à antibióticos, como a polimixina em *A. baumannii* (LEE et al., 2017; LIN, LAN, 2014; MOFFATT et al., 2010;).

2.5 HISTÓRICO DOS ANTIMICROBIANOS

A introdução de antibióticos no uso clínico foi indiscutivelmente o maior avanço médico do século 20. Além de tratar doenças infecciosas, os antibióticos possibilitaram muitos procedimentos médicos modernos, incluindo o tratamento do câncer, transplantes de órgãos e cirurgia de coração aberto. Desde a introdução dos primeiros antimicrobianos (1911), vários novos medicamentos foram descobertos, fornecendo mais opções terapêuticas para doenças que antes ameaçavam a vida. A origem do termo 'antibiótico' pode ser rastreada até a palavra antibiose usada pela primeira vez como um antônimo de simbiose por Paul Vuillemin (1980) para descrever a ação antagônica entre diferentes microorganismos. Posteriormente, a palavra antibiótico foi usada para descrever metabólitos secundários de ocorrência natural produzidos por bactérias e fungos que possuíam atividades inibidoras do crescimento (bacteriostática) ou matadoras (bactericidas) contra bactérias ou fungos, no total, os microorganismos produzem mais de 40.000 antibióticos. O número de compostos semissintéticos e sintéticos derivados deles pode ser estimado em 100.000 ou até mais. Apesar deste elevado número de compostos, apenas cerca de centenas são utilizados na prática clínica. Hoje o termo antibiótico tem um significado mais amplo, em um sentido para incluir moléculas projetadas e uma definição mais restrita, em outro e com os termos antibacteriano ou antifúngico, para designar suas ações específicas contra bactérias e fungos, respectivamente, mas não contra vírus (HUTCHINGS, TRUMAN, WILKINSON, 2019; NICOLAOU, RIGOL, 2018; SPÍZEK et al, 2016; ZAFFIRI, GARDNER, PEREYRA, 2012).

Durante o século XIX, infecções como pneumonia, diarreia e difteria representaram as principais causas de morte. Além disso, a Revolução Industrial e a urbanização iminente levaram a um deslocamento da população para as cidades, o que consequentemente aumentou a incidência de doenças como tuberculose e sífilis. Apesar da introdução da antissepsia (1867), as infecções hospitalares e pós-cirúrgicas induzidas por bactérias Gram-positivas permaneceram uma causa comum de morte (ZAFFIRI, GARDNER, PEREYRA, 2012). A descoberta e subsequente produção em grande escala de antibióticos no início do século XX foi uma das conquistas mais importantes da história da medicina. Essas novas drogas milagrosas, além de um conhecimento

abrangente sobre patógenos e medidas de higiene aprimoradas, aumentaram extremamente a qualidade e a expectativa de vida (MOHR, 2016).

O surgimento dos antibióticos pode ser dividido em duas linhas distintas: a descoberta dos antibióticos naturais e sintéticos. A primeira foi dominante entre as décadas de 40 e 60 e facilitou o desenvolvimento de ensaios para a purificação e caracterização de penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina, eritromicina e macrolídeos relacionados, vancomicina e teicoplanina. Produtos antibióticos naturais tendem a ter estruturas arquitetônicas complexas e grupos funcionais densamente implantados para a interação específica com, e reconhecimento por, alvos em bactérias patogênicas. A segunda linha de descoberta de antibióticos veio da química sintética, como produto, surgiram inicialmente as sulfas, introduzidas na década de 1930 e utilizadas até hoje na prática clínica, além de outros grupos mais recentes que incluem as fluoroquinolonas e oxazolidinonas. O objetivo principal da química sintética para a produção de antimicrobianos é atingir a complexidade arquitetônica e densidade de grupo funcional que se aproximem de produtos naturais para fornecer uma população de moléculas que têm uma chance de reconhecimento de afinidade moderada a alta por regiões específicas de macromoléculas alvo e assim, obter sucesso no tratamento clínico (WALSH, 2003).

O primeiro uso clínico de um antibiótico foi relatado na década de 1890 com a piocianase, descoberta por Rudolf Emmerich e Oscar Löw, que observaram que as bactérias verdes, até então conhecidas como *Bacillus pycyanus*, isoladas de curativos de pacientes feridos inibiam o crescimento de outros micróbios. Eles cultivaram o organismo, que hoje sabe-se ser a bactéria *P. aeruginosa*, em lotes e usaram o sobrenadante como um medicamento até a década de 1910 (GOULD, 2016). Na década de 1910 surgiu o primeiro antibiótico produzido sinteticamente, a arsfenamina (Salvarsan), descoberto por Paul Ehrlich, para tratamento contra *Treponema pallidum*, o agente causador da sífilis. Por quase 40 anos, Salvarsan foi a terapia padrão para essa doença, com novas versões, como as sulfonamidas, sendo introduzidas posteriormente como medicamentos aprimorados e foram os primeiros antimicrobianos de amplo espectro verdadeiramente eficazes em uso clínico (GOULD, 2016; HUTCHINGS, TRUMAN, WILKINSON, 2019; MOHR, 2016; NICOLAOU, RIGOL, 2018; SPÍZEK, et al, 2016; ZAFFIRI, GARDNER, PEREYRA, 2012).

Em 1929 surgia a penicilina, o primeiro antibiótico capaz de matar bactérias Gram-positivas, incluindo os patógenos que causavam gonorréia, sífilis e infecções

puerperais. Apesar de sua descoberta, Alexander Fleming não foi capaz de produzir quantidades apreciáveis nem elucidar a estrutura da penicilina e, portanto, a produção em larga escala e a elucidação da estrutura levaram mais 10 anos. A produção em larga escala desse antibiótico só foi possível no ano de 1939 após a elucidação de sua estrutura por Howard Walter Florey e Ernst Boris Chain e a aprimoração do processo de purificação por Norman Heatley. A introdução da penicilina na terapia em 1941 foi o grande marco do período que ficou conhecido como “nascimento da era dos antibióticos” (MOHR, 2016).

2.6 POLIMIXINAS

As polimixinas são peptídeos antibacterianos que exibem sua atividade rompendo as membranas das células bacterianas, levando à lise celular (KASSAMALI; JAIN; DANZIGER, 2015). Atua como uma das principais classes de antibióticos com atividade contra a maioria das bactérias Gram-negativas (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). É uma classe de antibióticos lipodecapeptídeos cíclicos policatiônicos isolada pela primeira vez em 1947 a partir da bactéria do solo Gram-positiva formadora de esporos *Bacillus polymyxa*, que em 1993 foi reclassificada como *Paenibacillus polymyxa*. (YU et al., 2015; TRIMBLE et al., 2016).

Em 1947, Benedict e Langlykke relataram pela primeira vez a atividade antibacteriana da mistura bruta de *P. polymyxa*. Ao mesmo tempo, Stansly, Shepherd e White, descreveram o isolamento e purificação de outro antibiótico da mesma bactéria, e o nomearam como “polimixina”. Embora outro antibiótico, a colistina, tenha sido isolado de *Bacillus colistinus* e tenha sido inicialmente descrito como uma nova classe, eventualmente foi identificado que tanto a colistina quanto a polimixina E são os mesmos compostos, sendo classificados como o mesmo antibiótico. Ao todo, cinco agentes diferentes foram descritos e nomeados como polimixina A, B, C, D e E (colistina), eles diferem uns dos outros em suas sequências de aminoácidos e cadeias de ácidos graxos. Logo após sua descoberta, nefrotoxicidade reversível foi relatada para diferentes polimixinas, sendo a Polimixina B e E (colistina) as menos nefrotóxicas utilizando modelos *in vivo*, no entanto, com relação a atividade antibacteriana todos eles mostraram atividade muito semelhante. Consequentemente, apenas as polimixinas B e E (colistina), têm sido utilizadas no cenário clínico (KELESIDIS; FALAGAS, 2015; OLAITAN; LI, 2016; KADAR et al, 2013; NANG et al, 2021).

Utilizados nas décadas de 1960 e 1970 no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas, as polimixinas foram largamente abandonadas devido à sua alta nefrotoxicidade e neurotoxicidade após administração parenteral (BECEIRO et al., 2014). Juntamente com o surgimento de antimicrobianos menos tóxicos, como aminoglicosídeos, quinolonas e β -lactâmicos, sua utilização passou a ser cada vez menos frequente (YU et al., 2015; VAARA, 2018). A toxicidade das polimixinas foi detectada pela primeira vez na década de 1950, são extensivamente reabsorvidas nos túbulos e se concentram nas células tubulares, danificando as células tubulares proximais.

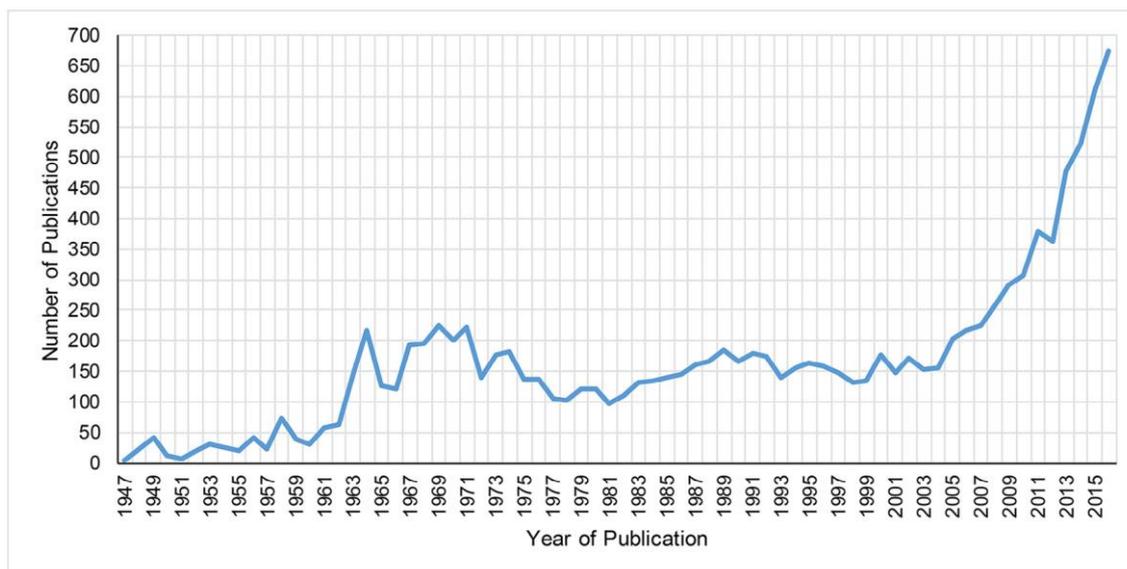
O bloqueio neuromuscular também pode ocorrer durante a terapia com polimixina. Os neurônios são ricos em lipídios e as polimixinas são conhecidas por se ligarem aos lipídios das membranas celulares (KADAR et al, 2013).

Por 20 anos, o uso da colistina foi restrito aos usos oftálmico e tópico. A colistina sistêmica ou nebulizada foi usada apenas para pacientes com fibrose cística. Durante a última década, a crescente prevalência de bactérias Gram-negativas MDR, especialmente *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, aumentou significativamente a procura e o uso clínico de polimixinas (Figura 2) devido à atual escassez de novos medicamentos antibióticos para combater infecções causadas por isolados resistentes, as polimixinas (colistina e Polimixina B) foram reintroduzidas na prática clínica sendo atualmente o único agente antibiótico efetivo contra organismos MDR, particularmente bactérias produtoras de carbapenemase. (OLAITAN; LI, 2016; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017; VAARA, 2018). As polimixinas foram reclassificadas pela OMS como "criticamente importantes" para a medicina humana (WHO, 2011). No entanto, com o aumento do uso desses agentes, a incidência de heterorresistência e resistência completa às polimixinas tem sido frequentemente relatada em diversas partes do mundo (JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017; BOINETT et al., 2019).

As polimixinas são antibióticos seletivos e têm um espectro antibacteriano estreito que só são eficazes contra bactérias Gram-negativas. Eles são ativos contra a maioria dos membros da família Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.) também têm atividade antimicrobiana significativa contra algumas bactérias Gram-negativas não fermentadoras, como *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* e *Acinetobacter* spp. Por outro lado, algumas espécies são naturalmente resistentes às polimixinas, incluindo *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp., *Brucella*, *Legionella*, *Campylobacter* e *Vibrio*

cholerae. As polimixinas não são ativas contra cocos Gram-negativos (*Neisseria spp.*), bactérias Gram-positivas e bactérias anaeróbicas (KADAR et al, 2013; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017)

Figura 3 – Número de publicações sobre polimixinas no PubMed pesquisando "polimixina" ou "colistina"



Fonte: OLAITAN; LI (2016).

2.6.1 Estrutura química e mecanismo de ação

A estrutura química das polimixinas é semelhante à dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) (defensinas e gramicidinas), que representam a primeira linha de defesa contra a colonização bacteriana em células eucarióticas (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). As polimixinas são pequenas moléculas lipopeptídicas de 1200 kDa em massa, são polipeptídeos pentacatiônicos com uma estrutura comum: que consistem em um heptapeptídeo cíclico que possui uma cadeia lateral tripeptídica acilada no terminal N por uma cauda de ácido graxo hidrofóbico (Figura 3). Contêm aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos, e alguns deles têm grupos amino carregados positivamente ligados a eles. As polimixinas não são proteínas codificadas por DNA, portanto, são resistentes a enzimas proteolíticas de mamíferos. A toxicidade inerente da colistina pode ser explicada pelas propriedades hidrofóbicas do segmento de acil graxo N-terminal, que

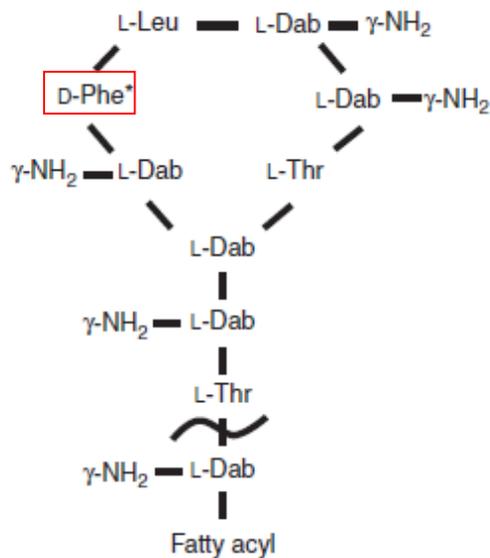
também responde significativamente por sua atividade antimicrobiana (TRIMBLE et al., 2016; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017; KADAR et al, 2013).

As polimixinas B e E compartilham uma sequência primária quase idêntica com a única diferença presente na posição 6, onde D-Phe (D-fenilalanina) na Polimixina B é substituído por D-Leu (D-leucina) em polimixina E (Figura 3) (YU et al., 2015). O anel catiônico torna essas drogas solúveis em ambientes aquosos, enquanto a cadeia acil hidrofóbica facilita a inserção em membranas bacterianas (TRIMBLE et al., 2016). Os principais componentes da Polimixina B são a Polimixina B1 e B2 com uma pequena quantidade de Polimixina B3-8. A colistina consiste principalmente em colistina A e B (também conhecida como polimixina E1 e E2, respectivamente) e componentes menores adicionais, nomeadamente polimixina E3-8. A diferença entre os componentes é a cadeia N-terminal, que é 6-metiloctanoil no primeiro, 6-metilheptanoil no segundo, octanoil no terceiro, heptanoil no quarto, nonanoil no quinto e 3-hidroxi-6-metiloctanoil no sexto tipo. A Polimixina B é administrada diretamente como um antibiótico ativo, enquanto a colistina é administrada como um pró-fármaco inativo, metanossulfonato de colistina (também conhecido como colistimetato [CMS]), um pró-fármaco inativo polianiônico menos tóxico do que o sulfato de colistina formado pela reação da colistina com formaldeído e bissulfito de sódio (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017; KADAR et al, 2013).

Os termos “colistina” e “colistimetato” não são intercambiáveis, pois correspondem a diferentes formas de colistina disponíveis para uso clínico. De fato, o colistimetato de sódio é uma pró-droga inativa polianiônica que é menos tóxica que o sulfato de colistina. O colistimetato é formado pela reação da colistina com formaldeído e bissulfito de sódio. Esta pró-droga é transformada em meio aquoso, e também in vivo em fluidos biológicos, e é convertida em colistina e vários compostos metanossulfonados inativos (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

No geral, o recente avanço de ferramentas analíticas para identificação química e elucidação de estrutura irá acelerar o desenvolvimento e descoberta de novas polimixinas com propriedades farmacológicas e farmacêuticas favoráveis. As polimixinas de nova geração fortalecerão nossos arsenais para combater a resistência a antibióticos devido a patógenos Gram negativos problemáticos (NANG et al, 2021).

Figura 4 – Estrutura da Polimixina B



Fonte: TRIMBLE et al (2016).

Legenda: Estrutura química da Polimixina B, com destaque (em vermelho) para o aminoácido que caracteriza a única diferença entre Polimixina B (D-Phe) e polimixina E (D-Leu).

A Polimixina B e E (colistina) são antibióticos bactericidas com atividade dependente da concentração e pouco ou nenhum efeito pós-antibiótico (KADAR et al, 2013; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). Ambas as polimixinas (B e E) compartilham o mesmo mecanismo de ação contra bactérias (Figura 4), rapidamente bactericidas, com alvo na membrana externa de Gram-negativas, não afetando a microbiota eucariota (VAARA, 2018). O índice farmacocinético-farmacodinâmico (PK-PD) que melhor prediz a atividade antibacteriana contra *A. baumannii* é a razão da área sob a curva de concentração-tempo para droga livre de 0 a 24 h para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) ($fAUC_{0-24}/CIM$), sendo este índice superior à relação concentração máxima do fármaco no soro (C_{max})/CIM, sugerindo que a exposição média do tempo à colistina é mais importante do que atingir altas concentrações de pico (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

Especificamente, o anel peptídico policatiônico carregado positivamente interage com os grupos fosfato da membrana de lipídio A do LPS carregada negativamente, permitindo a penetração através da membrana externa. As moléculas de polimixina carregadas positivamente formam uma interação eletrostática com o LPS carregado negativamente, e por isso deslocam os íons de cálcio e magnésio na membrana externa, que em circunstâncias normais estabilizam as moléculas de LPS e a membrana externa.

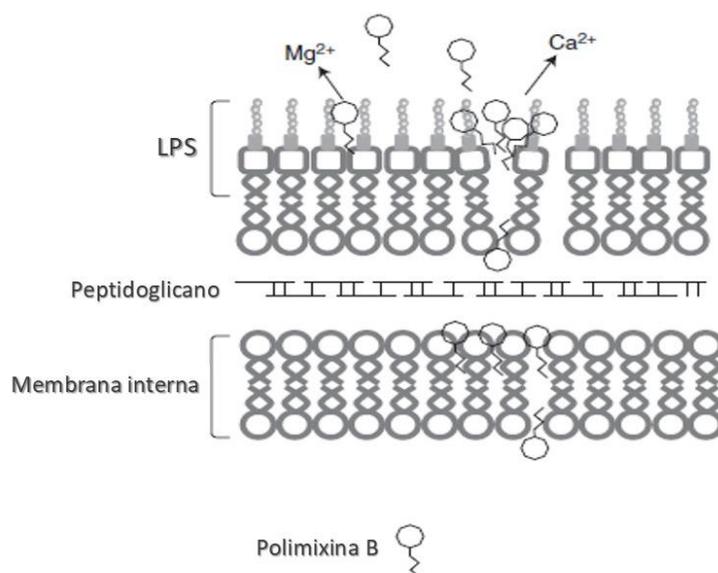
Ocorre então, a desestabilização do LPS, conseqüentemente aumentando a permeabilidade da membrana bacteriana, levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e, por fim, causando morte celular (KWA et al., 2007; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

A polimixina E (colistina) é encontrada comercialmente como sulfato, usada topicamente para descontaminação intestinal, e como colestimetato de sódio (CMS) para uso parenteral (intravenoso, intramuscular, intratecal e inalatório). A polimixina B na forma de sulfato é utilizada topicamente (pele, ouvidos e olhos) e por via parenteral (intravenosa e intratecal) (MENDES; BURDMANN, 2009)

Interessantemente, as polimixinas são capazes de sensibilizar a membrana celular de bactérias Gram-negativas a outros antimicrobianos, por exemplo, ácido fusídico, novobiocina, rifampicina e eritromicina. A explicação deste efeito é que as polimixinas rompem a membrana externa das bactérias Gram-negativas, tornando-as mais suscetíveis a outros antibióticos hidrofóbicos que de outra forma não poderiam penetrar na membrana intacta (KADAR et al, 2013).

Embora o LPS seja o alvo inicial, mecanismos adicionais possíveis de ação além do dano da membrana também foram descritos. Além da ruptura da membrana celular, a capacidade de ligação ao LPS das polimixinas tem um efeito secundário, mas muito importante. Outro mecanismo antibacteriano é o efeito da endotoxina, a endotoxina de patógenos Gram negativos corresponde à porção lipídica A do LPS, as polimixinas têm a capacidade de se ligar e neutralizar essa molécula de LPS liberada durante a lise celular. As polimixinas também neutralizam o efeito inibitório do LPS sobre a atividade transcricional de células mononucleares periféricas, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Também ativam a via alternativa do sistema complemento, causando degranulação de mastócitos com liberação de histamina. Além disso, as polimixinas inibem a atividade de enzimas respiratórias vitais como NADH-quinona oxidoreductase na membrana interna bacteriana (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017; KADAR et al, 2013; VAARA, 2018).

Figura 5 – Mecanismo de ação Polimixina B



Fonte: TRIMBLE et al (2016).

Legenda: Mecanismo de interação entre a molécula de Polimixina B e a membrana externa do lipopolissacarídeo (LPS). Os peptídeos interagem com fosfolípídeos e LPS, promovendo o deslocamento de íons estabilizadores da membrana (como Ca^{2+} e Mg^{2+}), resultando na diminuição da integridade da parede celular bacteriana e extravasamento do conteúdo celular, conduzindo as bactérias à morte.

2.6.2 Mecanismos de resistência à polimixina em *Acinetobacter baumannii*

A capacidade das bactérias de sobreviver e crescer em condições de constante mudança exige que elas se adaptem continuamente aos seus ambientes físicos e químicos (FRÖHLICH; FÖRSTNER; GITAI, 2018). *Acinetobacter baumannii* é um patógeno nosocomial versátil e multirresistente, apresentando resistência a quase todos os antibióticos disponíveis, incluindo β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina e aminoglicosídeos (DAHDOUH et al., 2017; CAI et al., 2012). Sua aptidão a adquirir resistência a múltiplas classes de agentes antimicrobianos, e a grande dificuldade no tratamento da infecção por cepas de alta resistência levaram a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) a incluir *A. baumannii* entre os 6 patógenos resistentes a antimicrobianos responsáveis por altos índices de morbimortalidade em pacientes (QURESHI et al., 2015).

A prevalência de resistência a carbapenêmicos entre isolados de *A. baumannii* trouxe de volta a prática clínica a utilização das polimixinas B e E (colistina). Esse fato levanta uma questão importante, uma vez que as polimixinas são consideradas drogas de último recurso para o tratamento de organismos multirresistentes e o aumento da taxa de

resistência observada a esses antimicrobianos é um fator de grande preocupação para a saúde pública (LENHARD et al., 2017a; REUS RODRIGUES PEREZ; LUÍS BARTH, 2017).

Acinetobacter baumannii, possui uma membrana externa semipermeável para inserção de elementos essenciais e eliminação de compostos tóxicos. O primeiro passo crítico na ação das polimixinas é a interação eletrostática entre o peptídeo antimicrobiano carregado positivamente e o lipídeo A, componente endotóxico do lipopolissacarídeo (LPS), carregado negativamente. Os LPSs residem na superfície externa e contêm um lipídio A hidrofóbico carregado negativamente, que por sua vez interage com os lipopeptídeos catiônicos não ribossomais das polimixinas (MOFFATT et al., 2010; KYRIAKIDIS et al, 2021). Uma vez as polimixinas visam a bicamada lipídica da membrana externa bacteriana, a resistência a esses peptídeos antimicrobianos é rara, no entanto bactérias resistentes à polimixina foram identificadas (CLAUSELL et al., 2007; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

Os mais comuns mecanismos de resistência às polimixinas em *A. baumannii* envolvem a adição de grupos catiônicos ao LPS (modificação qualitativa do LPS) ou a perda completa da produção de LPS (modificação quantitativa do LPS) que reduzem ou abolem essa interação inicial baseada em carga com as polimixinas, subsequente a mutações no operon *pmrCAB* e a presença dos genes *mcr*; mutações dos genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD* que codificam aciltransferases essenciais à biossíntese do lipídeo A e associadas à sua deficiência; expressão de *lpsB*, *lptD* e *vacJ* associada a defeitos de permeabilidade e resistência osmótica da membrana externa, levando a CIMs consideravelmente elevadas para polimixinas; concentração insuficiente de cofatores constitucionais para a formação de LPS, como a biotina, que são essenciais para a suscetibilidade às polimixinas; e bombas de efluxo (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017; KYRIAKIDIS et al, 2021).

Em *Acinetobacter spp.*, a resistência à polimixina é principalmente controlada pelo sistema regulador de dois componentes PmrA/PmrB (PmrAB), mutações neste sistema, especialmente em *pmrA* induzem a superexpressão de *pmrC* e a adição de resíduos de fosfoetanolamina transferase (pEtN) ao sítio do grupo 40-fosfato da forma hepta-acilada do lipídeo A, resultando na remoção de cargas negativas e, assim, diminuindo a afinidade do LPS para essa classe de drogas. Recentemente foi observado que a adição de 4-amino-L-arabinose e/ou galactosamina aos grupos fosfato do lipídeo A e aos resíduos dentro do oligossacarídeo central atua de forma semelhante, no qual PmrB é uma quinase sensora localizada na membrana que fosforila e ativa o PmrA, o regulador

da resposta de ligação ao DNA citosólico (CHIN et al, 2015; KYRIAKIDIS et al, 2021; PELLETIER et al, 2013).

Da mesma forma, o sistema de dois componentes PmrA/PmrB pode levar à resistência à polimixina através da regulação positiva da transcrição de *NaxD*, uma desacetilase pertencente à superfamília YdjC e, portanto, pela modificação do lipídeo A do LPS por meio da β -galactosamina desacetilada. Um estudo realizado por Chin et al (2015) detectou uma proteína hipotética semelhante a YdjC no genoma da ATCC 17978 de *A. baumannii* que apresentou uma superexpressão na cepa resistente à polimixina em comparação com seu nível de expressão na ATCC 17978 do tipo selvagem. Foi observado que a cepa resistente possuía uma mutação ativadora em PmrB e que esta proteína era responsável pela superexpressão de *naxD*. De fato, a expressão de *naxD* foi reduzida a um nível basal em um mutante de deleção isogênica de *pmrB* e restaurada em uma cepa complementada com *pmrB*, indicando que a expressão de *naxD* depende diretamente de PmrB (CHIN et al, 2015). Adicionalmente, mutações no gene *miaA* (que codifica o regulador pós-transcricional tRNA dimetilalil difosfato transferase) parecem agir sinergicamente com mutações em *pmrA* produzindo fenótipos resistentes à polimixina. Além disso, mutações nos parálogos de *pmrC*, *eptA-1* e *eptA-2* foram associadas a resistência à colistina (KYRIAKIDIS et al, 2021).

Também foram detectadas pEtN associadas à resistência à polimixina em *Acinetobacter* codificadas por plasmídeo pelos genes *mcr-1*, *mcr-4* e *mcr-4.3*. Os genes *mcr* conferem resistência à polimixina codificando uma fosfoetanolamina transferase que catalisa a adição de uma fração de fosfoetanolamina ao lipídio A na membrana externa bacteriana, o que pode modificar a estrutura do lipídio A e então diminuir a taxa de crescimento, a viabilidade celular e capacidade competitiva. A MCR é uma enzima ligada à membrana que consiste em cinco hélices transmembranares hidrofóbicas e uma forma solúvel localizada no espaço periplasmático. Uma vez que os genes *mcr* codificam uma fosfoetanolamina transferase que modifica a estrutura do LPS, isso levanta a possibilidade de que o MCR pode afetar a suscetibilidade das bactérias aos antibióticos hidrofóbicos, alterando a permeabilidade da membrana (HAMEED et al, 2019; GELBÍCOVÁ et al, 2019; MARTINS-SORENSEN et al, 2020; KYRIAKIDIS et al, 2021; LI et al, 2020).

Outro mecanismo de resistência à polimixina em *A. baumannii* é a perda completa da produção de LPS por meio de mutações que envolvem uma substituição ou deleção de nucleotídeos e uma inativação com a inserção do elemento ISAb11 nos três primeiros genes de biossíntese de lipídio A, ou seja, *lpxA* (codificando uma UDP-N-

acetilglucosamina aciltransferase) que catalisa a primeira reação da biossíntese de lipídio A, *lpxC* (codificando uma UDP-3-O-[3-hidroxiiristoil] N-acetilglucosamina deacetilase) que catalisa a segunda reação e a primeira etapa comprometida na biossíntese de lipídio A e *lpxD* (codificando uma UDP-3-O-[3-hidroxiiristoil] glucosamina N-aciltransferase) que catalisa a terceira etapa da biossíntese do lipídio A. As cepas resistentes que abrigam essas mutações exibem uma CIM elevada e não possuem LPSs devido à sua incapacidade de sintetizar o lipídio A e como o lipídio A é o alvo inicial da polimixina, sua ausência resulta na perda do sítio alvo da polimixina em um alto nível de resistência em *A. baumannii*. (MOFFATT et al., 2010; OIKONOMOU et al., 2015; OLAITAN, MORAND, ROLAIN, 2014; MOOSAVIAN; EMAM, 2019).

Os níveis de biotina são essenciais para a suscetibilidade às polimixinas em *A. baumannii*. A biotina é um cofator do metabolismo lipídico, envolvido em uma etapa limitante da síntese de ácidos graxos. Assim, altos níveis de biotina promovem aumento da síntese de lipídio A, com maior susceptibilidade à polimixina. Desta forma, a biotina contribui de maneira dose-dependente para a síntese de LPS. Deleções em *lpsB*, um gene que codifica uma glicosiltransferase envolvida na síntese de biotina, e as enzimas biotindependentes ACCase e propionil carboxilase, que estão envolvidas diretamente no metabolismo de ácidos graxos também têm sido associadas à resistência à colistina (KYRIAKIDIS et al, 2021; HOOD et al, 2012; MOURARECK et al, 2020).

Mutações no gene *vacJ* também foram implicadas na resistência à polimixina de *A. baumannii*. VacJ é uma lipoproteína de membrana externa altamente conservada e amplamente distribuída, importante para a virulência em vários patógenos Gram-negativos. O VacJ é frequentemente associado ao Vps (Mla) para formar o sistema transportador Vps-VacJ ABC, responsável pela manutenção da assimetria da membrana externa (LPS no folheto externo e fosfolipídios no folheto interno). As bactérias acumulam fosfolipídios no folheto externo, por exemplo, após exposição a tratamentos químicos, interrompendo a organização do LPS e aumentando a sensibilidade a compostos tóxicos (NHU et al, 2016).

Um estudo recente realizado com isolados de *A. baumannii* resistentes à colistina identificou ligação com os genes *zndP*, *pldA*, *ttg2C* e *pheS*. PldA tem o papel de remover fosfolipídeos no folheto externo da membrana externa, enquanto ZndP é uma peptidase A dependente de zinco, a montante de PldA, que também tem um papel fundamental no processamento da membrana externa. Ttg2C é um transportador ABC de efluxo regulado positivamente em resposta à exposição ao fenol (um solvente orgânico que solubiliza a

parede celular, agindo de forma equivalente com as polimixinas). Mutações em *pheS* que codifica a subunidade alfa da fenilalanina-tRNA ligase e a bomba de efluxo RND superexpressa MexAB-OprM também encontra-se correlacionada com a resistência à colistina (KYRIAKIDIS et al, 2021).

Por fim, Lucas et al (2018) detectaram isolados de *A. baumannii* altamente resistentes à colistina que apresentavam alterações na família de proteínas H-NS. As cepas resistentes possuíam uma cópia extra de ISAbal25 dentro de um gene que codifica um regulador transcricional dessa família. Além disso, a inativação de H-NS mostrou alterar a expressão de mais de 150 genes, incluindo um gene pEtN transferase. É a primeira vez que um regulador transcricional da família H-NS é associado à regulação de uma pEtN transferase específica para lipídios A e a primeira demonstração de que mutantes de *hns* resistentes à colistina podem surgir no cenário clínico.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram divididos em objetivo geral e objetivos específicos, conforme descrito a seguir.

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os principais motivos envolvidos na heterorresistência e resposta adaptativa à Polimixina B de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* geneticamente relacionados, exibindo distinto perfil de susceptibilidade à polimixina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o perfil de susceptibilidade à Polimixina B das cepas clínicas I056 e C345;
- b) Avaliar a tolerância das cepas clínicas I056 e C345 a diferentes condições de estresse;
- c) Pesquisar nos genomas das cepas clínicas I056 e C345 sobre determinantes genéticos associados a resistência à polimixina;
- d) Investigar alterações no transcriptoma dos isolados clínicos I056 e C345 de *A. baumannii* submetidos à exposição de diferentes concentrações de polimixina;

4 METODOLOGIA

A metodologia utilizada nas diferentes etapas do presente estudo encontra-se descrita nos tópicos a seguir.

4.1 CEPAS BACTERIANAS

O conjunto amostral foi composto de dois isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* recuperados em estudos prévios. As cepas I056 e C345 foram isoladas em um Hospital Universitário pertencente ao complexo médico-hospitalar da Universidade Federal do Rio de Janeiro, oriundas de sítios de infecção distintos do mesmo paciente (sangue e secreção traqueal, respectivamente) e praticamente no mesmo momento. Essas cepas apresentam estreita relação epidemiológica, porém apresentaram CIM de polimixina E de 0,5 e 32 µg/mL, respectivamente (Tabela 1).

As amostras foram armazenadas no Banco de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do IAM/FIOCRUZ-PE, em Luria Bertani (LB) acrescido de glicerol [15%, v/v) a -80°C.

Tabela 1 – Identificação das cepas das linhagens de *Acinetobacter baumannii* incluídas no presente estudo

Cepa	Espécime clínico/ Infecção	CIM Pol (µg/mL)
C345	Secreção traqueal	32 (PoR)
I056	Sangue/Bacteremia	0,5 (PoS)

Fonte: Dados não publicados

Legenda: Cepas isoladas do mesmo paciente; PoR: polimixina resistente; PoS: polimixina suscetível.

4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização e recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2018).

Os isolados bacterianos I056 e C345 foram testados frente à Polimixina B (Pol) para verificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A solução estoque de sulfato de polimixina B foi preparada utilizando água ultrapura como diluente, esterilizada por filtração em filtro para seringa *Millex*® de poros de 0,22 µm (Merck Millipore) e armazenada a -80 °C. Como controle de qualidade, foram utilizadas as cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC®) de *E. coli* ATCC® 25922 e *A. baumannii* ATCC® 19606.

Placas de microdiluição de 96 poços para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foram confeccionadas preenchendo cada coluna com um volume de 50µL de CA-MHB (*Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth*, Fluka – Sigma-Aldrich) contendo uma diluição seriada de Polimixina B a concentrações que variaram de 0,25 à 128 µg/mL. As placas foram armazenadas em freezer -80 °C até a realização dos testes.

O inóculo bacteriano das cepas I056 e C345 foi preparado pela técnica de suspensão direta de colônias crescidas em placas contendo ágar Müller-Hinton (Himedia) em 1 mL de CA-MHB estéril até uma densidade (OD) à 625nm de 0,08 – 0,13 UA, determinada em espectrofotômetro UV 1101 Biotech Photometer (WPA), correspondente a 0,5 da escala de McFarland ou $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Essa suspensão foi subsequentemente diluída 1:1000 em CA-MHB em volume suficiente para inoculação dos poços da placa de microdiluição. Um volume de 50 µL desta última diluição foi inoculado simultaneamente com o auxílio de pipetador automático multicanal em cada poço da placa previamente confeccionada, de modo que, ao final dessa etapa, cada poço contivesse um volume final de 100 µL, contendo a concentração final desejada e uma densidade celular bacteriana de cerca de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL. Como controle positivo do crescimento bacteriano foram inoculados poços contendo CA-MHB livre de antimicrobianos e, como controle negativo de crescimento foram reservados poços contendo apenas CA-MHB, sem inoculação.

As placas foram confeccionadas e inoculadas seguindo recomendações de boas práticas de laboratório em capela de fluxo laminar. Após inoculação, as mesmas foram

incubadas por 18-24 horas, a 35 ± 2 °C e após esse período, inspecionadas visualmente para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC), que é considerada a menor concentração de cada antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. Os resultados da MIC foram interpretados de acordo com os critérios de interpretação do EUCAST (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2018) para classificação dos isolados como sensíveis ou resistentes a Polimixina B. Para controle da qualidade do inóculo, um volume de 10 µL recuperados do poço correspondente ao controle positivo do crescimento bacteriano foi diluído 1:1000 (10^{-3}) imediatamente após sua inoculação e, dessa diluição, 100 µL foram semeados em ágar BHI (Himedia) e espalhados por toda a sua superfície com o auxílio de alças de Drigalski, sendo esta etapa realizada em triplicata. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 20 horas a 35 ± 2 °C. O número de colônias foi determinado e utilizado para o cálculo da concentração de células bacterianas presentes no inóculo.

Os testes considerados válidos foram aqueles nos quais: a) os controles negativos de crescimento não apresentaram turvação; b) as concentrações inibitórias mínimas da cepa de *E. coli* ATCC® 25922 e *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606 utilizadas como controle de qualidade para cada antibiótico corresponderam aos critérios estabelecidos pelo EUCAST; c) o inóculo apresentou uma densidade de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL estimada como descrito para controle de qualidade do inóculo bacteriano.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) E DA CEPA LABORATORIAL ATCC 19606

A determinação da curva de crescimento dos isolados foi realizada com intuito de verificar se o padrão de crescimento bacteriano apresentava diferenças entre as cepas clínicas estudadas. Para isto, os isolados de interesse foram inicialmente repicados da coleção de microrganismos em LB ágar previamente preparado e incubados por 24 horas a 35 ± 2 °C. O pré-inóculo bacteriano foi preparado pela técnica de suspensão direta de colônias crescidas em placas em 5 mL de LB líquido estéril por 18 horas a 35 ± 2 °C sob agitação de 200 r.p.m.

Após o período de incubação, a OD_{600} foi determinada em espectrofotômetro UV 1101 Biotech Photometer (WPA) e as culturas diluídas a uma OD_{600} de aproximadamente 0,05 Unidades de Absorbância (AU) no volume de 100 mL de LB líquido estéril em um

Erlenmeyer e incubadas novamente a 35 ± 2 °C, sob agitação de 200 r.p.m por um período de 16 horas. A OD₆₀₀ foi determinada a cada hora durante o período de incubação. Após as 16 horas, as culturas permaneceram incubadas sob agitação de 200 r.p.m até completar o período de incubação total de 24 horas e foram realizadas duas medições nas últimas 2 horas.

Como controle de qualidade, foi utilizada a cepa da *American Type Culture Collection* (ATCC®) de *A. baumannii* ATCC® 19606. Os gráficos foram construídos utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

4.4 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO COM TOLERÂNCIA AO ESTRESSE DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) E DA CEPA LABORATORIAL ATCC 19606

O teste de tolerância ao estresse dos isolados foi realizado com intuito de verificar se as cepas clínicas estudadas apresentavam variações no padrão de crescimento bacteriano frente a diferentes condições. Para isto, as culturas foram cultivadas conforme detalhado no tópico anterior, adicionando-se cada um dos agentes estressantes em experimentos independentes.

Para efeitos de estresse por temperatura, as células foram cultivadas a 20 e 50 °C, respectivamente. Em todos os demais efeitos, os isolados foram incubados à 37 °C e os agentes estressantes adicionados às culturas conforme descrito a seguir: Para efeitos de estresse por alta osmolaridade e estresse oxidativo, foi adicionado NaCl à suspensão de células bacterianas na concentração de 3%. Além disso, etanol e Triton X-100 foram adicionados à suspensão bacteriana nas concentrações de 3 e 1%, respectivamente. Para condições de estresse ácido e alcalino, as células foram cultivadas a pH 5,5 e pH 8,5, respectivamente (KUO et al, 2017).

Como controle de qualidade, foi utilizada a cepa ATCC® 19606 de *A. baumannii*. Os gráficos foram construídos utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

4.5 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA RELATIVA À POLIMIXINA B

Para a determinação da curva de sobrevivência à Polimixina B, os isolados bacterianos I056 e C345 foram repicados da coleção de micro-organismos em LB ágar contendo 1 mM de $MgCl_2$ suplementado com concentrações crescentes de Polimixina B. A solução estoque de Polimixina B foi preparada utilizando água ultrapura como diluente, esterilizada por filtração em filtro para seringa *Millex*® de poros de 0.22 μm (Merck Millipore) e armazenada a $-80\text{ }^\circ C$. Como controle de qualidade, foi utilizada a cepa ATCC® 19606 de *A. baumannii*.

As placas de Petri para o teste de sobrevivência relativa à Polimixina B foram previamente confeccionadas com LB ágar suplementado com 1 mM de $MgCl_2$ e Polimixina B em concentrações crescentes (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 $\mu g/mL$) e armazenadas a $4\text{ }^\circ C$ até o momento do uso.

As cepas estudadas foram inicialmente repicadas da coleção de microrganismos em LB ágar contendo 1 mM de $MgCl_2$ e incubadas durante 24 horas à $35 \pm 2\text{ }^\circ C$. Três à cinco colônias foram inoculadas em 5 mL de LB contendo $MgCl_2$ 1 mM e incubadas por 18 horas à $35 \pm 2\text{ }^\circ C$ sob agitação de 200 r.p.m. Após o período de incubação, a OD_{600} foi determinada e as culturas diluídas a uma OD_{600} de aproximadamente 0,05 unidades de absorvância em 5 mL de LB fresco suplementado com 1 mM $MgCl_2$ e incubadas novamente à $35 \pm 2\text{ }^\circ C$, sob agitação de 200 r.p.m. Ao atingir uma OD_{600} de 0,08 – 0,13 UA, as culturas foram diluídas 10^{-5} vezes em LB caldo para a preparação do inóculo.

Imediatamente, 100 μL do inóculo foi depositado na superfície de uma placa de Petri contendo LB ágar suplementado com Polimixina B em concentrações crescentes e espalhado com auxílio de pequenas esferas de vidro estéreis. Após a completa absorção do inóculo pelo ágar, as esferas de vidro foram descartadas e as placas incubadas à $35 \pm 2\text{ }^\circ C$. Após 24 horas de incubação, as placas foram retiradas e as colônias, correspondentes às unidades formadoras de colônias (UFCs) contadas. O experimento foi realizado em triplicata.

A sobrevivência relativa em porcentagem foi determinada em relação ao número médio das UFCs contidas na placa livre de Polimixina B (100%). Os gráficos foram construídos utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

4.6 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA BACTERIANO DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POL5) E C345 (POLR) DE *Acinetobacter baumannii*

As cepas clínicas I056 (Pol5) e C345 (PolR) foram sequenciadas com o intuito de se realizar uma análise mais detalhada sobre suas características genéticas, com ênfase nos mecanismos de resistência à polimixina. Para o sequenciamento do genoma, o DNA genômico dos isolados foi extraído, purificado e enviado à Macrogen, Inc (Coreia do Sul) para a confecção da biblioteca genômica, que posteriormente foi normalizada e sequenciada de acordo com técnica descrita nos tópicos seguintes.

4.6.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA foi isolado a partir de culturas de células das cepas de *A. baumannii* I056 e C345 utilizando o *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* (Lucigen), seguindo as orientações do fabricante, a partir de uma alíquota de 150 µL de cultura crescida em caldo LB (Himedia) a 35 ± 2 °C por 18 a 24 horas. Para isto, uma alíquota de cada amostra de interesse foi previamente semeada em LB (Himedia), o qual foi incubado em estufa a 35 ± 2 °C durante 18 a 24 horas.

O DNA genômico extraído foi quantificado em *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc.) com a verificação dos parâmetros utilizados para estimar a pureza e rendimento da extração (A260/280). Uma alíquota do DNA extraído foi quantificada em *Qubit® Fluorometer Quantitation* (Thermo Fisher Scientific Inc.) com a utilização do *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.), a fim de verificar a eficácia, pureza e rendimento da extração. Além disso, 0,5 µL do DNA genômico extraído foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% por 30 minutos sob uma voltagem de 160V.

4.6.2 Preparação da biblioteca

A biblioteca genômica foi preparada com o *Nextera Mate Pair Sample Prep Kit (Gel plus)* (Illumina Inc.), pela Macrogen, Inc (Córea do Sul), de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizada a tagmentação do DNA genômico aplicando 4 µg do gDNA de cada isolado em um tubo de microcentrífuga de 1,7 ml contendo 80 µL do *Tagment Buffer Mate Pair* e 12 µL do *Mate Pair Tagment Enzyme* e centrifugados brevemente. Os tubos foram incubadas a 55°C por 30 minutos. Em seguida, o DNA

tagmentado foi purificado utilizando o *Zymo Genomic DNA Clean & Concentrator* (Zymo Research). 1 μL de cada DNA purificado foi diluído em 7 μL de H_2O ultrapura para executar uma análise em aparelho 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology).

O DNA genômico de cada isolado tagmentado na etapa anterior foi preparado para a circularização adicionando 20 μL do *10x Strand Displacement Buffer*, 8 μL de dNTPs, 10 μL do *Strand Displacement Polymerase*, 132 μL de H_2O ultrapura e posteriormente incubado a 20°C por 30 minutos. A reação foi então purificada, adicionando um volume de 100 μL *AMPure XP Beads* e em seguida incubada em temperatura ambiente por 15 minutos. Os tubos foram posicionados em uma estante magnética por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Para finalizar a purificação, a reação foi lavada duas vezes com um volume de 400 μL de 70 % EtOH fresco. Em seguida, 30 μL do *Resuspension Buffer* foram adicionados à reação que foi posteriormente incubada em temperatura ambiente e posicionados em estante magnética por 5 minutos para recuperação do sobrenadante em um novo tubo de microcentrífuga de 1,7 mL.

Foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose para selecionar os fragmentos utilizados na construção da biblioteca. Os fragmentos foram purificados utilizando *Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit* (Zymo Research). Foi executada uma nova análise em aparelho 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology) utilizando 1 μL do DNA recuperado.

Após as etapas anteriores 600 ng do DNA pronto para ser circularizado foram adicionados a uma reação contendo 30 μL de *Circularization Buffer 10x* e 2 μL de *Circularization Ligase*, a reação foi então incubada a 30 °C por 12-16 horas. Em seguida, o DNA linear restante foi removido adicionando 9 μL de Exonuclease diretamente à reação de circularização, o tubo foi incubado a 37 °C por 30 minutos e em seguida a 70°C por adicionais 30 minutos. Após as incubações foram adicionados 12 μL do Stop Ligation Buffer as reações. O DNA circularizado foi então fragmentado utilizando o sistema *S220 Focused-ultrasonicator* (Covaris).

Os fragmentos de DNA foram purificados adicionando 300 μL de *Dynabeads M-280 Streptavidin* (ThermoFischer) a reação e em seguida incubando a 20 °C por 15 minutos. Os tubos foram posicionados em uma estante magnética por 1 minuto, o sobrenadante descartado e as amostras lavadas 4 vezes com 200 μL do *Bead Wash Buffer* e 2 vezes com 200 μL do *Resuspension Buffer*. Após as etapas de lavagem, 100 μL do *End Repair Reaction Mix* foram adicionados, as reações incubadas a 30 °C por 30 minutos

e em seguida lavadas novamente com 200 μL do *Bead Wash Buffer* e *Ressuspension Buffer*.

Para impedir que os fragmentos se ligassem uns aos outros na etapa de ligação aos adaptadores foram adicionados nucleotídeos A às extremidades 3' dos fragmentos. Foram adicionados 30 μL do *A-tailing Reaction Mix* e em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, os adaptadores foram ligados adicionando-se 2,5 μL do *Ligation Mix* e 1 μL do *DNA Adapter Index* à reação que foi lavada novamente utilizando 200 μL do *Bead Wash Buffer* e *Ressuspension Buffer*.

Após a ligação dos adaptadores, foi realizada a amplificação dos fragmentos de DNA da biblioteca. Foram adicionados 20 μL *Enhanced PCR Mix*, 5 μL do *PCR Primer Cocktail* e 25 μL de água aos tubos contendo o DNA, em seguida as reações foram amplificadas utilizando a seguinte ciclagem: 98 °C por 30 segundos, seguido de 15 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos com extensão final de 72 °C por 5 minutos. A etapa seguinte consistiu na purificação das bibliotecas geradas, com a remoção de fragmentos curtos para otimização do sequenciamento. Para isso, os tubos foram posicionados na estante magnética por 1 minuto e 45 μL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de microcentrífuga de 1,7 mL contendo 30 μL *AMPure XP beads*. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e posteriormente transferida para uma estante magnética por adicionais 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e as beads lavadas 2 vezes com 200 μL de EtOH 80% fresco. O sobrenadante foi novamente descartado e foram adicionados 20 μL do *Ressuspension Buffer* as beads, a reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e posicionada em uma estante magnética. Foram transferidos 20 μL do sobrenadante contendo a biblioteca pronta para análise para um novo tubo de microcentrífuga de 1,7 mL.

4.6.3 Normalização e sequenciamento da biblioteca

Foi utilizada a PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) a fim de quantificar e padronizar a quantidade de cada amostra a ser aplicada para obter dados de sequenciamento de alta qualidade. Após essa etapa, as amostras foram normalizadas e diluídas até a concentração 2 nM com Tris-Cl 10 mM, pH 8,5 contendo 0,1% de Tween 20. Posteriormente as bibliotecas indexadas e normalizadas foram agrupadas em um *pool* contendo 10 μL de cada biblioteca para geração de *cluster* e sequenciamento.

As amostras foram desnaturadas utilizando *Hybridization Buffer HT1* (Illumina Inc.), sendo posteriormente incubadas a 96 °C por 2 minutos em termociclador. A reação de sequenciamento foi realizada em *NovaSeq 6000 Sequencing System* (Illumina Inc.), na Macrogen, Inc (Córrea do Sul), de acordo com os parâmetros recomendados pelo fabricante.

4.6.4 Montagem e anotação dos genomas

O sequenciador Illumina gerou imagens brutas utilizando software de controle de sequenciamento para controle do sistema e chamada de base por meio do software de análise primária integrado RTA (*Real Time Analysis*) que disponibilizou os arquivos FastQ gerados para cada biblioteca. Os arquivos foram submetidos a análise com o software *FASTQC* (Andrews et al, 2014) para verificações dos índices de qualidade Phred (Q20 e Q30) e o conteúdo GC/AT dos genomas.

Os scores Q (Q20 e Q30) foram gerados através do cálculo dos índices de qualidade *Phred*, são definidos como uma propriedade que está logaritmicamente relacionada às probabilidades de erro de chamada de base e utilizados para caracterizar a qualidade das sequências de DNA geradas em um sequenciamento. A alta consistência de uma base sequenciada é indicada por valores maiores de *Phred* (ILLUMINA, INC, 2011).

A montagem dos genomas foi realizada com o algoritmo *SPAdes*, utilizando a estratégia de montagem *de novo* (BANKEVICH et al., 2012) e a anotação foi feita utilizando o servidor *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) *Prokaryotic Genome Annotation* (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>).

Os *contigs* foram comparados à base de dados do *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) e *ResFinder 2.1* do *Center of Genomic Epidemiology services* (<http://cge.cbs.dtu.dk/services>) para a tipagem bacteriana e identificação dos mecanismos de resistência antimicrobiana adquiridos, respectivamente.

A tipagem bacteriana para determinação do *sequence type* (ST) foi realizada pela utilização de ambos os esquemas de Bartual (Oxford) (BARTUAL et al., 2005) e Diancourt (Pasteur) (DIANCOURT et al., 2010) (<http://pubmlst.org/abaumannii>), considerando sete diferentes genes constitutivos (*housekeeping*) em cada um dos esquemas.

Análises manuais de *loci* de interesse foram realizadas para a avaliação da presença de mutações relacionadas à resistência à Polimixina B pela utilização dos softwares *Artemis Release 16.0.0* (Sanger Institute) e *BioEdit Sequence Alignment Editor*® (Tom Hall). Foram analisadas as sequências nucleotídicas das regiões determinantes de resistência à Polimixina B (operons *lpxCAD*, *pmrCAB* e os genes *lpsB*, *lptD* e *vacJ*) de *A. baumannii* dos isolados, bem como a análise da sequência de aminoácidos de seus respectivos produtos.

Uma análise abrangente do genoma dos isolados foi realizada utilizando a plataforma *Bacterial Bioinformatics Resource Center* (PATRIC) para verificar a distribuição dos subsistemas, presença e distribuição de genes de resistência antimicrobiana dos isolados. A comparação do proteoma predito foi realizada com base na sequência de proteínas das duas cepas estudadas utilizando a ferramenta BLASTP.

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR RNA-SEQ DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) DE *Acinetobacter baumannii*

Foi realizado o RNA-seq para análise e comparação da expressão gênica diferencial das cepas clínicas I056 (POLS) e C345 (POLR) submetidas a diferentes concentrações de Polimixina B. Para isso, os isolados foram cultivados sob diferentes condições de exposição à Polimixina B, o RNA dos isolados foi extraído e enviado à Macrogen, Inc (Coreia do Sul) para sequenciamento. Resumidamente, o rRNA das amostras foi depletado e a biblioteca foi preparada através da síntese de cDNA a partir do RNA dos isolados, seguido de tagmentação. A biblioteca foi normalizada e sequenciada de acordo com técnica descrita nos tópicos seguintes.

4.7.1 Cultivo dos isolados

Os isolados clínicos I056 e C345 foram inicialmente semeados em placas de ágar-sangue e incubados por 18-24 horas, a 35 ± 2 °C para observação da pureza e morfologia das células bacterianas, paralelamente foram também semeados em LB ágar (Himedia) e novamente incubadas por 18-24 horas, a 35 ± 2 °C. Posteriormente, os isolados foram então repicados em novas placas LB ágar 1 mM MgCl₂ nas concentrações 0, 2 e 8 ug/mL de Polimixina B (Sigma-Aldrich) e incubados por 18-24 horas, a 35 ± 2 °C. Por fim, uma

única colônia bacteriana proveniente de cada uma das culturas realizadas em placa foi posteriormente inoculada em 5 mL de LB 1 mM MgCl₂, suplementado com as concentrações de antibiótico desejadas (0, 2 e 8 ug/mL). As suspensões foram então incubadas sob agitação de 200 rpm por 18-24 horas.

Após crescimento bacteriano, a OD₆₀₀ foi verificada e ajustada para uma suspensão estimada de 0,05 UA em 5 mL de LB 1 mM MgCl₂, suplementado com as concentrações de antibiótico desejadas (0, 2 e 8 ug/mL), incubado sob agitação de 200 rpm e a OD₆₀₀ monitorada até atingir 0,8 – 1,13 UA. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

4.7.2 Extração do RNA

O RNA foi isolado a partir das culturas preparadas na etapa anterior utilizando o *RNeasy Protect Bacteria Mini Kit* (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, 500 µL da cultura bacteriana foram adicionados em um tubo de microcentrífuga de 1,7 mL contendo 1000 µL do *RNAprotect Bacteria Reagent*, a reação foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente (15–25°C) e posteriormente centrifugada à 5000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 200 µL de *TE buffer* contendo 1 mg/mL de lizozima ao tubo contendo o *pellet* resultante da etapa anterior, o tubo foi incubado sob agitação durante 15 minutos em temperatura ambiente (15–25°C).

Foram adicionados 700 µL do *Buffer RLT* e o tubo agitado vigorosamente em vórtex por 30 segundos, posteriormente a reação foi lavada com 500 µL de 96 – 100% EtOH para prosseguir com a etapa de purificação. O lisado de células obtido foi transferido para uma coluna de rotação *RNeasy* posicionada em um tubo de coleta de 2 mL e centrifugado à 8000 x g por 15 segundos, o líquido restante no tubo de coleta foi descartado. Para lavar a membrana de sílica da foram adicionados 700 µL do tampão RW1 à coluna e os tubos centrifugados novamente à 8000 x g por 15 segundos, posteriormente, a coluna foi lavada 2 vezes com 500 µL do tampão RPE e a centrifugada à 8000 x g por 15 segundos.

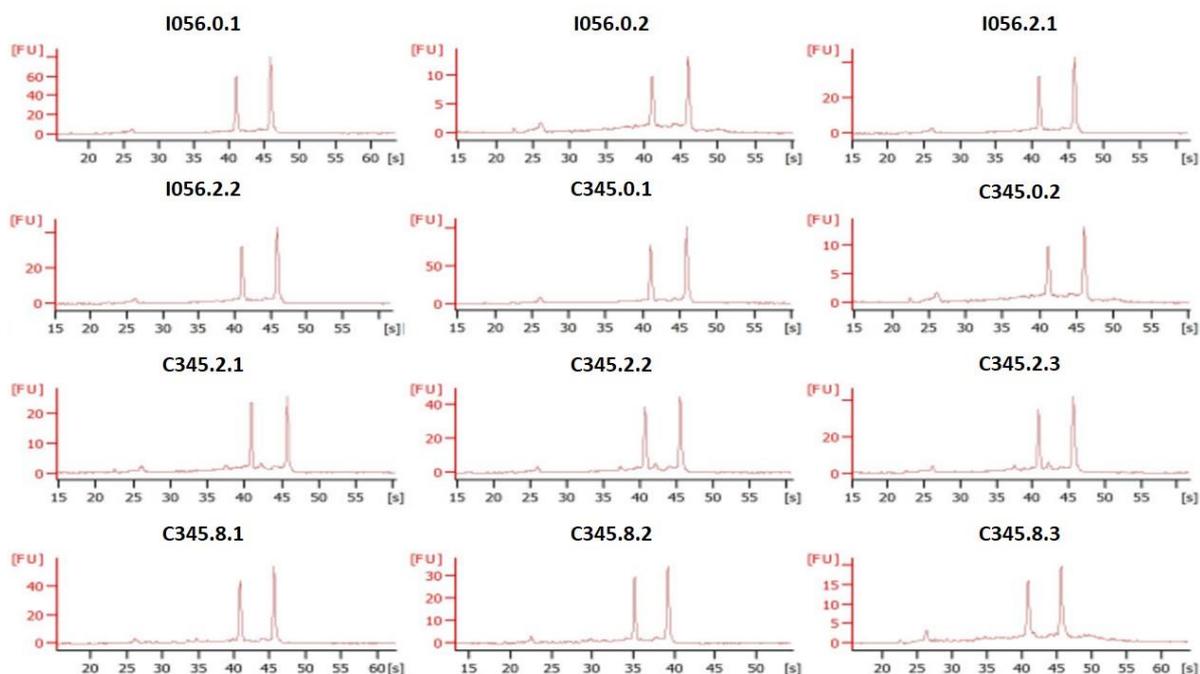
Por fim, a coluna foi posicionada em um novo tubo de coleta de 1,5 mL e adicionados 50 µL de H₂O *RNAse free* diretamente à membrana da coluna de rotação. O tubo foi incubado por 15 minutos em temperatura ambiente (15–25°C) e posteriormente centrifugado à 8000 x g por 1 minuto para eluir o RNA.

4.7.3 Controle de qualidade do RNA

O RNA extraído foi analisado em *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc.) para assegurar a escolha de amostras com índices próximos a 2.0 na razão 260/280.

A qualidade do RNA a ser sequenciado foi verificada através do *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technology), para obter o valor do *RNA Integrity Number* (RIN) que detecta possíveis degradações. Essa análise foi realizada utilizando 1 μ L de RNA total. Os valores de RIN das amostras variaram entre 7,3 e 9,3. O RIN é um algoritmo que tem como objetivo atribuir valores de integridade a medições de RNA, apenas amostras com um $RIN \geq 7$ foram consideradas aceitáveis para a realização do experimento de RNA-seq. Os eletroferogramas apresentados na Figura 5 demonstram os perfis cromatográficos e eletroforéticos que foram utilizados para o cálculo dos valores de RIN de todas as amostras avaliadas.

Figura 56 – Eletroferograma utilizado para cálculo do valor de RIN das amostras analisadas através do 2100 Bioanalyzer



Fonte: A autora.

Legenda: Análise de RNA realizada pelo *2100 Bioanalyzer*. Ensaios de eletroferograma de medições representativas de RNA total com número de integridade de RNA (RINs) entre 7,3 e 9,3.

4.7.4 Depleção do RNA ribossomal (rRNA)

O rRNA foi depletado a partir do RNA total das amostras utilizando o kit *NEBNext rRNA Depletion Kit (Bacteria)* (New England BioLabs). Resumidamente, 1 µg do RNA total foi adicionado a um mix contendo 2 µL do *NEBNext Bacterial rRNA Depletion Solution* e 2 µL do *NEBNext Probe Hybridization Buffer*, a reação foi homogeneizada e incubada em termociclador sob uma temperatura de 95 °C por 2 minutos, seguido de 5 minutos à 22 °C, com a tampa aquecida à 105°C. Foi realizada a digestão do RNA hibridizado na etapa anterior adicionando-se a reação 2 µL de *RNase H Reaction Buffer* e 2 µL de *NEBNext Thermostable RNase H*, a reação foi incubada em um termociclador por 30 minutos a 50 °C com a tampa ajustada para 55°C. Após o tratamento com RNase H, foi realizada a digestão com DNase I adicionando 5 µL do reagente *DNase I Reaction Buffer* e 2,5 µL do *NEBNext DNase I (RNase-free)*, a reação foi homogeneizada e incubada em um termociclador por 30 minutos a 37°C com a tampa aquecida ajustada para 40 °C.

Foi realizada a purificação do RNA adicionando-se 90 µL de *NEBNext RNA Sample Purification Beads* (New England BioLabs) à amostra de RNA. A reação foi incubada em gelo por 15 minutos para ligação do RNA às *beads*, após o período de incubação os tubos foram posicionados em uma estante magnética e o sobrenadante descartado. As *beads* foram lavadas duas vezes com 200 µL de 80 % EtOH fresco ainda na estante magnética.

Os tubos foram retirados da estante magnética, o RNA foi eluído em 7 µL de H₂O *RNase free* e incubado por 2 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, os tubos foram novamente posicionados na estante magnética até que a solução estivesse límpida e 5 µL do sobrenadante contendo o RNA foram transferidos para um novo microtubo estéril.

4.7.5 Sequenciamento do RNA (RNA-seq)

Para a síntese do cDNA, a partir do RNA obtido na etapa anterior, foram adicionados 8 µL de um mix previamente preparado contendo 9 µL de *First Strand Synthesis Act D Mix* e 1 µL *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific Inc.) ao tubo contendo o RNA. A reação foi incubada em termociclador sob uma temperatura de 25°C por 10 minutos, seguida de 42°C por 15 minutos e 70°C por

adicionais 15 minutos, com a tampa aquecida à 100°C. Posteriormente, foi realizada a remoção do molde de RNA e síntese de uma fita de substituição contendo dUTP no lugar de dTTP. Foram adicionados 10 µL do *Ressuspension Buffer*, seguido de 20 µL do *Second Strand Marking Master Mix* ao tubo contendo a reação que em seguida foi incubada em termociclador à 16°C por 1 hora, com a tampa aquecida à 30°C. Após a reação atingir a temperatura ambiente, foram adicionados 90 µL de *AMPure XP beads*, o tubo foi incubado em temperatura ambiente por 15 minutos e posteriormente posicionado em uma estante magnética por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as *beads* lavadas 2 vezes com 200 µL de EtOH 80% fresco. Foram adicionados 17,5 µL de *Ressuspension Buffer* às *beads* lavadas, que foram em seguida incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos, brevemente centrifugadas a 280 × g por 1 minuto e então, posicionadas em uma estante magnética por 5 minutos. 15 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo estéril.

Para evitar a formação de quimeras devido a ligação dos fragmentos entre si durante a reação de ligação aos adaptadores, é adicionado um nucleotídeo Adenina (A) às extremidades 3' dos fragmentos, uma vez que na extremidade 3' do adaptador correspondente encontra-se um nucleotídeo timina (T). Para isso, 1 µL do *A-Tailing Control* foi diluído em 99 µL do *Ressuspension Buffer* e 2,5 µL do mix foram adicionados aos tubos contendo as reações. Foram adicionados 12,5 µL do *A-Tailing Mix* e a reação foi incubada em termociclador com a tampa aquecida à 100°C à 37°C por 30 minutos seguido de 70°C por 5 minutos. Posteriormente, foi realizada a ligação dos fragmentos aos adaptadores, 1 µL do *Ligation Control* foi diluído em 99 µL do *Ressuspension Buffer* e 2,5 µL do mix foram adicionados aos tubos contendo as reações, 2,5 µL do *Ligation Mix* e dos adaptadores de RNA foram adicionados logo em seguida. A reação foi incubada a 30°C por 10 minutos, após a o período de incubação os tubos foram mantidos em gelo e a reação foi finalizada adicionando 5 µL do *Stop Ligation Buffer*.

Os fragmentos ligados foram purificados adicionando-se às reações 42 µL de *AMPure XP beads*, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugados a 280 x g por 1 minuto e posicionados em uma estante magnética por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e descartado e as *beads* contendo a reação foram lavadas 2 vezes com 200 µL de EtOH 80% fresco. Após a etapa de lavagem, foram adicionados 52,5 µL do *Ressuspension Buffer*, os tubos foram novamente incubados em temperatura ambiente por 2 minutos, posicionados em estante magnética por 5 minutos e 50 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. A purificação foi repetida,

adicionando aos tubos 50 μL de *AMPure XP beads*, após incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, os tubos foram centrifugados, posicionados em uma estante magnética por 5 minutos e o sobrenadante descartado. A reação foi novamente lavada 2 vezes com 200 μL de EtOH 80% fresco. Após a etapa de lavagem, foram adicionados 22,5 μL do *Ressuspension Buffer*, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 2 minutos, posicionados em estante magnética por 5 minutos e por fim, 20 μL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo.

Os fragmentos purificados foram enriquecidos através da amplificação por PCR da quantidade de DNA na biblioteca. Com os tubos em gelo, foram adicionados 5 μL do *PCR Primer Cocktail* e 25 μL do *PCR Master Mix*, em seguida a reação foi incubada em termociclador com a tampa aquecida à 100°C à 98 °C por 30 segundos, seguido de 15 ciclos de 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final à 72°C por 5 minutos. O produto de PCR foi então purificado adicionando-se ao tubo 50 μL de *AMPure XP beads* seguido de nova lavagem com EtOH 80% descrita nas etapas anteriores. Após a lavagem, foram adicionados 32,5 μL de *Ressuspension Buffer*, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 2 minutos, posicionados em estante magnética por 5 minutos e 30 μL do sobrenadante contendo a biblioteca finalizada foram transferidos para um novo tubo.

4.7.6 Normalização e sequenciamento da biblioteca

1 μL da biblioteca de DNA foi diluída em 1 μL do *Ressuspension Buffer* para análise da qualidade e tamanho da biblioteca através do *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies).

Foi utilizada a PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) a fim de quantificar e padronizar a quantidade de cada amostra a ser aplicada para obter dados de sequenciamento de alta qualidade. Após essa etapa, 10 μL de cada biblioteca foram normalizados e diluídas até a concentração 10nM com Tris-Cl 10 mM, pH 8,5 contendo 0,1% de Tween 20. Posteriormente as bibliotecas indexadas e normalizadas foram agrupadas em um *pool* contendo 10 μL de cada biblioteca para geração de *cluster* e sequenciamento.

As amostras foram desnaturadas utilizando *Hybridization Buffer HT1* (Illumina Inc.), sendo posteriormente incubadas a 96°C por 2 minutos em termociclador. A reação de sequenciamento foi realizada em *NovaSeq 6000 Sequencing System* (Illumina Inc.), na

Macrogen, Inc (C ria do Sul), de acordo com os parâmetros recomendados pelo pelo fabricante.

4.7.7 Montagem e anota o dos transcriptomas

Os arquivos FastQ gerados para cada biblioteca foram submetidos a análise com o software *FASTQC* (Andrews et al, 2014) para verifica es de controle de qualidade através de um conjunto modular de análises que gera plotagens baseadas no *Q score* por base sequenciada, distribui o de *Q score* médio de cada sequência obtida, conteúdo de adaptadores remanescentes, entre outras informa es. A remo o dos adaptadores e sequências de baixa qualidade foi realizada utilizando a ferramenta Trimmomatic.

O mapeamento das sequências obtidas por RNA-seq em rela o a sequência genômica do isolado C345 utilizado como referência foi realizado utilizando a ferramenta Bowtie2, que divide o genoma em partes para mapear de forma mais eficiente. Foram utilizados arquivos em formato *.gbk*, que cont m as informa es das sequências de todos os genes anotados dos genomas de referência.

Para as análises estatísticas de expressão diferencial entre genes de transcriptomas diferentes, foi usada a biblioteca *DESeq2* do ambiente de programa o R, usando como dados de entrada os valores brutos de contagem de sequências para cada gene. Como parâmetros para definir um gene como diferencialmente expresso entre duas condi es distintas foi estabelecido ter um valor de $p_{adj} < 0,05$ e um valor de $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$.

4.7.8 Análise de enriquecimento funcional de redes gênicas

Os dados anotados do transcriptoma foram submetidos a análise de enriquecimento de termos e categorias do *Gene Ontology* (GO) utilizando o Banco de Dados para Anota o, Visualiza o e Descoberta Integrada (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/versão> 2021). Foram aplicadas a classifica o de termos GO, incluindo GO-BP (processo biológico), GO-MF (fun o molecular) e GO-CC (componente celular) e análises da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) para descobrir as fun es dos genes que se cruzam e testar as liga es biológicas em genes co-regulados. Por meio da análise de enriquecimento de GO,   possível comparar e classificar aproximadamente os genes diferencialmente expressos (DEGs) para entender melhor suas características biológicas. O KEGG colabora na interpreta o funcional de

genes e genomas como uma rede completa, registrando redes de interações moleculares nas células e variantes específicas a determinados organismos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo nas análises (ZHOU et al, 2019; XING et al, 2015).

4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo não envolve seres humanos e/ou animais, seja de forma direta ou indireta, portanto o mesmo não necessita ser avaliado criteriosamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do IAM sob registro nº 01/2018.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo encontram-se descritos nos tópicos a seguir.

5.1 PERFIL DE SUSCEPBILIDADE À POLIMIXINA B ENTRE OS ISOLADOS I056 E C345

Os resultados acerca do perfil de susceptibilidade à polimixina entre os isolados I056 e C345 demonstraram para a cepa C345 uma CIM de 16 µg/mL, caracterizando-a como resistente a Polimixina B, enquanto a cepa I056 demonstrou uma CIM de 2 µg/mL, sendo classificada como sensível a Polimixina B (tabela 2). De acordo com o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2018), a caracterização de cepas de *A. baumannii* resistentes a Polimixina B se dá com a apresentação de uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) a partir de 4 µg/mL.

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) das cepas I056 e C345

CEPA	CIM (µg/mL)
I056	2 (PolS)
C345	16 (PolR)

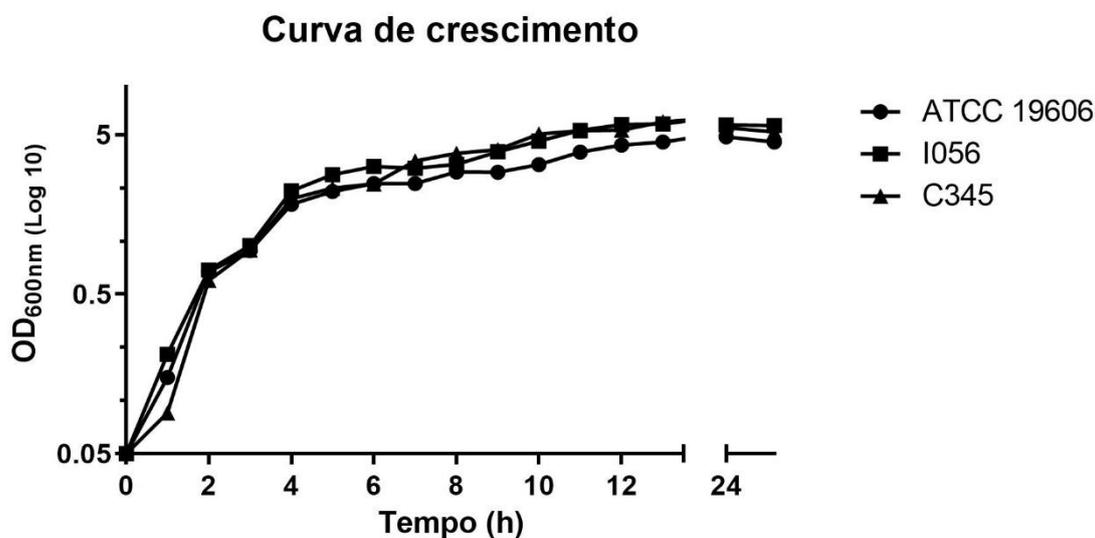
Fonte: A autora

Legenda: PolS: cepa sensível a Polimixina B; PolR: cepa resistente a Polimixina B

5.2. CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) EDA CEPA LABORATORIAL ATCC 19606

A curva de crescimento das cepas I056 e C345 foi realizada para comparar a taxa de crescimento. Não foi possível observar diferença no padrão da curva de crescimento para *A. baumannii* de nenhuma das cepas analisadas. A figura 6 demonstra que os isolados atingiram a fase estacionária após cerca de 12 horas de crescimento à 37 °C, sem apresentar diferenças na curva entre as cepas I056 (PolS) e C345 (PolR).

Figura 6 – Curva de crescimento das cepas clínicas I056 (PoIS) e C345 (PoIR) e da cepa laboratorial ATCC 19606 em meio LB



Fonte: A autora

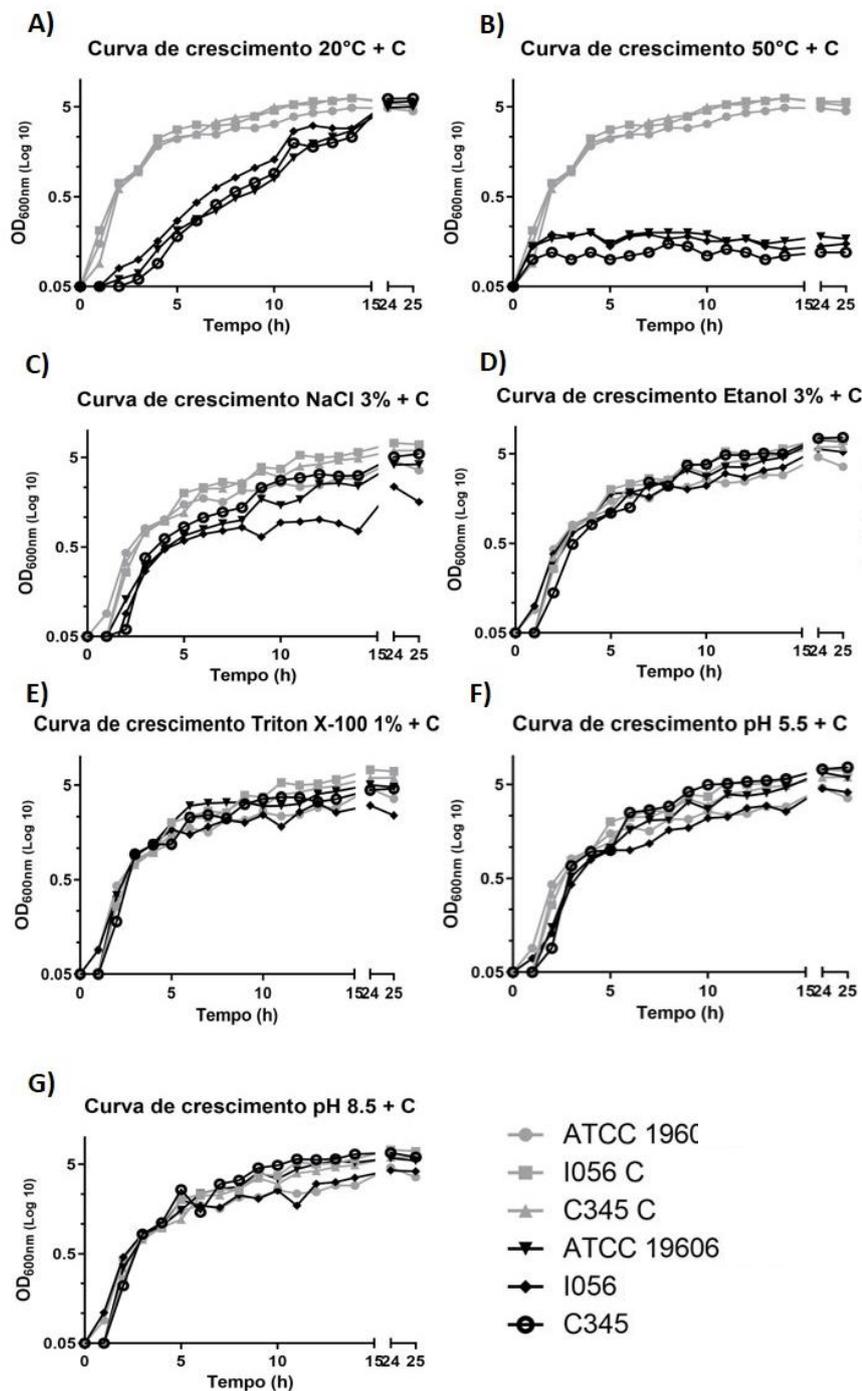
Legenda: Crescimento das cepas I056 (PoIS) e C345 (PoIR) e ATCC 19606 (cepa controle) em meio LB. No eixo X o tempo está representado em horas. No eixo Y a OD₆₀₀ está representada em Unidades de Absorbância (AU).

Além disso, para observar se a capacidade em lidar com agentes estressantes presentes no ambiente apresenta variações entre os isolados I056 (PoIS) e C345 (PoIR) foi realizada uma curva de crescimento sob estresses aplicados em experimentos individuais para cada uma das cepas estudadas (Figura 7).

Os estresses de temperatura aplicados aos isolados causaram comprometimento no crescimento, as cepas I056 (PoIS) e C345 (PoIR) apresentaram um padrão de crescimento mais lento quando cultivadas a 20°C, enquanto foi observado grande comprometimento no crescimento das células cultivadas a 50°C, no entanto, não foi observada diferença entre o padrão de crescimento entre os dois isolados avaliados (I056 e C345).

Quando cultivada na presença de NaCl à 3% (alta osmolaridade), a cepa I056 (PoIS) apresentou leve comprometimento no crescimento bacteriano ao atingir o início da fase estacionária em comparação com as demais cepas analisadas. Os demais agentes estressantes (estresse oxidativo e estresse ácido e alcalino) aplicados não foram capazes de comprometer o crescimento de nenhum dos isolados analisados, além disso, não foram observadas diferenças no padrão de crescimento das cepas analisadas.

Figura 7 – Curva de sobrevivência com tolerância ao estresse das cepas clínicas I056 (PoIS) e C345 (PoIR) e da cepa laboratorial ATCC 19606 em meio LB



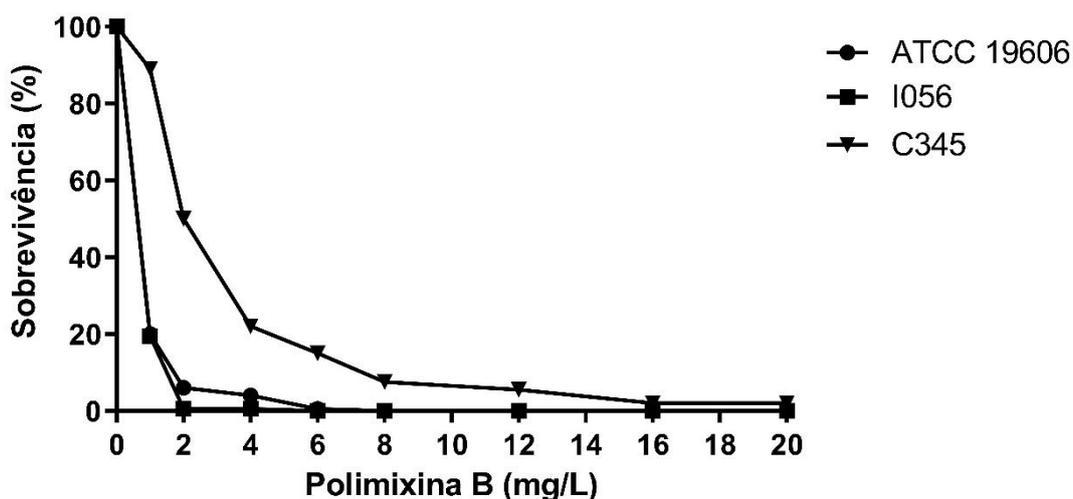
Fonte: A autora

Legenda: O efeito da tolerância ao estresse das cepas I056 (PoIS) e C345 (PoIR) e ATCC 19606 sob a) 20 °C; b) 50 °C; c) 3% NaCl; d) 1% Triton X-100; e) 3% Etanol; f) pH 5,5; g) pH 8,5. Foram utilizados os resultados da curva de sobrevivência padrão à 37 °C do experimento anterior como controle para comparação em todas as análises (C).

5.3 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA RELATIVA À POLIMIXINA B

Para avaliar o padrão de crescimento das cepas frente à exposição a Polimixina B em diferentes concentrações (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 $\mu\text{g/mL}$) foi realizada uma curva de sobrevivência. A cepa I056, sensível a polimixina apresentou crescimento até a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, apresentando comportamento similar à cepa ATCC 19606 utilizada como controle do experimento. Os dados de crescimento para o isolado C345 corroboraram o resultado detectado através do MIC, onde foi possível observar a formação de colônias até a concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7).

Figura 8 – Padrão de crescimento das cepas clínicas I056 (PolS) e C345 (PolR) e da cepa laboratorial ATCC 19606 relativo a Polimixina B



Fonte: A autora

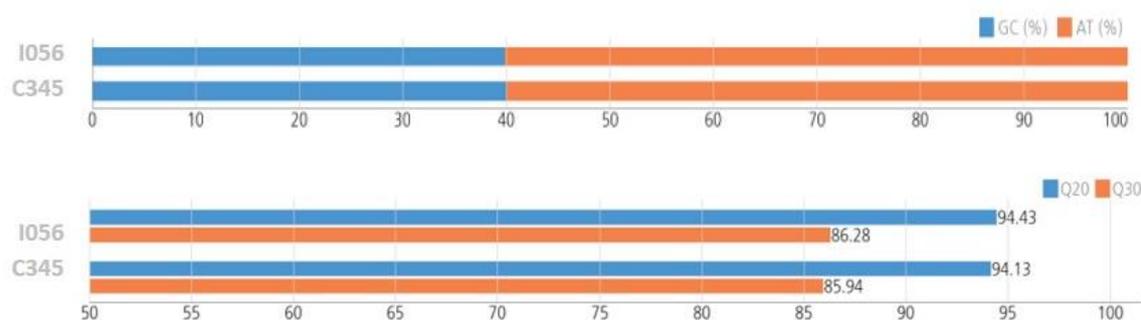
Legenda: Padrão de crescimento relativo à Polimixina B. O gráfico apresenta o padrão de crescimento das 3 cepas avaliadas (ATCC 19606, I056 e C345).

5.4 ANÁLISE DO GENOMA BACTERIANO DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) DE *Acinetobacter baumannii*.

5.4.1 Conjunto de dados de sequenciamento do DNA genômico, análise de qualidade e anotação genômica.

O comprimento total dos genomas sequenciados foi de aproximadamente 3.9 Mb para os isolados I056 e C345, que apresentaram um conteúdo GC de 39,8% e AT de 60,2% para ambas as cepas analisadas. O valor aproximado de Q20 foi de 94% e Q30 86% para ambos os genomas analisados, esses dados configuram um genoma de boa qualidade (Figura 9). O score Q corresponde ao índice de qualidade de sequenciamento de uma determinada base, scores Q mais altos indicam uma menor probabilidade de erro, ou seja, maior confiabilidade dos dados gerados através do sequenciamento.

Figura 9 – Conteúdo GC/AT e escores Q20/Q30 dos genomas das cepas I056 e C345



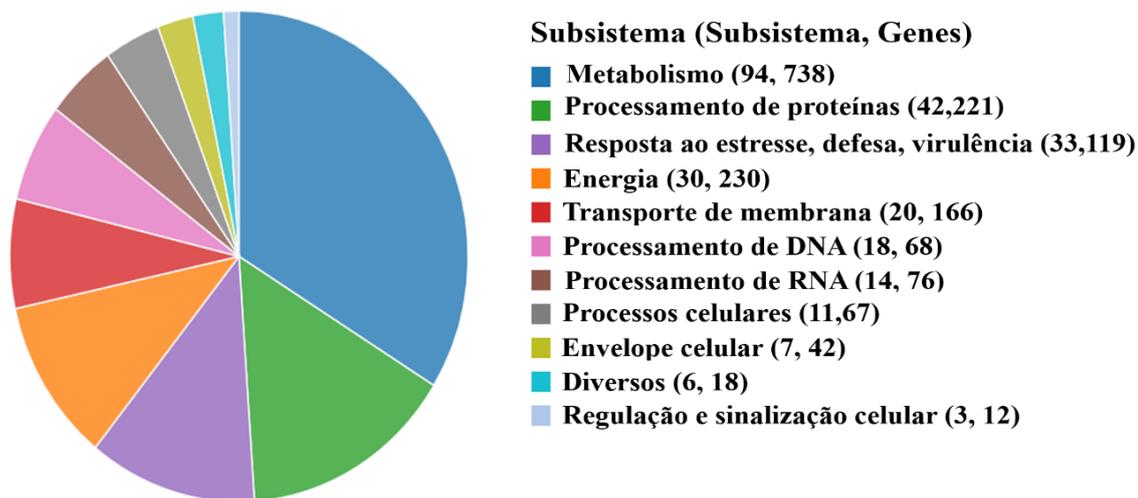
Fonte: A autora

Legenda: Conteúdo GC/AT (%) e scores Q20/Q30 (%) dos dados brutos das cepas I056 e C345.

A tipagem por MLST revelou que as cepas I056 e C345 pertencem ao mesmo *sequence type* (ST): ST514^B/ST103^P. A anotação dos genomas utilizando a ferramenta RAST demonstrou a presença de 3.768 sequências codificantes de proteínas (CDS) para as cepas I056 e C345. Além de 63 genes de RNA de transferência (tRNA) e 3 genes de RNA ribossomal (rRNA) para ambas as cepas. Para ambas as cepas a anotação incluiu 911 proteínas hipotéticas e 2.857 proteínas com atribuições funcionais.

Uma análise dos subsistemas exclusivos, que compreendem um conjunto de proteínas que juntas implementam um processo biológico específico ou complexo estrutural para determinado organismo, demonstrou que a distribuição de subsistemas de proteínas é idêntica para ambas as cepas I056 e C345. A anotação gerada através da plataforma PATRIC demonstra que a maioria dos conjuntos de subsistemas das cepas I056 e C345 apresenta relação com o metabolismo bacteriano (94 subsistemas / 738 genes), seguido do processamento de proteínas (42 subsistemas / 221 genes) e resposta ao estresse, defesa e virulência (33 subsistemas / 119 genes) (Figura 10).

Figura 10 – Distribuição dos subsistemas das cepas I056 e C435



Fonte: A autora

Através de dados gerados pela plataforma PATRIC, foi possível atribuir genes específicos a determinados mecanismos de resistência (Tabela 3). Nenhuma diferença na distribuição dos genes responsáveis pelos mecanismos de resistência antimicrobiana foi encontrada entre as cepas I056 e C345, além disso não foi detectada a presença de nenhum gene comumente relacionado a resistência a Polimixina B.

Tabela 3 – Genes de resistência antimicrobiana detectados nos isolados I056 e C345 utilizando a ferramenta k-mer

Mecanismo de resistência antimicrobiana	Genes
Enzima de ativação antibiótica	<i>katG</i>
Enzima de inativação antibiótica	<i>ADC family, OXA-51 family</i>
Alvo antibiótico em espécies suscetíveis	<i>alr, ddl, dxr, EF-G, EF-Tu, folA, dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, iso-tRNA, murA, rho, rpoB, rpoC, S10p, S12p</i>
Proteína de proteção ao alvo de antibiótico	<i>bcrC</i>
Proteína de substituição de alvo de antibiótico	<i>fabG, htdX</i>
Bomba de efluxo conferindo resistência a antibióticos	<i>EmrAB-TolC, macA, macB, MdfA/Cmr, TolC/OpmH</i>
Gene conferindo resistência via ausência	<i>gidB</i>
Proteína de alteração da carga da parede celular e conferência de resistência a antibióticos	<i>gdpD, pgsA</i>
Permeabilidade moduladora de proteínas ao antibiótico	<i>OprD - family</i>
Regulador modulando a expressão de genes de resistência a antibióticos	<i>oxyR</i>

Fonte: A autora

Uma análise realizada utilizando a ferramenta Resfinder também detectou a presença dos genes de resistência *bla*_{OXA-70} (uma OXA-51-like) e *bla*_{ADC-25} (Tabela 4), ambos envolvidos na resistência aos betalactâmicos e intrínsecos a espécies de *A. baumannii*.

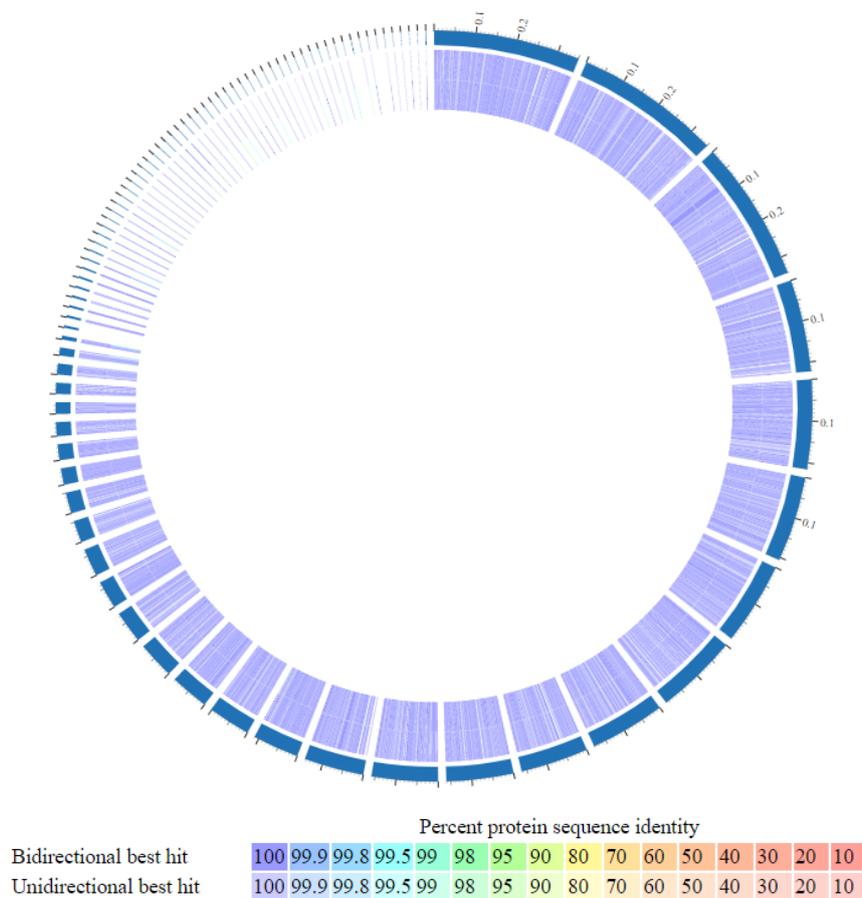
Tabela 4 – Genes de resistência antimicrobiana detectados nos isolados I056 e C345 utilizando a ferramenta Resfinder

Gene	Identidade (%)	Cobertura (%)	Fenótipo
<i>bla</i> _{OXA-70}	100.00	100.00	Resistência a betalactâmicos
<i>bla</i> _{ADC-25}	97.05	100.00	Resistência a betalactâmicos

Fonte: A autora

Através da análise do proteoma predito, realizado com base na sequência de proteínas utilizando a ferramenta BLASTP com base na sequência dos genomas de ambos os isolados, foi possível observar uma distribuição idêntica do conjunto de proteínas detectadas entre as cepas I056 e C345 (Figura 11).

Figura 11 – Proteoma predito para os isolados I056 (PoIS) e C345 (PoIR) utilizando a ferramenta BLASTP



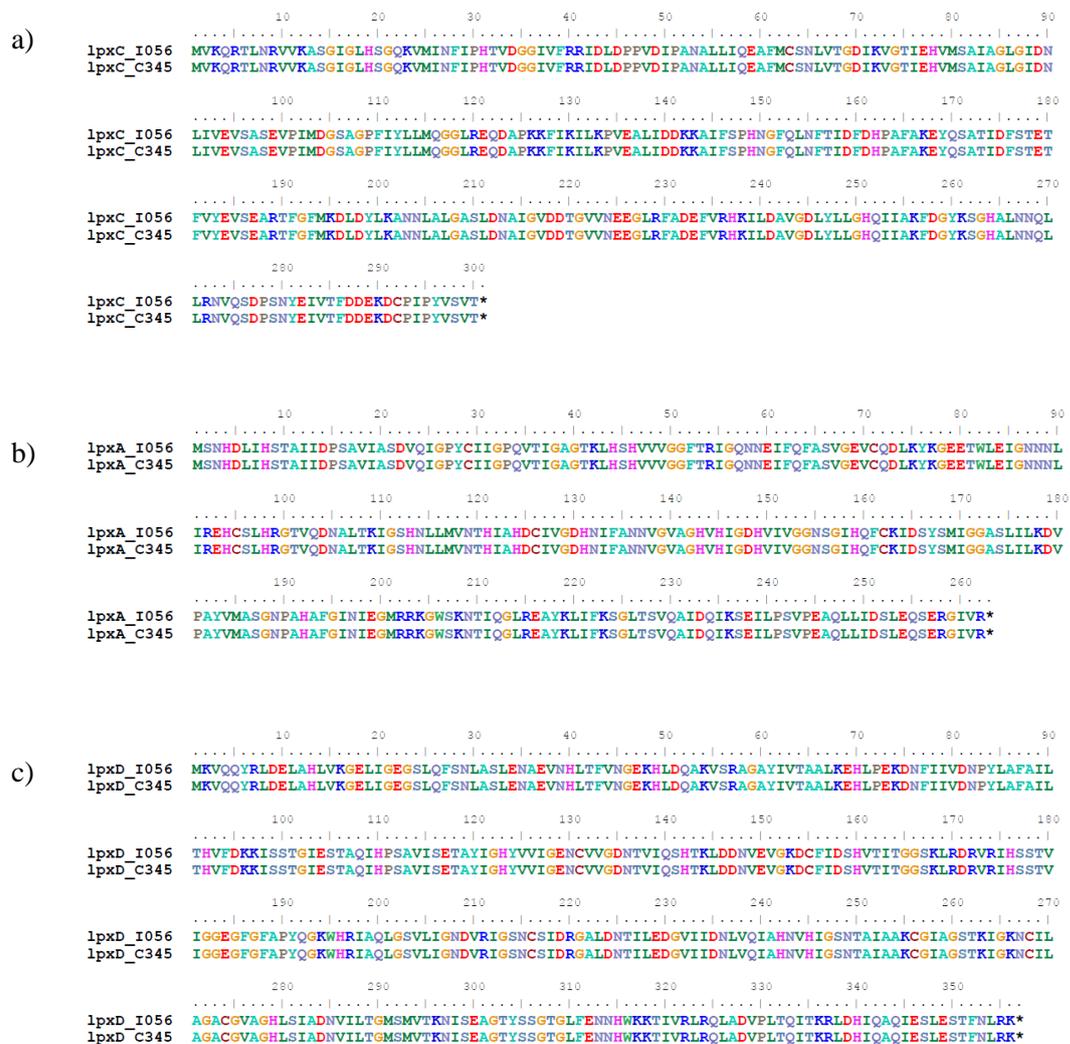
Fonte: A autora.

Legenda: Proteoma predito das cepas clínicas estudadas. *A. baumannii* I056 (mais externamente) e *A.baumannii* C345 (mais internamente)

Além disso, foi realizado o alinhamento manual dos aminoácidos que compõem os mecanismos mais comumente associados a resistência à polimixina em *A. baumannii*, os operons *lpxCAD*, *pmrCAB* e os genes *lpsB*, *lptD* e *vacJ* (Figuras 12-16) dos isolados I056 e C345 utilizando o software *BioEdit* versão 7.2. Não foi detectada nenhuma alteração na

sequência de aminoácidos das proteínas geradas por nenhum dos genes que são sabidamente envolvidos na resistência a Polimixina B.

Figura 12 – Alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas para o operon *lpxCAD* das cepas I056 e C345 utilizando o software BioEdit versão 7.2



Fonte: A autora.

Legenda: Alinhamento de aminoácidos correspondentes aos genes a) *lpxC* b) *lpxA* c) *lpxD* dos isolados I056 e C345 de *A. baumannii* utilizando a ferramenta *ClustaW Multiple Alignment* (BioEdit versão 7.2).

Figura 73 – Alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas para o operon *pmrCAB* das cepas I056 e C345 utilizando o software BioEdit versão 7.2



Fonte: A autora.

Legenda: Alinhamento de aminoácidos correspondentes aos genes a) *pmrC* b) *pmrA* c) *pmrB* dos isolados I056 e C345 de *A. baumannii* utilizando a ferramenta *ClustaW Multiple Alignment* (BioEdit versão 7.2).

Figura 14 – Alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas para o gene *lpsB* das cepas I056 e C345 utilizando o software BioEdit versão 7.2

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
lpsB_I056  MKVMQLLPFLNLSGGVERGTLEIARALVAQGHQSLVVSNGGRLVLSQLEAEGSTHLLTLPPIHKKSLSSLWQIRPLRQLIEBHPDIVHVRSRV
lpsB_C345  MKVMQLLPFLNLSGGVERGTLEIARALVAQGHQSLVVSNGGRLVLSQLEAEGSTHLLTLPPIHKKSLSSLWQIRPLRQLIEBHPDIVHVRSRV

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
lpsB_I056  PAWLTHFALRKIPANKRPHLISTVHGPFYSVNRYSALMTQAEKVIAVSDSVVKYITDHYKNCPPQDIVRIYRGIDPAAFPHNYQPSAQWFN
lpsB_C345  PAWLTHFALRKIPANKRPHLISTVHGPFYSVNRYSALMTQAEKVIAVSDSVVKYITDHYKNCPPQDIVRIYRGIDPAAFPHNYQPSAQWFN

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
lpsB_I056  QVFNDPPELENKFLLLCLPGRITRLKGHESLIELMQQLHSQYPQLHAVVVGADVKKQAYLSELQNTIQSKGLADKITFEVGHRSDIREWLA
lpsB_C345  QVFNDPPELENKFLLLCLPGRITRLKGHESLIELMQQLHSQYPQLHAVVVGADVKKQAYLSELQNTIQSKGLADKITFEVGHRSDIREWLA

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
lpsB_I056  FSDIVLSLSNQAETFGRTALEALSVGTFPIGWNRGGVAEILSHVYPQGLVEAENEKALLETVKHHIEQPQTVAFVTMFSLKDMDQDTLEL
lpsB_C345  FSDIVLSLSNQAETFGRTALEALSVGTFPIGWNRGGVAEILSHVYPQGLVEAENEKALLETVKHHIEQPQTVAFVTMFSLKDMDQDTLEL

lpsB_I056  .....
lpsB_I056  YQSVLK*
lpsB_C345  YQSVLK*

```

Fonte: A autora.

Legenda: Alinhamento de aminoácidos correspondentes ao gene *lpsB* dos isolados I056 e C345 de *A. baumannii* utilizando a ferramenta *ClustaW Multiple Alignment* (BioEdit versão 7.2).

Figura 15 – Alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas para o gene *lptD* das cepas I056 e C345 utilizando o software BioEdit versão 7.2

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
lptD_I056  MKHQFKFNPLATAIFLLCSGSIQSSYABASAGVVSNIIDNNQLKASIKBAYPGQEFFQOYYVDKSAPBAQLRNNKYLSSAFCCGWTWTPIN
lptD_C345  MKHQFKFNPLATAIFLLCSGSIQSSYABASAGVVSNIIDNNQLKASIKBAYPGQEFFQOYYVDKSAPBAQLRNNKYLSSAFCCGWTWTPIN

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
lptD_I056  PETKALDADKATSVVTADYGHYNPAGDSVLBGNVVIDQBGRTVVRADKVTIDKTQTFAHAQGRVQLAQGGLLSQSDEIDYNLRTQTGNLDN
lptD_C345  PETKALDADKATSVVTADYGHYNPAGDSVLBGNVVIDQBGRTVVRADKVTIDKTQTFAHAQGRVQLAQGGLLSQSDEIDYNLRTQTGNLDN

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
lptD_I056  SPYISEQQHAGHAGHACKIERTSPNVMLNDATYTTCPGQKPGWKIQANKIELNQBTGRGVTRGCKLYVKDVPVLAVPYNFPIDDRRTTC
lptD_C345  SPYISEQQHAGHAGHACKIERTSPNVMLNDATYTTCPGQKPGWKIQANKIELNQBTGRGVTRGCKLYVKDVPVLAVPYNFPIDDRRTTC

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
lptD_I056  ILNPQFGFSNDGGIELSVPVYLNLAAPNYDATITPRYLADRGAMLQCBFRYLTDGPGAGQIWGGILPSDKKEYDDKDRKDPHFLHNWDINDQ
lptD_C345  ILNPQFGFSNDGGIELSVPVYLNLAAPNYDATITPRYLADRGAMLQCBFRYLTDGPGAGQIWGGILPSDKKEYDDKDRKDPHFLHNWDINDQ

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
lptD_I056  WSTNLEYNYASDKDYFSDLDSSPISKTDLNLRRAWELNYQHICIGLKAQLKVEDPQTLDPQVKDADKPYARLPQFLNLYVTGNPLGLQYE
lptD_C345  WSTNLEYNYASDKDYFSDLDSSPISKTDLNLRRAWELNYQHICIGLKAQLKVEDPQTLDPQVKDADKPYARLPQFLNLYVTGNPLGLQYE

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
lptD_I056  FNNDTAYFKKSIINDNSAQESSGTRIYNQFATRYNYRTPAAAFVIEVSVRSIQTFYDKDSIASRGLDGGSENKSVVVPQPTLDTGLNFERE
lptD_C345  FNNDTAYFKKSIINDNSAQESSGTRIYNQFATRYNYRTPAAAFVIEVSVRSIQTFYDKDSIASRGLDGGSENKSVVVPQPTLDTGLNFERE

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
lptD_I056  GKYLQTLTPRAFYAYAPYKNQDGYPNFDSTTASISYDQLEFNPFYFCHDRLEDNNFSLGVSYSLPDVTGLERLRASVGSYYFEDRRVT
lptD_C345  GKYLQTLTPRAFYAYAPYKNQDGYPNFDSTTASISYDQLEFNPFYFCHDRLEDNNFSLGVSYSLPDVTGLERLRASVGSYYFEDRRVT

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
lptD_I056  LKQGQDEFDTERKTGPVILSSQLNQNFTIAANSAMWSNGDNAQRDPQVYTTGDKGNLYNLGYFYRKDIPGRQDITYDQVVASFIQPIKDN
lptD_C345  LKQGQDEFDTERKTGPVILSSQLNQNFTIAANSAMWSNGDNAQRDPQVYTTGDKGNLYNLGYFYRKDIPGRQDITYDQVVASFIQPIKDN

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
lptD_I056  WRIMGHVQYDMDNDVARELLLCVNYBSCCWGISVYGRSYNDLDDPKTSDVSEKRAIMABITLKLGGCLNNKLASLLENRVLGFNKNQNS
lptD_C345  WRIMGHVQYDMDNDVARELLLCVNYBSCCWGISVYGRSYNDLDDPKTSDVSEKRAIMABITLKLGGCLNNKLASLLENRVLGFNKNQNS

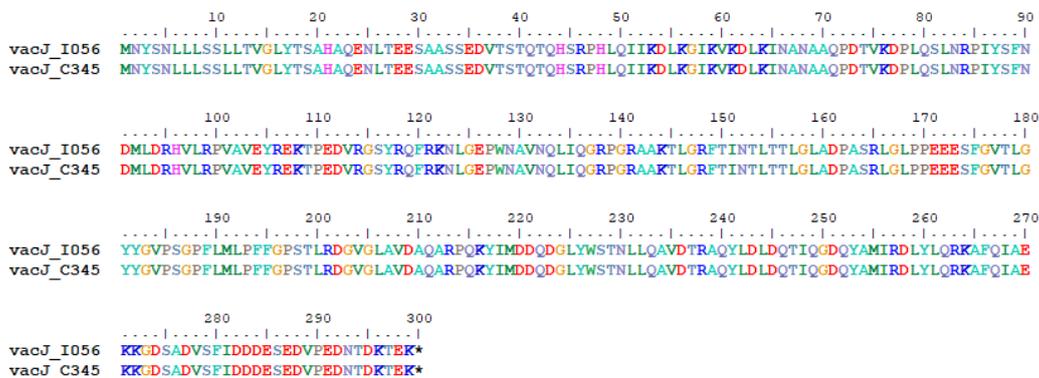
lptD_I056  WTQR*
lptD_C345  WTQR*

```

Fonte: A autora.

Legenda: Alinhamento de aminoácidos correspondentes ao gene *lptD* dos isolados I056 e C345 de *A. baumannii* utilizando a ferramenta *ClustaW Multiple Alignment* (BioEdit versão 7.2).

Figura 16 – Alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas para o gene *vacJ* das cepas I056 e C345 utilizando o software BioEdit versão 7.2



Fonte: A autora.

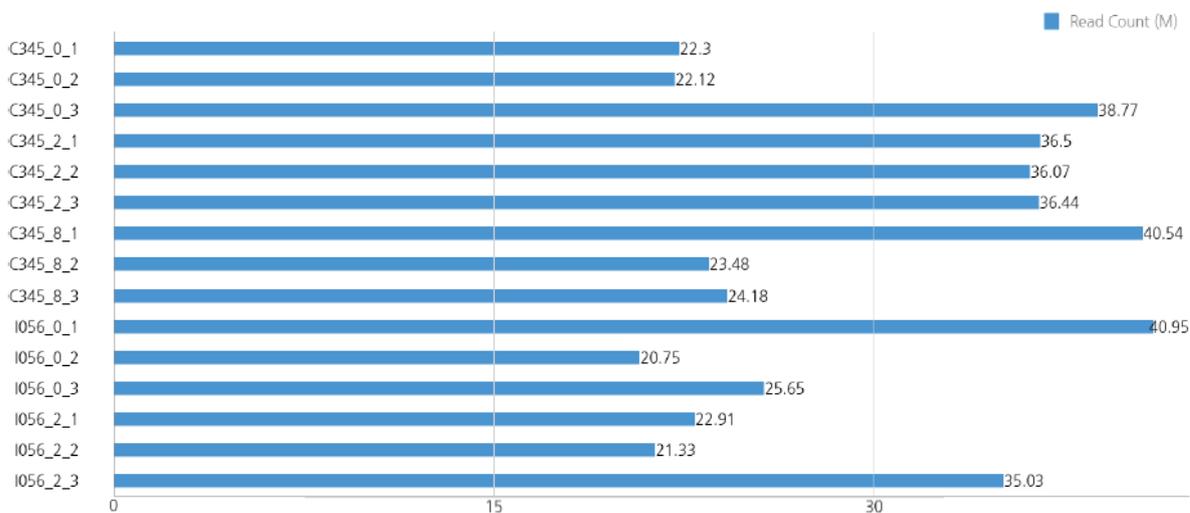
Legenda: Alinhamento de aminoácidos correspondentes ao gene *vacJ* dos isolados I056 e C345 de *A. baumannii* utilizando a ferramenta *ClustaW Multiple Alignment* (BioEdit versão 7.2).

5.5 ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DAS CEPAS CLÍNICAS I056 (POLS) E C345 (POLR) DE *Acinetobacter baumannii*.

4.5.1 Qualidade das *reads* FASTQC

Depois de carregar os dados, o dataset criado foi verificado, o mesmo contém valores de contagem brutos que representam o número de *reads* mapeadas para os alvos. A contagem total de *reads* dos dados brutos variou entre 20.745.114 e 40.948.652 entre todas as amostras e suas replicatas (Figura 17).

Figura 8 – Contagem de reads dos dados brutos gerados através do RNA-seq das cepas estudadas e suas replicatas biológicas

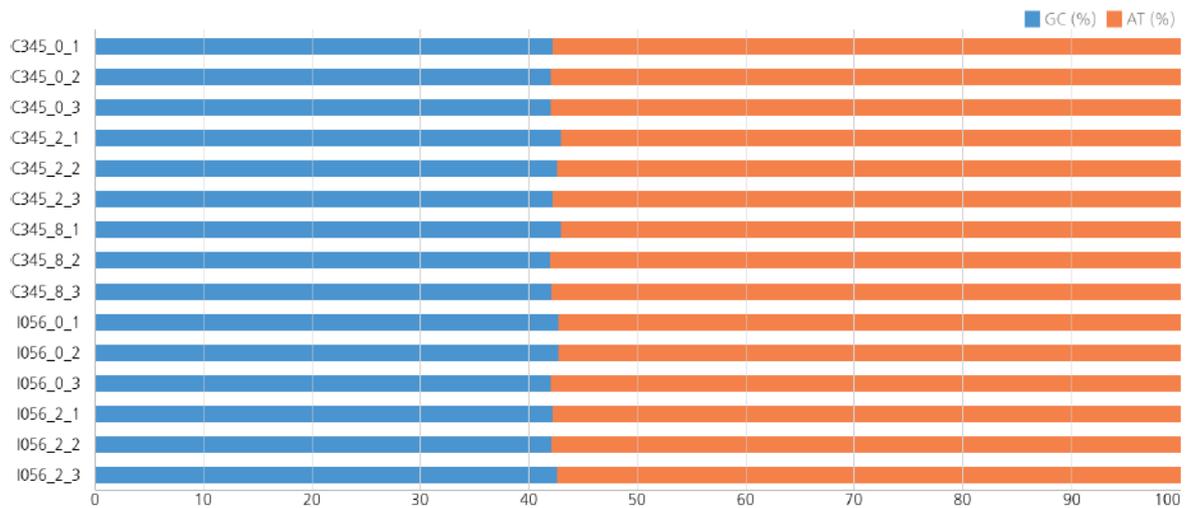


Fonte: A autora

Legenda: Contagem de reads dos dados brutos gerados das cepas I056 e C345 e suas replicatas biológicas. Os números são apresentados em milhões (M).

As amostras apresentaram um conteúdo GC e AT de aproximadamente 42% e 57%, respectivamente. Com um valor de Q20 de 98% e Q30 que variou entre 95 e 96% (Figuras 18 e 19).

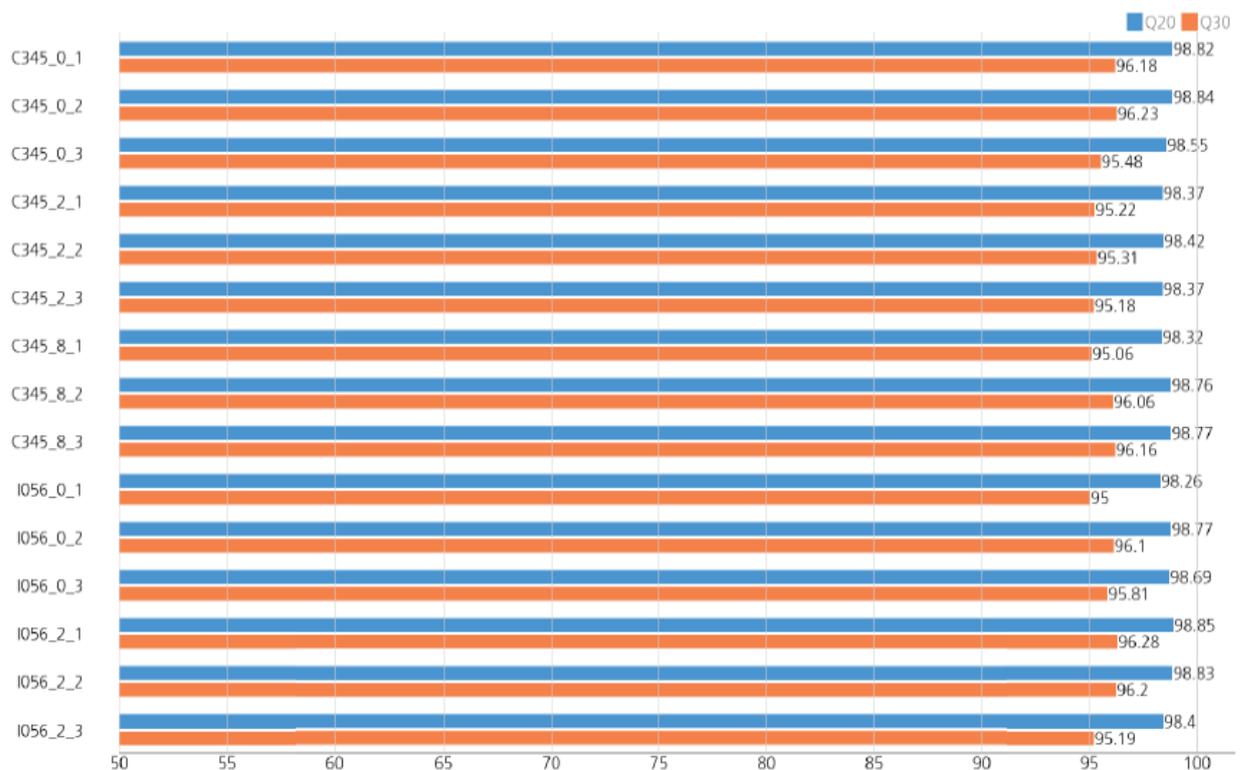
Figura 18 – Conteúdo GC/AT dos transcriptomas gerados através do RNA-seq das cepas estudadas e suas replicatas biológicas



Fonte: A autora

Legenda: Conteúdo GC/AT (%) dos dados brutos gerados das cepas I056 e C345 e suas replicatas biológicas.

Figura 19 – Escores Q20/Q30 dos transcriptomas gerados através do RNA-seq das cepas estudadas e suas replicatas biológicas



Fonte: A autora

Legenda: Scores Q20/Q30 (%) dos dados brutos gerados das cepas I056 e C345 e suas replicatas biológicas

4.5.2 Análise do RNAseq

4.5.2.1 Caracterização da amostra

Para as análises de RNA-seq, as cepas clínicas I056 (PolS) e C345 (PolR) foram cultivadas sob diferentes concentrações de Polimixina B (0, 2 e 8 µg/mL). Os dados de transcriptoma das cepas expostas a diferentes concentrações de antibióticos foram comparados entre si para a verificação dos Genes Diferencialmente Expressos (DEG). O quadro 1 apresenta as estratégias de comparações utilizadas nas análises do presente estudo.

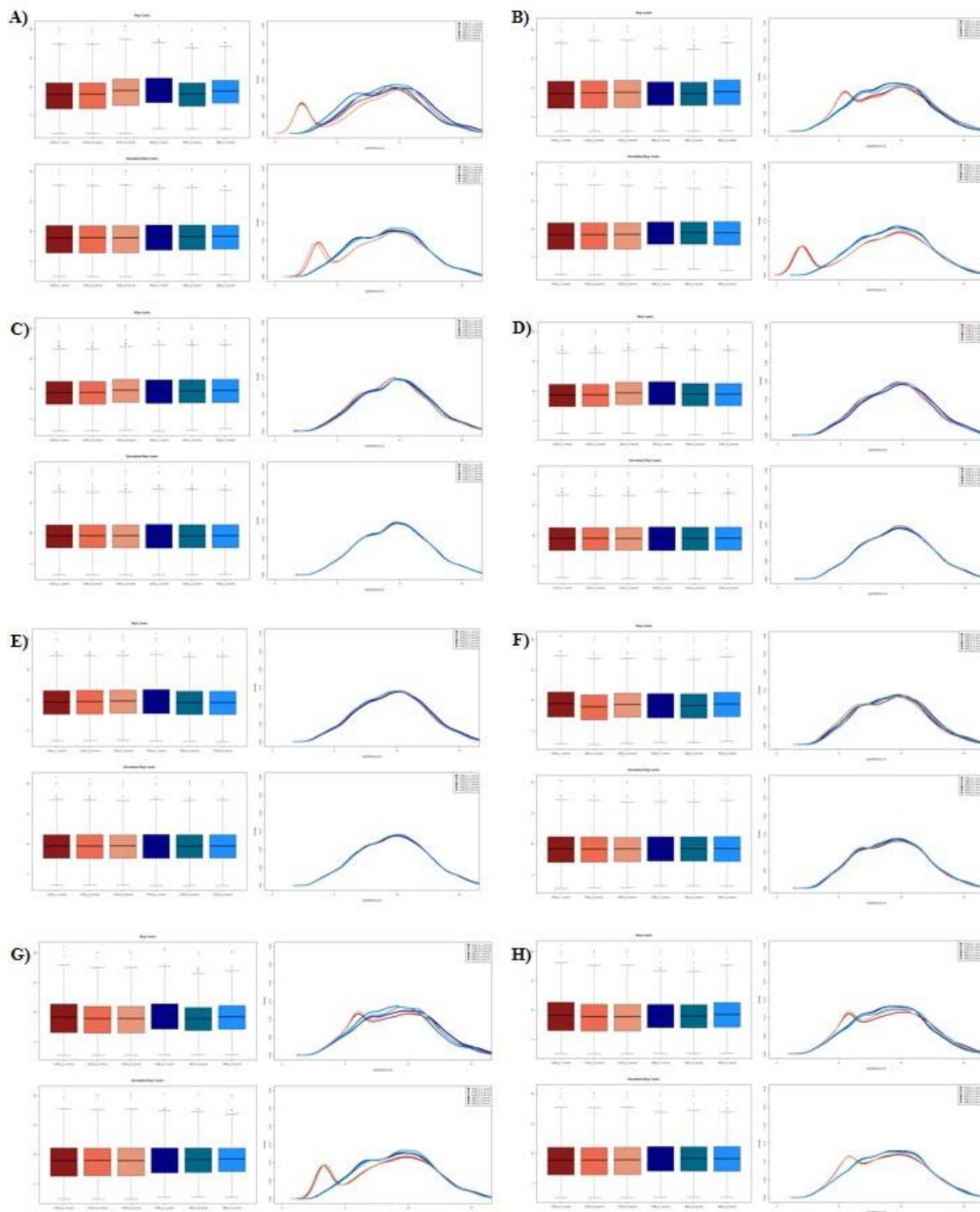
Quadro 1 – Comparações utilizadas nas análises de RNA-seq das cepas estudadas sob diferentes condições de exposição à Polimixina B

Cepa (Concentração PolB)	X	Cepa (Concentração PolB)
C345 (0 µg/mL)	X	I056 (0 µg/mL)
C345 (2 µg/mL)	X	I056 (2 µg/mL)
C345 (0 µg/mL)	X	C345 (2 µg/mL)
C345 (0 µg/mL)	X	C345 (8 µg/mL)
C345 (2 µg/mL)	X	C345 (8 µg/mL)
I056 (0 µg/mL)	X	I056 (2 µg/mL)
C345 (8 µg/mL)	X	I056 (0 µg/mL)
C345 (8 µg/mL)	X	I056 (2 µg/mL)

Fonte: A autora

Para uma melhor análise os dados gerados foram normalizados visando corrigir vieses técnicos sistemáticos, a fim de tornar as contagens de *reads* comparáveis entre as amostras (Figura 20) e a variabilidade do experimento também foi analisada através do PCA (*Principal Component Analysis*) (Figura 21). Através desses resultados, foi possível observar que as triplicatas de cada amostra utilizada para as comparações realizadas são homogêneas, concluindo-se que a única variabilidade no experimento é advinda de diferenças biológicas entre as amostras comparadas sob diferentes condições de cultivo.

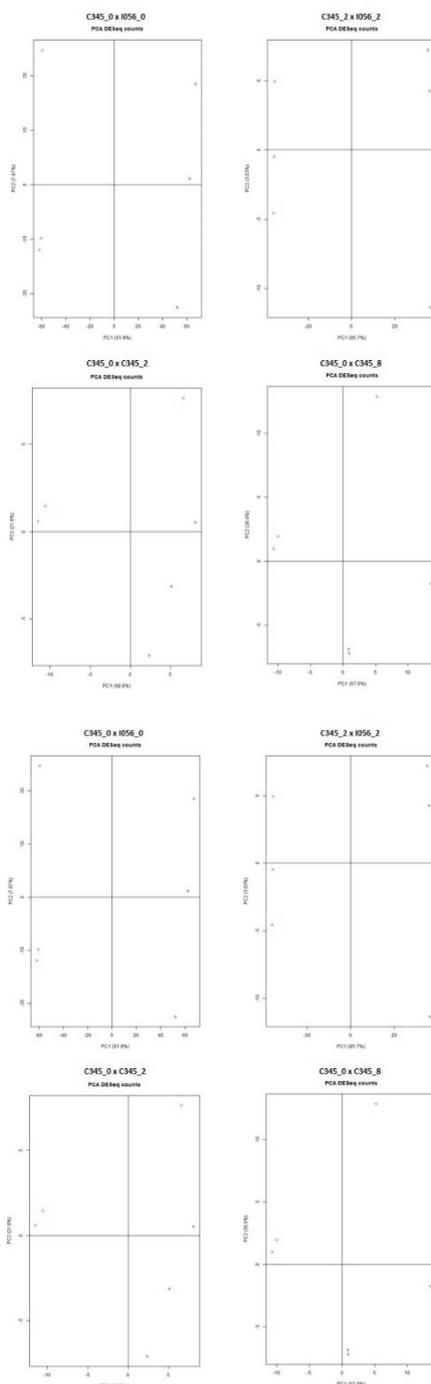
Figura 20 – Box plots e gráficos de densidade das contagens de leitura bruta do RNA-seq



Fonte: A autora

Legenda: Boxplots e gráficos de densidade de contagens de leitura bruta (acima) e normalizada (abaixo) do RNA-seq das cepas I056 e C345 sob diferentes condições de comparação. A) C345 (0 µg/mL) versus I056 (0 µg/mL); B) C345 (2 µg/mL) versus I056 (2 µg/mL); C) C345 (0 µg/mL) versus C345 (2 µg/mL); D) C345 (0 µg/mL) versus C345 (8 µg/mL); E) C345 (2 µg/mL) versus C345 (8 µg/mL); F) I056 (0 µg/mL) versus I056 (2 µg/mL); G) C345 (8 µg/mL) versus I056 (0 µg/mL); H) C345 (8 µg/mL) versus I056 (2 µg/mL). Obs: A figura encontra-se acima para fins ilustrativos e está disponível para melhor visualização no Apêndice 1.

Figura 9 – Análise de variação dos dados do RNA-seq realizada via PCA (Principal Component Analysis)



Fonte: A autora

Legenda: Gráfico de PCA do RNA-seq das cepas I056 e C345 sob diferentes condições de comparação. A) C345 (0 $\mu\text{g/mL}$) *versus* I056 (0 $\mu\text{g/mL}$); B) C345 (2 $\mu\text{g/mL}$) *versus* I056 (2 $\mu\text{g/mL}$); C) C345 (0 $\mu\text{g/mL}$) *versus* C345 (2 $\mu\text{g/mL}$); D) C345 (0 $\mu\text{g/mL}$) *versus* C345 (8 $\mu\text{g/mL}$); E) C345 (2 $\mu\text{g/mL}$) *versus* C345 (8 $\mu\text{g/mL}$); F) I056 (0 $\mu\text{g/mL}$) *versus* I056 (2 $\mu\text{g/mL}$); G) C345 (8 $\mu\text{g/mL}$) *versus* I056 (0 $\mu\text{g/mL}$); H) C345 (8 $\mu\text{g/mL}$) *versus* I056 (2 $\mu\text{g/mL}$). Obs: A figura encontra-se acima para fins ilustrativos e está disponível para melhor visualização no Apêndice 2.

4.5.3.2 Genes Diferencialmente Expressos (DEG)

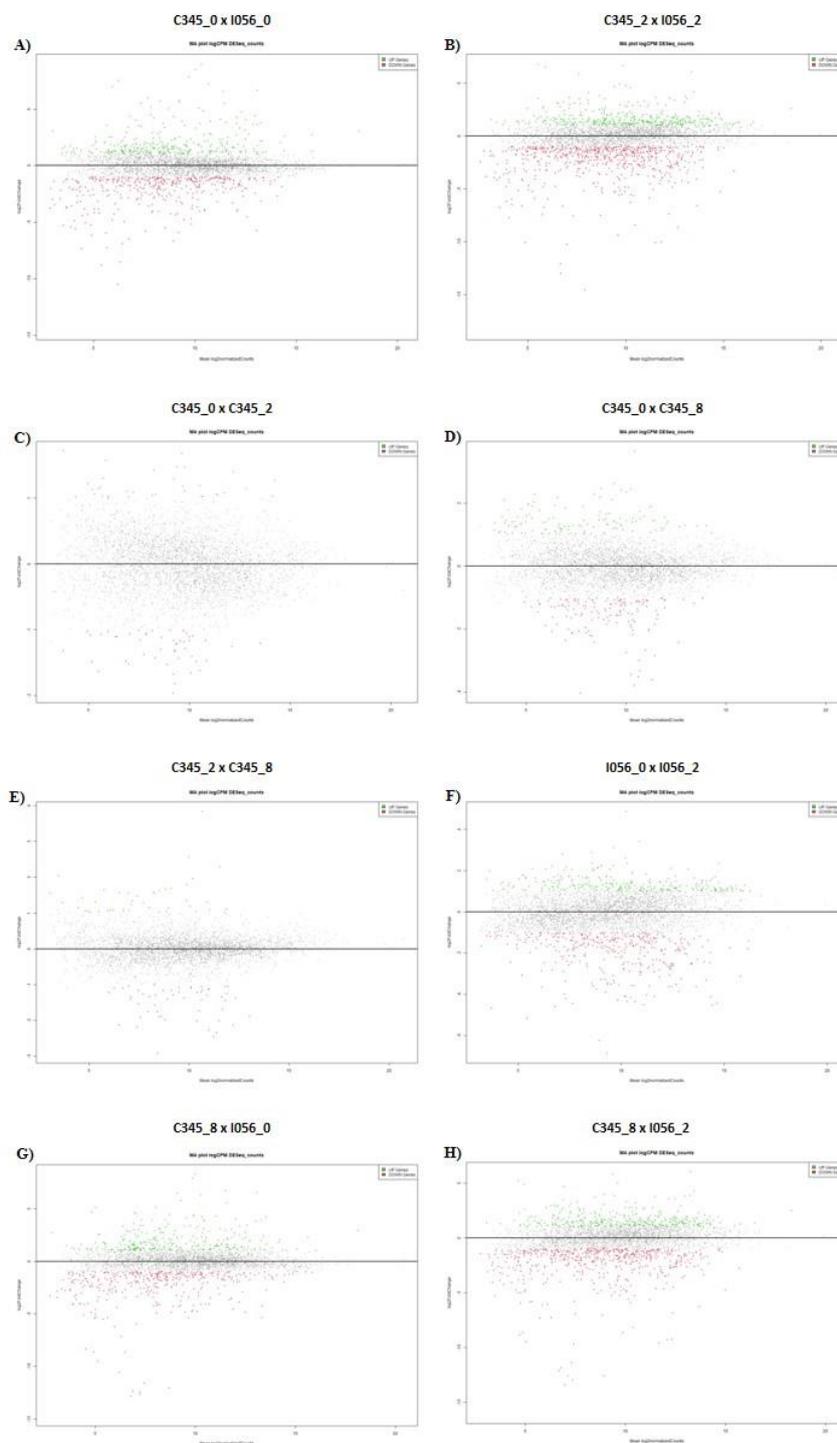
Após a normalização dos dados, foram detectados uma gama de Genes Diferencialmente Expressos (DEG) para cada uma das comparações realizadas. O número total de DEG para cada estratégia encontra-se na tabela 5 e na figura 22 encontram-se os MA plot (s) onde consta uma representação visual da razão logarítmica da expressão diferencial em função da intensidade média para cada comparação analisada. Dentre as comparações que geraram mais DEGs encontram-se C345 (2 µg/mL) *versus* I056 (2 µg/mL) com 1096 genes regulados positivamente e 413 regulados negativamente, C345 (8 µg/mL) *versus* I056 (2 µg/mL) com 1050 genes regulados positivamente e 380 regulados negativamente e C345 (0 µg/mL) *versus* I056 (0 µg/mL) com 849 genes regulados positivamente e 312 regulados negativamente.

Tabela 5 – Genes Diferencialmente Expressos (DEG) nas diferentes condições de comparação

Estratégia de comparação	Genes regulados positivamente	Genes regulados negativamente
C345 (0 µg/mL) x I056 (0 µg/mL)	849	312
C345 (2 µg/mL) x I056 (2 µg/mL)	1096	413
C345 (0 µg/mL) x C345 (2 µg/mL)	48	34
C345 (0 µg/mL) x C345 (8 µg/mL)	143	129
C345 (2 µg/mL) x C345 (8 µg/mL)	54	44
I056 (0 µg/mL) x I056 (2 µg/mL)	374	274
C345 (8 µg/mL) x I056 (0 µg/mL)	833	315
C345 (8 µg/mL) x I056 (2 µg/mL)	1050	380

Fonte: A autora

Figura 10 – MA plot (s) para as diferentes estratégias de comparação



Fonte: A autora

Legenda: MA plot (s) para cada estratégia de comparação entre as diferentes cepas e condições de cultivo. Os pontos verdes representam os genes regulados positivamente, os pontos vermelhos representam os genes regulados negativamente e os pontos cinzas representam genes que não foram significativamente diferentes entre os dois grupos comparados. Obs: A figura encontra-se acima para fins ilustrativos e está disponível para melhor visualização no Apêndice 3.

4.5.3.3 Análise de enriquecimento funcional (*Gene Ontology*)

A análise de enriquecimento teve como objetivo estabelecer o aumento ou diminuição de vias funcionais que pudessem estar associadas às respostas fisiológicas do organismo. Para se analisar as respostas funcionais do transcriptoma de um organismo, os dados de expressão gênica são analisados sobre a perspectiva de processos biológicos possibilitada pelo enriquecimento de termos GO (ASHBURNER et al, 2000). Essa análise busca comparar determinados subconjuntos de transcritos em relação a todo o transcriptoma, verificando-se processos biológicos estatisticamente enriquecidos nos subconjuntos de transcritos testados.

Foram selecionadas as estratégias de comparações mais relevantes para a análise de enriquecimento funcional de redes gênicas. A primeira estratégia consistiu em comparar a expressão gênica dos isolados clínicos quando cultivados sob as mesmas condições, na ausência e presença de uma concentração subinibitória de Polimixina B: C345 (0 µg/mL) *versus* I056 (0 µg/mL); C345 (2 µg/mL) *versus* I056 (2 µg/mL) e em seguida verificar os DEG quando comparamos a cepa resistente C345 cultivada à 8 µg/mL *versus* a cepa sensível I056 cultivada na ausência de Polimixina B e a cepa C345 à (8 µg/mL) *versus* I056 cultivada à (2 µg/mL).

A análise de enriquecimento funcional demonstrou que para todas as comparações realizadas, a cepa resistente C345 apresentou superexpressão para o grupo de genes relacionados a exportação transmembrana de drogas, sendo a única dentre todas as categoria superexpressa na cepa C345 resistente a ser observada em todas as estratégias de análise realizadas (Quadro 2). Demais categorias hiperexpressas identificadas incluíram componentes de membrana, metabolismo da arginina e da prolina, regulação da transcrição, processos de tradução e componentes do ribossomo, beta-oxidação de ácidos graxos e atividade de enoil-CoA hidratase.

Algumas categorias como processo catabólico de fenilacetato, metabolismo da fenilalanina, fosforilação oxidativa, metabolismo lipídico e processo biossintético do glutamato encontravam-se regulados negativamente na cepa C345.

Quadro 2 – Resultado da análise de enriquecimento funcional de categorias do Gene Ontology (GO) para comparações entre as cepas I056 (PolS) C345 (PolR)

(continua)

C345 (0 µg/mL) x I056 (0 µg/mL)				
DEGS	Categoria	Termo <i>Gene Ontology</i>	<i>P value</i>	<i>Enrichment Score</i>
DOWN	PB	Processo catabólico de fenilacetato	5.9E-11	6.26
	KEGG_Pathway	Metabolismo da fenilalanina	3.3E-7	
	PB	Fosforilação oxidativa	8.4E-3	1.48
	CC	Complexo de citocromo	1.1E-2	
	FM	Ligação a DNA de sequência específica	3.8E-2	
UP	PB	Exportação transmembrana de drogas / resposta a antibióticos	1.9E-6	3.3
	CC	Componente integral da membrana	1.6E-4	2.97
	KEGG_Pathway	Metabolismo da arginina e da prolina	4.2E-2	1.75
	FM	Atividade do transportador transmembrana de aminoácidos	3.4E-2	1.21
	FM	Atividade do fator de transcrição	2.4E-2	0.99
	PB	Regulação negativa da transcrição	3.9E-2	
C345 (2 µg/mL) x I056 (2 µg/mL)				
DEGS	Categoria	Termo <i>Gene Ontology</i>	<i>P value</i>	<i>Enrichment Score</i>
DOWN	BP	Processo catabólico de fenilacetato	2.9E-15	7.86
	KEGG_Pathway	Metabolismo da fenilalanina	2.0E-8	
	BP	Desintoxicação celular	4.6E-4	2.04
	BP	Processo metabólico do enxofre	1.6E-3	1.89
	BP	Transporte de alcanossulfonato	8.1E-3	
	BP	Regulação positiva da transcrição	5.5E-3	1.52
	MF	Complexo proteína-DNA	3.1E-2	
	MF	Ligação a DNA de sequência específica	1.5E-3	
	BP	Metabolismo lipídico	7.2E-2	0,9
UP	BP	Tradução	3.4E-8	4.84
	MF	Constituinte estrutural do ribossomo	5.1E-7	
	MF	Ligação de RNA	1.1E-5	2.47
	BP	Exportação transmembrana de drogas / resposta a antibióticos	2.5E-4	
	BP	Processo biossintético de nucleotídeos de purina	5.3E-3	
	MF	Enovelamento de proteínas	1.1E-2	
1.27				
C345 (8 µg/mL) x I056 (0 µg/mL)				
DEGS	Categoria	Termo <i>Gene Ontology</i>	<i>P value</i>	<i>Enrichment Score</i>
DOWN	BP	Processo metabólico do enxofre	6.5E-4	1.86
	BP	Fosforilação oxidativa	8.7E-3	1.45
	CC	Complexo de citocromo	1.3E-2	
	BP	Processo biossintético do glutamato	1.3E-2	1.23
	MF	Ligação a DNA de sequência específica	3.8E-3	1.04
UP	BP	Exportação transmembrana de drogas / resposta a antibióticos	2.3E-6	2.45
	BP	Beta-oxidação de ácidos graxos	1.2E-4	2.19
	BP	Processo catabólico de fenilacetato	1.2E-4	
	KEGG_Pathway	Metabolismo da fenilalanina	1.3E-3	
	MF	Atividade de enoil-CoA hidratase	7.1E-3	2.05
	KEGG_Pathway	Metabolismo da arginina e da prolina	3.1E-3	
	CC	Complexo proteína-DNA	4.1E-2	1.15

Quadro 3 – Resultado da análise de enriquecimento funcional de categorias do Gene Ontology (GO) para comparações entre as cepas I056 (PolS) C345 (PolR)

(conclusão)

C345 (8 µg/mL) x I056 (2 µg/mL)				
DEGS	Categoria	Termo <i>Gene Ontology</i>	<i>P value</i>	<i>Enrichment Score</i>
DOWN	BP	Processo catabólico de fenilacetato	4.1E-15	7.75
	KEGG	Metabolismo da fenilalanina	3.7E-8	
UP	BP	Processo metabólico do enxofre	1.8E-3	1.84
	MF	Ligação a DNA de sequência específica	1.7E-3	1.15
	BP	Regulação positiva da transcrição	2.0E-2	1.14
	BP	Exportação transmembrana de drogas / resposta a antibióticos	8.6E-5	2.86
	BP	Processo biossintético de nucleotídeos de purina	2.7E-3	1.62
	KEGG	Metabolismo da arginina e da prolina	1.8E-1	1.53
	BP	Enovelamento de proteínas	2.0E-2	1.5
	BP	Tradução	8.7E-4	1.33
CC	Ribossomo	2.0E-2		
BP	Transporte de aminoácidos	2.7E-2	1.02	

Fonte: A autora

Legenda: BP: processos biológicos; CC: componente celular; MF: função molecular

Na segunda estratégia os isolados foram comparados entre si na ausência versus presença de condição subinibitória de Polimixina B para cada uma das cepas analisadas. Os grupos gênicos relacionados ao processo catabólico de fenilacetato, metabolismo da fenilalanina e atividade de enoil-CoA hidratase encontraram-se reguladas negativamente em ambas as cepas I056 e C345 cultivadas na ausência de polimixina. Genes envolvidos na regulação da transcrição, metabolismo da alanina, aspartato e glutamato apresentaram-se superexpressos na cepa C345 em cultivo sem a presença de Polimixina B, em comparação a cepa cultivada sob uma concentração de 8 µg/mL do antibiótico (Quadro 3).

Quadro 4 – Resultado da análise de enriquecimento funcional de categorias do Gene Ontology (GO) com as cepas I056 (PolS) C345 (PolR) comparadas entre si

C345 (0 µg/mL) x C345 (8 µg/mL)				
DEGS	Categoria	Termo <i>Gene Ontology</i>	<i>P value</i>	<i>Enrichment Score</i>
DOWN	BP	Processo catabólico de fenilacetato	7.8E-24	12.14
	KEGG_Pathway	Metabolismo da fenilalanina	4.7E-18	
	MF	Atividade de enoil-CoA hidratase	1.5E-3	1.16
UP	BP	Regulação da transcrição	5.4E-3	1.91
	KEGG_Pathway	Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato	2.1E-2	0.47
I056 (0 µg/mL) x I056 (2 µg/mL)				
DEGS	Categoria	Termo <i>Gene Ontology</i>	<i>P value</i>	<i>Enrichment Score</i>
DOWN	BP	Processo catabólico de fenilacetato	1.4E-20	9.67
	KEGG_Pathway	Metabolismo da fenilalanina	2.4E-13	
	BP	Desintoxicação celular	2.2E-3	0.95
	MF	Atividade de enoil-CoA hidratase	4.9E-3	
UP	BP	Tradução	1.1E-28	19.14
	MF	Constituinte estrutural do ribossomo	4.5E-25	1.17
	MF	Atividade da Ligase	9.3E-3	

Fonte: A autora

Legenda: BP: processos biológicos; CC: componente celular; MF: função molecular

Tendo em vista o mecanismo de ação da polimixina na membrana externa bacteriana, os genes pertencentes ao grupo GO de exportação transmembrana de drogas superexpressos para a cepa resistente C345 quando comparada a I056 nas diferentes condições foram investigados. Os genes *macA*, *mprA*, além dos componentes do complexo EmrAB e EmrKY tiveram a expressão aumentada em todas as estratégias de comparação avaliadas. O gene *acrA* foi encontrado superexpresso quando comparadas as cepas C345 *versus* I056 cultivadas a 2 µg/mL de Polimixina B, C345 cultivada a 8 µg/mL *versus* I056 na ausência do antibiótico e C345 a 8 µg/mL *versus* I056 cultivada a 2 µg/mL. Os genes *rpmG* e *bacA* estavam regulados positivamente exclusivamente quando analisada a comparação C345 *versus* I056 cultivadas a 2 µg/mL e C345 cultivada a 8 µg/mL *versus* I056 à 2 µg/mL, enquanto o gene *parE* foi regulado positivamente apenas na estratégia de comparação C345 *versus* I056, ambas cultivadas a 2 µg/mL (Quadro 4).

Quadro 5 – Genes hiperexpressos na cepa resistente C345 de *A. baumannii* relacionados à exportação transmembrana de drogas

	Genes hiperexpressos
C345 (0 µg/mL) x I056 (0 µg/mL)	<i>macA</i> <i>mprA</i> <i>emrA</i> <i>emrB</i> <i>emrK</i> <i>emrY</i> <i>ybhR</i> <i>ybhS</i>
C345 (2 µg/mL) x I056 (2 µg/mL)	<i>macA</i> <i>mprA</i> <i>emrA</i> <i>emrB</i> <i>emrK</i> <i>emrY</i> <i>ybhR</i> <i>ybhS</i> <i>rpmG</i> <i>parE</i> <i>acrA</i> <i>bacA</i>
C345 (8 µg/mL) x I056 (0 µg/mL)	<i>macA</i> <i>mprA</i> <i>emrA</i> <i>emrB</i> <i>emrK</i> <i>emrY</i> <i>ybhR</i> <i>ybhS</i> <i>acrA</i>
C345 (8 µg/mL) x I056 (2 µg/mL)	<i>macA</i> <i>mprA</i> <i>emrA</i> <i>emrB</i> <i>emrK</i> <i>emrY</i> <i>ybhR</i> <i>ybhS</i> <i>rpmG</i> <i>bacA</i> <i>acrA</i>

Fonte: A autora

6 DISCUSSÃO

Acinetobacter baumannii causa uma série de infecções, incluindo infecções do trato urinário, osteomielite, endocardite, meningite, infecções de cicatrizes e feridas, pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções do trato respiratório e septicemia. Essas infecções são a principal fonte de efeitos potencialmente fatais em pacientes hospitalizados atribuída à sua alta capacidade de formar biofilmes e desenvolver resistência contra vários antibióticos. É um patógeno oportunista intrinsecamente resistente a muitos antibióticos, além de obter a capacidade de adquirir resistência a diversos os antibióticos. As cepas clínicas I056 e C345 de *A. baumannii* do presente estudo foram isoladas em Hospital Universitário pertencente ao complexo médico-hospitalar da Universidade Federal do Rio de Janeiro, do mesmo paciente, praticamente no mesmo momento e de sítios de infecção distintos (sangue e secreção traqueal, respectivamente). Tais cepas apresentavam estreita relação epidemiológica, no entanto, apresentaram diferença com relação à resistência à polimixina.

Até alguns anos atrás, a resistência à polimixina era um evento incomum, no entanto, cepas clínicas de *A. baumannii* apresentam cada vez mais elevadas taxas de sobrevivência frente à essa classe de antibióticos, o que pode estar associado à sua alta competência, plasticidade genômica e capacidade de transferência horizontal de genes (BOUVIER et al, 2021; JABEEN et al, 2021; SHIN; PARK; PARK, 2020). O presente estudo observou uma CIM para Polimixina B de 2 µg/mL para a cepa sensível I056 e 16 µg/mL para a cepa resistente C345, apresentando valores compatíveis com as taxas de resistência descritas comumente na prática clínica em trabalhos realizados em diferentes centros hospitalares do Brasil que visaram o estudo de isolados clínicos, sendo observada variações na CIM de polimixina de 4 a 128 µg/mL para os diversos isolados de *A. baumannii* (CARRASCO et al. 2021, FEDRIGO et al.,2021; GENTELUCI et al., 2020).

Os dados para a análise da sobrevivência relativa à polimixina dos isolados I056 e C345 puderam reforçar o resultado detectado através da MIC para ambas as cepas, onde pôde ser observado o crescimento de colônias até a concentração de 16 µg/mL para a cepa C345, confirmando sua resistência à polimixina. Atualmente, os antibióticos polimixina (colistina e Polimixina B) representam o último recurso para o tratamento de infecções graves por Gram-negativos, isso impõe um esforço significativo para manter as propriedades antibacterianas desses antibióticos. O aumento constante das taxas de resistência à essa classe de antibióticos é um ponto crítico para a prática clínica, uma vez

que é crucial otimizar o uso desses antimicrobianos, maximizando sua eficácia e minimizando o surgimento de resistência (TREBOSC et al, 2019; SHARAFI; ARDEBILI, 2019).

O crescimento bacteriano geralmente mostra uma fase em que a taxa de crescimento específica começa em um valor de zero e depois acelera até um valor máximo em um determinado período de tempo. Além disso, as curvas de crescimento contêm uma fase final na qual a taxa diminui e finalmente chega a zero, de modo que uma assíntota é alcançada. Geralmente essas mudanças na taxa de crescimento resultam em uma curva sigmoidal, com uma fase lag logo após $t = 0$ (tempo zero), seguida por uma fase exponencial e por fim, uma fase estacionária (HALMI et al, 2014). Em relação a taxa de crescimento bacteriano, não foram observadas diferenças entre as cepas I056 (PolS) e C345 (PolR), ambas atingiram sua fase estacionária em um período de 12 horas de crescimento sob condições normais de cultivo ($35 \pm 2^\circ \text{C}$), esses dados foram compatíveis com outros estudos de fenótipo bacteriano, que observaram que a cepa ATCC 17978 e outras cepas clínicas de *A. baumannii* atingiram sua fase estacionária em um período de aproximadamente 12 horas de cultivo, indicando que ambos os isolados avaliados no presente estudo apresentam taxa de crescimento característica e compatível com demais cepas de *A. baumannii* de diferentes linhagens laboratoriais e clínicas (NG et al, 2019; SUN; XIANG. 2021).

Apesar de uma ligação direta entre resposta ao estresse e determinantes de resistência bacteriana em muitos casos, o presente estudo não observou diferença na resposta das cepas I056 (PolS) e C345 (PolR) frente a exposição a diferentes agentes estressantes, com exceção do cultivo à 50°C , ambas as cepas foram capazes de crescer igualmente sob todas as condições de estresse a que foram expostas. Esse fato pode se dar pela capacidade que cepas clínicas de *A. baumannii* tem de persistir no hospedeiro humano e no ambiente médico, onde encontra uma infinidade de estressores independente do fenótipo MDR, estudos indicam que *A. baumannii* está entre as espécies mais comumente envolvidas em infecções hospitalares e pacientes colonizados ou infectados por uma determinada cepa de *A. baumannii* podem carregar o patógeno em diferentes locais do corpo por períodos de dias a semanas, além da capacidade de cepas clínicas de *A. baumannii* sobreviverem por mais de 30 dias em superfícies abióticas secas (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; FIESTER; ACTIS, 2013).

Apesar dos resultados do presente estudo serem concordantes, é importante destacar a presença de possíveis limitações técnicas que envolvem os testes de

crescimento bacteriano com polimixinas que podem ser responsáveis pela alta taxa de variabilidade nos resultados da CIM para este antibiótico. Fatores que incluem heterogeneidade entre as diferentes marcas, fabricantes e formulações, ligação de drogas a materiais plásticos, variação entre as marcas na composição de cátions de meios de MH, a potencial atividade antimicrobiana de aditivos (por exemplo, polissorbato-80, soro e proteínas) para reduzir a adesão do fármaco às microplacas e a presença de fenômeno “*skipped well*”, que se refere a observação de um poço sem crescimento, apesar da ocorrência de crescimento em poços com maiores concentrações podem ser responsáveis pelo insucesso e/ou variabilidade nos testes com polimixina (SHARAFI; ARDEBILI, 2019).

A propriedade policatiônica inerente as polimixinas, as faz aderir a uma ampla gama de materiais, incluindo plásticos usados em laboratórios de microbiologia. Isso faz com que o antibiótico seja perdido consideravelmente durante os experimentos *in vitro*, resultando em dados muitas vezes variáveis de procedimentos laboratoriais padrão. Embora sejam potencialmente graves, tais implicações ainda não são bem caracterizadas na comunidade científica ou literatura, embora cada vez mais diversos estudos tenham abordado estas características inerentes à polimixina. Até o momento não existem normas específicas que possam eliminar tais vieses nos testes de sensibilidade à polimixina, no entanto, sugere-se que a utilização de microplacas de superfície de baixa ligação ou não ligação às proteínas, como as microplacas de vidro, ou a realização do teste de CIM com a presença de um surfactante como polissorbato 80 nas soluções estoque, diluições e meio de crescimento podem ser úteis na diminuição de taxas de erros. Em um estudo realizado com duas cepas de controle de qualidade sensíveis à polimixina, foram medidas as CIM para este antibiótico na presença e ausência de polissorbato 80. A presença de polissorbato 80 teve um efeito consistente na redução do valor da CIM de ambos os isolados testados (NATION et al, 2015; SHARAFI; ARDEBILI, 2019; SINGHAL et al, 2018)

Em *A. baumannii*, a resistência às polimixinas resulta principalmente de modificações do LPS presente na membrana externa bacteriana. Essas modificações correspondem principalmente à adição do grupo catiônico pETN no lipídio A associado a mutações no operon PmrCAB e perda ou redução na síntese de LPS como resultado de mutações no operon LpxCAD (LIMA et al, 2020). Outros mecanismos de resistência às polimixinas conhecidos em cepas de *A. baumannii* incluem a redução na síntese de biotina, um cofator importante para produção de LPS e para a susceptibilidade à

polimixina, devido à deleções no gene *lpsB* que codifica uma glicosiltransferase envolvida na síntese de biotina. Mutações no gene *vacJ*, uma vez que VacJ é uma lipoproteína de membrana externa altamente conservada e amplamente distribuída, importante para a virulência em vários patógenos Gram-negativos e responsável pela simetria da membrana externa bacteriana. O gene *lptD*, responsável pela inserção de LPS na membrana externa bacteriana, também encontra-se implicado na resistência à polimixina. Estudos verificaram que a perda desse gene causa uma diminuição significativa na quantidade de LPS associado a células, comprometendo a integridade do envelope celular, levando a uma diminuição na suscetibilidade à Polimixina B (RICHIE et al, 2016; KYRIAKIDIS et al, 2021; MOURARECK et al, 2020).

A análise genômica das cepas I056 (PoIS) e C345 (PoIR) não revelou nenhuma modificação estrutural ou diferença entre as sequências do DNA de ambas as cepas que pudesse justificar a diferença no perfil de resistência à Polimixina B seja de mecanismos já estabelecidos ou desconhecidos. Ambas as cepas pertencem ao mesmo ST: ST514^B/ST103^P e a distribuição de conjuntos de proteínas específicas é idêntica para as cepas estudadas, onde ambas possuem 33 subsistemas e 119 genes relacionados a resposta ao estresse e virulência. Nenhuma das análises realizadas identificou a presença de qualquer gene ou modificação que pudesse justificar a resistência à polimixina da cepa C345.

Estudos de transcriptoma podem conferir informações relevantes sobre os processos biológicos que resultam na resistência bacteriana em cepas incomuns, como é o caso dos dois isolados avaliados no presente estudo, tais estudos podem detectar potenciais alvos terapêuticos e colaborar no direcionamento do combate à resistência. O papel do transcriptoma na fisiologia bacteriana e nos mecanismos de resistência antimicrobiana está se tornando cada vez mais claro. Estudos anteriores já chamaram atenção para a contribuição do transcriptoma no mecanismo de resistência à polimixina (CAFISO et al, 2019; HENRY et al, 2011). Isolados clínicos intimamente relacionados como é o caso das cepas I056 e C345 podem ter perfis transcricionais muito diferentes e alterações transcricionais podem surgir ao longo do período de infecção do paciente uma vez que as bactérias podem apresentar alterações fisiológicas alterando o padrão global de expressão gênica em resposta à baixa concentração de antibióticos (HEO et al, 2014).

A análise genômica dos isolados clínicos I056 e C345 não foi capaz de detectar nenhuma mutação que pudesse justificar a divergência na susceptibilidade à polimixina apresentada, sendo então necessários estudos mais aprofundados com foco na expressão

gênica dessas cepas que pudessem esclarecer e possivelmente apontar vias de interesse. Para isso, o RNA dessas cepas foi sequenciado utilizando estratégias de exposição a diferentes concentrações de polimixina a fim de observar quais alterações poderiam estar relacionadas com a diferença no fenótipo entre as cepas clínicas I056 e C345.

O RNA-seq dos isolados I056 e C345 revelou uma gama de genes diferencialmente expressos (DEGs) para cada uma das estratégias de comparação realizadas. Sabe-se que a expressão gênica varia de acordo com a pressão seletiva a qual o organismo está sendo exposto, o que pode justificar a quantidade de dados gerada. Além de não ser possível realizar uma análise considerando os genes detectados de maneira individual, sabe-se que estes não agem sozinhos. Processos celulares são o resultado de complexas interações entre diferentes genes e moléculas e bases de dados como o *Gene Ontology* e KEGG possibilitam a implementação de uma série de métodos para análise de enriquecimento gênico com o objetivo de identificar grupos diferencialmente expressos (enriquecidos) sob determinadas condições (MOLAN, 2018).

Genes pertencentes ao grupo GO de exportação transmembrana de drogas encontraram-se superexpressos na cepa resistente à polimixina C345 em todas as estratégias de comparação utilizadas frente a cepa sensível I056. Em uma análise mais aprofundada, foi possível observar que os genes *macA*, *mprA*, *emrA*, *emrB*, *emrK*, *emrY*, *ybhR* e *ybhS* foram regulados positivamente no isolado C345 para todas as condições avaliadas. Interessantemente, todos os genes detectados codificam proteínas membros de bombas de efluxo que têm a função de transportar moléculas para o exterior das células, importante fator na resistência à antibióticos.

Bactérias Gram-negativas expressam uma infinidade de bombas de efluxo que são capazes de transportar moléculas estruturalmente variadas, incluindo antibióticos, para fora da célula bacteriana. A presença de transportadores de efluxo de drogas é um problema para o tratamento de infecções bacterianas porque reduz a concentração intracelular de antibiótico, permitindo que as bactérias sobrevivam. A superexpressão de algumas bombas de efluxo pode causar níveis clinicamente relevantes de resistência a antibióticos em patógenos Gram-negativos. Cinco superfamílias de bombas de efluxo multidrogas bacterianas foram identificadas com base na similaridade de sequência, consistindo em MFS (Superfamília Facilitadora Principal), SMR (*Small Multidrug Resistance*), RND (Divisão Celular de Nodulação de Resistência), ABC (Cassete de Ligação de ATP) e MATE (Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas). Várias dessas bombas de efluxo, embora desencadeiem baixos níveis de resistência, são

frequentemente o primeiro passo, eventualmente levando a níveis mais altos de resistência ao adquirir mutações cromossômicas (BLAIR; RICHMOND; PIDDOCK, 2014; FENG et al, 2020).

O gene *macA* codifica a proteína de exportação de macrolídeos MacA envolvida no efluxo de drogas em bactérias Gram-negativas desempenhando o papel de proteína de fusão da membrana periplasmática, mediando a interação entre os componentes da membrana interna e externa do complexo. Faz parte do sistema transportador ABC MacAB-TolC, identificado como o primeiro transportador do tipo ABC envolvido no efluxo de drogas em bactérias Gram-negativas, onde a eficiência catalítica da MacB é fortemente estimulada por MacA. TolC por sua vez, é um importante canal de membrana externa e desempenha um papel importante na excreção de várias moléculas, funciona sempre em combinação com sistemas de transporte e é necessário para a execução da função de diversas bombas de efluxo, incluindo MacAB. Estudos anteriores observaram que o complexo MacAB apesar de não ser essencial para o crescimento em *E. coli*, encontrando-se em níveis muito baixos sob condições laboratoriais padrão tem sua expressão amplamente aumentada em bactérias expostas a estresses, sugerindo que o papel de MacAB no transporte de glicolipídios é necessário apenas sob certas condições, como a pressão exercida pela presença de antibióticos (LU; ZGURSKAYA, 2013; SHI et al, 2019).

O LPS é considerado um substrato fisiológico da bomba MacAB-TolC, a proteína de fusão de membrana MacA possui alta afinidade e liga-se especificamente ao núcleo do LPS, sendo ativada pela ATPase. Shirshikova et al (2021) demonstraram que a ausência da bomba de efluxo MacAB em *Serratia marcescens* aumenta a suscetibilidade a aminoglicosídeos e polimixinas, diminui a motilidade natatória e a capacidade de formação de biofilme (HUANG, et al, 2022; LU; ZGURSKAYA, 2013).

A função da bomba de efluxo MacAB-TolC *A. baumannii* ainda não foi elucidada. No entanto, estudos recentes sugerem um papel importante na resistência a antibióticos. Perfis proteômicos de duas cepas de *A. baumannii* cultivadas em fase estacionária planctônica ou em biofilme sólido-líquido maduro foram comparadas e foi possível observar que a bomba de efluxo MacAB-TolC desempenha um papel essencial na formação do biofilme. Sugere-se que a hiperexpressão de MacAB-TolC ajuda o patógeno a se adaptar às más condições que ocorrem em biofilmes maduros e está envolvida nas respostas ao estresse do envelope que mantêm a rigidez da membrana e conferem resistência ao alto estresse osmótico (HUANG et al, 2022). Outro estudo realizado em *A.*

baumannii com uma cepa deficiente de LPS demonstrou que a expressão de MacAB-TolC foi regulada positivamente entre 28 e 39 vezes nesse organismo. O aumento da expressão desse sistema provavelmente aumenta a taxa de efluxo de compostos tóxicos da célula, ajudando assim a compensar o aumento da permeabilidade da membrana externa bacteriana deficiente em LPS (HENRY, et al, 2011). De maneira semelhante, um estudo anterior também realizado com cepas de *A. baumannii* observou que o tratamento com polimixina induziu a superexpressão de MacAB-tolC como uma resposta de manutenção da parede celular ao estresse do envelope gerado, o que pode corroborar os achados de superexpressão do gene *macA* para a cepa C345 resistente a polimixina e chamar atenção para o fato de que a bomba de efluxo MacAB-TolC pode ajudar *A. baumannii* na desintoxicação celular para persistir e se encaixar em ambientes agressivos. Ainda que os substratos precisos desta bomba ainda precisem ser caracterizados, seu possível papel na manutenção da parede celular está de acordo com sua superexpressão quando as bactérias estão enfrentando antibióticos direcionados à membrana, como a polimixina (HENRY et al, 2021).

Os genes que compõem as bombas de efluxo homólogas EmrKY (*emrK; emrY*) e EmrAB (*emrA; emrB*) pertencentes a família de transportadores de drogas MFS também estavam regulados positivamente na cepa resistente a polimixina C345. Os genes *emrK* e *emrY*, controlados pelo regulador de resposta EvgA, foram detectados inicialmente em 1996, apresentam uma alta similaridade aos genes *emrA* e *emrB*, com 50,4% e 63,3% de identidade de sequência de aminoácidos, respectivamente (TANABE et al, 1997) e compõem a bomba de efluxo EmrKY ainda pouco investigada e relatada na literatura para bactérias Gram-negativas. No entanto, a superexpressão desses genes em condições de estresse já foi previamente detectada em estudos realizados em *E. coli* e *Shigella flexneri*, sugerindo o papel dessa bomba de efluxo na sobrevivência bacteriana (KATO et al, 2000; PASQUA et al, 2019; TANABE et al, 1997).

EmrAB por sua vez, contribui para a adaptação ao estresse osmótico e resistência à polimixina, no entanto, as funções específicas dessa bomba de efluxo são em sua maioria desconhecidas em *A. baumannii*. O operon *emrAB* foi identificado pela primeira vez há 28 anos como conferindo resistência intrínseca de *E. coli* a carbonil-cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) e ácido nalidíxico. Sua superexpressão causa aumento da resistência a uma gama de antibióticos, incluindo as polimixinas. Sugere-se que o transportador EmrB reconhece seus substratos do citoplasma ou do folheto interno da membrana interna, esses substratos são posteriormente liberados no lado periplasmático

dentro do componente adaptador multimérico EmrA, conectado ao conhecido canal de membrana externa TolC, conduzindo os compostos tóxicos através da membrana externa (YOUSEFIAN et al, 2021).

Um trabalho realizado com isolados de *A. baumannii* demonstrou através de análises *in silico*, análise de expressão e ensaio de efluxo que a bomba de efluxo EmrAB fornece uma melhor capacidade de resistir ao estresse osmótico e a vários compostos químicos, incluindo a polimixina, uma vez que um mutante $\Delta emrB$ de *A. baumannii* apresentou diminuição da susceptibilidade a este antibiótico. Ainda não se sabe como o EmrAB bombeia os antibióticos na resistência a polimixina em *A. baumannii*, sugere-se que a sua ação seja similar a RosA/RosB, uma bomba de efluxo regulada por temperatura/sistema antiportador de potássio que pode mediar a resistência a peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs), como a Polimixina B, em *Yersinia*. Este sistema é induzido a 37°C e torna-se um mecanismo crítico de resistência, bombeando os CAMPs e induzindo a acidificação do citoplasma. O pH intracelular mais baixo pode então atuar como um sinal regulatório positivo para a indução de outros mecanismos de resistência a CAMPs. No entanto, estudos futuros são necessários para afirmar se EmrAB atua dessa maneira em *A. baumannii* exposto a polimixina (LIN; LIN; LAN, 2017).

O gene *mprA* (*emrR*) também estava hiperexpresso na cepa C345. MprA pertence à família MarR de reguladores transcricionais, que respondem a uma variedade de compostos fenólicos e são encontrados em espécies gram-positivas e gram-negativas, MprA executa uma co-regulação, regulando negativamente a transcrição de genes que codificam a bomba de efluxo EmrAB, além de reprimir um gene que codifica uma porina de membrana externa (RODIONOV et al, 2001). Interessantemente, MprA, assim como a bomba de efluxo EmrAB, regulada negativamente por essa proteína estavam superexpressos na cepa resistente C345. Uma vez que MprA também regula negativamente porinas de membrana externa, pode-se hipotetizar que esse achado seja devido a uma tentativa da bactéria em fechar os canais de entrada e/ou atuação da polimixina. Além disso, sob condições de estresse oxidativo, a tradução de *mprA* é aumentada pela presença de poliaminas e esse contexto ocasiona a diminuição do percentual de entrada dessa via em bactérias Gram-negativas, podendo ocasionar quadros de resistência a diversos antimicrobianos, incluindo polimixina.

As poliaminas são moléculas essenciais para o crescimento e funções das células normais, interagindo, no meio biológico, com muitas macromoléculas. Como consequência dessas variadas formas de interação, as poliaminas desencadeiam uma

variedade de efeitos celulares, como inibição da porina, ligação ao DNA, estabilização da membrana e resposta ao estresse externo. Um estudo anterior demonstrou que a presença de poliaminas lineares de baixo peso molecular pode resultar em um aumento da CIM de polimixina em até 16 vezes, no entanto, a proteção real das membranas por poliaminas permanece enigmática, sugere-se que, em concentrações suficientes elas podem bloquear as porinas na membrana externa, resultando em permeabilidade de membrana reduzida para antibióticos hidrofóbicos, como as polimixinas. Esses resultados sugerem fortemente que as poliaminas estão envolvidas no alívio do estresse oxidativo através da estimulação da síntese de proteínas membro do modulon de poliaminas, tais como EmrR (LI; BEUERMAN; VERMA, 2020; SAKAMOTO et al, 2015).

Os genes *ybhR* e *ybhS*, parte da bomba de efluxo ABC YbhFSR também estavam regulados positivamente na cepa C345 para todas as estratégias de comparação analisadas. O sistema YbhFSR consiste em três proteínas, YbhF como componente dependente de ATP e YbhRS como componentes de membrana, pouco se sabe a respeito dessa bomba de efluxo, que ainda não foi caracterizada para nenhuma espécie bacteriana, no entanto, estudos relataram o seu envolvimento na resistência à cefoperazona (uma cefalosporina de terceira geração) e tetraciclina em *E. coli*. Através de análise via semelhança de sequência, verificou-se também que o transportador com maior semelhança com YbhFSR em *E. coli* é o transportador de lipoproteína LolCDE, essencial para a liberação de lipoproteínas (YAMANAKA et al, 2016; FENG et al, 2020). Ainda é incerto se YbhS e YbhR são essenciais para o transporte de drogas, sua hiperexpressão na cepa resistente C345 do presente estudo é um importante achado que destaca ainda mais a necessidade de pesquisas subsequentes aprofundadas sobre o papel desse transportador para explicar a sua função como transportador multidrogas ABC.

Estudos futuros sobre os papéis das bombas de efluxo na resistência bacteriana em *A. baumannii* podem ajudar a desenvolver novas estratégias terapêuticas, como por exemplo o projeto de inibidores de bomba de efluxo seguros e de amplo espectro, que seriam ferramentas valiosas na diminuição da resistência e restauração da atividade de antimicrobianos na prática clínica.

O gene *acrA*, por sua vez, estava hiperexpresso na cepa C345 quando cultivada à 2 e 8 µg/mL em comparação a cepa I056. Esse gene codifica a bomba de efluxo AcrAB. Como é o caso de outras bombas de efluxo, AcrAB-TolC compreende uma proteína transportadora (efluxo), AcrB, na membrana interna; um canal de proteína de membrana externa, TolC; e uma proteína acessória periplasmática, AcrA, que consiste em quatro

domínios: α -hairpin, lipoyl, β -barrel e membrana proximal. As bombas de efluxo AcrAB são conhecidas por reconhecer e transportar uma ampla gama de compostos, incluindo antibióticos, sais biliares, corantes e detergentes. Em *E. coli*, AcrAB é uma bomba de limpeza que confere resistência aos antibióticos cloranfenicol, fluoroquinolona, tetraciclina, novobiocina, rifampicina, ácido fusídico, ácido nalidíxico e betalactâmicos (GREEN et al, 2021; SUBHADRA et al, 2020).

Em estudos anteriores, a deleção de *acrA* e/ou *acrB* levou à diminuição da formação de biofilme nos mutantes de deleção, indicando o envolvimento de AcrAB na formação de biofilme em bactérias Gram-negativas, como *Acinetobacter nosocomialis*, *E. coli*, *Klebsiella* e *Salmonella Typhimurium*. Além disso, mutantes Δ *acrA* e Δ *acrB* em *A. nosocomialis* mostraram suscetibilidade à tobramicina, polimixina e acriflavina. Os resultados dos trabalhos citados destacam a importância da administração de antibióticos específicos em conjunto com inibidores de bomba de efluxo (EPIs) para melhorar as estratégias terapêuticas no controle de infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes (SUBHADRA et al, 2020; KVIST et al, 2008; BAUGH et al, 2012; SCHLISSELBERG et al, 2015).

Nas estratégias de comparação C345 (2 μ g/mL) versus I056 (2 μ g/mL) e C345 (8 μ g/mL) versus I056 (2 μ g/mL) foram detectados alguns genes regulados positivamente na cepa resistente C345 específicos para essas condições de cultivo, são eles *rpmG*, *parE* e *bacA*. RpmG apesar de pouco estudada, é amplamente conservada em todas as espécies bacterianas e frequentemente anotada como uma proteína ribossômica bacteriana, codificando a proteína ribossomal L33, no entanto, estudos anteriores observaram que a deleção de *rpmG* em *E. coli* não apresentou efeito discernível na função do ribossomo mas sim no reparo de lesões de DNA, esse achado se assemelha às funções extra-ribossômicas relatadas de proteínas "ribossômicas" em procariontes e eucariotos, inclusive no reparo de DNA, em outros organismos uma dessas proteínas ribossomais incomuns interage fisicamente com uma enzima de reparo de DNA, estimulando sua atividade. No entanto, são necessários mais estudos a cerca das funções extras dessas proteínas, tais como RpmG para afirmar com certeza seu papel no reparo de DNA e como isso contribui para a resistência à antibióticos (BOLT et al, 2016).

Interessantemente, *parE* e *bacA*, que codificam duas topoisomerases tipo IV, também encontraram-se reguladas positivamente na cepa resistente C345 cultivada na presença de polimixina. As topoisomerases são enzimas onipresentes necessárias de modo geral para induzir quebras de fita no DNA, controlando a interligação e a torção

das moléculas de DNA. Até o momento, quatro topoisomerases foram identificadas em bactérias (I, II, III e IV). A topoisomerase IV é essencial para a segregação cromossômica e relaxa o DNA duplex superenrolado, o que favorece a separação das fitas e a replicação, transcrição, recombinação e o reparo do DNA. A sua hiperexpressão na cepa resistente C345 pode se dar justamente pela necessidade da célula em ativar outros processos regulatórios e de transcrição/tradução gênica na presença de polimixina (URUSHIBARA et al, 2017).

Devido à presença presumida das topoisomerases em todas as bactérias e, em alguns casos, seus papéis essenciais dentro da célula bacteriana, essas enzimas são alvos atraentes para a terapia antibacteriana, e tanto a natureza quanto a indústria farmacêutica têm sido bem-sucedidas em explorá-las para esse fim, uma vez que tais enzimas estão criticamente envolvidas no controle do superenrolamento do DNA e na segregação cromossômica durante a replicação e, conseqüentemente, a sua inibição enzimática é letal para a célula bacteriana. (HOOPER, 1998; URUSHIBARA et al, 2017).

O domínio ATPase contendo subunidades de *gyrB* (uma topoisomerase tipo II) e *parE*, por exemplo tem sido reconhecido há muito tempo como alvos antibacterianos, uma vez que existem indícios de que ambas enzimas atuam em conjunto. Os inibidores dessas enzimas se qualificariam como inibidores de alvo duplo, reduzindo potencialmente a frequência de resistência. No entanto, a maioria dos inibidores GyrB/ParE conhecidos possui atividade Gram-positiva com atividade limitada ou nenhuma contra bactérias Gram-negativas. O principal desafio se dá pelo fato de por serem alvos citoplasmáticos, os potenciais inibidores dessas enzimas precisam atravessar a membrana externa assimétrica, o espaço periplasmático e, finalmente, a membrana interna para atingir os alvos em bactérias Gram-negativas, além dos mecanismos de efluxo eficientes para a remoção de agentes antibacterianos do citoplasma presentes nessas bactérias. Tais desafios tomados em conjunto, exigem propriedades físico-químicas ideais para que um determinado composto apresente um efeito antibacteriano eficaz e estudos realizados já demonstram que é possível obter compostos com atividade inibidora eficaz contra espécies Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (HO et al, 2018). A superexpressão de genes que codificam topoisomerases tipo IV, incluindo *parE* na cepa C345 resistente à polimixina pode ser um achado interessante em relação ao papel dessas enzimas na resistência bacteriana e lançar mão de estudos que busquem entender e buscar compostos que atuem diretamente nessas topoisomerases podem ser úteis no combate à bactérias clínicas MDR.

No presente trabalho, análises fenotípicas, genotípicas e transcriptômicas foram combinadas com o objetivo de melhorar a compreensão acerca dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de heteroresistência à polimixina de cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* e possibilitar a descoberta de novos potenciais marcadores moleculares associados à progressão da resistência. As diferentes vias (bombas de efluxo, proteínas ribossômicas e topoisomerasas) hiperexpressas na cepa C345 resistente à polimixina podem representar novos alvos de estudos que busquem compreender os mecanismos por trás da resistência à polimixina e chamar a atenção para o possível envolvimento de genes não somente relacionados à porinas e proteínas de membrana, como também genes que regulam operons inteiros.

7 CONCLUSÃO

- a) As cepas clínicas I056 e C345, embora intimamente relacionadas, apresentam diferente perfil de resistência frente à Polimixina B;
- b) A diferença no perfil de resistência frente à Polimixina B não exerce influência no padrão de crescimento sob condições normais ou de estresse bacteriano avaliados das cepas I056 (PolS) e C345 (PolR);
- c) A cepa C345 (PolR) apresentou maior taxa de crescimento frente à Polimixina B quando comparada com a cepa I056 (PolS);
- d) Não foi detectada a presença de nenhum dos mecanismos mais comumente relacionados à resistência à Polimixina B ou nenhuma diferença entre os genomas dos isolados I056 (PolS) e C345 (PolR) que pudesse justificar o distinto perfil de resistência frente à Polimixina B;
- e) Uma gama de genes diferencialmente expressos puderam ser detectados entre as cepas I056 (PolS) e C345 (PolR), especialmente genes que codificam bombas de efluxo, uma proteína ribossômica, com possível papel no reparo de DNA e enzimas topoisomerasas IV.
- f) Os genes hiperexpressos na cepa C345 (PolR), codificam proteínas ainda pouco estudadas em *A. baumannii*, mas com potencial importância na resistência à Polimixina B e outros antibióticos.

REFERÊNCIAS

- ALMASAUDI, S. B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi Journal of Biological Sciences, Riyadh, v. 25, p. 586-596, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5910652/pdf/main.pdf>. Acesso em 15 jul. 2022.
- AMIN, S. V. et al. Novel small RNA (sRNA) landscape of the starvation-stress response transcriptome of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. RNA Biology, Londres, v. 13, n. 3, p. 331–342, 2016. Disponível em: [ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4829330/pdf/krn-13-03-1144010.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4829330/pdf/krn-13-03-1144010.pdf). Acesso em 10 jul. 2022.
- AMORIM, A. M. B.; NASCIMENTO, J. S. *Acinetobacter*: an underrated foodborne pathogen? The Journal of Infection in Developing Countries, Sassari, v. 11, n. 2, p. 111-114, 2017. Disponível em: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/28248670/1655>. Acesso em: 16 jul. 2022.
- ANDRADE, J. M. et al. The RNA -binding protein Hfq is important for ribosome biogenesis and affects translation fidelity. The EMBO Journal, Heidelberg, v. 37, n. 11, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983149/>. Acesso em: 16 jun. 2022.
- ANDRADE, J. M. et al. The crucial role of PNPase in the degradation of small RNAs that are not associated with Hfq. RNA, Cambridge, v. 18, n. 4, p. 844–855, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312570/pdf/844.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2022.
- ANTUNES, L. C. S.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii* : evolution of a global pathogen. Pathogens and Disease, Cambridge, v. 71, n. 3, p. 292–301, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article/71/3/292/475786>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- ARANDA, J. et al. A rapid and simple method for constructing stable mutants of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiology, Londres, v. 10, p. 279, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2993698/>. Acesso em: 22 jun. 2022.

ASHBURNER, M. Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nature Genetics, Nova Iorque, v. 25, n. 1, p. 25-29, 2000. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3037419/pdf/nihms-269796.pdf>.

Acesso em: 26 jul. 2022.

ASIF, M.; ALVI, I. A.; REHMAN, S. U. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. Infection and Drug Resistance, Auckland, v. 11, p. 1249-1260, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6110297/pdf/idr-11-1249.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2022.

ATTIA, A. S. et al, *Moraxella catarrhalis* expresses an unusual Hfq protein. Infection and Immunity, Washington v. 76, n. 6, p. 2520-2530, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2423088/pdf/1652-07.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2022.

BANKEVICH, A., et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology, New Rochelle, v. 19, n. 5, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3342519/pdf/cmb.2012.0021.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2022

BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. International Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdam, v. 48, n. 6, p. 583–591, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857916301935?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jul. 2022.

BAUGH, S. et al. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* results in impaired ability to form a biofilm. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Birmingham, v. 67, n. 10, p. 2409-2417, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/67/10/2409/723887>. Acesso em: 26 jul. 2022.

BAYLISS C. D. et al. Simple sequence repeats (microsatellites): mutational mechanisms and contributions to bacterial pathogenesis. A meeting review. Immunology and Medical Microbiology, Frankfurt, v. 40, p. 11-19, 2003. Disponível

em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928824403003250>. Acesso em: 20 jul. 2022.

BECEIRO, A. et al. Biological Cost of Different Mechanisms of Colistin Resistance and Their Impact on Virulence in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Houston v. 58, n. 1, p. 518-526, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910726/pdf/zac518.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2022.

BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 9, n. 2, p. 148-165, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172888/>. Acesso em: 09 jul. 2022.

BERRY, K. E.; HOCHSCHILD, A. A bacterial three-hybrid assay detects *Escherichia coli* Hfq-sRNA interactions in vivo. Nucleic Acids Research, v. 46, n. 2, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5778611/>. Acesso em: 25 jul. 2022.

BHATT, S. et al. Hfq and three Hfq-dependent small regulatory RNAs-MgrR, RyhB and McaS-coregulate the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic *Escherichia coli*. Pathogens and Disease, Delft, v. 75, n. 1, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article/75/1/ftw113/2670550>. Acesso em: 15 jun. 2022.

BICHARA, M.; WAGNER, J.; LAMBERT, I. B. Mechanisms of tandem repeat Instability in bacteria. Mutation Research, Amsterdam, v. 598, p. 144-163, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0027510706000522?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jul. 2022.

BLAIR, J. M. A.; RICHMOND, G. E.; PIDDOCK, L. J. V. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. Future Microbiology, Londres, V. 9, N. 10, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25405886/>. Acesso em: 03 jul. 2022.

BOHN, C.; RIGOULAY, C.; BOULOC, P. No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiology, Londres, v. 7, p. 1–9, 2007. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1800855/pdf/1471-2180-7-10.pdf>.

Acesso em: 23 jul. 2022.

BOINETT, C. J. et al. Clinical and laboratory-induced colistin-resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii*. Microbial Genomics, Londres, v. 5, n. 2, p. 1–10, 2019.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6421349/>. Acesso em: 04 jul. 2022.

BOLT, E. L. et al. Identification of *Escherichia coli* ygaQ and rpmG as novel mitomycin C resistance factors implicated in DNA repair. Bioscience Reports, Londres, v. 36, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4725251/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

BOUVIER, M. et al. RapidResa Polymyxin Acinetobacter NP® Test for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antibiotics, Basel, v. 10, n. 5, 2021. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8150362/>. Acesso em: 05 jul. 2022.

BROVEDAN, M. A. et al. What do we know about plasmids carried by members of the *Acinetobacter* genus? World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v. 36, n. 109, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-020-02890-7>. Acesso em: 06 jul. 2022.

BZYMEK M.; LOVETT, S. Instability of repetitive DNA sequences: The role of Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Washington v. 67, n. 7, p. 1607–1615, 2012. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC37438/>. Acesso em: 28 jun. 2022.

CAFISO, V. et al. Colistin Resistant *A. baumannii*: Genomic and Transcriptomic Traits Acquired Under Colistin Therapy. Frontiers in Microbiology, Lausanne v. 7, 2019.

Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03195/full>. Acesso em: 02 jul. 2022.

CAMERON, T. A. et al. Polynucleotide phosphorylase promotes the stability and function of Hfq-binding sRNAs by degrading target mRNA-derived fragments. Nucleic Acids Research, Londres, n. 24, p. 1–17, 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7145675/pdf/gkz616.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2022.

- CAMPANA, E. H. et al. Avaliação das metodologias M.I.C.E.®, Etest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 157–164, 2011. Disponível em:
<https://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/6393/S1676-24442011000200011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- CARRASCO, L. D. M. et al. Polymyxin Resistance Among XDR ST1 Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clone Expanding in a Teaching Hospital. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 12, 2021. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8063854/>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- CASSIR, N.; ROLAIN, J. M.; BROUQUI, P. A new strategy to fight antimicrobial resistance: The revival of old antibiotics. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 5, n. OCT, p. 1–15, 2014. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4202707/>. Acesso em: 27 jun. 2022.
- CDC. Antibiotic Resistance Threats (2013). Disponível em:
<<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf>>. Acesso em: 24/05/2022
- CHAN, J. Z. M. et al. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. BMC Microbiology, Londres, v. 12, p. 2-11, 2012. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3556118/>. Acesso em: 13 jun. 2022.
- CHAO, Y.; VOGEL, J. A 3' UTR-Derived Small RNA Provides the Regulatory Noncoding Arm of the Inner Membrane Stress Response. Molecular Cell, Cambridge, v. 61, n. 3, p. 352–363, 2016. Disponível em:
<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2815%2901005-9>. Acesso em: 10 jun. 2022.
- CHAO, Y.; VOGEL, J. The role of Hfq in bacterial pathogens. Current Opinion in Microbiology, Londres, v. 13, n. 1, p. 24–33, 2010. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527410000032?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jul. 2022
- CHEN, F. et al. Multiple genetic switches spontaneously modulating bacterial mutability. BMC Evolutionary Biology, Londres, v. 10, p. 277, 2010. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2955026/>. Acesso em: 10 jul. 2022.

- CHIANG, M. K. et al. Impact of Hfq on global gene expression and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. PLoS ONE, Sao Francisco, v. 6, n. 7, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3136514/>. Acesso em: 05 jul. 2022.
- CHIN, C. Y. A PmrB-Regulated Deacetylase Required for Lipid A Modification and Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington v. 59, n. 12, p. 7911-7914, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649237/>. Acesso em: 30 jun. 2022.
- CLAUSELL, A. et al. Gram-negative outer and inner membrane models: Insertion of cyclic cationic lipopeptides. Journal of Physical Chemistry B, Washington, v. 111, n. 3, p. 551–563, 2007. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp064757%2B>. Acesso em: 13 jul. 2022.
- CONSALES, G. et al. A multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in intensive care unit: Antimicrobial and organizational strategies. Journal of Critical Care, Filadelfia, v. 26, n. 5, p. 453–459, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0883944110003552?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jul. 2022.
- DAHDOUH, E. et al. A novel mutation in pmrB mediates colistin resistance during therapy of *Acinetobacter baumannii*. International Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdam, v. 49, n. 6, p. 727–733, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092485791730122X?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- DE LAY, N.; SCHU, D. J.; GOTTESMAN, S. Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 288, n. 12, p. 7996–8003, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3605619/>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nature Reviews Microbiology, Londres, v. 5, p. 939-951, 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1789>. Acesso em: 10 jun. 2022.
- DIMASTROGIOVANNI, D. et al. Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein. eLife, Cambridge, v. 3, p. 1–19, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4337610/>. Acesso em: 13 jul. 2022.

DING, Y.; DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates σ E expression. Molecular Microbiology, Nova Iorque, v. 53, n. 1, p. 345–354, 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2958.2004.04142.x>. Acesso em: 10 jul. 2022.

ESTERLY, J. S. et al. Impact of Carbapenem Resistance and Receipt of Active Antimicrobial Therapy on Clinical Outcomes of *Acinetobacter baumannii* Bloodstream Infections. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Washington v. 55, n. 10, p. 4844–4849, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3186964/>. Acesso em: 28 jun. 2022.

FEDRIGO, N. H. et al. Pharmacodynamic evaluation of suppression of in vitro resistance in *Acinetobacter baumannii* strains using polymyxin B-based combination therapy. Scientific Reports, Londres, v. 11, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8167102/>. Acesso em: 06 jun. 2022.

FELICIANO, J. R. et al. Hfq: A multifaceted RNA chaperone involved in virulence. Future Microbiology, Londres, v. 11, n. 1, p. 137–151, 2016. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb.15.128>. Acesso em: 27 jun. 2022.

FENG, Z. et al. A Putative Efflux Transporter of the ABC Family, YbhFSR, in *Escherichia coli* Functions in Tetracycline Efflux and Na⁺(Li⁺)/H⁺ Transport. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7190983/>. Acesso em: 02 jul. 2022.

FERNANDES, M.R., et al. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the mcr-1 Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Houston, v. 60, n. 10, p. 6415–6417, 2016. Disponível em: <https://europepmc.org/article/PMC/5038249>. Acesso em: 19 jul. 2022.

FIESTER, S. E.; ACTIS, L. Stress responses in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. Future Medicine, Londres, v. 8, n. 3, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3638152/>. Acesso em: 02 jun. 2022.

FRÖHLICH, K. S.; FÖRSTNER, K. U.; GITAI, Z. Post-transcriptional gene regulation by an Hfq-independent small RNA in *Caulobacter crescentus*. Nucleic Acids Research,

Londres, v. 46, n. 20, p. 10969–10982, 2018. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6237742/>. Acesso em: 05 jul. 2022.

GADDY, J. A.; ACTIS, L. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation.

Future Microbiology, Londres, v. 4, n. 3, p. 273-278, 2009. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2724675/pdf/nihms119273.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2022.

GELBÍCOVÁ, T., et al. Detection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* with the mcr-4 gene. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, Praha, v. 25, n. 1, p. 4-6, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31266086/>. Acesso em: 23 jun. 2022.

GENTELUCI, G. L. et al. Polymyxin B Heteroresistance and Adaptive Resistance in Multidrug- and Extremely Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Current Microbiology, Nova Iorque, v. 77, p. 2300-2306, 2020. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-020-02064-6>. Acesso em: 22 jun. 2022.

GENUS ACINETOBACTER. Braunschweig, DE: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, 2022. Disponível em:

<https://lpsn.dsmz.de/genus/acinetobacter>. Acesso em: 24 mai. 2022.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K.

Acinetobacter baumannii: a universal threat to public health? International Journal of Antimicrobial Agents, Marseille, v. 32, n. 2, p. 106–119, 2008. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092485790800109X>. Acesso em: 15 jul. 2022.

GIAMMANCO, A. et al. Global Assessment of the Activity of Tigecycline against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens between 2004 and 2014 as Part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. mSphere, Washington, v. 2, n. 1, p. 310-316, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5244261/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

GIRARDELLO, R. et al. Diversity of polymyxin resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Nova Iorque, v. 87, n. 1, p. 37–44, 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889316303352?> Acesso em: 02 jun. 2022.

GIRARDELLO; GALES, 2012. Polymyxins resistance: old antimicrobials, last therapeutic options. Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, Santa Cruz, v. 2, n. 2, p. 66–69, 2012. Disponível em:

<https://doaj.org/article/dab3c09cbfe4417aa73bc5d7b0e3d46d>. Acesso em: 29 jun. 2022.

GORDON, N. C.; WAREHAM, D. W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. International Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdã, v. 35, n. 3, p. 219–226, 2010. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857909005159?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jul. 2022

GOULD, K. Antibiotics: from prehistory to the present day. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Londres, v. 71, p. 572-575, 2016. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jac/article/71/3/572/2364412>. Acesso em: 10 jul. 2022

GREEN, A. T. et al. Discovery of multidrug efflux pump inhibitors with a novel chemical scaffold. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, Amsterdã, v. 1864, n. 6, 2020. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/32032658/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

HALMI, M. I. E. et al. Modeling the growth curves of *Acinetobacter sp.* strain DRY12 grown on diesel. Journal of environmental bioremediation and toxicology, Jalan, v. 2, n. 1, p. 33-37, 2014. Disponível em:

<https://journal.hibiscuspublisher.com/index.php/JEBAT/article/view/143/178>. Acesso em: 15 jun. 2022.

HAMEED, F. et al. Plasmid-mediated mcr-1 gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 52, 2019. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/PZTrM4hfph8NxVyGZ5nYkdv/?lang=en>. Acesso em: 10 jul. 2022.

HARDING, CHRISTIAN M; HENNON. SETH W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. Nature Reviews Microbiology, Londres, v. 16, n. 2, p. 91–102, 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6571207/>. Acesso em: 20 jul. 2022.

- HENRY, R. et al. Colistin-Resistant, Lipopolysaccharide-Deficient *Acinetobacter baumannii* Responds to Lipopolysaccharide Loss through Increased Expression of Genes Involved in the Synthesis and Transport of Lipoproteins, Phospholipids, and Poly-beta-1,6-N-Acetylglucosamine. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, p. 59-69, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3256090/>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- HEO, A. et al. Global Transcriptome and Physiological Responses of *Acinetobacter oleivorans* DR1 Exposed to Distinct Classes of Antibiotics. Plos One, São Francisco, v. 9, n. 10, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4201530/>. Acesso em: 02 jul. 2022.
- HO, S. Y. et al. Discovery of dual GyrB/ParE inhibitors active against Gram-negative bacteria. European Journal of Medicinal Chemistry, Paris, v. 157, n. 5, p. 610-621, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523418306895?via%3Dihub>. Acesso em: 09 jun. 2022.
- HOEKZEMA, M. et al. Hfq-dependent mRNA unfolding promotes sRNA -based inhibition of translation. The EMBO Journal, Eynsham, v. 38, n. 7, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6443205/>. Acesso em: 22 jul. 2022.
- HOOD, M. I., et al. Genetic Determinants of Intrinsic Colistin Tolerance in *Acinetobacter baumannii*. Infection and Immunity, Washington, v. 81, n. 2, p. 542-551, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3553813/pdf/zii542.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2022.
- HOOPER, D. C. Bacterial Topoisomerases, Anti-Topoisomerases, and Anti-Topoisomerase Resistance. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 27, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9710672/>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- HUANG, L. et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. Antibiotics, Basel, v. 11, p. 520, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9032748/>. Acesso em: 23 jul. 2022.
- HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. Current Opinion in Microbiology, Londres, v. 51, p. 72-80, 2019.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527419300190?via%3Dihub>.

Acesso em: 22 jul. 2022.

ISHIKAWA, H. et al. The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' poly(U) tail. RNA, Nova Iorque, v. 18, n. 5, p. 1062–1074, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3334693/pdf/1062.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2022.

JABEEN, F. et al. Antibiotic resistance pattern of *Acinetobacter baumannii* isolated from bacteremia patients in Pakistan. Journal of Ayub Medical College Abbottabad, Abbottabad, v. 34, n. 1, p. 95-100, 2021. Disponível em: <http://jamc.ayubmed.edu.pk/index.php/jamc/article/view/9105/3248>. Acesso em: 20 jun. 2022.

JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. International. Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdã, v. 49, n. 5, p. 526–535, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857917300328?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jul. 2022.

KADAR, B. et al. The Renaissance of Polymyxins. Current Medicinal Chemistry, Schiphol, v. 20, n. 30, p. 3759-3773, 2013. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/55379>. Acesso em: 22 jul. 2022.

KASSAMALI, Z.; JAIN, R.; DANZIGER, L. H. An Update on the arsenal for multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: Polymyxin antibiotics. International Journal of Infectious Diseases, Hamilton, v. 30, p. 125–132, 2015. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(14\)01666-X/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(14)01666-X/fulltext).

KATO, A. et al. Transcription of emrKY is Regulated by the EvgA-EvgS Two-Component System in *Escherichia coli* K-12. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Tóquio, v. 64, n. 6, p. 1203-1209, 2000. Disponível em: <https://academic.oup.com/bbb/article/64/6/1203/5945948?login=false>. Acesso em: 22 jul. 2022.

KAVITA, K.; DE METS, F.; GOTTESMAN, S. New aspects of RNA-based regulation by Hfq and its partner sRNAs. Current Opinion in Microbiology, Londres, v. 42, p. 53–

61, 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527417300401?via%3Dihub>

b. Acesso em: 22 jul. 2022.

KELESIDIS, T.; FALAGAS, M. E. The safety of polymyxin antibiotics. Expert Opinion on Drug Safety, Londres, v. 14, n. 11, p. 1687–1701, 2015. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8082492/pdf/nihms-1691339.pdf>.

Acesso em: 20 jun. 2022.

KIM, T. et al. Systematic analysis of the role of bacterial Hfq-interacting sRNAs in the response to antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Londres, v. 70, n. 6, p. 1659–1668, 2014. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jac/article/70/6/1659/730290?login=false>. Acesso em: 20 jul. 2022.

KULESUS, R. R. et al. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity, Washington, v. 76, n. 7, p. 3019–3026, 2008. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2446724/>. Acesso em: 23 jun. 2022.

KUO, H. Y. et al. Functional characterization of *Acinetobacter baumannii* Lacking the RNA chaperone Hfq. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 8, n. OCT, p. 1–12, 2017.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5663733/>. Acesso em: 23 jul. 2022.

KVIST, M. et al. Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. Applied and Environmental Microbiology, Michigan, v. 74, n. 23, p. 7376-7382, 2008.

Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.01310-08>. Acesso em: 13 jul. 2022.

KWA, A. et al. Polymyxin B: Similarities to and differences from colistin (polymyxin E). Expert Review of Anti-Infective Therapy, Londres, v. 5, n. 5, p. 811–821, 2007.

Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14787210.5.5.811?journalCode=ierz20>.

Acesso em: 02 jul. 2022.

KYRIAKIDIS, I. et al. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. Pathogens, Basel, v. 10, n. 3, 2021. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8003822/>. Acesso em: 10 jul. 2022.

- LALAOUNA, D. et al. Regulatory RNAs Involved in Bacterial Antibiotic Resistance. PLoS Pathogens, São Francisco, v. 10, n. 8, p. 8–10, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4148430/>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Lausanne, v. 7, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5346588/>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- LENHARD, J. R. et al. High-intensity meropenem combinations with polymyxin B: New strategies to overcome carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Londres, v. 72, n. 1, p. 153–165, 2017a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5161044/>. Acesso em: 19 jul. 2022.
- LENHARD, J. R. et al. Polymyxin-resistant, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* is eradicated by a triple combination of agents that lack individual activity. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Londres, v. 72, n. 5, p. 1415–1420, 2017b. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5890697/>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- LI, J.; BEUERMAN, R.; VERMA, C. Mechanism of polyamine induced colistin resistance through electrostatic networks on bacterial outer membranes. Biochim Biophys Acta Biomembranes, Amsterdã, v. 862, n. 9, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273620301280?via%3Dihub>. Acesso em: 03 jul. 2022.
- LI, J. H. et al. Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: roles of two-component systems PhoPQ and PmrAB. Future Microbiology, Londres, v. 15, n. 6, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7236789/>. Acesso em: 10 jul. 2022.
- LIMA, W. G. Rate of polymyxin resistance among *Acinetobacter baumannii* recovered from hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Berlin, v. 39, p. 1427-1438, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-020-03876-x>. Acesso em: 04 jul. 2022.

- LIN, LAN, 2014. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* : From bench to bedside. World Journal of Clinical Cases, Hong Kong, v. 2, n. 12, p. 787-814, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4266826/pdf/WJCC-2-787.pdf>. Acesso em 11 jul. 2022.
- LIN, M. F. et al. Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii* adeAB genes and its correlation with tigecycline susceptibility. BMC Microbiology, Londres, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4101873/>. Acesso em: 14 jul. 2022.
- LIN, M. F.; LIN, Y. Y.; LAN, C. Y. Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. Journal of Microbiology, Seoul, v. 55, n. 2, p. 130-136, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-017-6408-5>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- LIU, D. et al. Identification of the novel tigecycline resistance gene tet(X6) and its variants in Myroides, Acinetobacter and Proteus of food animal origin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Londres, v. 75, p. 1428-1431, 2020. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/75/6/1428/5739989?login=false>. Acesso em: 24 jul. 2022.
- LIU, D. et al. Intravenous combined with aerosolised polymyxin versus intravenous polymyxin alone in the treatment of pneumonia caused by multidrug-resistant pathogens: A systematic review and meta-analysis. International Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdã, v. 46, n. 6, p. 603–609, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857915003325?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. The Lancet Infectious Diseases, Nova Iorque, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473-3099\(15\)00424-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473-3099(15)00424-7). Acesso em: 12 jul. 2022.
- LOB, S. H. et al. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. International Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdã, v. 47, n. 4, p. 317–323, 2016. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857916300140?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jun. 2022.

LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. New Microbiologica, Pavia, v. 37, p. 119-127, 2014. Disponível em: https://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2014/2/119.pdf. Acesso em: 15 jul. 2022.

LOOVEREN, M. V.; GOOSSENS, H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clinical Microbiology and Infection, v. 10, p. 684-704, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14627658>. Acesso em: 12 jul. 2022.

LU, S.; ZGURSKAYA, H. I. MacA, a Periplasmic Membrane Fusion Protein of the Macrolide Transporter MacAB-TolC, Binds Lipopolysaccharide Core Specifically and with High Affinity. Journal of Bacteriology, Washington, v. 195, n. 21, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3807484/>. Acesso em: 03 jul. 2022.

LUCAS, D. D. et al. Emergence of high-level colistin resistance in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate mediated by inactivation of the global regulator H-NS. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nova Iorque, v. 62, n. 7, p. 1–17, 2018. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/29712662>. Acesso em: 23 jun. 2022.

LUKE, N. R. et al. Identification and Characterization of a Glycosyltransferase Involved in *Acinetobacter baumannii* Lipopolysaccharide Core Biosynthesis. Infection and Immunity, Washington, v. 78, n. 5, p. 2017-2023, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863528/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

MALLI, E. et al. Implementation of the Rapid Polymyxin NP test directly to positive blood cultures bottles. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 95, Nova Iorque, v. 95, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889319306273?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jul. 2022.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. Antimicrobial Resistance: *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 46, n. 8, p. 1254–1263, 2008. Disponível em:

<https://academic.oup.com/cid/article/46/8/1254/362279?login=false>. Acesso em: 23 jun. 2022.

MARTINS, N. et al. Imported and intensive care unit-born *Acinetobacter baumannii* clonal complexes: one-year prospective cohort study in intensive care patients. Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.), Larchmont, v. 19, n. 3, p. 216–23, 2013. Disponível em:

https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2012.0174?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 04 jul. 2022.

MARTINS-SORENSEN, N. A novel plasmid-encoded mcr-4.3 gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Londres, v. 75, n. 1, p. 60-64, 2020. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6910164/>. Acesso em: 06 jul. 2022.

MATEO-ESTRADA, V. et al. Phylogenomics Reveals Clear Cases of Misclassification and Genus-Wide Phylogenetic Markers for *Acinetobacter*. Genome Biology and Evolution, Oxford, v. 11, n. 9, p. 2531-2541, 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6740150/pdf/evz178.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2022.

MCCONNELL, M. J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdã, v. 37, p. 130-155, 2012. Disponível em:

<https://academic.oup.com/femsre/article/37/2/130/622880?login=false>. Acesso em: 26 jun. 2022.

MENDES, C, A. C.; BURDMANN, E. A. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo, v. 55, n. 6, p. 752-759, 2009. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/ramb/a/ZNvsbTFvfcgSYp854CKDVcL/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

MIKULECKY, P. J. et al. Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. Nature structural & molecular biology, Nova Iorque, v. 11, n. 12, p. 1206–1214, 2004. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071270/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

- MOFFATT, J. H. et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 54, n. 12, p. 4971–4977, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2981238/>. Acesso em: 05 jul. 2022.
- MOFFATT, J. H. et al. Insertion sequence ISAba11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 55, n. 6, p. 3022–3024, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3101452/>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- MOHR, K. I. History of Antibiotics Research. Current Topics in Microbiology and Immunology, Heildeberg, v. 398, p. 237-272, 2016. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2016_499. Acesso em: 12 jul. 2022.
- MOLAN, A. L. Construção de uma ferramenta para análise de enriquecimento funcional gênico multiespécie entre amostras comparativas. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de biociências de Botucatu, Botucatu, 2018. Disponível em: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/2633038>. Acesso em: 11 jul. 2022.
- MOOSAVIAN, M.; EMAM, N. The first report of emerging mobilized colistin-resistance (mcr) genes and ERIC-PCR typing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in southwest Iran. Infection and Drug Resistance, Auckland, v. 12, p. 1001-1010, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6500874/>. Acesso em: 03 jul. 2022.
- MORITA, T.; AIBA, H. Mechanism and physiological significance of autoregulation of the *Escherichia coli* HFQ gene. RNA, Nova Iorque, v. 25, n. 2, p. 264–276, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6348989/>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- MOUBARECK, C. A.; HALAT, D. H. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. Antibiotics, Basel, v. 9, n. 119, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7148516/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

- MURINA, V. N.; NIKULIN, A. D. Bacterial Small Regulatory RNAs and Hfq Protein. Biochemistry (Moscow), Moscou, v. 80, n. 13, p. 1647–1654, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0006297915130027>. Acesso em: 19 jul. 2022.
- NANG, S. C. et al. Rescuing the Last-Line Polymyxins: Achievements and Challenges. Pharmacological Reviews, Baltimore, v. 73, n. 2, p. 679-728, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7911091/>. Acesso em: 13 jul. 2022.
- NATION, R. L. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. The Lancet Infectious Diseases, Nova Iorque, v. 15, n. 2, p. 225-234, 2015. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473-3099\(14\)70850-3](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473-3099(14)70850-3). Acesso em: 12 jul. 2022.
- NICOLAOU, K. C., RIGOL, S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. The Journal of Antibiotics, Tóquio, v. 71, p. 153–184, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ja201762>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- NG, C. K. et al. Characterization and Transcriptome Studies of Autoinducer Synthase Gene from Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain 863. Genes, Basel, v. 10, n. 282, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6523755/>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- NWUGO, C. C. et al. Deciphering the iron response in *Acinetobacter baumannii*: A proteomics approach. Journal of Proteomics, Amsterdã, v. 74, n. 1, p. 44–58, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2997898/>. Acesso em: 02 jul. 2022.
- OIKONOMOU, O. et al. Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Greece: Mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. BMC Infectious Diseases, Londres, v. 15, n. 1, p. 13–18, 2015. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1297-x>. Acesso em: 10 jul. 2022.
- OLAITAN, A. O.; LI, J. Emergence of polymyxin resistance in Gram-negative bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents, Filadélfia, v. 48, n. 6, p. 581–582, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11908-017-0596-3>. Acesso em: 19 jul. 2022.

- OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 5, n. November, p. 1–18, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4244539/>. Acesso em: 22 jul. 2022.
- PASQUA, M. et al. The MFS efflux pump EmrKY contributes to the survival of *Shigella* within macrophages. Scientific Reports, Londres, v. 9, 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6393483/pdf/41598_2019_Article_39749.pdf. Acesso em: 12 jul. 2022.
- PELLETIER, M. R. et al. Unique Structural Modifications Are Present in the Lipopolysaccharide from Colistin-Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 57 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811424/>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- PENG, Y. et al. Structural model of an mRNA in complex with the bacterial chaperone Hfq. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, WEashington, v. 111, n. 48, p. 17134–17139, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260595/>. Acesso em: 05 jul. 2022.
- PETERSON, C. N. et al. LrhA Regulates rpoS Translation in Response to the Rcs Phosphorelay System in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, Washington, v. 188, n. 9, p. 3175–3181, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1447435/>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- POGUE, J. M.; COHEN, D. A.; MARCHAIM, D. Editorial commentary: Polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii*: Urgent action needed. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 60, n. 9, p. 1304–1307, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4392843/pdf/civ044.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2022.
- POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Genetic Basis of Antibiotic Resistance in Pathogenic *Acinetobacter* Species. IUBMB Life, Londres, v. 63, v. 12, p. 1061-1067, 2011. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.532>. Acesso em: 10 jul. 2022.
- POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 30, n. 2, p. 557–596, 2017. Disponível

em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5355641/>. Acesso em: 13 jul. 2022.

POURNARAS, S. et al. Growth retardation, reduced invasiveness, and impaired colistin-mediated cell death associated with colistin resistance development in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 58, n. 2, p. 828–832, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910856/>. Acesso em: 13 jul. 2022.

PROVASI CARDOSO, J. et al. Diversity of mechanisms conferring resistance to β -lactams among OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clones. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Stanford, v. 85, n. 1, p. 90–97, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889316000377>. Acesso em: 23 jul. 2022.

QIN, J. et al. Precise Species Identification for *Acinetobacter*: a Genome- Based Study with Description of Two Novel *Acinetobacter* Species. mSystems, Washington, v. 6, v. 3, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8269215/>. Acesso em: 05 jul. 2022.

QUALITY SCORES FOR NEXT-GENERATION SEQUENCING: Assessing sequencing accuracy using Phred quality scoring. San Diego, USA: Illumina, Inc, 2011. Disponível em: https://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf. Acesso em: 11 jul. 2022.

QURESHI, Z. A. et al. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: Beyond carbapenem resistance. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 60, n. 9, p. 1295–1303, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462660/>. Acesso em: 23 jul. 2022.

RANI, F. M. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter baumannii* and non-baumannii *Acinetobacter*s from Terengganu, Malaysia and their carriage of carbapenemase genes. Journal of Medical Microbiology, Londres, v. 67, p. 1538-1543, 2018. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000844#tab2>. Acesso em: 12 jul. 2022.

REUS RODRIGUES PEREZ, L.; LUÍS BARTH, A. Stable polymyxin B susceptibility among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: for how long? Journal of

- Chemotherapy, Florença, v. 29, n. 1, p. 60–61, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/1973947815Y.0000000071?journalCode=yjoc20>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- RICHIE, D. L. et al. Toxic Accumulation of LPS Pathway Intermediates Underlies the Requirement of LpxH for Growth of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Plos One, São Francisco, v. 15, p. 1-22, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4985137/>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- ROCHA, I. V. et al. Ciprofloxacin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 strain carrying the *mcr-1* gene associated with bloodstream infection. International Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdã, v. 49, n. 5, p. 655–656, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092485791730081X?via%3DiHub>. Acesso em: 16 jul. 2022.
- RODIONOV, D. A. et al. Comparative approach to analysis of regulation in complete genomes: multidrug resistance systems in gamma-proteobacteria. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, Wymonham, v. 3, n. 2, p. 319-324, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11321589/>. Acesso em: 12 jun. 2022.
- RODRIGUEZ-SANTIAGO, J. Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas. International Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdã, v. 10, p. 11-58, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857921002041?via%3DiHub>. Acesso em: 26 jun. 2022.
- ROSCETTO, E. et al. Functional characterization of the RNA Chaperone Hfq in the opportunistic human pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Journal of Bacteriology, Washington, v. 194, n. 21, p. 5864–5874, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3486118/>. Acesso em: 14 jul. 2022.
- RUSSO, T. A. The K1 Capsular Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* Strain 307-0294 Is a Major Virulence Factor. Infection and Immunity, Washington, v. 78, n. 9, p. 3993-4000, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937447/>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- SAKAMOTO, A. et al. Three Members of Polyamine Modulon under Oxidative Stress Conditions: Two Transcription Factors (SoxR and EmrR) and a Glutathione Synthetic

- Enzyme (GshA). Plos One, São Francisco, p. 1-15, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4405209/>. Acesso em: 17 jul. 2022.
- SANTIAGO-FRANGOS, A. et al. Acidic C-terminal domains autoregulate the RNA chaperone Hfq. eLife, Cambridge, v. 6, p. 1–25, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5606850/>. Acesso em: 08 jul. 2022.
- SANTIAGO-FRANGOS, A. et al. *Caulobacter crescentus* Hfq structure reveals a conserved mechanism of RNA annealing regulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 166, n. 22, p. 10978–10987, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6561178/>. Acesso em: 29 jun. 2022.
- SCHILLING, D.; GERISCHER, U. The *Acinetobacter baylyi* hfq gene encodes a large protein with an unusual C terminus. Journal of Bacteriology, Washington, v. 191, n. 17, p. 5553–5562, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2725631/>. Acesso em: 17 jul. 2022.
- SCHLISSSELBERG, D. B. et al. Biofilm formation ability of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* *acrAB* mutants. International Journal of Antimicrobial Agents, Marseille, v. 46, n. 4, p. 456-459, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857915002496>. Acesso em: 23 jul. 2022.
- SHARAFI, T.; ARDEBILI, A. Plastic binding feature of polymyxins: the effect on MIC susceptibility measurements. Infection and Drug Resistance, Auckland, v. 12, p. 2649-2653, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6717857/>. Acesso em: 10 jul. 2022.
- SHARMA, A. et al. The unusual glycine-rich C terminus of the *Acinetobacter baumannii* RNA chaperone Hfq plays an important role in bacterial physiology. Journal of Biological Chemistry, Boston, v. 293, n. 35, p. 13377–13388, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820309741>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- SHAVER, A. C.; SNIÉGOWSKI, P. D. Spontaneously Arising *mutL* Mutators in Evolving *Escherichia coli* Populations Are the Result of Changes in Repeat Length. Journal of Bacteriology, Washington, v. 185, n. 20, p. 6076-6082, 2003. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC225017/pdf/0318.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2022.

SHI, Y. Alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay contributes to the high-altitude adaptation of maca (*Lepidium meyenii*). Gene, Amsterdã, v. 694, p. 7-18, 2019. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378-1119\(19\)30082-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378-1119(19)30082-4). Acesso em: 10 jul. 2022.

SHIN, B.; PARK, C.; PARK, W. Stress responses linked to antimicrobial resistance in *Acinetobacter* species. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, V. 104, P. 1423-1435, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-10317-z>. Acesso em: 18 jul. 2022.

SHIN, B.; PARK, W. Antibiotic resistance of pathogenic *Acinetobacter* species and emerging combination therapy. Journal of Microbiology, v. 55, n. 11, p. 837-849, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-017-7288-4>. Acesso em: 19 jul. 2022.

SIMONSEN, K. T. et al. A role for the RNA chaperone Hfq in controlling Adherent-invasive *Escherichia coli* colonization and virulence. PLoS ONE, Washington, v. 6, n. 1, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2446724/>. Acesso em: 13 jul. 2022.

SINGHAL, L. et al. Comparative Evaluation of Broth Microdilution with Polystyrene and Glass-Coated Plates, Agar Dilution, E-Test, Vitek, and Disk Diffusion for Susceptibility Testing of Colistin and Polymyxin B on Carbapenem-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Microbial Drug Resistance, Larchmont, v. 24, n. 8, 2018. Disponível em: https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2017.0251?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acesso em: 16 jul. 2022.

SITTKA, A. et al. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. Molecular Microbiology, Oxford, v. 63, n. 1, p. 193–217, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1810395/>. 05 jul. 2022.

SMANI, Y.; DOMINGUEZ-HERRERA, J.; PACHÓN, J. Association of the Outer Membrane Protein Omp33 with Fitness and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 208, p. 1561-1570, 2013. Disponível:

<https://academic.oup.com/jid/article/208/10/1561/840016?login=false>. Acesso em: 09 jul. 2022.

SOBRERO, P.; VALVERDE, C. The bacterial protein Hfq: Much more than a mere RNA-binding factor. Critical Reviews in Microbiology, Glasgow, v. 38, n. 4, p. 276–299, 2012. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/22435753>. Acesso em: 11 jul. 2022.

SONNLEITNER, E. et al. Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. Microbial Pathogenesis, Marseille, v. 35, n. 5, p. 217–228, 2003.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401003001499>. Acesso em: 09 jul. 2022.

SPÍZEK, J. et al. Biogenesis of antibiotics—viewing its history and glimpses of the future. Folia Microbiologica, Praga, v. 61, p. 347–358, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-016-0462-y>. Acesso em: 07 jul. 2022.

STORZ, G.; VOGEL, J.; WASSARMAN, K. M. Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. Molecular Cell, Cambridge, v. 43, n. 6, p. 880–891, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176440/>. Acesso em: 13 jul. 2022.

SUBHADRA, B. et al. Regulation of the AcrAB efflux system by the quorum-sensing regulator AnoR in *Acinetobacter nosocomialis*. Journal of Microbiology, Seoul, v. 58, n. 6, p. 507–518, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-020-0185-2>. Acesso em: 15 jul. 2022.

SUN, X.; XIANG, J. Mechanism Underlying the Role of LuxR Family Transcriptional Regulator abaR in Biofilm Formation by *Acinetobacter baumannii*. Current Microbiology. Nova Iorque, v. 78, p. 3936–3944, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8439540/>. Acesso em: 07 jul. 2022.

TANABE, H. et al. Growth phase-dependent transcription of *emrKY*, a homolog of multidrug efflux *emrAB* genes of *Escherichia coli*, is induced by tetracycline. The Journal of General and Applied Microbiology, Tóquio, v. 43, p. 257–263, 1997. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam1955/43/5/43_5_257/_article. Acesso em: 14 jul. 2022.

- TRAN, T. B. et al. Anthelmintic closantel enhances bacterial killing of polymyxin B against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Antibiotics, Tóquio v. 69, n. 6, p. 415–421, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4911330/pdf/nihms737689.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2022.
- TREBOSC, V. et al. Dissecting Colistin Resistance Mechanisms in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Therapeutics and Prevention, Washington, v. 10, n. 4, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6635527/>. Acesso em 09 jul. 2022.
- TRIMBLE, M. J. et al. Polymyxin: Alternative mechanisms of action and resistance. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, Woodbury, v. 6, n. 10, p. 1–22, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5046685/>. Acesso em: 02 jul. 2022.
- UPDEGROVE, T. B.; ZHANG, A.; STORZA, G. Hfq: the flexible RNA matchmaker. Current Opinion in Microbiology, Londres, v. 25, n. 5, p. 1032–1057, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4821791/>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- URUSHIBARA, N. et al. Contribution of Type II Topoisomerase Mutations to Fluoroquinolone Resistance in *Enterococcus faecium* from Japanese Clinical Setting. Microbial Drug Resistance, Larchmont, v. 00, n. 00, 2017. Disponível em: https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2016.0328?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 17 jul. 2022.
- VAARA, M. New polymyxin derivatives that display improved efficacy in animal infection models as compared to polymyxin B and colistin. Medicinal Research Reviews, Nova Iorque, v. 38, n. 5, p. 1661–1673, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.21494>. Acesso em: 16 jul. 2022.
- VELKOV, T. Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. Future Microbiology, Londres, v. 8, n. 6, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3852176/>. Acesso em: 10 jul. 2022.

- VOGEL, J.; LUISI, B. F. Hfq and its constellation of RNA. Nature Reviews Microbiology, Londres, v. 9, n. 8, p. 578–589, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4615618/>. Acesso em: 17 jul. 2022.
- VIJAYAKUMAR, S.; BISWAS, I.; VEERARAGHAVAN, B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. Future Science OA, Londres, v. 5, n. 6, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6609899/pdf/fsoa-05-395.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2022.
- VRANCIANU, C. O. et al. Antibiotic Resistance Profiles, Molecular Mechanisms and Innovative Treatment Strategies of *Acinetobacter baumannii*. Microorganisms, Basel, v. 8, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7355832/>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- WALSH, C. Antibiotics: actions, origins, resistance. American Society for Microbiology, Washington, v. 13, n. 11, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1110/ps.041032204>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- WANG, M. C. et al. The RNA chaperone Hfq is involved in stress tolerance and virulence in uropathogenic *Proteus mirabilis*. PLoS ONE, São Francisco, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3893223/>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- WONG, D. et al. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 30, n. 1, 409-447, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5217799/>. Acesso em: 11 jul. 2022.
- WOOD, C. R. et al. Structural and functional analysis of the *Acinetobacter baumannii* BlsA photoreceptor and regulatory protein. Plos One, São Francisco, v. 14, n. 8, p. e0220918, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6695109/>. Acesso em: 18 jul. 2022.
- XIN, F. et al. Exploring the diversity of *Acinetobacter* populations in river water with genus-specific primers and probes. The Journal of General and Applied Microbiology, Tóquio, v. 60, p. 51-58, 2014. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/60/2/60_51/_article. Acesso em: 09 jul. 2022.

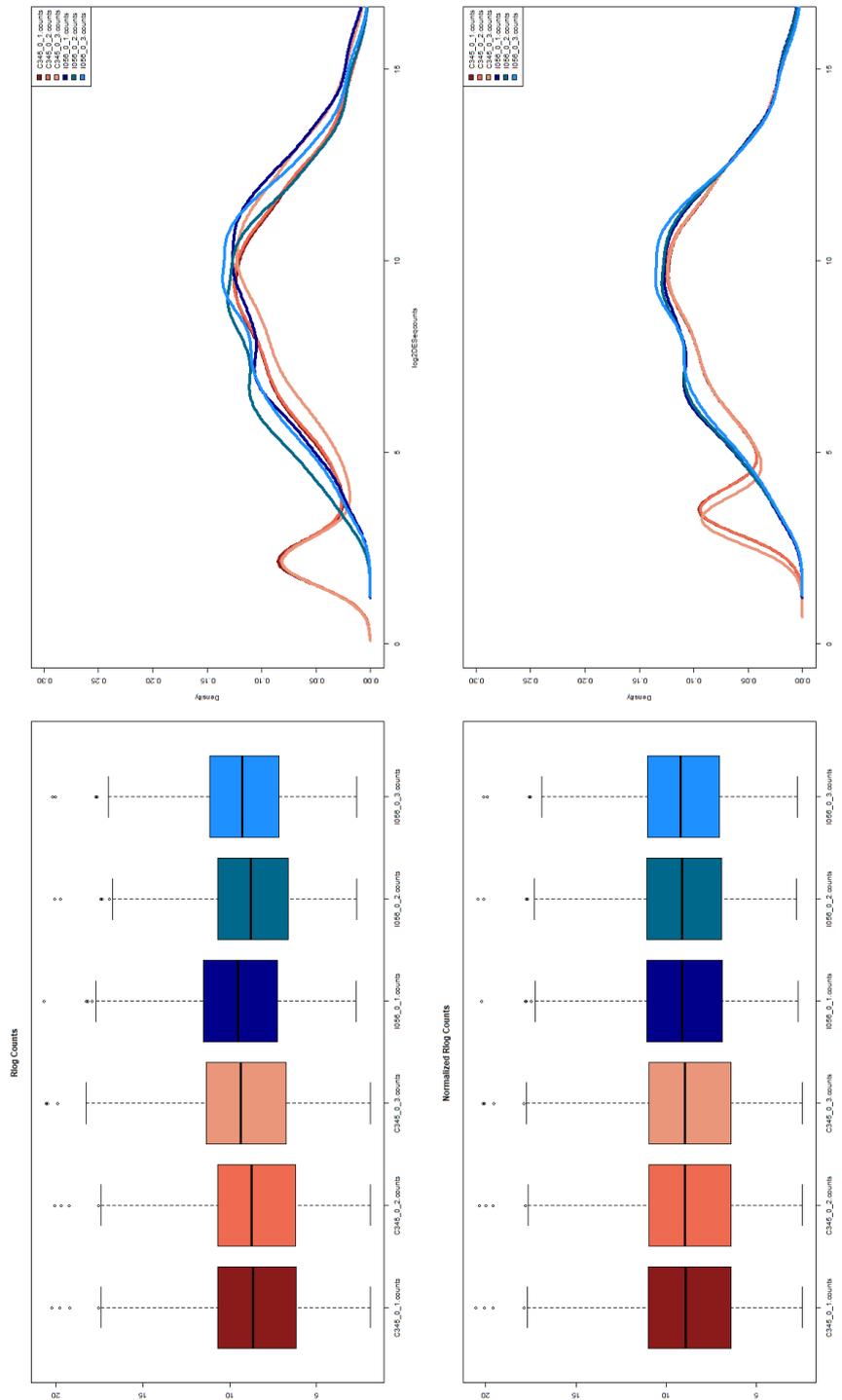
- XING, z. et al. The use of gene ontology terms and KEGG pathways for analysis and prediction of oncogene. BBA - General Subject, Amsterdã, v. 1860, n. 11, p. 2725-2734, 2016. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416516000210?via%3Dihub>
b. Acesso em: 16 jul. 2022.
- YAMADA, J. et al. Impact of the RNA chaperone Hfq on multidrug resistance in *Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Londres, v. 65, n. 5, p. 853–858, 2010. Disponível em:
<https://academic.oup.com/jac/article/65/5/853/824878?login=false>. Acesso em: 06 jul. 2022.
- YAMANAKA, Y. et al. Transcription factor CzcR (YbiH) regulates a set of genes affecting the sensitivity of *Escherichia coli* against cefoperazone and chloramphenicol. Microbiology, Reading, v. 162, p. 1253-1264, 2016. Disponível em:
<https://europemc.org/article/MED/27112147>. Acesso em: 14 jul. 2022.
- YOUSEFIAN, N. et al. Structural characterization of the EmrAB-TolC efflux complex from *E. coli*. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, Amsterdã, v. 1863, n. 1, 2021. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527362030331X?via%3Dihub>. Acesso em: 26 jul. 2022.
- YU, Z. et al. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. BioMed Research International, Nova Iorque, v. 2015, 2015. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4312571/>. Acesso em: 06 jul. 2022.
- ZAFFIRI, L.; GARDNER, J.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. Journal of Investigative Surgery, Filadélfia, v. 25, n. 2, p. 67-77, 2012. Disponível em:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/08941939.2012.664099?journalCode=iivs20>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- ZENG, Q.; SUNDIN, G. W. Genome-wide identification of Hfq-regulated small RNAs in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* discovered small RNAs with virulence regulatory function. BMC Genomics, Londres, v. 15, n. 1, 2014. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4070566/>. Acesso em: 04 jul. 2022.

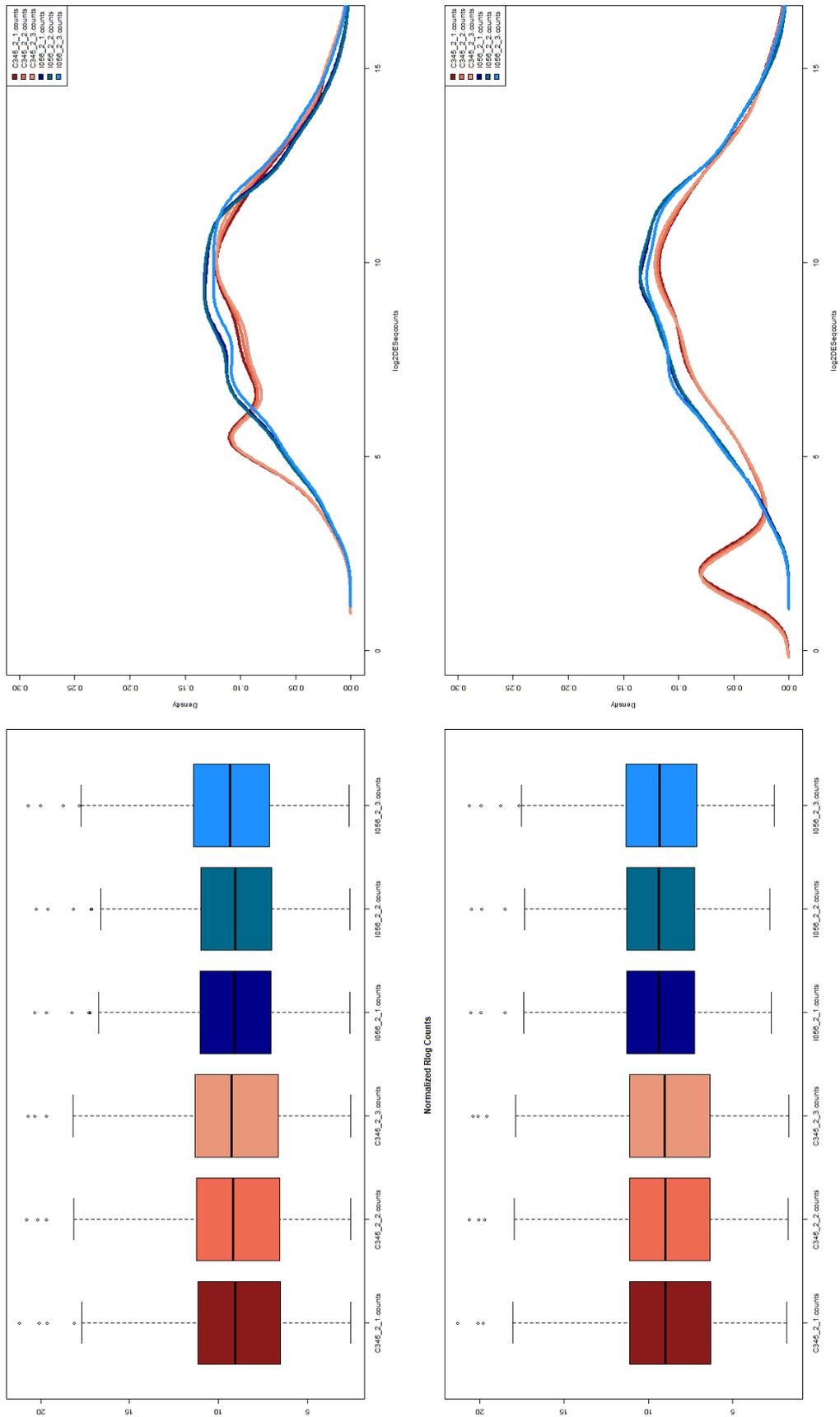
- ZHANG, L. et al. RNA chaperone hfq mediates persistence to multiple antibiotics in *Aeromonas veronii*. Microbial Pathogenesis, Londres, v. 132, n. April, p. 124–128, 2019. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401019300749?via%3Dihub>. Acesso em: 05 jul. 2022.
- ZHAO, W. H; HU, Z. Q. Acinetobacter: A potential reservoir and dispenser for β -lactamases. Critical Reviews in Microbiology, Londres, v. 38, n. 1, p. 30-51, 2012. Disponível em:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/1040841X.2011.621064?journalCode=imby20>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- ZHOU, K.; AERTSEN, A.; MICHIELS, C. W. The role of variable DNA tandem repeats in bacterial adaptation. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdã, v. 38, p. 119-141, 2014. Disponível em:
<https://academic.oup.com/femsre/article/38/1/119/510132?login=false>. Acesso em: 02 jul. 2022.
- ZHOU, Z. et al. Screening Hub Genes as Prognostic Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma by Bioinformatics Analysis. Cell Transplantation, Elmsford, v. 28, p. 76S-86S, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7016461/>. Acesso em: 19 jul. 2022.

APÊNDICES

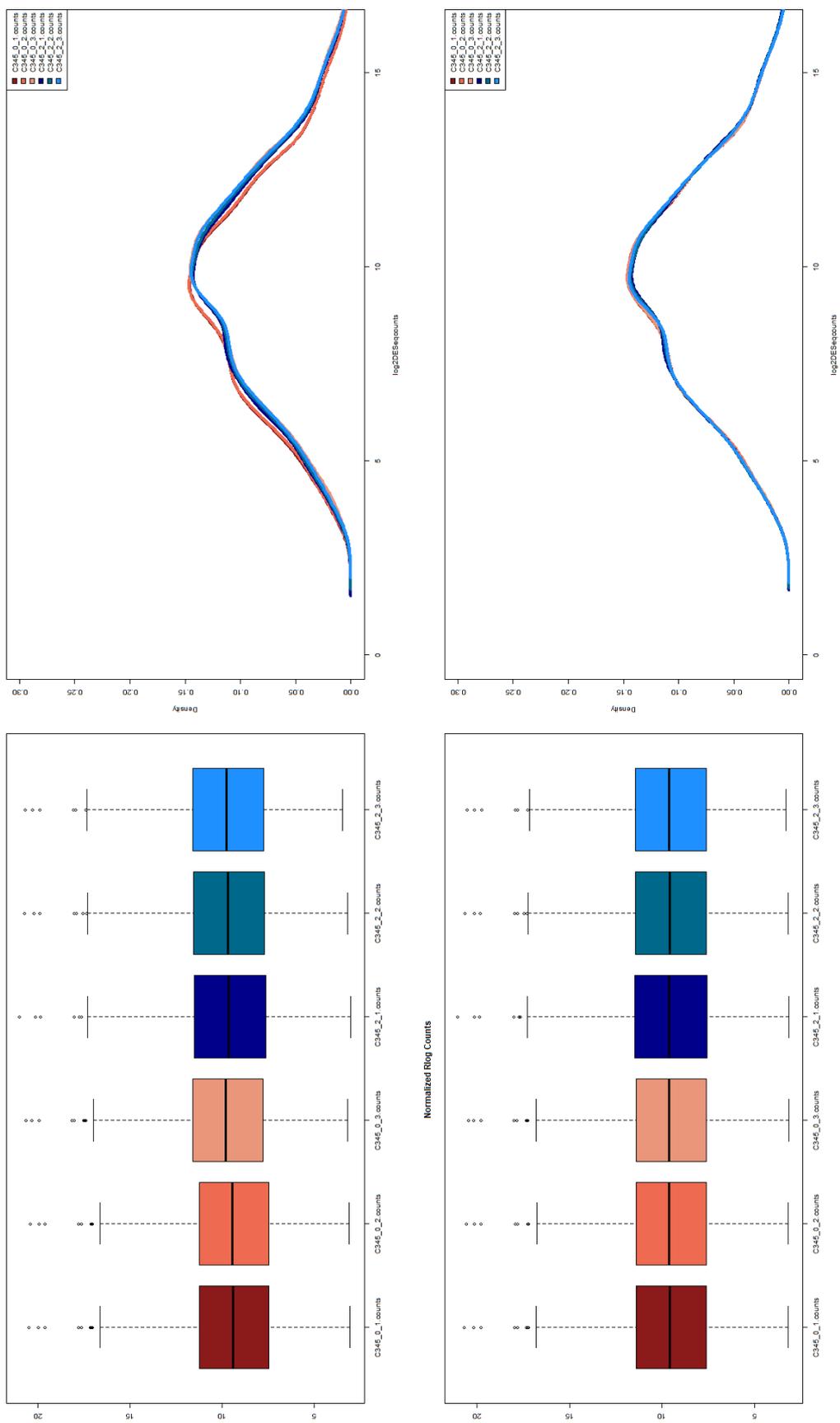
APÊNDICE 1: BOX PLOTS E GRÁFICOS DE DENSIDADE DAS CONTAGENS DE LEITURA BRUTA DO RNA-SEQ PARA TODAS AS COMPARAÇÕES REALIZADAS.

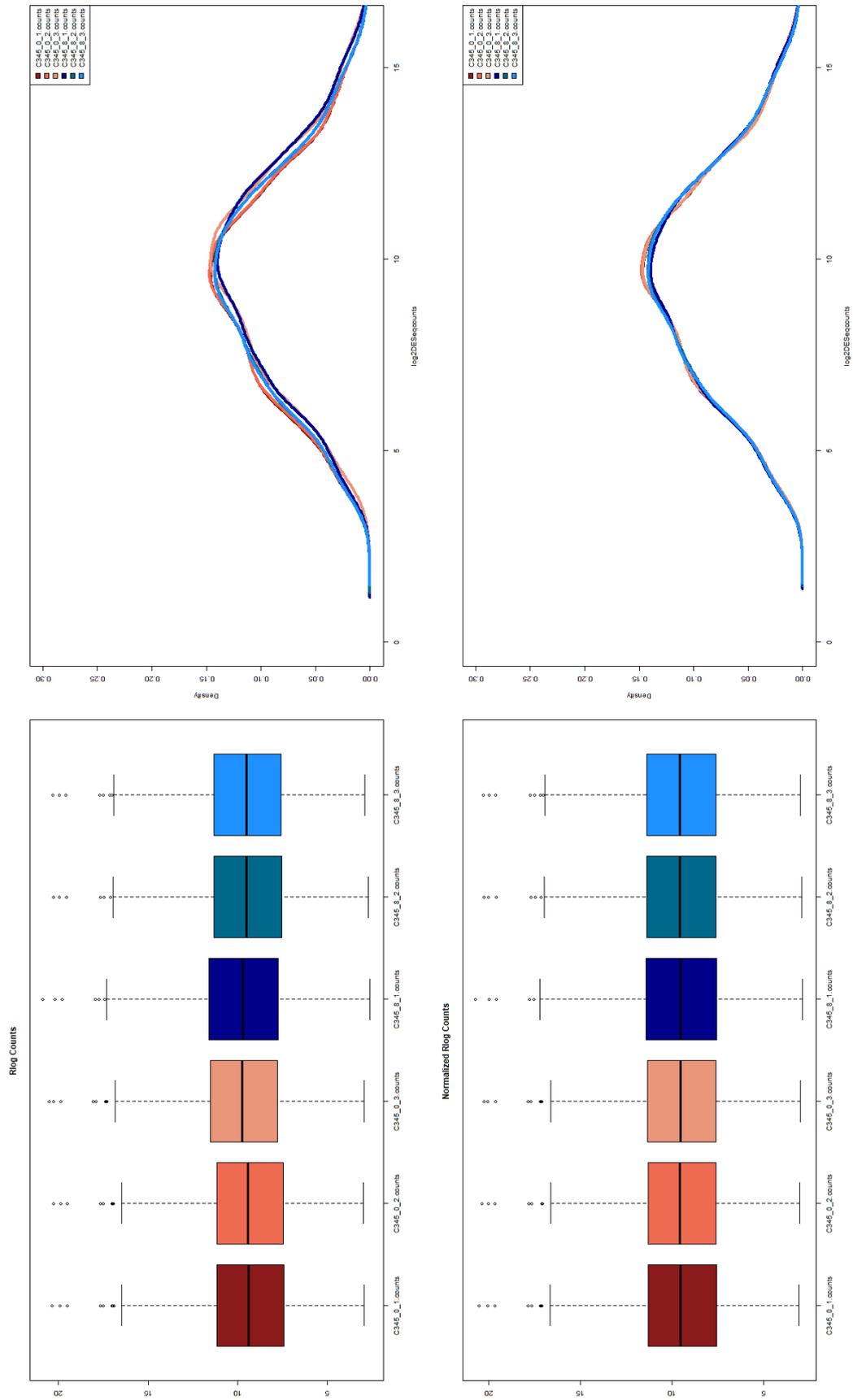
a) C345 (0 µg/mL) versus I056 (0 µg/mL)

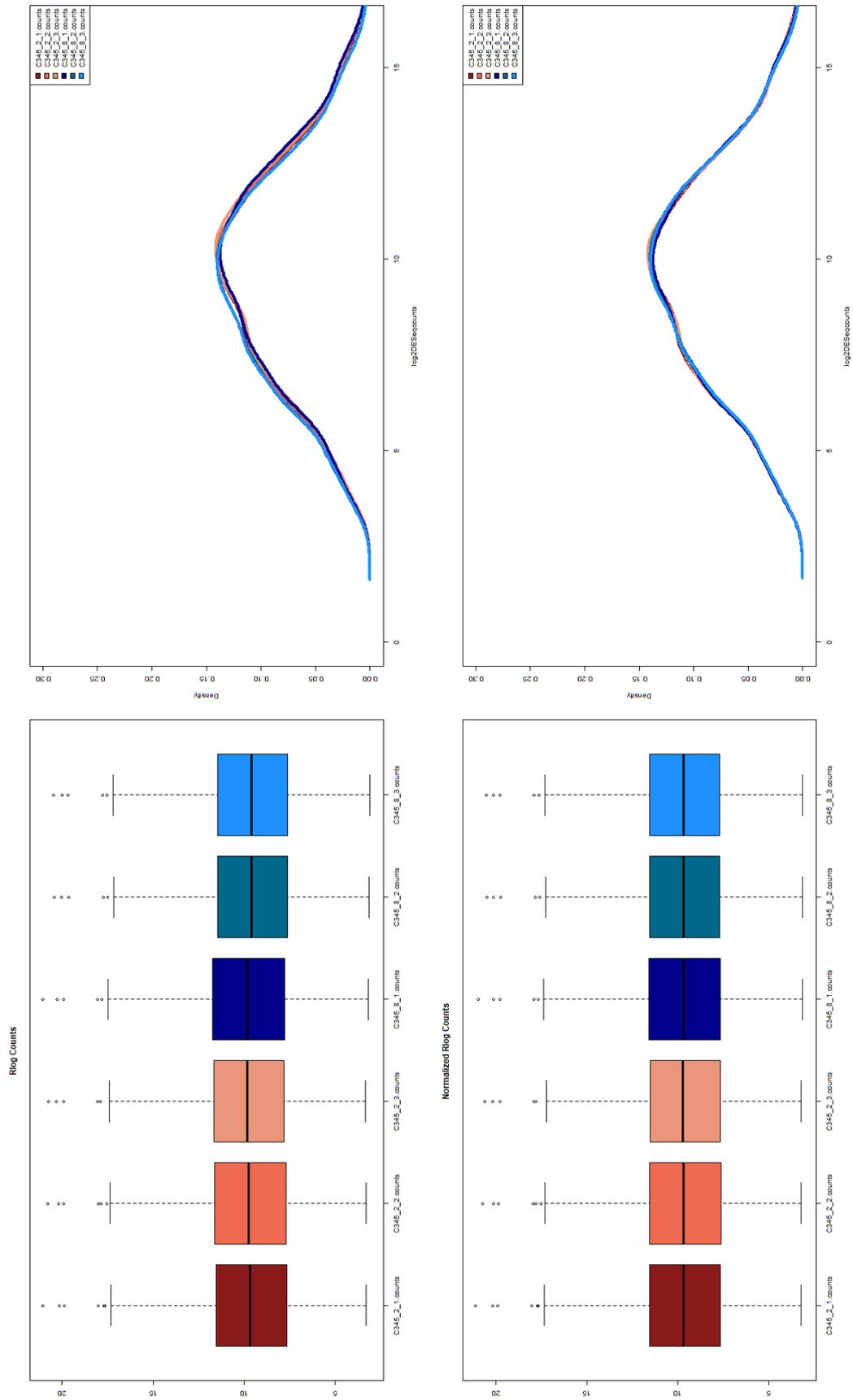


b) C345 (2 $\mu\text{g/mL}$) versus I056 (2 $\mu\text{g/mL}$)

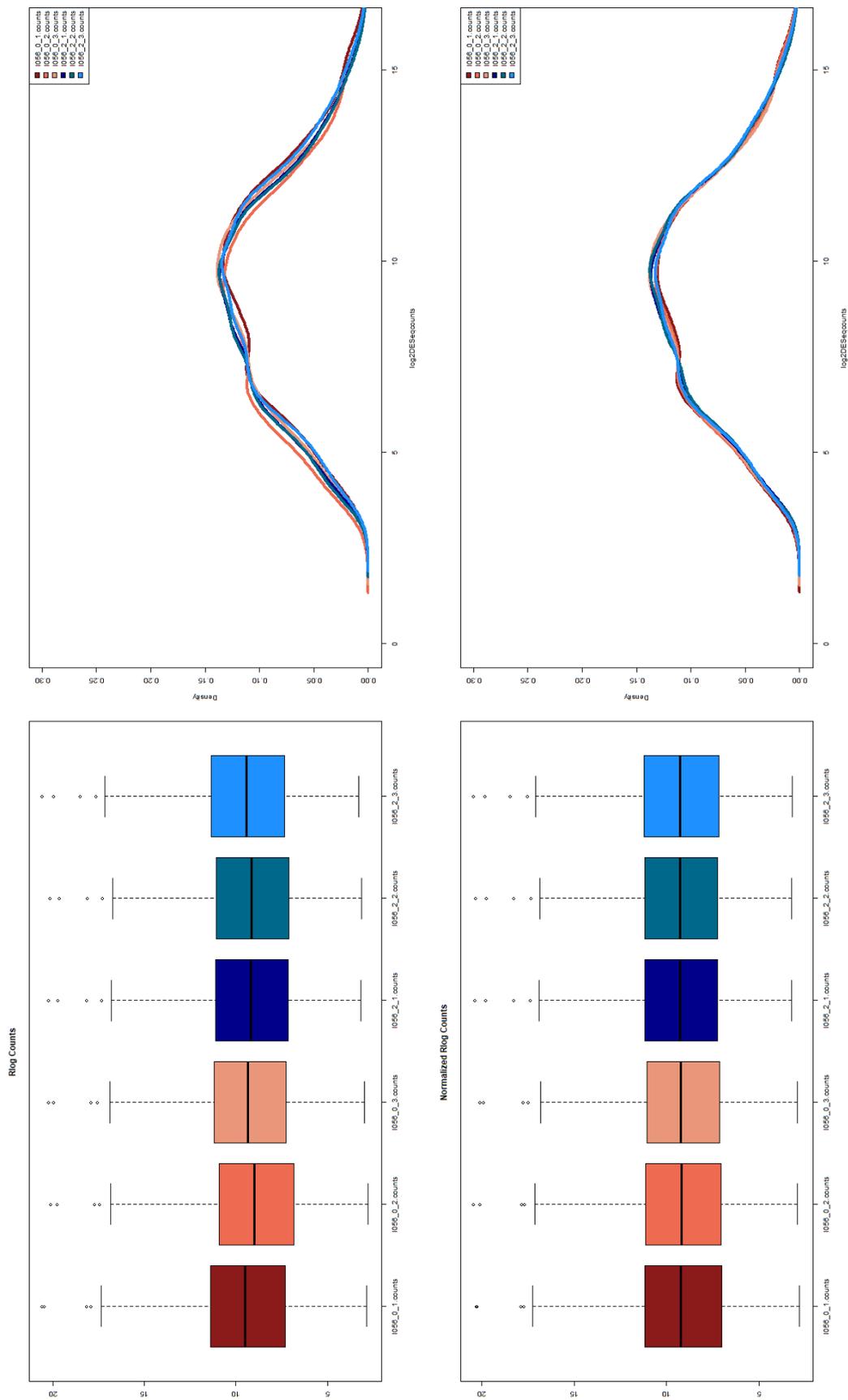
c) C345 (0 $\mu\text{g/mL}$) versus C345 (2 $\mu\text{g/mL}$)



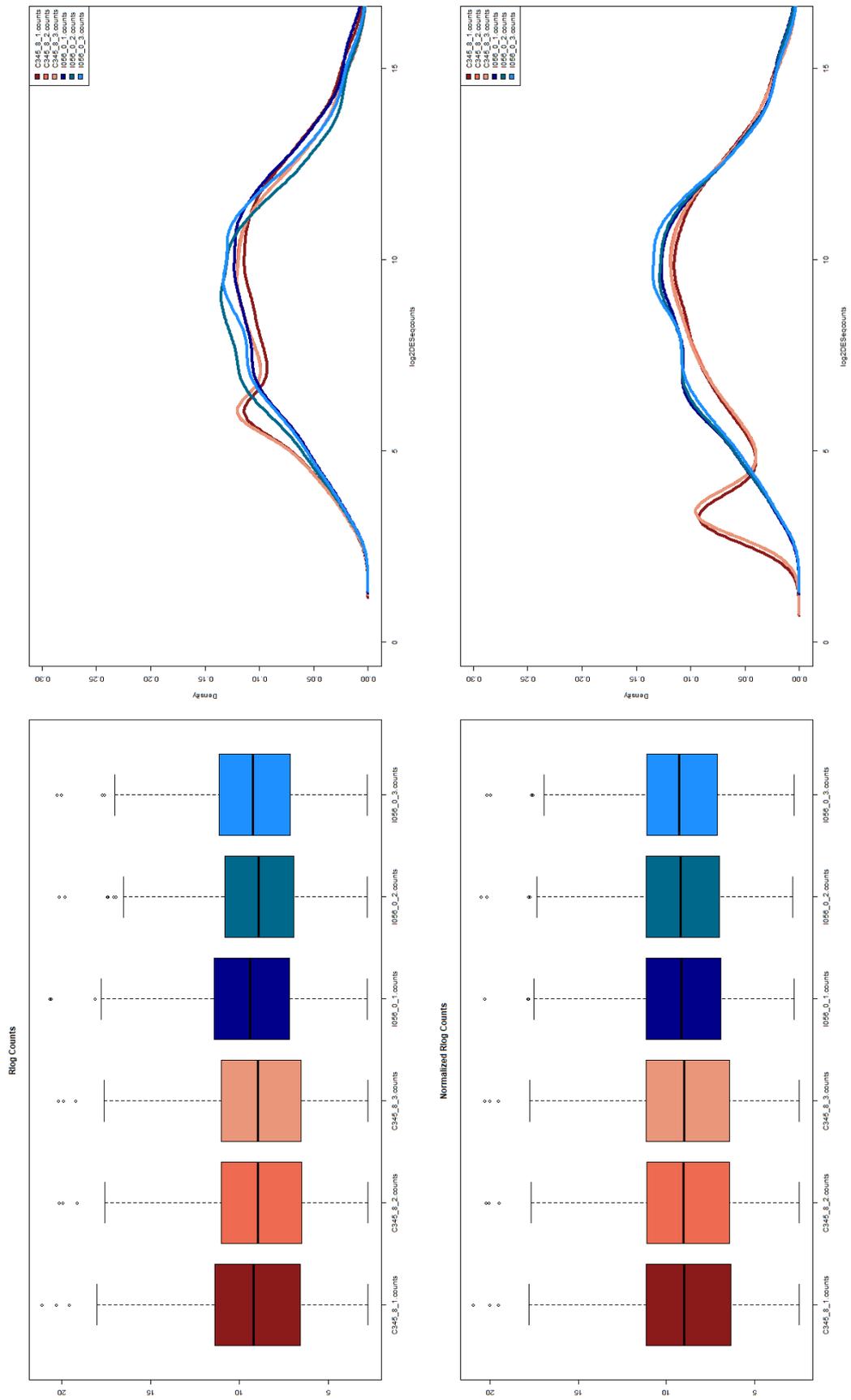
d) C345 (0 $\mu\text{g/mL}$) versus C345 (8 $\mu\text{g/mL}$)

e) C345 (2 $\mu\text{g/mL}$) versus C345 (8 $\mu\text{g/mL}$)

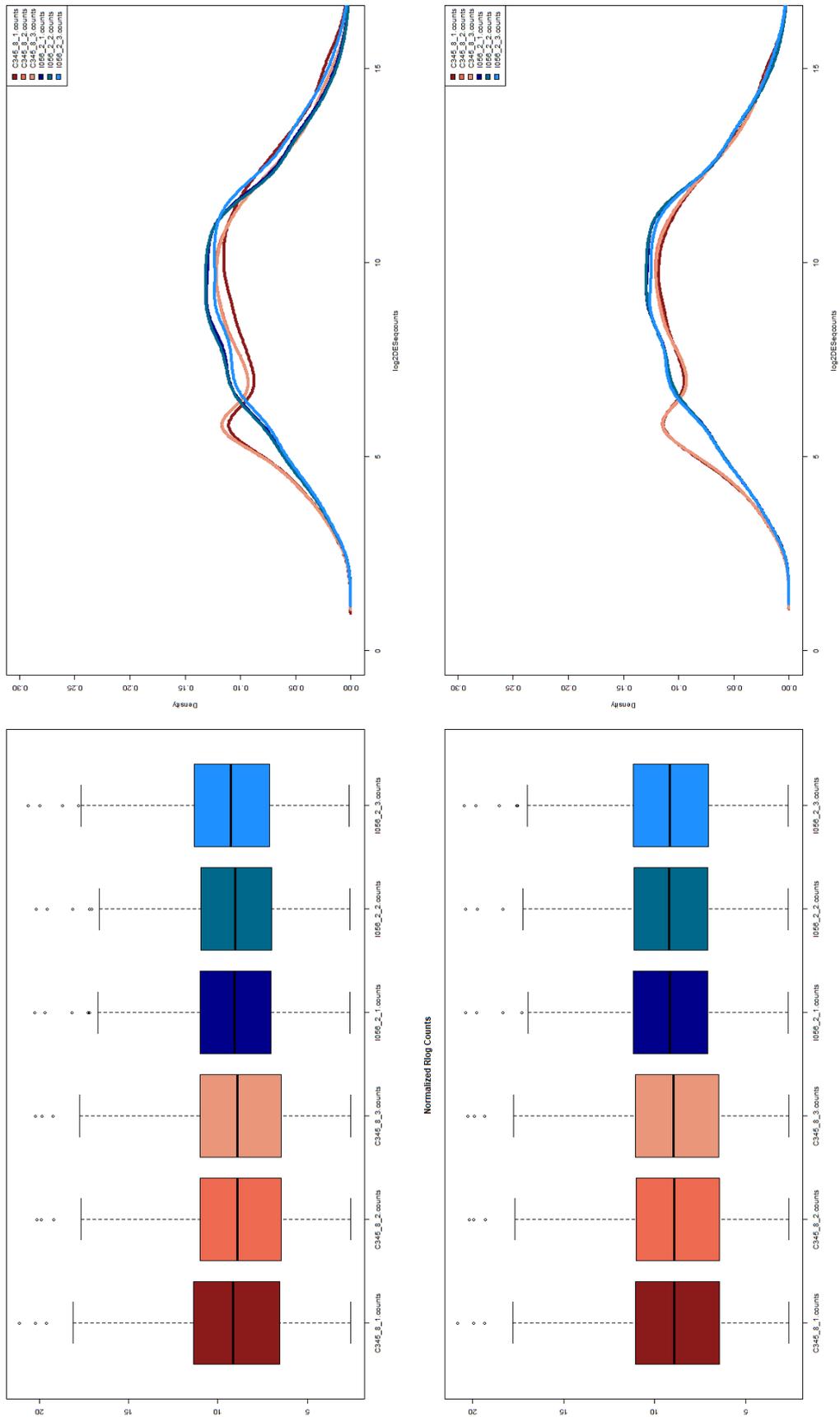
f) I056 (0 $\mu\text{g/mL}$) versus I056 (2 $\mu\text{g/mL}$)



g) C345 (8 µg/mL) versus I056 (0 µg/mL)

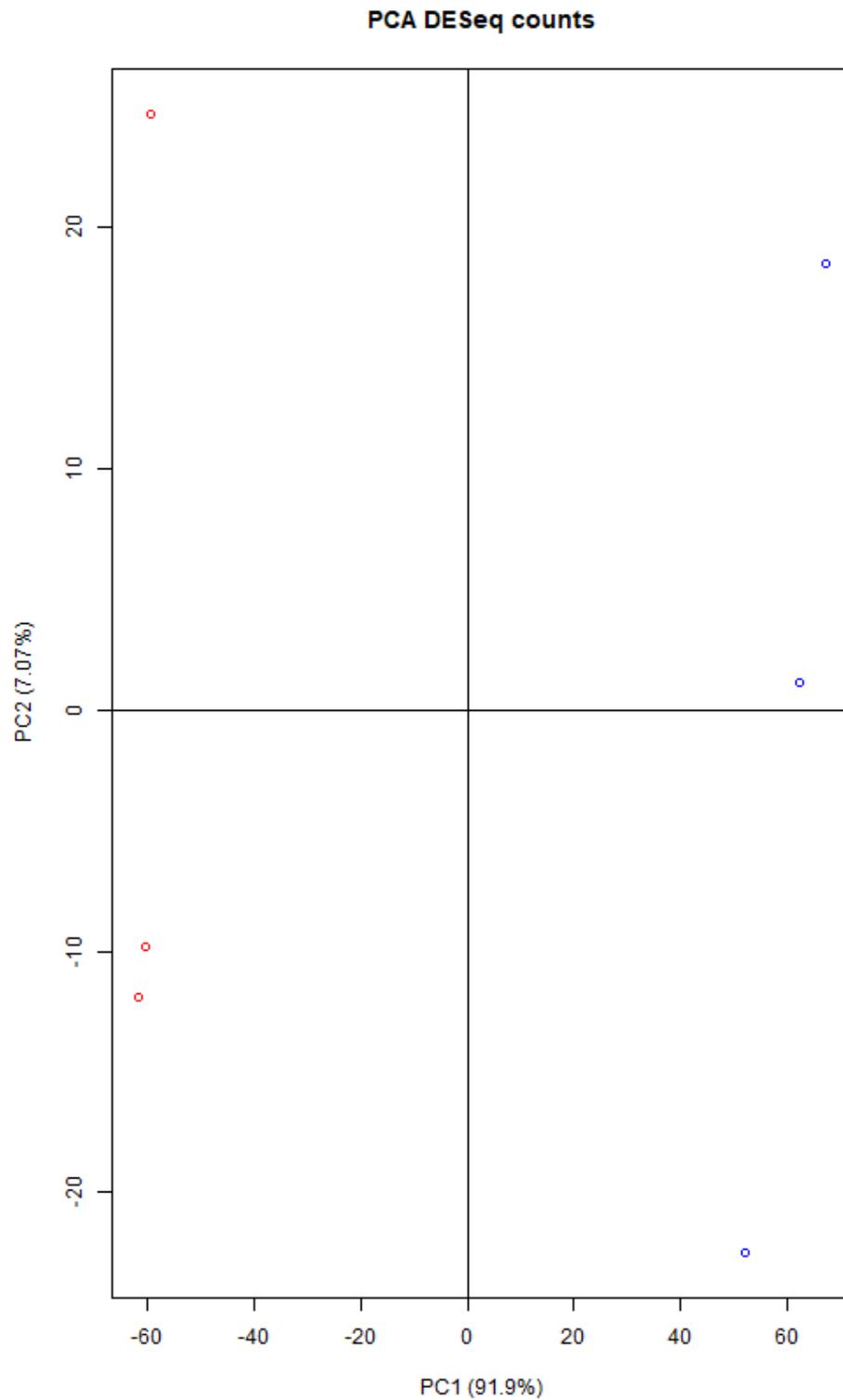


h) C345 (8 $\mu\text{g/mL}$) versus I056 (2 $\mu\text{g/mL}$)



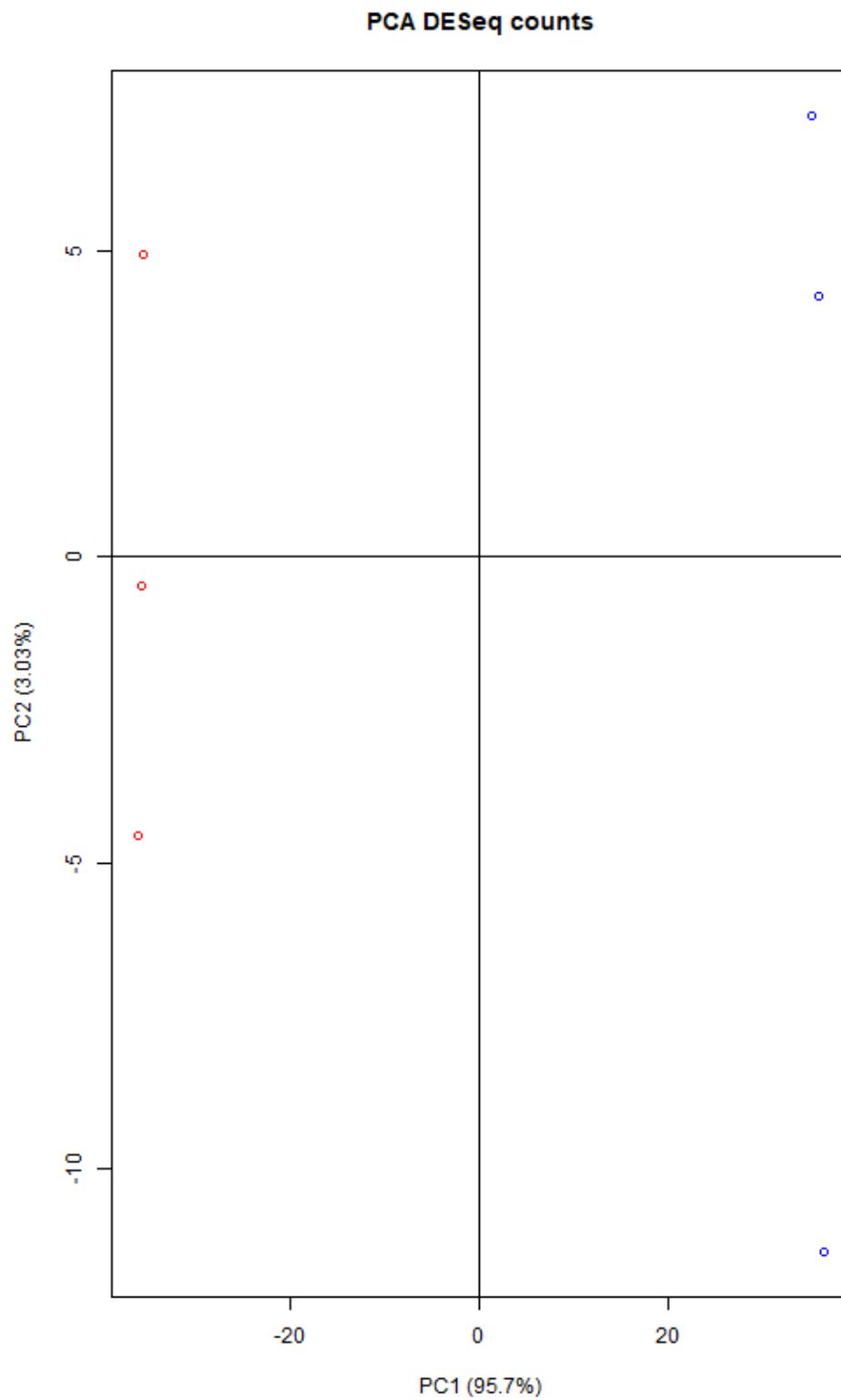
**APÊNDICE 2: ANÁLISE DE VARIAÇÃO DOS DADOS DO RNA-SEQ
REALIZADA VIA PCA (PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS)**

a) C345 (0 µg/mL) versus I056 (0 µg/mL)



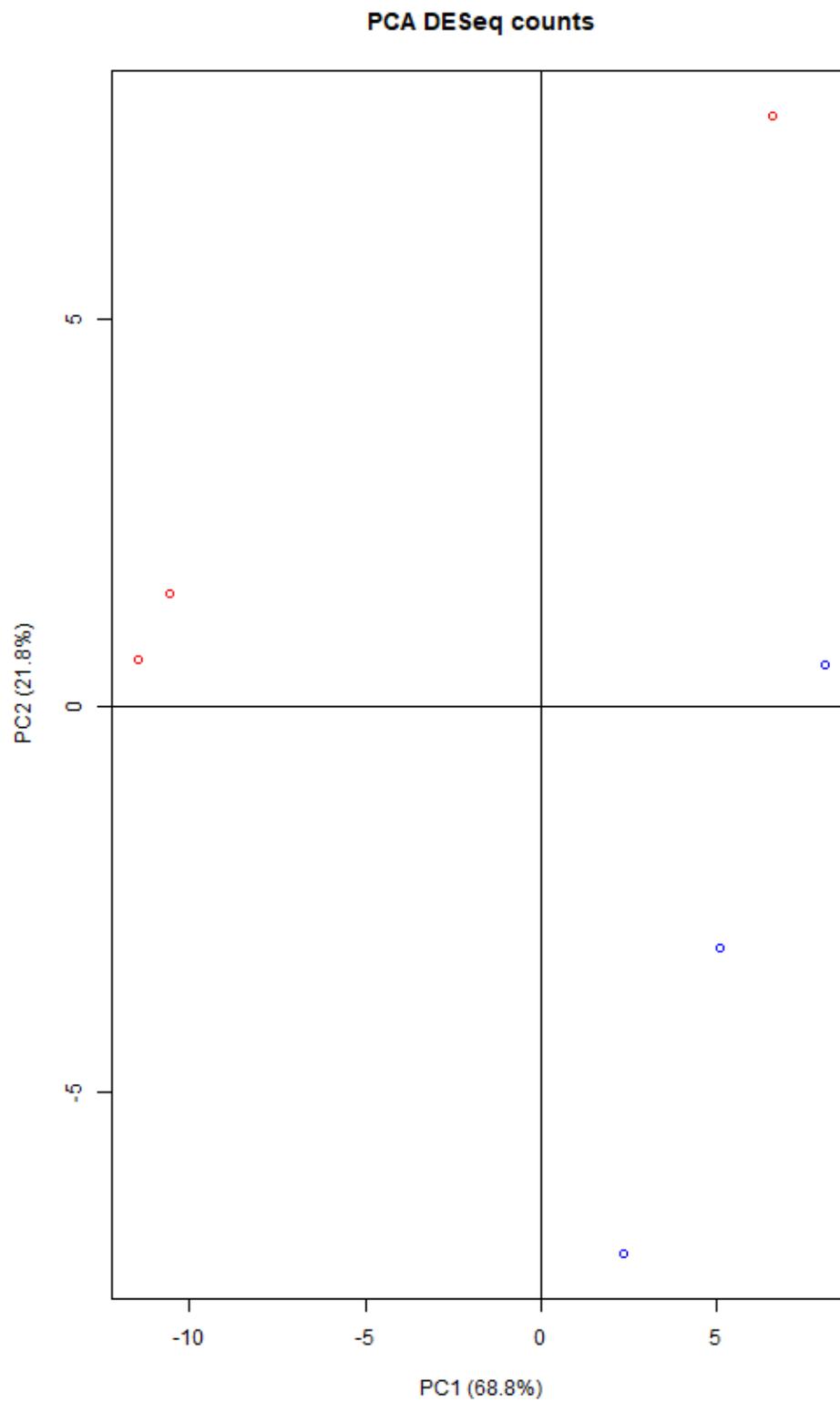
Legenda: Pontos em vermelho: C345 (0 µg/mL), pontos em azul: I056 (0 µg/mL)

b) C345 (2 $\mu\text{g/mL}$) versus I056 (2 $\mu\text{g/mL}$)



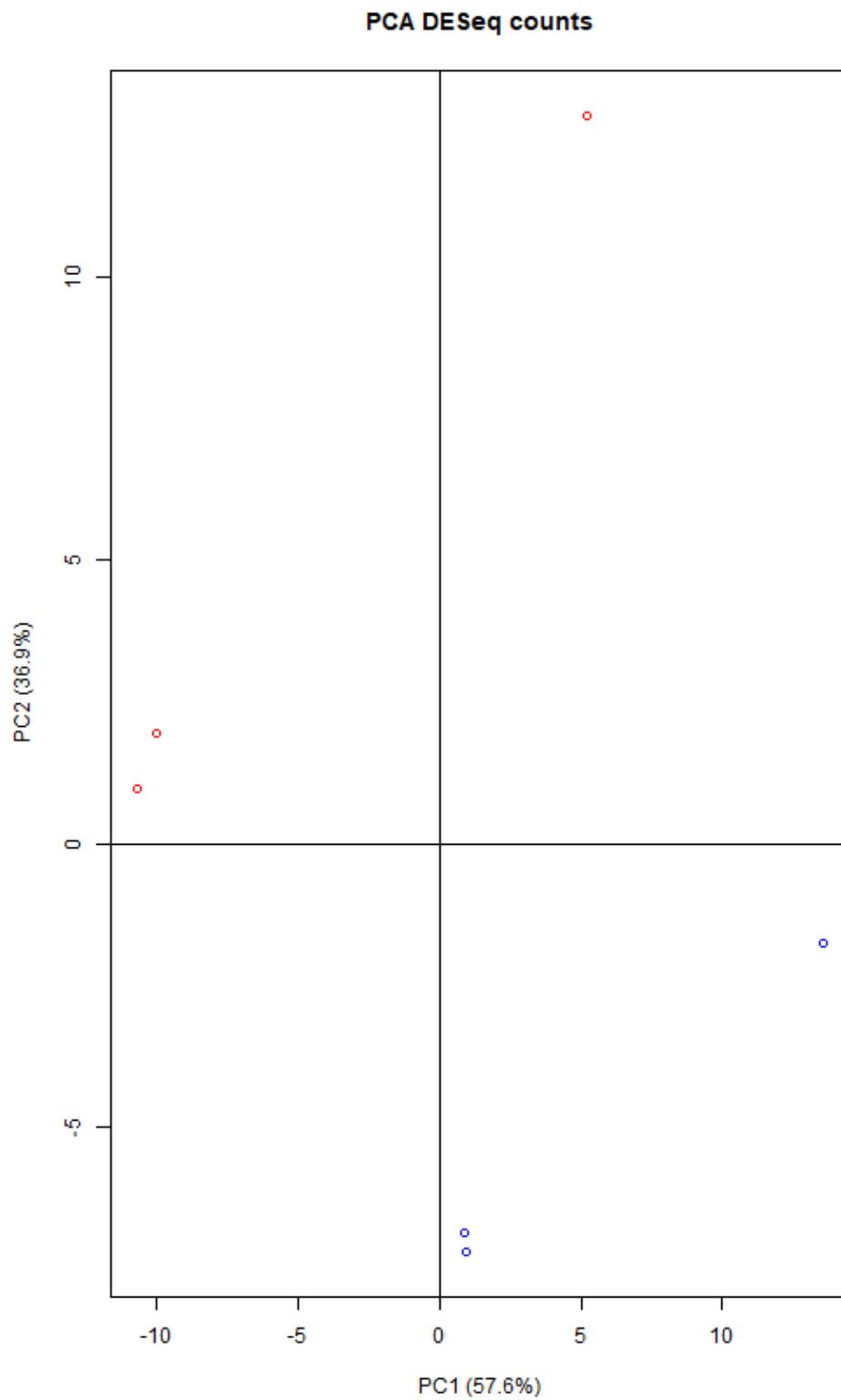
Legenda: Pontos em vermelho: C345 (2 $\mu\text{g/mL}$), pontos em azul: I056 (2 $\mu\text{g/mL}$)

c) C345 (0 $\mu\text{g/mL}$) versus C345 (2 $\mu\text{g/mL}$)



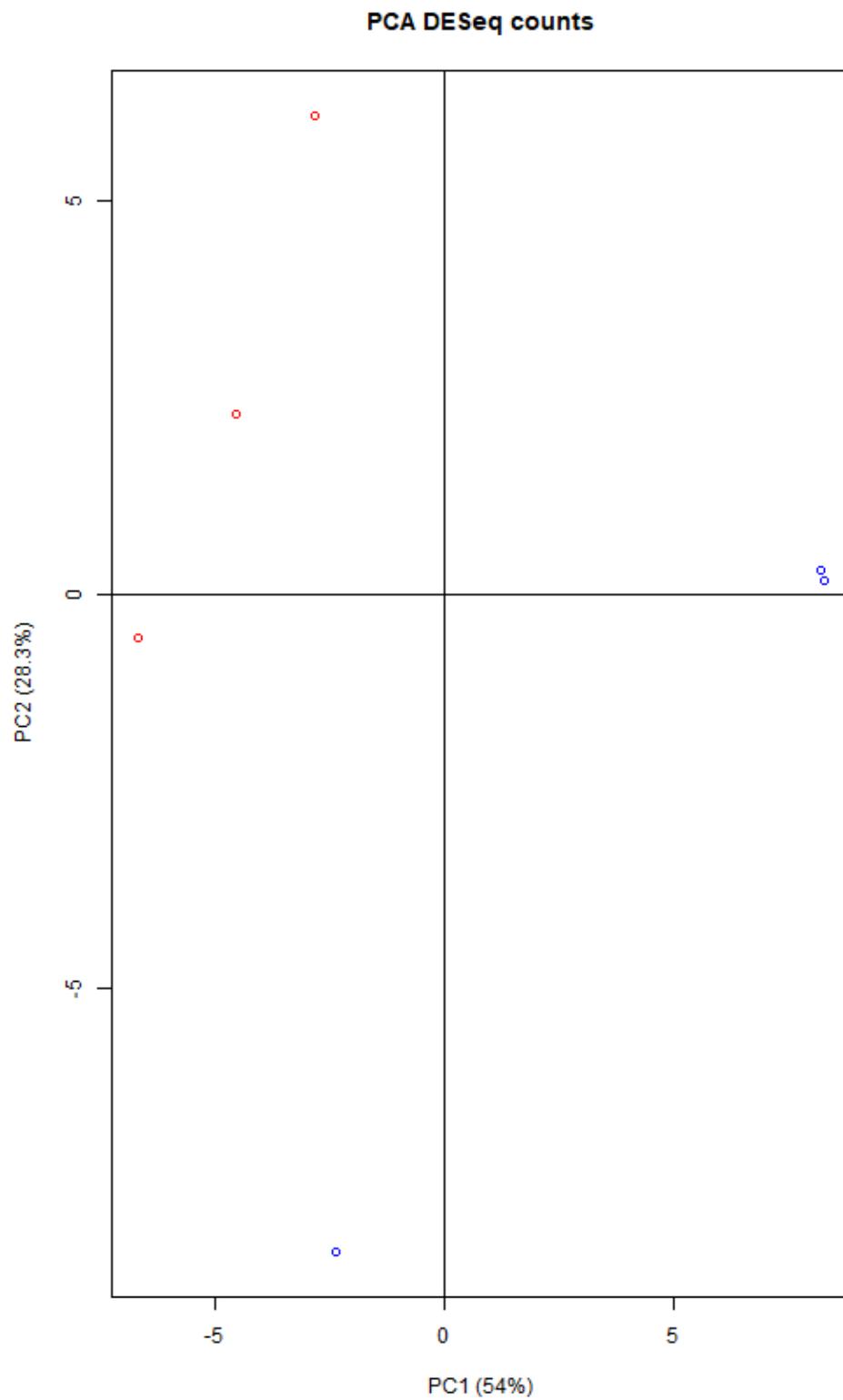
Legenda: Pontos em vermelho: C345 (0 $\mu\text{g/mL}$), pontos em azul: C345 (2 $\mu\text{g/mL}$)

d) C345 (0 $\mu\text{g/mL}$) versus C345 (8 $\mu\text{g/mL}$)



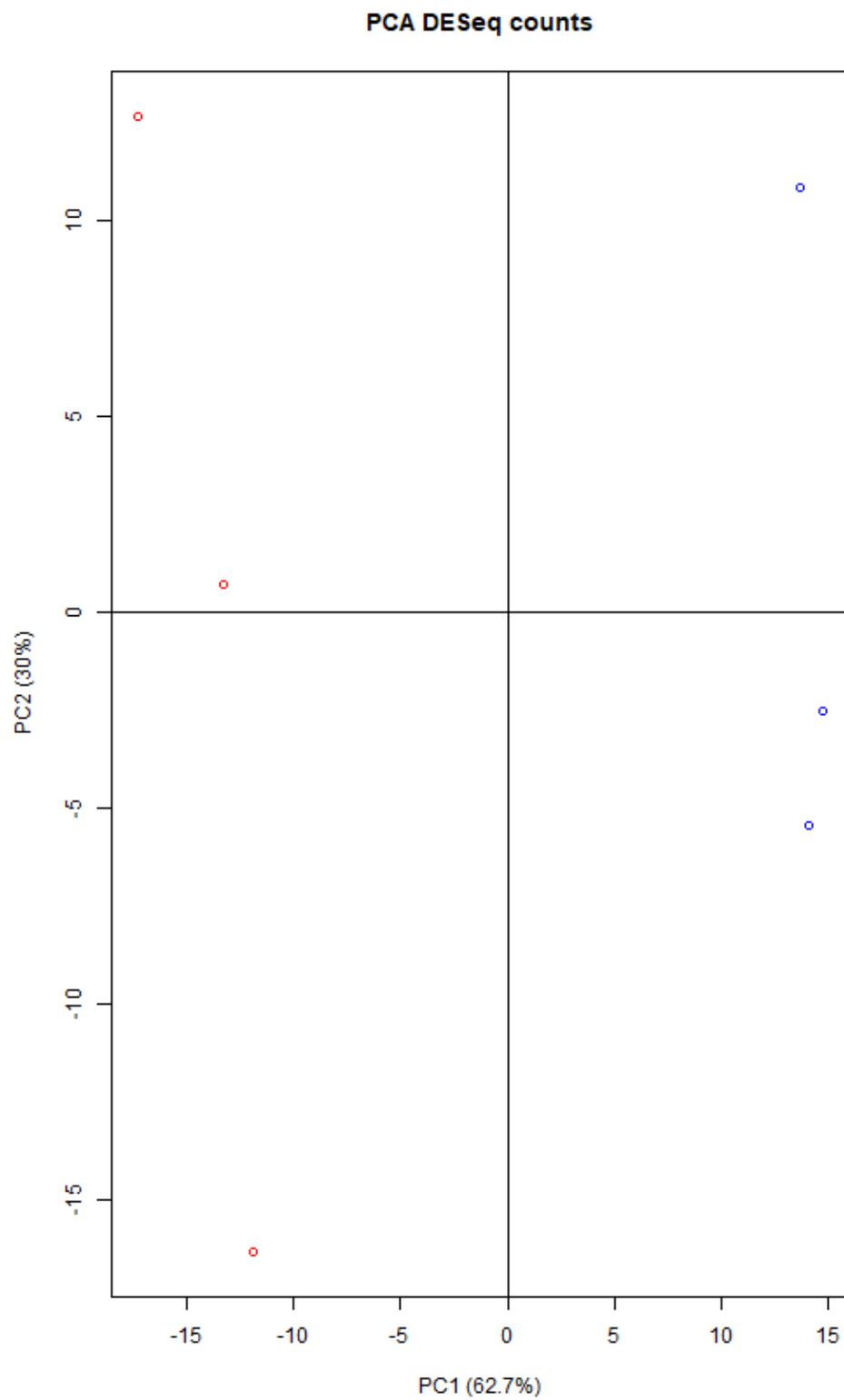
Legenda: Pontos em vermelho: C345 (0 $\mu\text{g/mL}$), pontos em azul: C345 (8 $\mu\text{g/mL}$)

e) C345 (2 $\mu\text{g/mL}$) versus C345 (8 $\mu\text{g/mL}$)



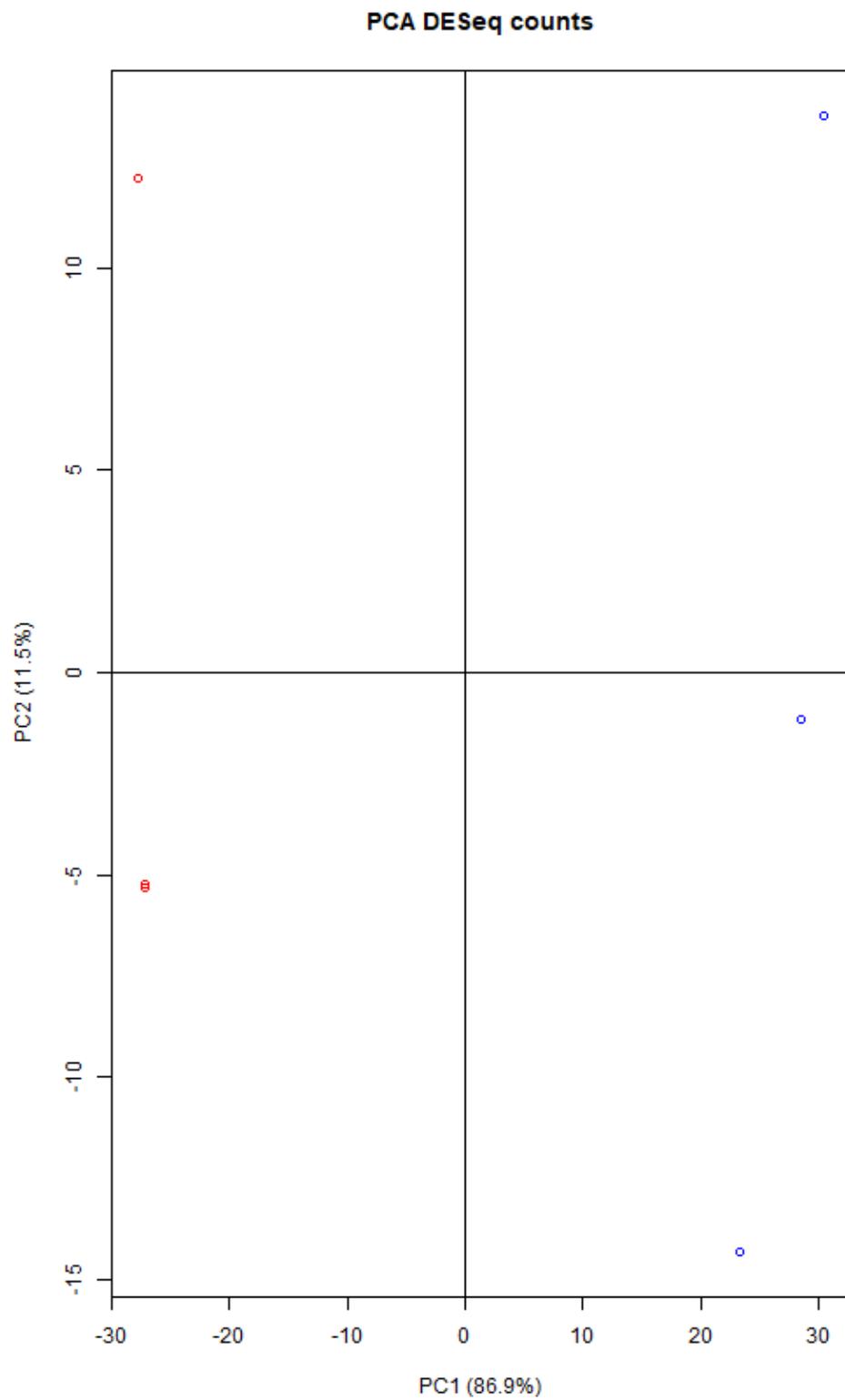
Legenda: Pontos em vermelho: C345 (2 $\mu\text{g/mL}$), pontos em azul: C345 (8 $\mu\text{g/mL}$)

f) I056 (0 $\mu\text{g/mL}$) versus I056 (2 $\mu\text{g/mL}$)



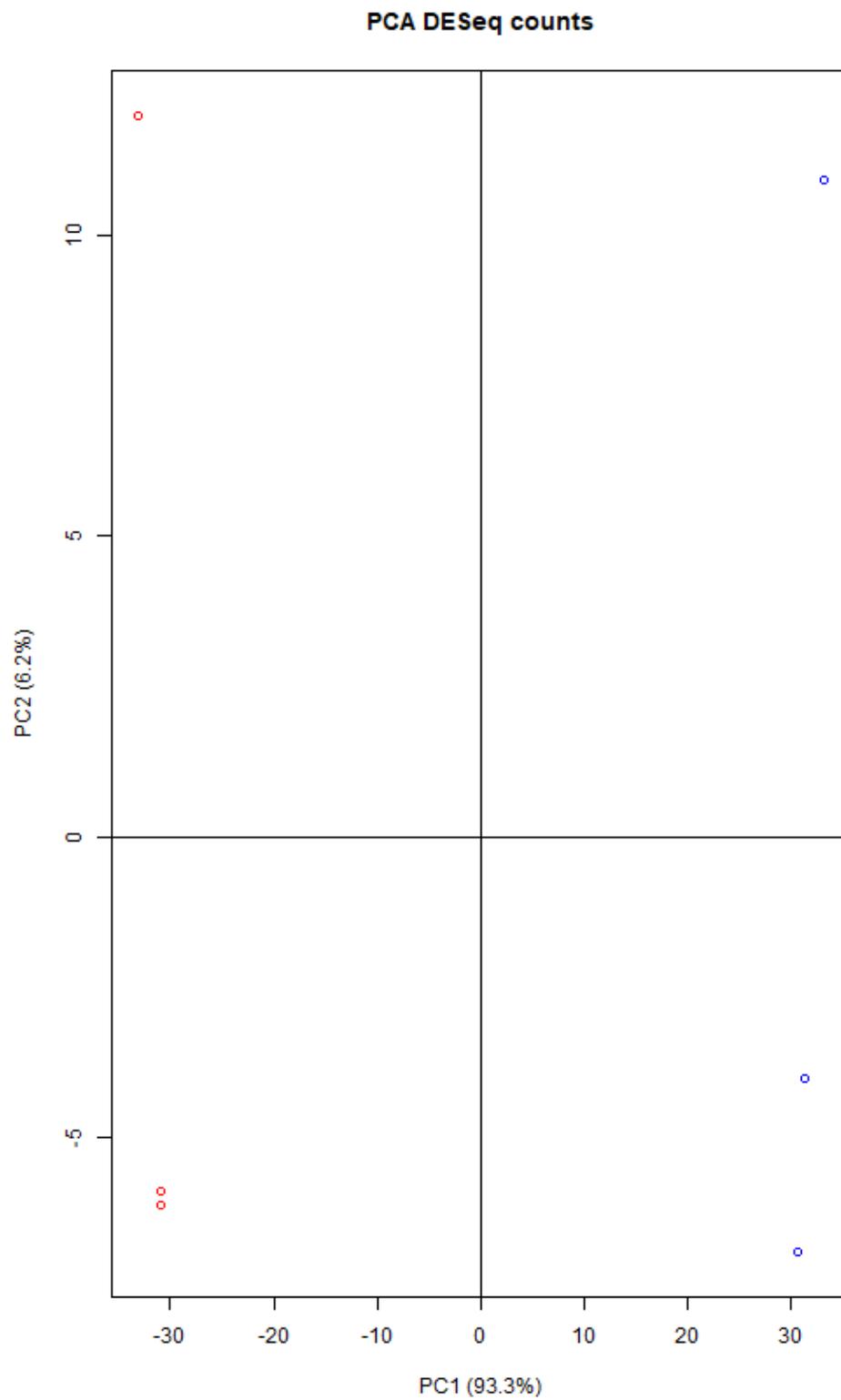
Legenda: Pontos em vermelho: I056 (0 $\mu\text{g/mL}$), pontos em azul: I056 (2 $\mu\text{g/mL}$)

g) C345 (8 $\mu\text{g/mL}$) versus I056 (0 $\mu\text{g/mL}$)



Legenda: Pontos em vermelho: C345 (8 $\mu\text{g/mL}$), pontos em azul: I056 (0 $\mu\text{g/mL}$)

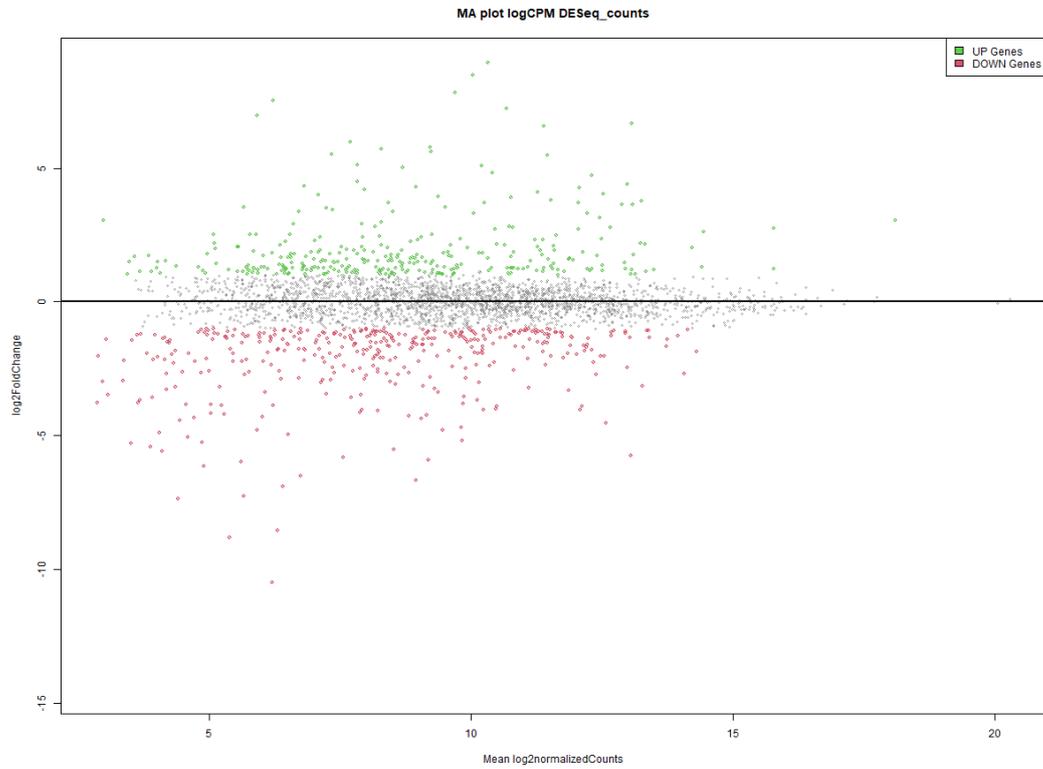
h) C345 (8 $\mu\text{g/mL}$) versus I056 (2 $\mu\text{g/mL}$)



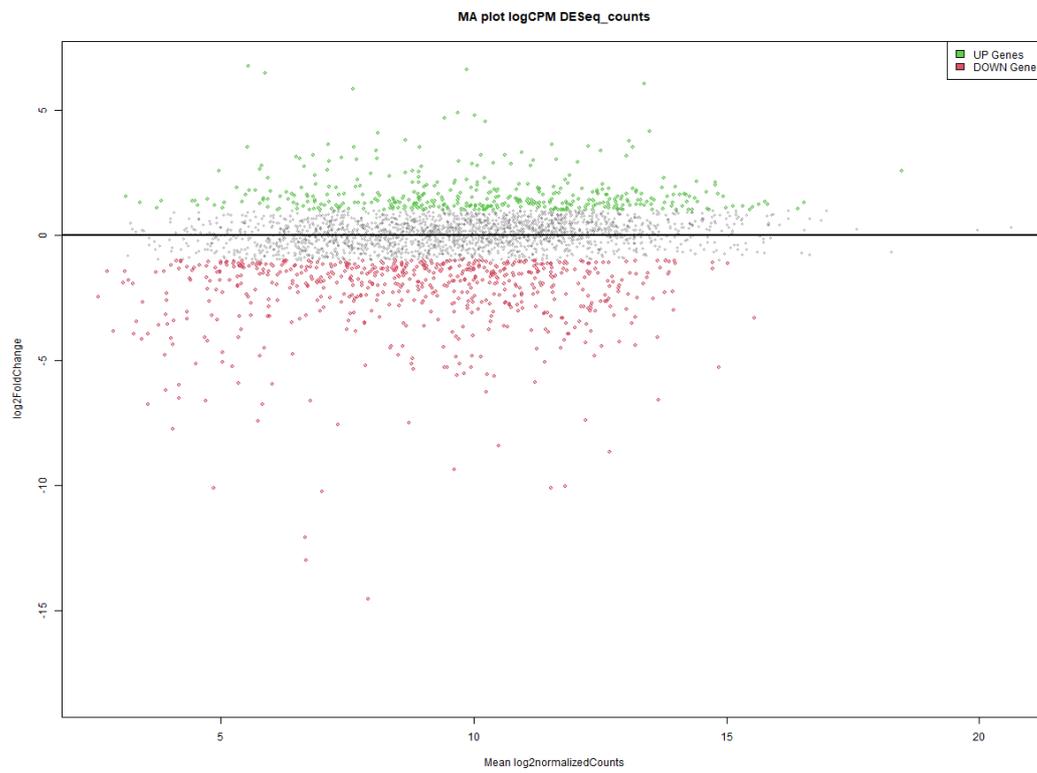
Legenda: Pontos em vermelho: C345 (8 $\mu\text{g/mL}$), pontos em azul: I056 (2 $\mu\text{g/mL}$)

APÊNDICE 3: MA PLOT (S) PARA AS DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE COMPARAÇÃO

a) C345_0_X_I056_0



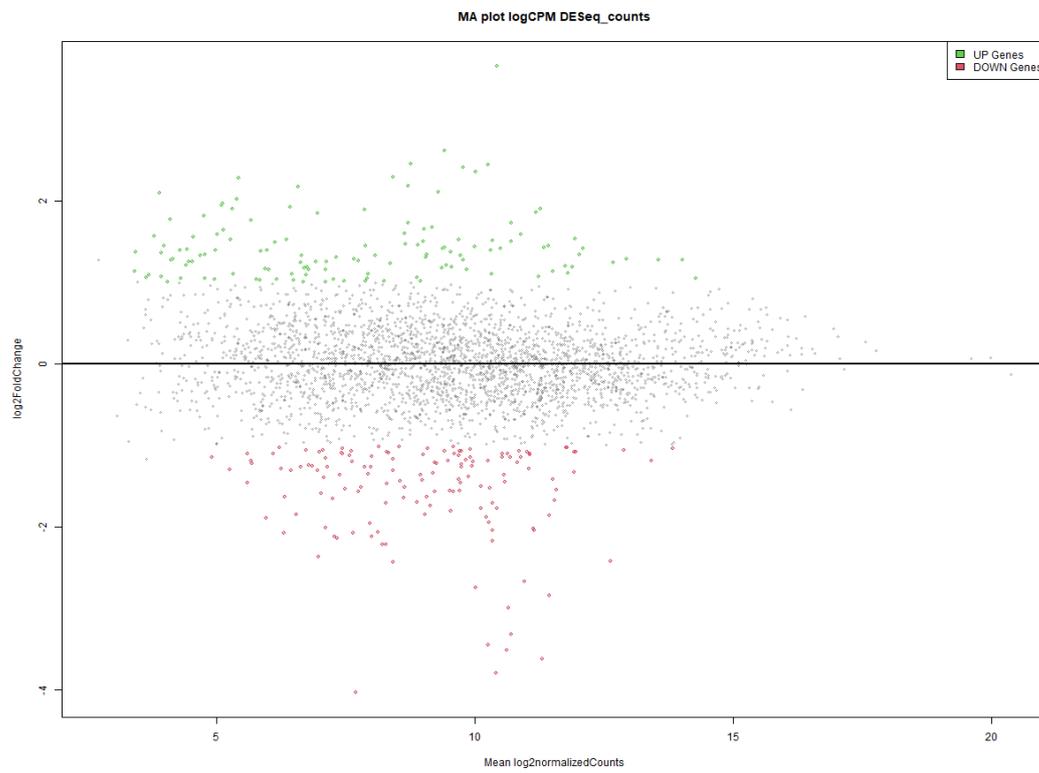
b) C345_2_X_I056_2



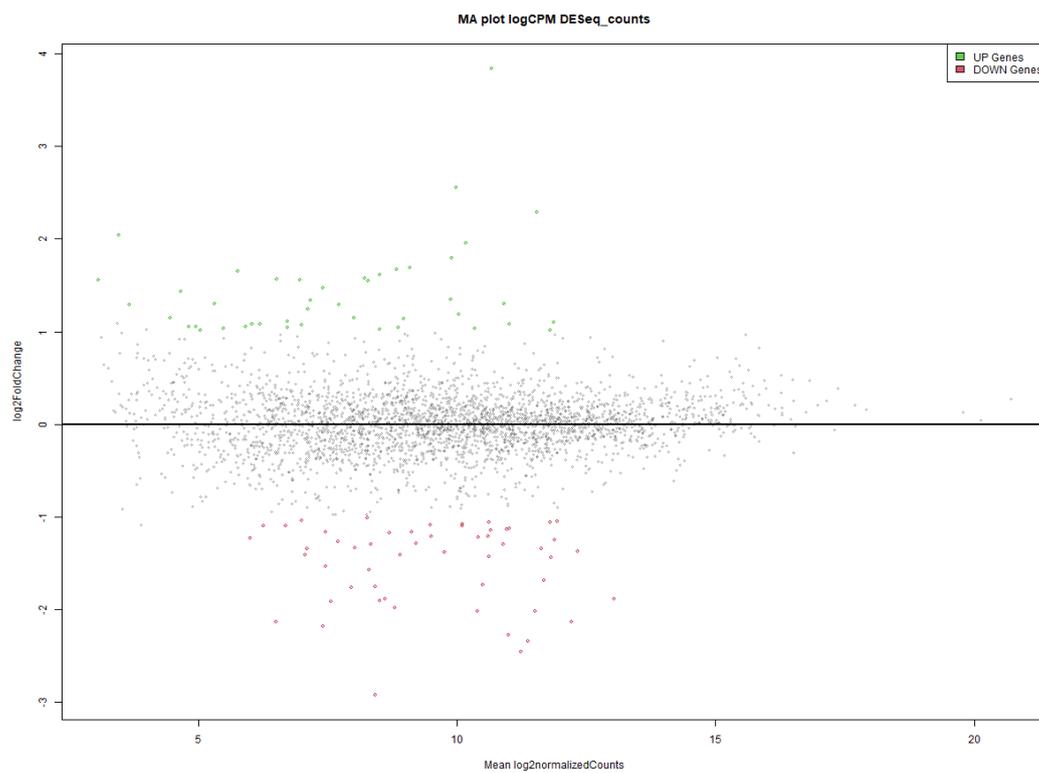
c) C345_0_X_C345_2



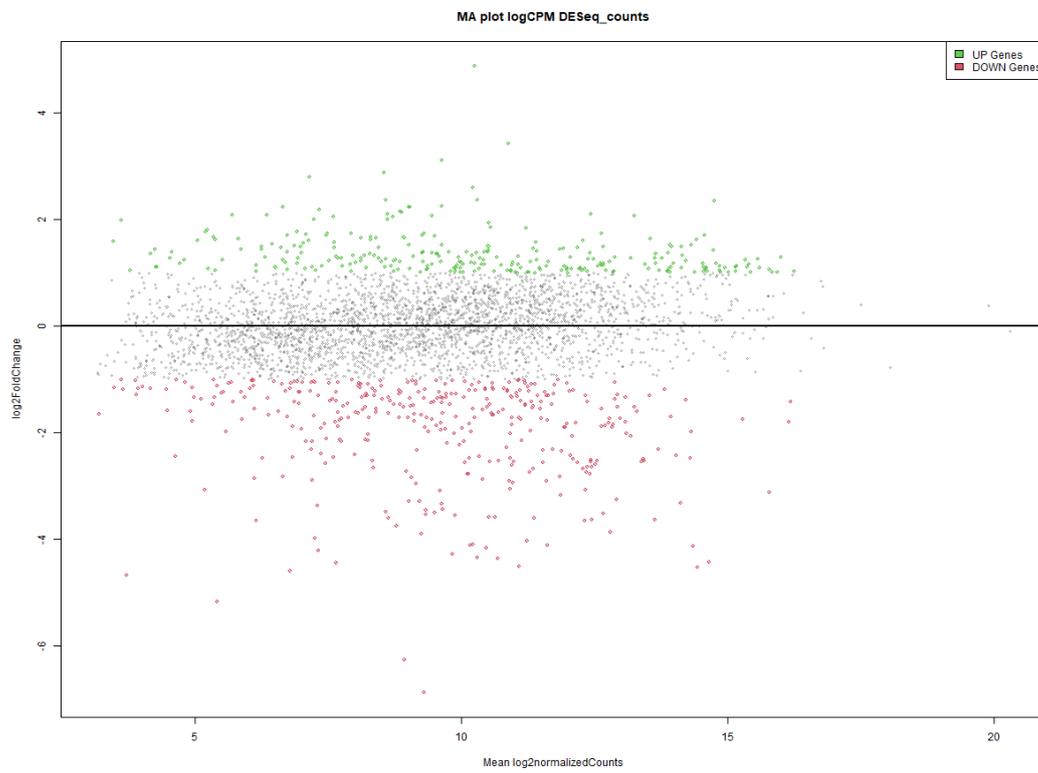
d) C345_0_X_C345_8



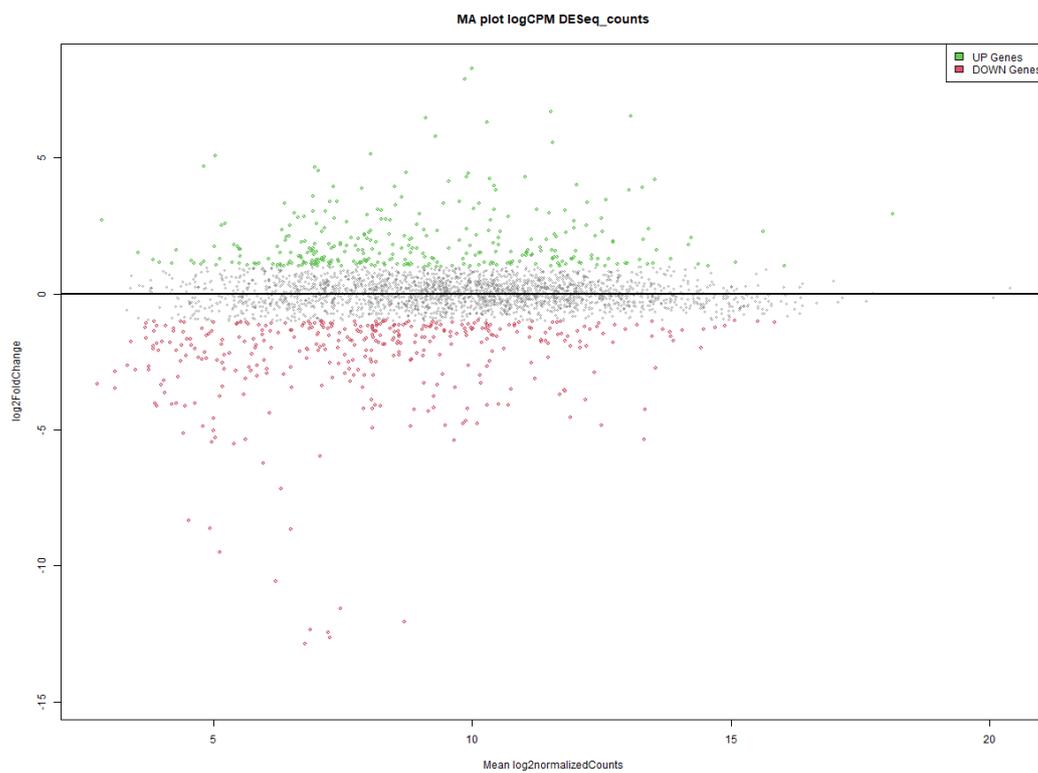
e) C345_2_X_C345_8



f) I056_0_X_I056_2



g) C345_8_X_I056_0



h) C345_8_X_I056_2



APÊNDICE 4: ACEITE DE ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

[REPIS] Decisão editorial Caixa de entrada x



Prof. Dr. Evandro Watanabe <naoresponda_revistasufpi@ufpi.edu.br>

para mim, Nilma, Danilo ▾

Lilian Caroliny Amorim Silva,

Foi tomada uma decisão sobre o artigo submetido à revista Revista
Prevenção de Infecção e Saúde,
"An update on the role of Hfq RNA Chaperone in resistance and virulence of
Acinetobacter baumannii".

A decisão é: Aceitar!

Parabéns. Seu manuscrito foi aceito para publicação na REPIS.
Favor Aguardar contato editorial para providências.

Prof. Dr. Evandro Watanabe
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
evandrowatanabe@gmail.com

Revista Prevenção de Infecção e Saúde (Qualis CAPES B3)
<http://ojs.ufpi.br/index.php/nupcis>

APÊNDICE 5: ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**An update on the role of Hfq RNA Chaperone in resistance and virulence of
*Acinetobacter baumannii***Lílian C. A. Silva¹; Nilma C. Leal²; Danilo E. Xavier³

- 1- Microbiology Laboratory, Department of Microbiology, Instituto Aggeu Magalhães, Recife - PE, Brazil (lilianamorim00@gmail.com); bibliographic research, writing and revision.
- 2- Microbiology Laboratory, Department of Microbiology, Instituto Aggeu Magalhães, Recife - PE, Brazil (nilma.leal@fiocruz.br); bibliographic research, writing and revision.
- 3- Microbiology Laboratory, Department of Microbiology, Instituto Aggeu Magalhães, Recife - PE, Brazil (danilo.xavier@fiocruz.br); bibliographic research, writing and revision.

* Corresponding author: Lílian Caroliny Amorim Silva; Instituto Aggeu Magalhães, Department of Microbiology, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Recife – PE, CEP: 50.740-465, Brazil. E-mail: lilianamorim00@gmail.com. Tel: 81 9 96794922.

FUNDING

Instituto Aggeu Magalhães, Recife - PE, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: The difficulty in treating *Acinetobacter baumannii* infections due to its high rate of resistance to antibiotics has led to the study of mechanisms inherent to the pathogen itself that can be used as effective targets in the treatment. Host Factor I Protein (Hfq) is an RNA chaperone generally necessary to assist in the connection between sRNAs and their mRNA target acting in the regulation of different genes, studies carried out in a range of bacterial species have shown that Hfq acts in a pleiotropic manner, contributing to virulence and response stress. **Outline:** This is an integrative review developed from articles published in any language on Science Direct and PubMed platforms. Data collection and analysis were carried out between the period of April 2020 and February 2021. **Results:** Hfq shown to play important roles in cell growth, OMVs,

metabolism of carbon sources, tolerance to physical and chemical stress, virulence through biofilm formation, fimbriae modulation, among others. **Conclusion:** Our work shows data that strengthen the role of Hfq in different aspects of virulence and environmental adaptation, including antimicrobial resistance of this pathogen, warning about the importance of Hfq as a possible future effective target in the treatment of these infections.

Descriptors: Virulence. Drug resistance. *Acinetobacter baumannii*. Review literature. Chaperone. Host Factor 1 Protein.

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative bacillus recognized for its ability to cause serious nosocomial infections and has emerged as one of the most relevant pathogens for health-associated infections worldwide. The high levels of resistance of this bacterium has been attributed to its great ability to adapt and survive under adverse conditions. Furthermore, *A. baumannii* is able to express virulence factors that facilitate bacterial infection and the expression of determinants that trigger resistance¹⁻⁴.

The post-transcriptional regulation of protein translation by means of small RNAs (sRNAs), which function as small non-coding RNA molecules and are normally involved in the environmental stress response to preserve cellular response to environmental stress to preserve cellular homeostasis, have received increasing attention in bacterial studies. In Gram-negative bacteria, Hfq, an understudied RNA chaperone, is an important part of the interaction between mRNA and sRNA⁵⁻⁷. Hfq plays crucial roles in the regulatory mechanisms that occur after RNA transcription that occur between the sRNA and the target mRNA. It was first detected in *Escherichia coli* in the 1960s and is considered a regulator of RNA transcription involved in responses to stressful conditions, iron homeostasis, and outer membrane synthesis. This chaperone is typically responsible for modulating motility and promoting resistance to cellular stresses, however, *hfq* mutations result in a spread of species-dependent phenotypic changes⁸⁻¹¹.

Studies on Hfq of bacterial pathogens, including *A.baumannii*, have detected, after deletion of the complete gene or part of it, disadvantages for the bacterium itself, including attenuation of virulence, defects in secretory systems expression, reduction of invasion and dissemination through host mammal organs, defects of motility and

decreased expression of several virulence factors¹¹⁻¹⁴. It is very likely that the Hfq RNA chaperone is implicated in regulation of these important processes through sRNAs¹⁵. However, although the Hfq chaperone plays critical roles in cellular stress resistance, the correlation between its expression and stress-related molecules in *A. baumannii* still needs further studies.

This review summarizes the current knowledge on the role of the Hfq RNA chaperone in the virulence and antibiotic resistance of *A. baumannii*, an increasing important human opportunist pathogen.

METHOD

This is an integrative review study, with the objective of gathering results obtained in previous studies, in a systematic and comprehensive way. The study was developed from the analysis of scientific reports published in scientific journals from Science Direct and PubMed databases. The articles were selected by applying the keywords: “Hfq and *Acinetobacter baumannii*”, “Hfq and Gram-negative bacteria”. The databases were accessed from April 2, 2020 to February 23, 2021.

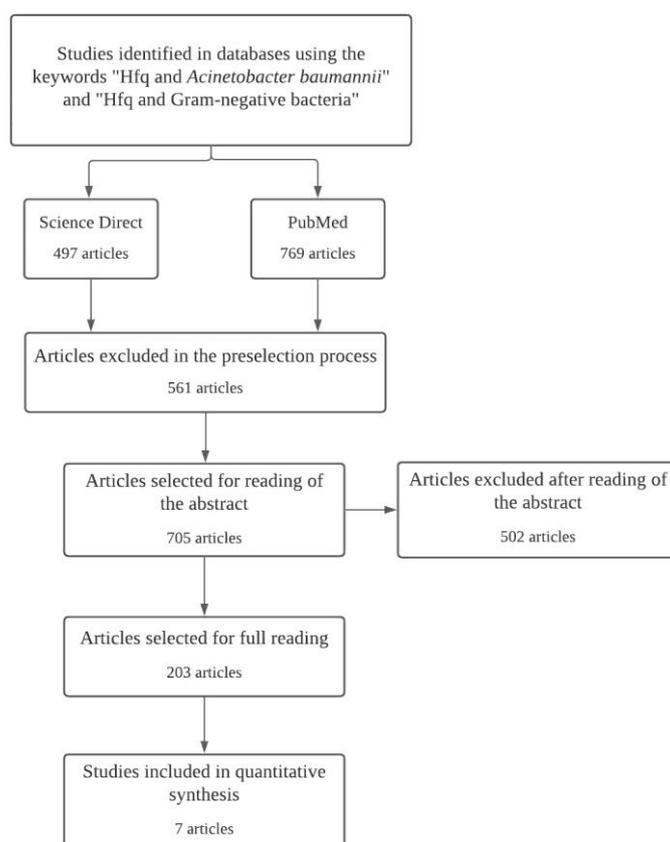
The guiding questions we sought to answer were: does the RNA Hfq chaperone play roles in the resistance and virulence of *A. baumannii*? What are these roles and what are their impacts?

The inclusion criteria were: studies available in full, in any language. As exclusion criteria: those that did not correspond to the object of the study were excluded.

The search results were filtered using the inclusion and exclusion criteria. The pre-selected studies went through the reading of titles and abstracts and then the full and carefully reading of the selected articles was carried out. After analyzing the results of the selected articles, our discussion was elaborated by considering their relationships with other available scientific references.

RESULTS

Seven studies were selected to compose the review, as they present results that are convenient to the guiding question (Figure 1).

Figure 1: Flowchart for selecting the articles included in the study.

Source: Study data.

Caption: Not applicable.

The analysis of the studies selected to compose the review is shown in chart 1, including the authors, year, journal and country where the study was carried out, as well as the objective and conclusions of each study. Three of the selected studies were carried out by a German group, two from the United States of America, one from a Indian and one from a Portuguese group. All articles were published in international journals, four were articles of review and three were original articles.

Chart 1: Analysis of the seven studies selected to compose the review.

Authors	Year / Journal	Country	Aim	Conclusions
Vogel J, Luisi BF	2011 / Nature	Germany	Describe the structural and functional	The main role of the Hfq chaperone is to act in bacterial

			<p>characteristics of Hfq and discuss possible ways in which this RNA chaperone can promote interactions to generate specific regulatory responses in vivo.</p>	<p>regulation, however, the specific roles of this protein are still not fully understood, and further studies on its function are needed. Studies such as a global map of Hfq interaction sites in vivo could establish whether there is a variation in the concentration of Hfq in the bacterial cell, in addition to clarifying the interactions in the regulation of Hfq with other cellular factors.</p>
<p>Sharma A, Dubey V, Sharma R, Devnath K, Gupta VK, Akhter J, et al.</p>	<p>2018 / Journal of Biological Chemistry</p>	<p>Indian</p>	<p>Understand the influence of the C-terminal tail of <i>A. baumannii</i> Hfq.</p>	<p>The flexible C-terminal tail present in <i>A. baumannii</i> Hfq is an integral functional part of this protein, being necessary for high-</p>

				affinity RNA binding.
Kuo HY, Chao HH, Liao PC, Hsu L, Chang KC, Tung CH, et al.	2017 / Frontiers in Microbiology	United States	Clarify the role of <i>A. baumannii</i> Hfq in virulence and stress responses.	In this, which was the first study to illustrate the functional role of Hfq in <i>A. baumannii</i> , it was possible to observe that this chaperone plays a fundamental role in controlling environmental adaptation and bacterial virulence.
Felicinao JR, Grilo AM, Guerreiro SI, Sousa SA, Leitão JH.	2016 / Future Microbiology	Portugal	Review and gather understanding of the role of Hfq in regulating traits related to secretion systems, alternative sigma factors, outer membrane proteins, polysaccharides and iron metabolism in bacterial virulence.	The role of Hfq in the post-transcriptional regulation of genes involved in cellular processes in bacteria of clinical importance is critical, especially its role in the production of virulence factors.
Schilling D, Gerischer U.	2009 / Journal of Bacteriology	Germany	Study <i>Acinetobacter baylyi</i> Hfq, which, due to its elongated C-terminal tail,	A reduction in the growth of <i>A. baylyi</i> was observed after deletion of the complete <i>hfq</i> ORF.

			results in a protein almost twice the size of other gammaproteobacterial Hfq.	Additionally, the deletion or overexpression of the Hfq protein triggered the loss of bacterial cell chain assembly, however, the glycine-rich domain was not responsible for the observed changes.
Updegrove TB, Zhang A, Storza G.	2017 / Current Opinion in Microbiology	United States	Review the results of different studies in order to elucidate the role of Hfq in RNA base pairing, with a main focus on Gram-negative pathogens.	Hfq is a regulator that affects the stability of sRNAs, and acts by enabling the base pairing of sRNA with target mRNAs.
Chao Y, Vogel J.	2012 / Current Opinion in Microbiology	Germany	Gather knowledge about the functions of Hfq in bacterial pathogens and highlight some useful experimental approaches to study these roles.	Hfq is a global regulator responsible for interfering, beneficially or not, in gene expression in different bacterial pathogens.

Source: Study data.

Caption: Not applicable.

DISCUSSION

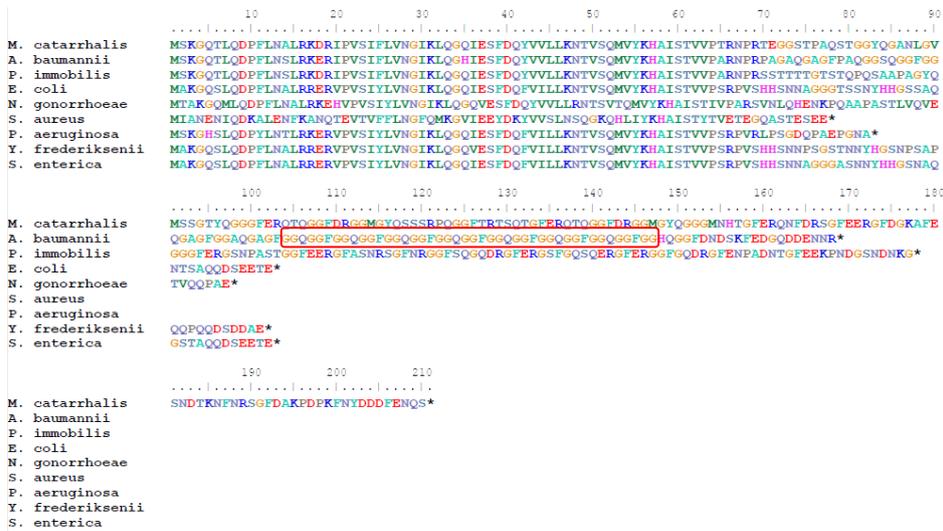
The Hfq RNA Chaperone

The chaperone Hfq RNA (Host Factor I Protein) is a highly conserved protein present in Gram-negative and positive pathogens that collaborates in the efficiency of the regulatory functions of different sRNAs, affecting the responses to stress, virulence and impairment in the growth of several clinically important pathogens, being the best characterized bacterial protein for this role¹⁶⁻¹⁸.

Identified in the 1960s in *Escherichia coli*, the RNA-binding protein Hfq was initially presented as necessary for the replication of the bacteriophage Q β and in the 1970s it was biochemically characterized as an abundant nucleic acid-binding protein, showing resistance to high temperatures, with a high preference for RNA with high rates of AU. Hfq was characterized as a member of the Like-Sm RNA-binding proteins family, found in eukaryotes, bacteria and archaea^{17,19,20-21}. Since the 1990s, when the *hfq* gene was initially identified and silenced in *E. coli*, studies have demonstrated the great advantages offered by the Hfq for the adaptation of the bacterium under stress conditions, where the *hfq* null mutant presented a pleiotropic phenotype that includes defective growth rates, change in cell size, susceptibility to stress, defective oxidation of carbon sources, reduced fitness, increased sensitivity, attenuated virulence, and difficulty responding to stress. Furthermore, the translation of several cellular mRNAs was found to be regulated by Hfq. Currently, it is known that Hfq acts as a chaperone of bacterial cells, facilitating base pairing between small sRNAs and their mRNA targets, so that Hfq interferes with the expression of different mRNAs, positively or negatively^{8,17,20,22-23}.

Hfq is a highly conserved protein, approximately half of bacterial genomes have Hfq homologs. The N-terminal portion of this protein is generally highly conserved between amino acids 1 and 66 in most pathogens, a region responsible for RNA binding and protein interactions. However, the C-terminus of Hfq from different bacteria varies significantly in length and sequence (Figure 2). The largest Hfq proteins are present in members of the *Moraxellaceae* family of gammaproteobacteria. The length of the Hfq chaperone varies considerably in different species, in *Acinetobacter* species, Hfq has 168 to 174 amino acids, for *Psychrobacter* species its size is from 183 to 203 amino acids and up to 210 amino acids for *Moraxella catarrhalis*^{6,24}.

Figure 2: Multiple sequence alignment of Hfq amino acids from different bacterial species.



Source: The authors.

Caption: Multiple sequence alignment visualized with BioEdit Sequence Alignment Editor (v 7.0.5.3). Capital letters indicate amino acids. The numbers indicate the size of the Hfq protein sequence. Asterisks indicate the end of the amino acid sequence. The glycine-rich amino acid repetitive pattern of the *A. baumannii* Hfq sequence is marked by a red box.

Structure of Hfq

Hfq, like the other members of the Sm/Lsm protein family, is characterized by its ring-shaped quaternary architecture that allows interactions with other macromolecules and acts by mediating the binding of sRNAs with their target mRNA^{8,20,25}. Each Hfq subunit is composed of a short, variable N-terminal helix, which is generally four amino acids long, five highly twisted and curved antiparallel β -strands, terminating in an unstructured C-terminal carboxy region. Hfq is a hexamer that has three RNA binding surfaces: proximal, distal, and lateral face, along with a C-terminal tail, necessary for contact between two RNA molecules^{23,26-27}.

The proximal face of Hfq is extremely conserved and binds to uridines at the ends of the bacterial sRNA. The distal face binds to the 5'-UTR untranslated regions of mRNAs and sRNAs. The positively charged side of Hfq binds to a uridine-rich sequence of some sRNAs and mRNAs and plays a role in duplex structure formation and RNA exchange. The C-terminal tail varies substantially in sequence and size, being untidy and flexible.

To date, studies investigating its cellular function of Hfq still yield conflicting conclusions. However, studies suggest that the C-terminal tail portion is important for interaction with some sRNAs^{23-25,27-29}.

Bacterial Hfq and its functions

Several mechanisms of regulation mediated by Hfq has been proposed. This RNA chaperone can stabilize and promote interactions between sRNAs and mRNAs, these interactions can work by activating or preventing protein synthesis through alterations that will remodel the mRNA regions that contain the Ribosome Binding Site (RBS) and the start codon. Hfq can repress protein synthesis by binding to the 5' region of the target mRNA, making it unavailable for sRNA binding, preventing translation initiation. Hfq can also stimulate translation, helping to bind an sRNA to the 5' region of its target mRNA, this prevents the formation of a secondary structure that hinders and prevents binding to the ribosome. Hfq may also protect sRNAs from fragmentation by ribonucleases or cooperate in a way that promotes efficient mRNA fragmentation by associating with RNase E and sRNA. Finally, Hfq can interact with the PAP I protein, stimulating its activity, making the 3' ends of the mRNA accessible for polyadenylation to promote RNA turnover. In previous studies, it was observed that when Hfq is absent, poly-A levels are reduced. In all cases, the information encoded in the RNA will be decisive to define the Hfq's mechanism of action^{8,27,30-31}.

The most important portion for target recognition of an sRNA is its 5' end, which is normally small in Gram-negative bacteria, less than 10 nucleotides in length and triggering a low stability of duplex bonds as they are imperfectly complementary to the target mRNA. Hfq can work around the situation by creating more stable complexes that work by strengthening sRNA-mRNA bonds, allowing the sRNA to complete its regulatory activity. There are a few possible ways for Hfq to act as an aid in forming these bonds, either by increasing the sRNA recognition rate with its target mRNA or by making the sRNA-mRNA duplexes more stable due to their presence. It has also been shown that Hfq can induce alterations in the RNA structure to favor the formation of duplexes^{8,29}.

In bacteria, most of the sRNAs that bind to Hfq are critical in stress responses. An example are the sRNAs that control the expression of RNA polymerase, sigma S (RpoS or $\sigma 38$), which are regulatory proteins activated in response to environmental conditions and act in the regulation of genes expression that promotes bacterial survival under

different stressors. Previous studies have shown that a loop formed in RpoS mRNA blocks the binding to RBS. Hfq can reverse the formation of this looping by binding to an upstream domain of RpoS mRNA, facilitating pairing and up-regulating RpoS expression. In previous studies, low expression of RpoS was observed in a mutant lacking the *hfq* gene (Δhfq), and many of the observed phenotypic effects were attributed to defects in RpoS expression^{19,21-22,32}.

Hfq also regulates the stress response mediated by RpoE (RNA polymerase, extracytoplasmic E), a sigma factor necessary for the response to extracytoplasmic stress, activated in situations such as heat shock (mutants with the silenced *rpoE* gene are unable to grow at temperatures above 42 degrees Celsius) and controls the expression of approximately 100 different genes. Hfq, together with other members of the RpoE regulon, controls the expression of OMPs and other components of the bacterial envelope, thus ensuring their integrity. The *hfq* deletion, in turn, causes severe activation of RpoE, along with uncontrolled OMP expression and increased envelope stress^{11,13,19}.

The destabilization of the mRNA responsible for encoding *ompA* is also related to Hfq. OmpA is one of the main proteins that act and are found in large amounts in the outer membrane of Gram-negative bacteria, having important roles in pathogenicity, including invasion, adhesion and survival in the host organism, being even considered as target proteins for the creation of vaccines. The stability of the OmpA mRNA encoding is inversely proportional to the rate of cell growth. In the stationary phase of slow-growing cells, Hfq accumulates and competes with ribosomes for the 5' untranslated region of the mRNA, repressing ribosome binding and protecting against RNaseE degradation, resulting in mRNA degradation²⁶.

The identification of the functions performed by the Hfq RNA chaperone during infectious processes is largely facilitated by the study of null-*hfq* mutants, since observing what happens to the organism in the absence of the gene of interest is the best way to discover its function. Studies of Δhfq mutants showed growth deficiency and increased susceptibility to stressful conditions. Hfq was also shown to be necessary for the suitability and virulence of almost all bacterial pathogens, especially in Gram-negative bacteria. Δhfq mutants tend to have a phenotype of sensitivity to host defense mechanisms and attenuated virulence, resulting in a failure to survive in the hostile and challenging environments encountered in the host environment, e.g. oxidative stress³³.

It was in the Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica* that the role of Hfq in controlling virulence was first implicated due to its role in the production of

enterotoxins from this microorganism. In other studies, Hfq has also been implicated in the production of exotoxin from *Pseudomonas aeruginosa* and the production of hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*, however the mechanisms that lead to these actions remain unknown. Hfq also controls virulence gene expression and synthesis of a crucial regulator to produce virulence factors in *Vibrio cholerae* and *Pseudomonas aeruginosa*^{6,11,14,33}.

A study carried out with Δhfq mutants of pathogens belonging to thirty-four different species, mostly Gram-negative bacteria, showed that, in most cases, pleiotropic phenotypes are observed in the absence of Hfq in the bacterial organism, such phenotypes compromise pathogen survival under stress conditions, as well as impaired biofilm formation and decreased virulence²².

The Hfq RNA chaperone and *Acinetobacter baumannii*

The *A. baumannii hfq* gene encodes a protein of 168 amino acids, almost twice as long as other bacterial Hfqs, this is a consequence of an unusually elongated C-terminal portion rich in glycine residues that consists of a strictly repeated amino acid pattern unique to *Acinetobacter* species, in turn, the alignment of the *hfq* sequence of the N-terminus revealed a significant level of similarity with other bacterial species, with conserved regions of amino acids between 1 and 66 known to be involved in RNA binding^{6,24}.

The C-terminal region of *A. baumannii* has a distinct repetitive pattern of amino acids GGFGGQ starting at amino acid 104 (Figure 1), which presented itself as an important component of Hfq for conferring flexibility and assisting these proteins in binding and interacting RNA with others protein partners, in addition, through experiments with truncated Hfq proteins it was possible to observe that the absence of the C-terminal portion rich in glycine brought disadvantages for the bacteria with respect to growth, tolerance to stress (oxidative, thermal, acid and osmotic), carbon metabolism, self-regulation of Hfq expression and virulence⁶.

Furthermore, the Hfq sequence reveals a relationship between its C-terminal portion and the family of eukaryotic glycine-rich proteins (GRP), the members of this family of proteins, as in *A. baumannii*, have an RNA recognition domain located in the N-terminal portion and a glycine-rich domain in the C-terminal portion, this glycine-rich tail confers flexibility and assists these proteins in binding RNA and

interacting with other partner proteins. Interestingly, GRPs are recognized as central to RNA interaction and stress adaptation, as is Hfq, these observations may suggest an evolutionary relationship between prokaryotic and eukaryotic LSM proteins and considering the structure and function of Hfq, the presence of a C-Tail terminal that assists in interactions seems to be an obvious advantage^{6,34}.

Experiments that silenced the *hfq* gene from strains of *A. baumannii* and *Acinetobacter baylyi*, a member of the same genus, also demonstrated that this chaperone has important functions for the bacterium itself. After deletion of *hfq*, defects and delays in cell growth of up to 7h, decreased levels of bacterial outer membrane vesicles (OMVs), deficiency in the metabolism of various carbon sources, including sugars, organic acids, amino acids, nucleosides, among others, were observed, drastic decrease in tolerance to physical and chemical stressors that can easily be found in hospital environments, such as temperature, pH, osmotic pressure and oxidative stress with consequent deficiency in the modulation of the expression of genes involved in stress tolerance, such as *basD*, *bauA*, *uspA*, among others^{6,7,24}.

Hfq is also involved in the virulence of *A. baumannii*, being a vital factor for the survival of the pathogen under desiccation, for the formation of biofilms and in the modulation of fimbriae, which in the absence of the gene encoding this chaperone are reduced in compared to a wild-type strain. In addition, silencing the gene encoding Hfq led to a reduction of about 1 log in adhesion of *A. baumannii* cells to eukaryotic cell membranes^{6,7,24}.

Hfq has also been involved in antibiotic resistance. A 2-fold reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of nalidixic acid and gentamicin was observed after deletion of *hfq*, and the resistance was recovered after its complementation. On the other hand, there was an increase in resistance to meropenem in strains with Δhfq mutants when compared to wild cells^{6,7,24}.

CONCLUSIONS

The data presented in this study gather evidence that implies Hfq as a central regulator of numerous functions of virulence and environmental adaptation in *A. baumannii*. The information exposed in this work allows this sRNA to be considered as a possible factor of significant virulence and resistance. Additional studies are needed in

order to better characterize this molecule and its functioning mechanism so that its use is considered as a possible drug target effective against infections by *A. baumannii*.

REFERENCES

- 1- Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin. Infect. Dis. 2008; 46(8): 1254–1263. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18444865/>
- 2- Nwugo CC, Gaddy JA, Zimblar DL, Actis LA. Deciphering the iron response in *Acinetobacter baumannii*: A proteomics approach. J Proteomics. 2011; 74(1): 44–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20692388/>
- 3- Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? Int J Antimicrob Agents. 2008; 32(2): 106–119. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18571905/>
- 4- Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35(3): 219–226. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20047818/>
- 5- Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. Mol Cell. 2011; 43(6): 880–891. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21925377/>
- 6- Sharma A, Dubey V, Sharma R, Devnath K, Gupta VK, Akhter J, et al. The unusual glycine-rich C terminus of the *Acinetobacter baumannii* RNA chaperone Hfq plays an important role in bacterial physiology. J Biol Chem. 2018; 293(35): 13377–13388. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6120210/>
- 7- Kuo HY, Chao HH, Liao PC, Hsu L, Chang KC, Tung CH, et al. Functional characterization of *Acinetobacter baumannii* Lacking the RNA chaperone Hfq. Front Microbiol. 2017; 8: 1-12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18444865/>
- 8- Vogel J, Luisi BF. Hfq and its constellation of RNA. Nat Rev Microbiol. 2011; 9(8): 578–589. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21760622/>
- 9- Chao Y, Vogel JA. A 3' UTR-Derived Small RNA Provides the Regulatory Noncoding Arm of the Inner Membrane Stress Response. Mol Cell. 2016; 61(3): 352–363. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26805574/>
- 10- Bohn C, Rigoulay C, Bouloc P. No detectable effect of RNA-binding protein

- Hfq absence in *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol. 2007; 7: 1–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17291347/>
- 11- Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K, Vogel J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol. 2007; 63(1): 193–217. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17163975/>
 - 12- Sonnleitner E, Hagens S, Rosenau F, Wilhelm S, Habel A, Jäger KE, et al. Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. Microb Pathog. 2003; 35(5):217–228. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14521880/>
 - 13- Ding Y, Davis BM, Waldor MK. Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates σ E expression. Mol Microbiol. 2004; 53(1): 345–354. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15225327/>
 - 14- Chiang MK, Lu MC, Liu LC, Lin CT, Lai YC. Impact of Hfq on global gene expression and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. PLoS ONE. 2011; 6(7): e22248. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21779404/>
 - 15- Amin SV, Roberts JT, Patterson DG, Coley AB, Allred JA, Denner, et al. Novel small RNA (sRNA) landscape of the starvation-stress response transcriptome of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. RNA Biol. 2016; 13(3): 331–342. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26853797/>
 - 16- Berry KE, Hochschild A. A bacterial three-hybrid assay detects *Escherichia coli* Hfq-sRNA interactions in vivo. Nucleic Acids Res. 2018; 46(2): 1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29140461/>
 - 17- Andrade JM, Santos RF, Chelysheva I, Ignatova Z, Arraiano CM. The RNA - binding protein Hfq is important for ribosome biogenesis and affects translation fidelity. EMBO J. 2018; 37(11): 1–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29669858/>
 - 18- Zhang L, Yu W, Tang Y, Li H, Ma X, Liu Z. RNA chaperone hfq mediates persistence to multiple antibiotics in *Aeromonas veronii*. Microb Pathog. 2019; 132: 124–128. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31054368/>
 - 19- Kulesus RR, Diaz-Perez K, Slechta ES, Eto DS, Mulvey MA. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 2008; 76(7): 3019–3026. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18458066/>
 - 20- De Lay N, Schu DJ, Gottesman S. Bacterial small RNA-based negative

- regulation: Hfq and its accomplices. *J Biol Chem*. 2013; 288(12): 7996–8003. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23362267/>
- 21- Peng Y, Curtis JE, Fang X, Woodson SA. Structural model of an mRNA in complex with the bacterial chaperone Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(48): 17134–17139. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25404287/>
- 22- Felicinao JR, Grilo AM, Guerreiro SI, Sousa SA, Leitão JH. Hfq: A multifaceted RNA chaperone involved in virulence. *Future Microbiol*. 2016; 11(1): 137–151. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26685037/>
- 23- Morita T, Aiba H. Mechanism and physiological significance of autoregulation of the *Escherichia coli* HFQ gene. *Rna*. 2019; 25(2): 264–276, 2019. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30487269/>
- 24- Schilling D, Gerischer U. The *Acinetobacter baylyi* hfq gene encodes a large protein with an unusual C terminus. *J Bacteriol*. 2009; 191(17): 5553–5562. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19561130/>
- 25- Yamada J, Yamasaki S, Hirakawa H, Hayashi-Nishino M, Yamaguchi A, Nishino K. Impact of the RNA chaperone HFQ on multidrug resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(5): 853–858. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20211861/>
- 26- Murina VN, Nikulin AD. Bacterial Small Regulatory RNAs and Hfq Protein. *Biochemistry (Mosc)*. 2015; 80(13): 1647–1654. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26878571/>
- 27- Updegrave TB, Zhang A, Storza G. Hfq: the flexible RNA matchmaker. *Curr Opin Microbiol*. 2017; 25(5): 1032–1057. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26907610/>
- 28- Dimastrogiovanni D, Fröhlich KS, Bandyra KJ, Bruce HA, Hohensee S, Vogel J, Luisi BF. Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein. *Elife*. 2014; 3: 1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25551292/>
- 29- Santiago-Frangos A, Jeliakov JR, Gray JJ, Woodson SA. Acidic C-terminal domains autoregulate the RNA chaperone Hfq. *Elife*. 2017; 6: 1–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28826489/>
- 30- Mikulecky PJ, Kaw MK, Brescia CC, Takach JC, Sledjeski DD, Feig AL. *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and

- poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2004; 11(12): 1206–1214. Available from: <https://www.nature.com/articles/nsmb858>
- 31- Andrade JM, Pobre V, Matos AM, Arraiano CM. The crucial role of PNPase in the degradation of small RNAs that are not associated with Hfq. *RNA.* 2012; 18(4): 844–855. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22355164/>
- 32- Peterson CN, LrhA regulates *rpoS* translation in response to the Rcs phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2006; 188(9): 3175–3181. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16621809/>
- 33- Chao Y, Vogel J. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 2012; 13(1): 24–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20080057/>

ANEXOS

ANEXO 1: DECLARAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

Declaro, para fins acadêmicos, que o projeto intitulado “**HETERORRESISTÊNCIA E RESPOSTA ADAPTATIVA À POLIMIXINA B DE CEPAS CLÍNICAS DE *Acinetobacter baumannii***”, da discente **Lílian Caroliny Amorim Silva**, do curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE), sob a orientação da pesquisadora **Dra. Nilma Cintra Leal** e coorientação do pesquisador **Dr. Danilo Elias Xavier**, não envolve seres humanos e/ou animais, seja de forma direta ou indireta, portando o mesmo não necessita ser avaliado criteriosamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Recife, 25 de fevereiro de 2019

Msc. Lílian Caroliny Amorim Silva
Discente do Doutorado PPGBBS
Instituto Aggeu Magalhães

Dra. Nilma Cintra Leal
Pesquisadora em Saúde Pública
Instituto Aggeu Magalhães

Dr. Danilo Elias Xavier
Pesquisador em Saúde Pública
Instituto Aggeu Magalhães