



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BÁRBARA GIONCO

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV PRODUTORA DE
UM ANTIBIÓTICO ORGANOMETÁLICO:
ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA NA PRESENÇA DE COBRE
E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM ISOLADOS DE
ACINETOBACTER BAUMANNII MULTIRRESISTENTES**

BÁRBARA GIONCO

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV PRODUTORA DE
UM ANTIBIÓTICO ORGANOMETÁLICO:
ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA NA PRESENÇA DE COBRE
E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM ISOLADOS DE
ACINETOBACTER BAUMANNII MULTIRRESISTENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

Londrina
2016

BÁRBARA GIONCO

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV PRODUTORA DE UM
ANTIBIÓTICO ORGANOMETÁLICO:
ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA NA PRESENÇA DE COBRE E
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM ISOLADOS DE *ACINETOBACTER
BAUMANNII* MULTIRRESISTENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Floristher Elaine Carrra Marroni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 12 de agosto de 2016.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Gionco, Bárbara.

Pseudomonas aeruginosa cepa LV produtora de um antibiótico organometálico: análise do transcriptoma na presença de cobre e atividade antibacteriana em isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes / Bárbara Gionco. - Londrina, 2016.
79 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade .

Coorientador: Admilton Gonçalves de Oliveira.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Multirresistência bacteriana - Tese. 2. Novos antimicrobianos - Tese. 3. Análise de transcriptoma - Tese. I. Andrade , Galdino. II. de Oliveira, Admilton Gonçalves . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

À Maria Santíssima, de quem sou filha e escrava.
“*Totus tuus ego sum et omnia mea tua sunt. Accipio Te in mea
omnia. Praebe mihi cor tuum, Maria*”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Trindade Santa, fonte de toda sabedoria, à Eles a minha gratidão por terem me guiado e conduzido na realização desse sonho.

Aos meus pais Antonio e Silvana. Não há palavras que possam ser ditas para agradecer tudo o que vocês fizeram e fazem por mim. Espero poder, com a minha vida, retribuir a todo esse amor.

À minha irmã, Beatriz. Obrigada por partilhar a vida comigo e me fazer rir quando eu mais preciso.

Ao meu namorado Roger, você me ensina a ser paciente e a respeitar o tempo de Deus. Obrigada por descomplicar minha vida. Você faz do meu ordinário extraordinário.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Galdino Andrade Filho, por todas as oportunidades que tive trabalhando com você. Agradeço pela confiança e respeito que sempre demonstrou por mim e pelo meu trabalho.

Ao meu Co-Orientador, Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, pela constante ajuda e direcionamento. Sou muito grata por tudo que aprendi e aprendo com você, você é um grande exemplo para mim.

À Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta. Obrigada por ter aberto as portas do NIP – 5, a senhora foi fundamental para a execução dessa tese.

Ao Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira pela calma e paciência ao me ensinar sobre “o mundo da bioinformática”.

À Profa. Dra. Floristher Elaine Carrara Marroni. Muito obrigada por ter me ensinado a amar a microbiologia, devo grande parte do que sei a você. Serei eternamente grata por sua ajuda, exortações e por todo amor que você tem por mim.

Ao Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos, pela disponibilidade e carinho que sempre me tratou. Obrigada pela ajuda nas correções da tese.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM). A rotina ficou mais leve e agradável por ter vocês comigo. Obrigada pela convivência.

De maneira especial agradeço aos amigos do LEM: Ana Carolina Polano Vivan, Ane Stéfano Simionato, Miguel Octavio Pérez Navarro, Martha Viviana Torrez Cely e Vanessa Fogaça de Freitas. O amor e respeito que tenho por cada um é imenso, vocês foram o meu suporte nesses quatro anos.

Ao amigo Eliandro Reis Tavares. Só nós sabemos o carinho e respeito que temos um pelo outro. Você foi essencial para mim, meu verdadeiro companheiro nesses quatro anos. Espero que nossa amizade perdure por toda a vida.

A todos os amigos, de longe e de perto, vocês são a família que escolhi. Até sem entenderem nada do que faço sempre me encorajaram na luta por essa conquista. A amizade de vocês edifica minha vida.

À coordenação e todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos de Doutorado.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução dessa tese, o meus mais sinceros agradecimentos

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança
brincando à beira-mar, divertindo-me em
descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma
concha mais bonita que as outras, enquanto o
imenso oceano da verdade continua misterioso
diante de meus olhos.”*

Isaac Newton

GIONCO, Bárbara. **Pseudomonas aeruginosa cepa Iv produtora de um antibiótico organometálico**: análise do transcriptoma na presença de cobre e atividade antibacteriana em isolados de acinetobacter baumannii multirresistentes. 2016. 80 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

As infecções causadas por microrganismos multirresistentes constituem um problema de saúde pública e apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. *Acinetobacter baumannii* é um dos principais patógenos multiresistentes relacionados às infecções hospitalares, com altas taxas de resistência aos carbapenêmicos relatadas em importantes centros de saúde. Atualmente a terapia antimicrobiana para o tratamento das infecções multirresistentes por *A. baumannii* baseia-se no uso de polimixinas, e tigeciclina, além da combinação de fármacos. Entretanto, isolados resistentes a essas drogas já foram detectados. Frente a este problema crescente há uma incerteza na perspectiva do uso de antimicrobianos, levando à necessidade de descoberta de novos compostos. O solo é um ecossistema promissor na busca de novos antimicrobianos e bactérias do gênero *Pseudomonas* isoladas desse hábitat se destacam como um dos microrganismos mais estudados na produção de compostos bioativos. Estratégias de biologia molecular, como o sequenciamento de RNA, são fundamentais na elucidação das vias metabólicas de novos compostos, visando à melhoria e otimização de sua produção. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de analisar a expressão gênica diferencial de uma cepa ambiental de *P. aeruginosa*, isolada do solo, produtora de um composto organometálico com atividade antimicrobiana, pela metodologia do RNA-seq, para a compreensão da via de síntese do agente bioativo. Além disso, objetivamos testar o composto produzido pela cepa, isoladamente ou em combinação com os fármacos comerciais imipenem e polimixina B, em isolados multirresistentes de *A. baumannii*, a fim de detectar sua possível ação sinérgica. Pela análise dos transcritos foram anotados nove genes diferencialmente expressos com relevância estatística nas condições ausência/presença do composto: três deles relacionados ao transporte de íons metálicos (PA3521, PA3523 e PA3920), três (PA2691, PA4141 e PA4782) não caracterizados em nenhum dos bancos utilizados, um gene (PA3574a) associado ao grupo de chaperonas ligadas ao cobre, um (PA4872) classificado como um regulador de transcrição e um dos genes (phzA2) relacionado à via biosintética das fenazinas. Esses resultados nos permitiram associar a produção do composto com a via metabólica das fenazinas, entretanto mais estudos precisam ser realizados para a confirmação e elucidação da hipótese. Para os cinco isolados multirresistentes de *A. baumannii* testados dois apresentaram resistência a polimixina B e todos foram resistentes ao imipenem com concentração inibitória mínima para o composto organometálico foi de 7,8µg/ml. A combinação do imipenem com o composto apresentou efeito antagônico para dois isolados e ação indiferente para os demais. A combinação com a polimixina B foi mais eficiente, apresentando ação sinérgica para todas as amostras de *A. baumannii*. Portanto, essa combinação fornece uma perspectiva futura para uma nova forma de utilização da polimixina B no tratamento das infecções multirresistentes causadas por *A. baumannii*.

Palavras-chave: Multirresistência. *Acinetobacter baumannii*. Composto Organometálico. RNA-seq. Expressão gênica diferencial.

GIONCO, Bárbara. **Pseudomonas aeruginosa strain Iv producing an organometallic antibiotic:** Analysis of differential gene expression of an environmental strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing an organometallic compound bioactive and their activity against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. 2016. 80 p. Tesis (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Infections caused by multiresistant microorganisms constitute a health problem that have high rates of morbidity and mortality worldwide. *Acinetobacter baumannii* is a major multiresistant pathogens related in hospital infections, with high rates of carbapenem resistance reported in important health centers. Currently, antimicrobial therapy for the treatment of multiresistant *A. baumannii* infections is based on the use of polymyxins and tigecycline or in drugs combination. However, isolates resistant to these drugs have been detected. Faced with this growing problem there is uncertainty in view of the use of antimicrobials, leading to the need for discovery of new compounds. Soil is a promising ecosystem in search of new antimicrobials and bacteria of the genus *Pseudomonas*, isolated habitat, stand out as one of the most studied organisms in the production of bioactive compounds. Molecular biology strategies, such as RNA sequencing, are critical in elucidating the metabolic routs of new compounds in order to improve and optimize its production. This study was developed in order to analyze the differential gene expression of an environmental strain of *P. aeruginosa* isolated from soil, producing an organometallic compound with antimicrobial activity by RNA-Seq methodology for understanding of the bioactive agent synthesis. Furthermore, the compound produced by the strain was tested alone or in combination with imipenem commercial drugs and polymyxin B in multidrug-resistant isolates of *A. baumannii*, in order to detect a possible synergistic action. By the analysis of the transcripts were noted nine genes differentially expressed with statistical significance in the absence/presence of the compound: three of them related to the transport of metal ions (PA3521, PA3523 and PA3920), three (PA2691, PA4141 and PA4782) not detected in any of the banks used, a gene (PA3574a) associated with chaperones group attached to the copper, one (PA4872) classified as a transcriptional regulator and a gene (phzA2) related to the phenazine biosynthetic route. These results allowed us to associate the production of the compound to the metabolic rout of phenazines, however more studies are needed to confirm and elucidate the hypothesis. For the five multiresistant isolates of *A. baumannii* tested, two showed resistance to polymyxin B and all were resistant to imipenem with an minimum inhibitory concentration for the organometallic compound of 7.8µg/ml. The combination of imipenem with the compound showed antagonistic effect for two isolates and indifferent action for the others. The combination with polymyxin B was most effective, with synergistic action in all samples of *A. baumannii* tested. Therefore, this combination provides a future perspective of a new way of use of polymyxin B in the treatment of multiresistant *A. baumannii* infections.

Keywords: Multidrug resistance. *Acinetobacter baumannii*. New compounds. RNA Seq. Differential gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	<i>Antagonistic Effect</i>
BGN	Bacilo Gram-Negativo
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDC	<i>Center of Diseases Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CHDL	<i>Carbapenem-Hidrolizing Class-D β-lactamases</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DDBJ	<i>DNA Data Bank of Japan</i>
EMBL-EBI	<i>European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute</i>
FICI	<i>Fractionated Inhibitory Concentration Index</i>
FRPKM	<i>Fragments Reads per Kilobase per Million of Mapped Reads</i>
INSDC	<i>International Nucleotide Sequence Database Collaboration</i>
INTERPRO	<i>Protein Sequence Analysis & Classification</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae Carbapenemase</i>
LV	Lesão Velha
MHA	<i>Mueller Hinton Agar</i>
MHB	<i>Mueller Hinton Broth</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MR	<i>Multidrug-resistant</i>
NB	<i>Nutrient Broth</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NE	<i>No Effect</i>
OAC	<i>Organocopper Antibiotic Compound</i>
PDR	<i>Pandrug-resistant</i>
PFAM	<i>Protein Domain Database</i>
PIB	Produto Interno Bruto
PN	Produtos Naturais
R	<i>Resistant</i>
RA	Resistência Antimicrobiana

RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPKM	<i>Reads per Kilobase per Million of Mapped Reads</i>
RPM	Rotações por Minuto
S	<i>Sensitive</i>
SE	<i>Synergistic Effect</i>
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
UNIPROT	<i>Universal Protein Resource</i>
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
XDR	<i>Extensively Drug-resistant</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Linha do tempo na descoberta dos antimicrobianos.....	20
Figura 2 –	Linha do tempo da terapia antimicrobiana. R – resistência, XDR extremamente resistente	23
Figura 3 –	Projeção do impacto causado no Produto Interno Bruto (PIB) mundial pela resistência antimicrobiana. Os valores foram dados em trilhões de USD (United States Dollar - \$).....	25
Figura 4 –	Epidemiologia global da resistência aos carbapenêmicos em <i>A. baumannii</i>	27
Figura 5 –	Fluxo de trabalho aplicado à tecnologia de RNA-seq. Os quadrados azuis representam o fluxograma experimental e os vermelhos a descrição dos processos e algumas opções metodológicas disponíveis no mercado	31
Figura 6 -	Esquemas das montagens de RNA-seq. O esquema à esquerda representa a montagem por genoma guiado e à direita por genoma independente	33
Figura 7 –	Fenazinas associadas ao biocontrole produzidas por <i>Pseudomonas spp.</i>	37
ARTIGO A		
Figura 1 -	Fluxo de trabalho das etapas de extração do RNA, depleção do RNA, síntese do cDNA, construção e sequenciamento das bibliotecas genômicas	53
Figura 2 -	Dispersão dos genes expressos entre os tratamentos quando comparados com o genoma de referência PA01	55
Figura 3 -	Relação integrada dos genes hiperexpressos quando há um aumento de cobre no meio de cultivo e as possíveis hipóteses de sua expulsão: eliminação ativa e biorremediação	60
ARTIGO B		
Figura 1 -	Curves of growth and <i>viability</i> for the isolated <i>A. baumannii</i> <i>bla</i> _{OXA-23} . The green line represents the control (growth	

curve), the blue line is the counts for polymyxin B, in purple for OAC and pink the combination Pol B vs OAC. The time is given in hours and each point on the graph is the sum of 2 hours from the inoculation time70

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1 -** Número e a porcentagem de *reads* mapeados e não mapeados das triplicatas de cada tratamento.....54
- Tabela 2 -** Categorias funcionais dos genes hiperexpressos com significância estatística, para os quatro banco de dados analisados e seus respectivos acessos57

ARTIGO B

- Tabela 1 -** Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the six isolates of *A. baumannii* to commercial antibiotics, OAC, the synergic actions between them and the FICI. (R) resistant, (S) sensitive, (AE) antagonistic effect, (NE) no effect, (SE) synergistic effect effect. Values MIC are given in µg/mL.....68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	A ERA ANTIBIÓTICA	19
3.2.	A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	21
3.2.1	Conceitos Em Resistência Antimicrobiana	21
3.2.2	O Impacto Econômico Da Resistência Antimicrobiana	24
3.2.3	A Resistência Antimicrobiana Em <i>Acinetobacter Baumannii</i>	26
3.3	NOVOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM NATURAL.....	28
3.3.1	A Triagem Fenotípica Na Detecção De Novos Produtos Naturais.....	28
3.3.2	A Triagem Molecular Na Detecção De Novos Produtos Naturais.....	29
3.3.2.1	<i>Análises de transcriptomas na descoberta das vias biossintéticas de produtos naturais</i>	30
3.1.1.1	<i>Metodologias de “reconstrução do genoma”</i>	33
3.3.2.3	<i>Expressão diferencial</i>	34
3.3.2.4	<i>Anotação dos transcritos</i>	34
3.3.3	Compostos Naturais Em <i>Pseudomonas Spp</i>	35
	REFERÊNCIAS	38
	ARTIGO A – ANÁLISE DA EXPRESÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE UMA CEPA AMBIENTAL DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PRODUTORA DE UM COMPOSTO ORGANOMETÁLICO BIOATIVO	46
	ARTIGO B – SYNERGISTIC ACTION OF POLYMYXIN B AND A ORGANOCOPPER COMPOUND AGAINST MULTIRESISTANT <i>Acinetobacter baumannii</i> ISOLATES	64
	CONCLUSÃO	79

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos, especialmente entre os bacilos Gram-negativos (BGN), tornou-se um sério problema de saúde pública. As infecções hospitalares causadas por BGN multirresistentes constituem uma epidemia global, principalmente entre os pacientes internados nas unidades de terapia intensiva (UTIs). O BGN *Acinetobacter baumannii* tornou-se um dos mais importantes patógenos da atualidade, além do seu papel como agente causador de infecções hospitalares graves e de difícil tratamento, este microrganismo está associado a importantes infecções adquiridas na comunidade (KAYE, POGUE, 2016). As infecções hospitalares causadas por *A. baumannii* incluem predominantemente pneumonia associada à ventilação mecânica seguida por infecções urinárias, infecções sanguíneas, infecções de feridas e meningites (GONZALEZ-VILLORIA, VALVERDE-GARDUNO, 2016). O sucesso de *A. baumannii* como patógeno hospitalar está amplamente relacionado à capacidade deste microrganismo sobreviver por períodos prolongados nesse ambiente assim como sua habilidade em produzir surtos (WEBER, HARDING, FELDMAN, 2015). Além disso, a resistência intrínseca apresentada por esse microrganismo frente a diferentes classes de antimicrobianos somada à sua notável habilidade em adquirir e acumular elementos genéticos móveis com determinantes de resistência adicionais, leva a emergência de isolados clínicos multirresistentes (BONNIN, NORDMAN, POIREL, 2013).

Os aminoglicosídeos, os β -lactâmicos e as tetraciclina foram amplamente utilizados no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* até a década de 70. A introdução dos carbapenêmicos nos anos 80 representou uma excelente opção terapêutica para as infecções causadas por cepas multirresistentes, tornando-se a droga de escolha no tratamento dessas enfermidades. Entretanto com o uso abusivo dessa classe de β -lactâmicos isolados resistentes foram selecionados (ZILBERBERG et al., 2016). Dados do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* revelaram que entre os anos de 2008-2010 a resistência ao imipenem em *Acinetobacter* spp. na América Latina era de aproximadamente 68% (GALES, SADER, 2012). Segundo Rossi (2011),

a taxa média de resistência aos carbapenêmicos em amostras de *A. baumannii* isolados no Brasil varia entre 25% e 45%.

Para os isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos as opções terapêuticas ficam restritas às polimixinas (polimixina B e colistina) e à tigeciclina. No entanto, amostras resistentes a estes antimicrobianos têm sido detectadas e estão relacionadas à terapia prévia com estes fármacos (MENEGUCCI et al., 2016). Surtos de resistência em *Acinetobacter* spp. às polimixinas e à tigeciclina já foram relatados em várias regiões no mundo (CHUNG et al., 2016; CHEAH et al., 2016; SUN et al., 2016; KIM et al., 2016)

Com a emergência de microrganismos multirresistentes e a falta de opções terapêuticas para o tratamento das infecções por esses patógenos a busca por novos agentes antimicrobianos é uma necessidade. Atualmente, poucos compostos com atividade antibiótica estão em estudo, sendo esses de amplo espectro para microrganismos Gram-positivos ou para infecções do trato respiratório. O cenário para bactérias Gram-negativas é ainda mais alarmante, pois não há compostos com novo mecanismo de ação em ensaios pré-clínicos (BASSETTI, RIGHI, 2015; PAYNE, GWYNN, HOLMES, POMPLIANO, 2007).

Os microrganismos competem entre si no ambiente em que vivem, inibindo o crescimento ou desenvolvimento uns dos outros, quer pela liberação de produtos metabólicos que alteram o meio tornando-o desfavorável, quer pela produção de substâncias químicas específicas, que são exemplos de antimicrobianos. Nesse aspecto, bactérias de solo são promissoras na busca de novos antimicrobianos, já que compostos antibacterianos isolados destas bactérias apresentam diferentes mecanismos de ação, como inibição da síntese proteica, inibição de RNA polimerase e interferência na síntese da parede celular (SARAVANA KUMAR, DURAI PANDIYAN, IGNACIMUTHU, 2014). Na busca por novos fármacos com atividade antimicrobiana abordagens relacionadas a técnicas de biologia molecular também são importantes pois visam a identificação dos possíveis genes associados com a biossíntese dos novos compostos antimicrobianos. O conhecimento da informação genética primária em relação à função de suas respectivas vias biossintéticas permite a otimização da produção do composto de interesse (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina mostraram que um antimicrobiano natural, produzido por um isolado ambiental de *Pseudomonas aeruginosa*, é capaz de atuar contra isolados multirresistente *Klebsiella pneumoniae*, produtora da carbapenemase KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), contra *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina, além de atuar contra patógenos de interesse agrônomo (KERBAUY et al., 2016; de OLIVEIRA et al., 2016; CARDOZO et al., 2013). Em paralelo aos trabalhos anteriores, o presente estudo avaliou a atividade deste antimicrobiano natural (composto organometálico) contra isolados clínicos multirresistentes de *A. baumannii*, uma vez que as alternativas terapêuticas a este patógeno estão se tornando cada vez mais ineficazes como consequência da resistência, tornando-se imperativo o estudo e o desenvolvimento de novos antimicrobianos e de terapias alternativas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão gênica diferencial de uma cepa ambiental de *Pseudomonas* produtora de um composto bioativo e testá-lo contra isolados isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*.

2.2 Objetivos Específicos

- Cultivar a cepa ambiental de *Pseudomonas aeruginosa* em presença ou ausência do íon cobre e extrair o RNA total e depletar o RNA ribossômico em ambos tratamentos.
- Construir bibliotecas de cDNA com o RNA depletado e sequênciá-las pela metodologia do RNA-seq.
- Mapear os transcritos gerados no sequenciamento no genoma da cepa de referência *P. aeruginosa* PA01.
- Analisar a expressão gênica diferencial entre os tratamentos e realizar a anotação funcional dos transcritos diferencialmente expressos.
- Testar o composto organometálico produzido pela cepa de *P. aeruginosa* contra isolados multiresistentes de *A. baumannii*.
- Determinar a concentração inibitória mínima dos antimicrobianos comerciais polimixina B e imipenem e do composto organometálico para os isolados de *A. baumannii*.
- Avaliar o efeito sinérgico dos antimicrobianos comerciais combinados com o composto organometálico no isolado *A. baumannii* *bla*_{OXA-23}.
- Construir curvas de viabilidade para o isolado *A. baumannii* *bla*_{OXA-23} na presença do composto organometálico, polimixina B e na combinação dos agentes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.2 A era antibiótica

Os antimicrobianos são, provavelmente, uma das formas mais bem sucedidas de quimioterápicos na história da medicina. Geralmente associamos o início da “era antibiótica” moderna com os nomes Paul Ehrlich e Alexander Fleming. Em 1891 Ehrlich começou a trabalhar no campo da quimioterapia estudando o efeito antimalárico do azul de metileno (BOSCH, ROSICH, 2008). A partir desse estudo Ehrlich teve a idéia de uma “bala mágica” que teria como alvo apenas os microrganismos causadores das doenças e não as células do hospedeiro. Em 1904, esta inovadora ideia, o levou a iniciar uma triagem sistemática para encontrar uma droga contra a sífilis, doença endêmica e quase incurável naquela época (AMINOV, 2010).

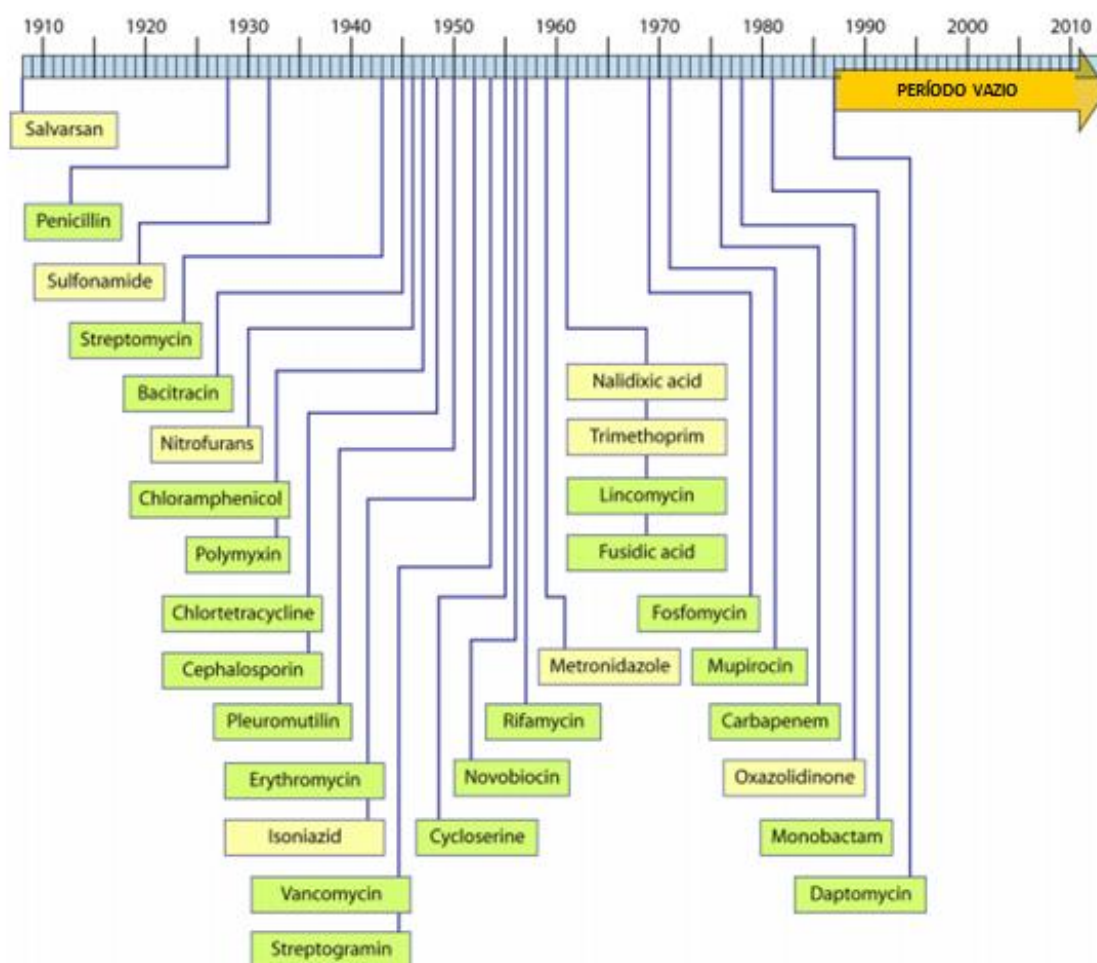
A princípio a doença era tratada com sais orgânicos de mercúrio, tratamento esse que tinha efeitos colaterais graves e pouca eficácia. Ehrlich, juntamente com o químico Alfred Bertheim e o bacteriologista Sahachiro Hata, em seu laboratório, sintetizaram centenas de derivados de um fármaco altamente tóxico e testaram em coelhos infectados com o patógeno. Em 1909, um desses derivados, curou os coelhos infectados e tornou-se uma promessa para o tratamento de pacientes com a doença (EHRlich, HATA, 1910). A droga, comercializada com o nome de Salvarsan foi um grande sucesso, sendo o fármaco mais frequentemente prescrito para o tratamento de sífilis até a sua substituição pela penicilina (MAHONEY et al., 1943).

Em 1928 Fleming iniciou uma série de experimentos com bactérias do gênero *Staphylococcus*. Acidentalmente, uma placa de Petri foi deixada aberta próxima a uma janela em seu laboratório, no Hospital de St. Mary, em Londres; por esse motivo a placa foi contaminada com esporos de fungos (AMINOV, 2010). Fleming observou que as bactérias mais próximas às colônias do fungo haviam morrido e, após o isolamento, identificou o microrganismo como pertencente ao gênero *Penicillium*. Alguns experimentos depois notou que fungo era eficaz contra agentes patogênicos Gram-positivos causadores da escarlatina, pneumonia, gonorreia, meningite e difteria. Fleming concluiu que não era o fungo propriamente dito que matava as bactérias mais sim o “suco”

que eles produziam. Ele nomeou então o “suco do fungo” de penicilina (FLEMING, 1929; TAN, TATSUMURA, 2015). Anos mais tarde Fleming afirmou: “Quando acordei, logo após o amanhecer em 28 de setembro de 1928, eu certamente não pretendia revolucionar toda a medicina por descobrir o primeiro antibiótico do mundo. Mas suponho que isso foi exatamente o que eu fiz” (TAN, TATSUMURA, 2015).

Iniciou-se então a “era de ouro” na busca de antimicrobianos (figura 1). Esse período, desde a descoberta do Salvarsan até 1960, ficou marcado pelo rastreamento de antimicrobianos originados de produtos naturais, extraídos de microrganismos. Essa triagem empírica era realizada analisando a capacidade dos compostos em inibir o crescimento dos patógenos de interesse, sem considerar o seu mecanismo de ação (CHOOPTA, 2000).

Figura 1 - Linha do tempo na descoberta dos antimicrobianos



Fonte: Adaptado de Silver, 2011

Após 1960 o método de rastreamento de novos compostos bioativos foi modificado para a busca dos mecanismos de ação de cada composto. Nesse novo conceito, a Indústria Farmacêutica pesou os custos dos recursos gastos para o rastreamento empírico de novos produtos, optando pela química sintética, onde o alvo a ser atingido é considerado, evitando também uma resistência cruzada com outras drogas. Por fim, a partir da década de 1980 até a atualidade, temos o denominado “período vazio”, onde vemos a ausência na condução da descoberta de novos antibacterianos. Essa grande lacuna é derivada da falta de investimento e de pesquisas na área, muito embora a necessidade contínua de novos compostos para o combate de organismos resistentes seja evidente (SILVER, 2011).

3.3 A resistência aos antimicrobianos

3.3.1 Conceitos em resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana (RA) é a capacidade que os microrganismos têm de se multiplicar na presença de concentrações mais elevadas de uma droga do que as doses terapêuticas. É um fenômeno biológico de adaptação natural das bactérias que se segue à introdução de agentes antimicrobianos. O surgimento de resistência a vários agentes antimicrobianos em bactérias patogênicas tornou-se uma ameaça significativa a saúde pública, pois há menos, ou por vezes não há, agentes antimicrobianos eficazes disponíveis para infecções causadas por esses patógenos (FRIEDMAN, TEMKIN, CARMELI, 2015).

A RA pode ser classificada de acordo com sua multiplicidade às classes dos agentes antimicrobianos testados em um patógeno específico. Assim, o termo multirresistência (*multidrug-resistant* – MR) é atribuído às bactérias não suscetíveis ao menos a um agente, em três ou mais classes, dos antimicrobianos testados contra esse patógeno. A denominação extensivamente resistente (*extensively drug-resistant* – XDR) é utilizada quando o isolado não for suscetível ao menos a um agente antimicrobiano entre todas as classes testadas, com exceção de duas ou menos classes. Por fim a definição pan-resistente (*pandrug-resistant* – PDR) engloba as bactérias

que não são suscetíveis a todos os agentes antimicrobianos em todas as classes testadas (MAGIORAKOS, et al., 2012).

Os microrganismos possuem estratégias para resistir às novas drogas usadas para combatê-los. Por exemplo, dois anos após as sulfonamidas serem introduzidas, em 1937, relatos de resistência à esse antibiótico foram descritos (figura 2). A resistência tornou-se um grande problema pois a velocidade da descoberta de novos antimicrobianos é muito inferior ao uso abusivo dos mesmos (DAVIES, DAVIES, 2010).

Os principais mecanismos de RA acontecem por meio de de modificações do sítio alvo da droga ou por alterações que levem à diminuição das concentrações disponíveis do composto. Os locais de atividade da droga (os alvos) podem ser transformados por mutações genômicas (por exemplo, na resistência à sulfonamida) e os compostos (os antibióticos) podem sofrer inativação enzimática e degradação (por exemplo, β -lactamases), diminuição de sua entrada na célula microbiana (como na redução da expressão das porinas) e remoção ativa do meio intracelular (hiperexpressão dos sistemas de efluxo) (WATKINS, BONOMO, 2016).

Qualquer uso de antimicrobianos, mesmo de maneira apropriada e conservada, contribui para o desenvolvimento de resistência, mas o uso desnecessário, excessivo e generalizado o torna pior. O mau uso dos antimicrobianos é facilitado por sua disponibilidade sem receita médica e pelas práticas de prescrição variáveis. Além disso, essa questão é agravada pela velocidade e volume das viagens intercontinentais, pois criam-se novas oportunidades para os patógenos resistentes se disseminarem em todo o mundo. Dessa forma esses microrganismos têm oportunidades de compartilhar seu material genético, criando novas cepas resistentes a um ritmo sem precedentes. Assim, nenhum país pode, com sucesso, enfrentar a RA agindo isoladamente (HOLMES et al., 2015).

Figura 2 - Linha do tempo da terapia antimicrobiana. R – resistência, XDR extremamente resistente.



Fonte: Adaptado de Daves, Daves (2008)

3.3.2 O impacto econômico da resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é uma questão global em constante evolução. As infecções causadas por patógenos resistentes aos antimicrobianos atualmente reivindica pelo menos 50.000 vidas por ano em toda a Europa e nos EUA, com milhares de mortes em outras áreas do mundo.

Apesar de haver variações nos padrões de RA, ela é preocupante em todos os continentes, independentemente do seu nível econômico. Por exemplo, em 15 países da Europa mais de 10% das infecções por *Staphylococcus aureus* na corrente sanguínea são causadas por cepas resistentes a metilicina, com taxas de resistência próximas à 50% (EARS-NET, European Centre for Disease Prevention and Control Antimicrobial Resistance Interactive Database). Em 2013, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) publicou um relatório focado na resistência antimicrobiana e seu impacto na saúde e economia da comunidade, mostrando que mais de 21% das infecções hospitalares são causadas por patógenos resistentes aos antimicrobianos (CDC, 2013).

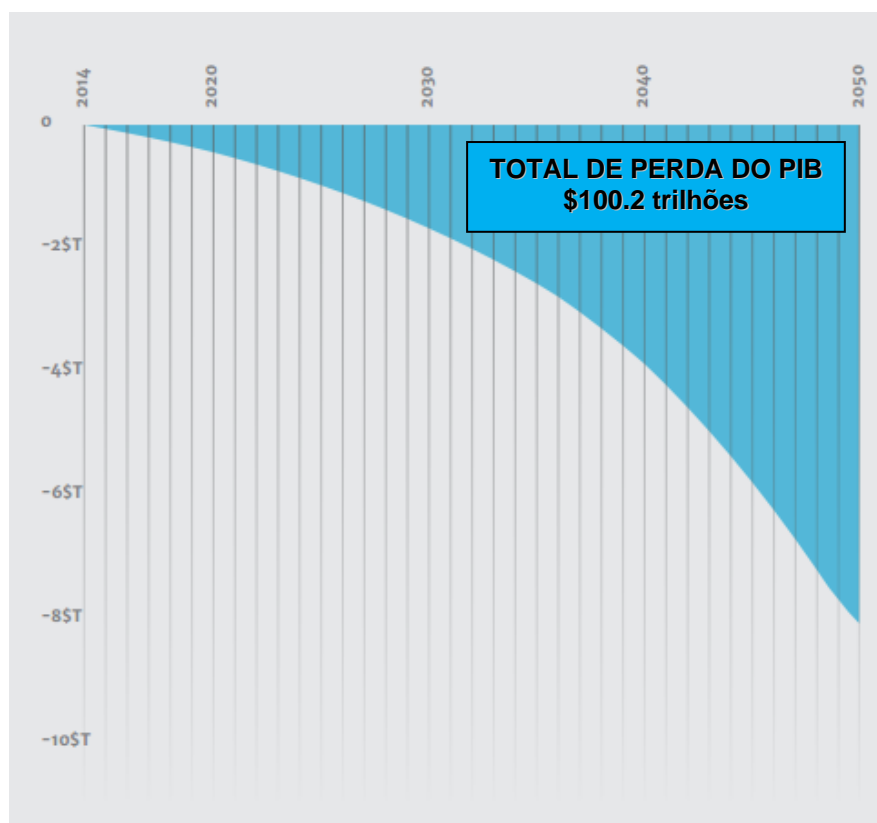
Embora em modernos e bem financiados sistemas de saúde o acesso a tratamentos de segunda e terceira linha podem muitas vezes não ser um problema, as taxas de mortalidade para pacientes com infecções causadas por bactérias resistentes são significativamente maiores, como são os seus custos de tratamento. Em regiões da Europa há um número crescente de pacientes em unidades de terapia intensiva, unidades de hematologia e unidades de transplante com infecções causadas por patógenos XDR (O'NEILL, 2014). Do ponto de vista econômico, a resistência antimicrobiana nos EUA resultou em um encargo \$18.000 - 29.000 dos custos médicos por paciente em um único ano fiscal. Além disso, a duração da estadia para pacientes com infecções resistentes aos antimicrobianos aumentou de 6,4 para 12,7 dias, com uma taxa de mortalidade atribuível de 6,5% (ROBERTS et al., 2009).

Ameaças de infecções cada vez mais resistentes aos medicamentos não são menos graves nos países menos desenvolvidos. A variação nos problemas da RA em cada país está ligada às diferenças na forma como é realizada a terapia antimicrobiana. O consumo global de antibióticos na medicina humana aumentou quase 40% entre 2000 e 2010, mas este valor oculta padrões de declínio em alguns países e o rápido crescimento em outros. Os países do BRIC (sigla que se refere, em economia, aos países Brasil, Rússia, Índia e China), mais a África do Sul, foram responsáveis por três quartos deste crescimento (VAN BOECKEL, 2014).

Se as taxas de RA atuais não forem alteradas teremos custos econômicos globais exorbitantes nos próximos anos. Um estudo estimativo

feito em 2014 mostrou que, considerando apenas parte dos impactos causados pela RA, em 2050 haverá 10 milhões de pessoas morrendo e uma redução de 2 - 3,5% do Produto Interno Bruto (PIB) dos países (figura 3). Ou seja, a perda da produção mundial ficaria maior ao longo do tempo, de modo que, em 2050, o mundo estaria produzindo entre 2% e 3,5% a menos do que poderia. Além disso, se os índices de resistência fossem mantidos, esperaríamos que 10 milhões morressem a cada ano (O'NEILL, 2014).

Figura 3 - Projeção do impacto causado no Produto Interno Bruto (PIB) mundial pela resistência antimicrobiana. Os valores foram dados em trilhões de USD (United States Dollar - \$)



Fonte: O'neill (2014)

3.3.3 A resistência antimicrobiana em *Acinetobacter baumannii*

Entre os membros identificados do gênero *Acinetobacter*, *A. baumannii* é o principal agente patogênico responsável pela maioria das infecções hospitalares e surtos relacionados a elas. A emergência deste patógeno

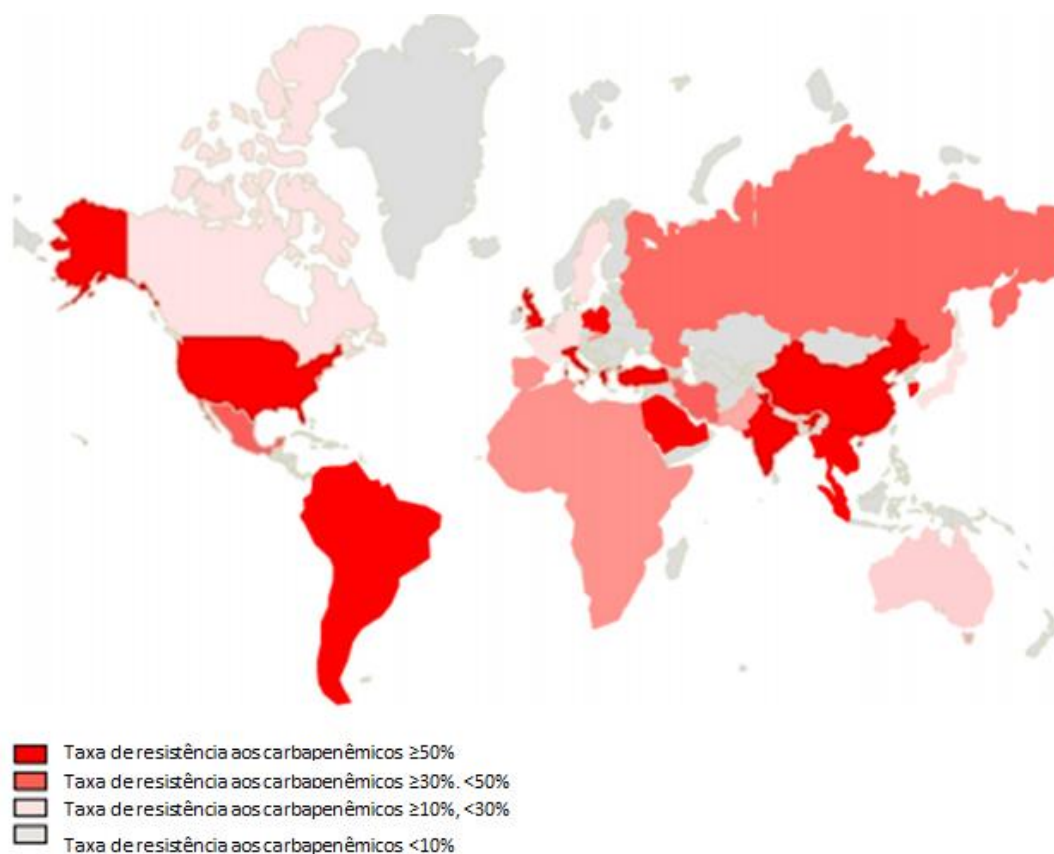
oportunista está associada à facilidade em adquirir multirresistência e a capacidade de sobreviver em ambientes hospitalares, sob condições de dessecação, por longo tempo (DURANTE-MANGONI, ZARRILLI, 2011; ESTERLY et al., 2011). Em conjunto com as espécies *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*, *A. baumannii* forma o complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* (complexo Acb) diferenciado apenas por técnicas moleculares (NEMEC, 2011).

Cerca de 12.000 infecções associadas aos cuidados de saúde devido a *Acinetobacter* spp. ocorrem a cada ano nos EUA. Dessas, estima-se que 7.300 são causadas por isolados MDR e resultem em 500 mortes a cada ano (CDC, 2011). Na América Latina, estimou-se que, entre os anos de 2011 a 2014, aproximadamente 1,9% de todas as infecções por patógenos Gram-negativos aeróbios ou facultativos, eram causadas por *A. baumannii*. Entre os anos de 2013 e 2014, aproximadamente 90% de todas as infecções causadas por *A. baumannii* eram por isolados MDR (LOB et al., 2016).

A resistência aos agentes antimicrobianos pode ser considerada a principal vantagem de sobrevivência de *A. baumannii* nos ambientes hospitalares. *A. baumannii* é intrinsecamente resistente a aminopenicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração e cloranfenicol. Os carbapenêmicos imipenem e meropenem eram, desde a década de 80, os mais importantes agentes no tratamento das infecções causadas por isolados MDR. Entretanto relatos de resistência aos carbapenêmicos são amplamente observados em todo o mundo (NOWAK, PALUCHOWSKA, 2016).

Dados do SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) revelaram que entre os anos de 2006-2009 a resistência ao imipenem em *Acinetobacter* spp. era de aproximadamente 56% em todo o mundo e de 48,3% na América Latina (GALES, JONES, SADER, 2011). Em 2014 a resistência aos carbapenêmicos na América Latina já era superior a 50% (figura 4) (KIM et al., 2014). Segundo Rossi (2011), a taxa média de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* isolados no Brasil varia entre 25% e 45%. Os isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos comprometem as opções de tratamento contra estes patógenos. Antibióticos antigos como as polimixinas (principalmente a polimixina B), e a recente tigeciclina, estão sendo utilizados como os fármacos de escolha contra *A. baumannii* MDR (RAO et al., 2016).

Figura 4 - Epidemiologia global da resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*



Fonte: Adaptado de Kim et al., 2014

A tigeciclina é um antibiótico que faz parte da classe das glicilciclinas. É uma droga de amplo espectro que pode evadir-se de bombas de efluxo de tetraciclina em *A. baumannii* MDR (THABIT, CRANDON, NICOLAU, 2014). Entretanto, o tratamento com tigeciclina não é recomendado para infecções graves causadas por *A. baumannii* devido a falhas clínicas relatadas e à sua baixa atividade bacteriostática (PELEG et al., 2007). Estudos *in vitro* mostraram que as polimixinas têm potente atividade antibacteriana contra *A. baumannii* MDR, através da desorganização de sua membrana externa. No entanto, a dosagem relacionada nefrotoxicidade e neurotoxicidade é um fator limitante à sua aplicação clínica mais ampla e o aumento de seu uso levou à emergência da resistência e da heterorresistência entre os isolados. Para melhorar o sucesso do tratamento clínico e para restringir a emergência de resistência,

terapias de combinação à base de polimixinas têm sido propostas como boas opções para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR (NI, 2015).

3.4 Novos compostos antimicrobianos de origem natural

As opções de tratamento para as infecções bacterianas multirresistentes são limitadas, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade. Embora existam algumas alternativas potenciais para a terapia antimicrobiana, como a combinação de drogas, a descoberta e desenvolvimento de novos, e eficazes, fármacos é urgente (AMINOV, 2010). Desde a descoberta da penicilina mais de 23.000 produtos naturais (PN) foram caracterizados, a grande maioria produzida por bactérias, principalmente por parte da família Actinomycetaceae. Os PN representam uma grande diversidade de agentes químicos com uma grande variedade em suas atividades biológicas, sendo utilizados na medicina humana e veterinária e no setor agrícola. São de origem bacteriana, fúngica, de plantas e animais marinhos. De maneira geral, os PN bacterianos e fúngicos são derivados do metabolismo secundário desses microrganismos, ou seja, são moléculas que não são necessárias para sua sobrevivência em condições de laboratório, mas proporcionam vantagens em seu ambiente natural (BHANOT, SHARMA, NOOLVI, 2011; DEMAIN, 2014; GIDDINGS, NEWMAN, 2013; NEWMAN, GRAGG, 2012).

3.4.1 A triagem fenotípica na detecção de novos produtos naturais

Durante as três primeiras décadas após o início da era antibiótica, 1940-1970, na indústria farmacêutica, importantes PN foram descobertos a partir de fontes microbianas, muitos dos quais ainda estão em uso (ou suas gerações posteriores e/ou derivados semissintéticos) até os dias de hoje. Nesse período o modelo de descoberta de novos PN seguia o seguinte padrão: (1) triagem fenotípica, (2) isolamento do composto e caracterização estrutural, (3) mecanismo de ação, em alguns casos, (4) o desenvolvimento pré-clínico, e se fosse bem sucedido, (5) desenvolvimento clínico e comercialização; sendo os esforços direcionados principalmente para descobrir compostos antibacterianos e antifúngicos. Os PN com atividades antibacterianas ou antifúngicas

descobertos eram selecionados por biomonitoramento, utilizando a morte celular ou inibição do crescimento de microrganismos, para a triagem de sua atividade (SMANSKI, SCHLATTER, KINKEL, 2016).

O objetivo era isolar e identificar *Streptomyces*, já que esse era o principal gênero bacteriano na busca de novos PN. Espécies de *Streptomyces* renderam muitos compostos importantes em várias classes de antibióticos: macrolídeos (tilosina, espiramicina); aminoglicosídeos (neomicina, canamicina,); β -lactâmicos (cefamicina, carbapenemos); tetraciclina (tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina); polienos (candididina, anfotericina B, nistatina); peptídeos (actinomicina); e cloranfenicol (KATZ, BALTZ, 2016). No final de 1950, uma base americana isolou do solo um grande grupo de actinomicetos, classificados como *Micromonospora*, e iniciou a triagem entre os isolados para detectar possíveis atividades antibacterianas (WEINSTEIN, 2004). Desse gênero foram isolados muitos PN, entre eles a sisomicina, fortimicina, sagamicina, rosaramicina, macrólidos, juvenimicina, megalomicina e a gentamicina, sendo esse último o único composto desenvolvido como um fármaco antibacteriano (KATZ, BALTZ, 2016).

3.4.2 A triagem molecular na detecção de novos produtos naturais

A partir dos anos 70 até meados de 2000 houve uma grande expansão nas metodologias e estratégias para a triagem de PN. Avanços na tecnologia do DNA recombinante e outras técnicas permitiram a determinação dos mecanismos de ação dos PN e seus análogos semissintéticos. Assim, a triagem fenotípica cedeu lugar à uma busca de PN baseada na interação do composto testado com o alvo designado, resultando em uma melhoria no efeito farmacológico desejado. Com a nova abordagem, a indústria farmacêutica preocupou-se em buscar, além de drogas antibacterianas e antifúngicas, PN ativos contra o câncer, doenças neurológicas, metabólicas e cardíacas, e agentes imunossupressores (RUDOLF, YAN, SHEN, 2015).

Atualmente, temos um avanço na descoberta de novos PN baseadas nas abordagens genômicas, metabolômicas e transcriptômicas. Com os sequenciamentos de nova geração, os avanços na compreensão da biossíntese dos metabólitos secundários, dos métodos analíticos e das

ferramentas de bioinformática, é possível prever, através das sequências de DNA do microrganismo, ao menos parcialmente, as estruturas dos possíveis compostos evitando o grande problema da replicação na descoberta dos PN (MADEMA, FISCHBACH, 2015; WEBER et al., 2015; TIETZ, MITCHELL, 2015). Essas tecnologias de sequenciamento de alto rendimento oferecem uma compreensão, em nível molecular, de várias espécies não modelo favorecendo o conhecimento muito mais elevado das informações e abrindo campos de investigação como o desenvolvimento de marcadores moleculares, descoberta de novos genes, uma melhor visão da transcrição e regulação pós-transcricional de genes importantes e elucidação das vias biossintéticas do composto (DEVI et al., 2016).

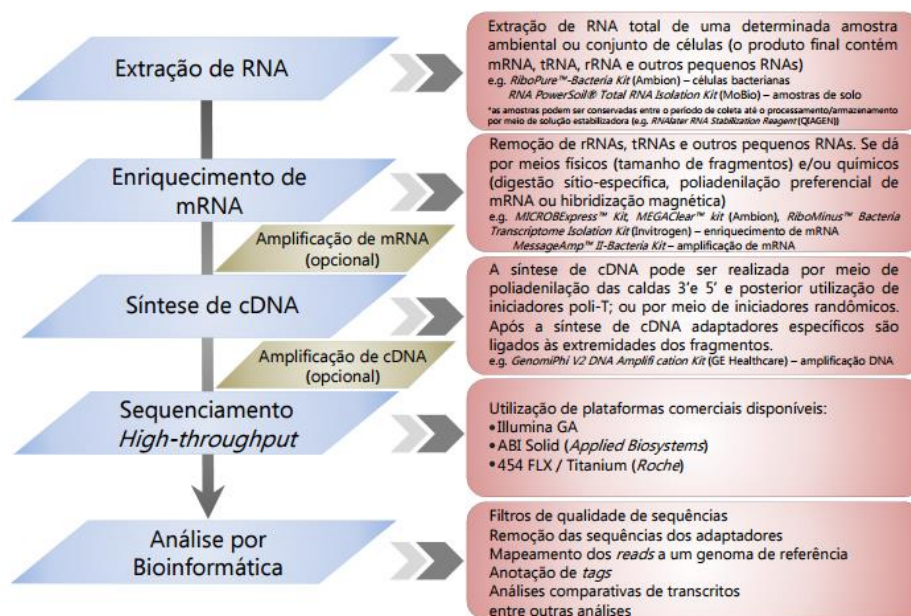
3.4.2.1 Análises de transcriptomas na descoberta das vias biossintéticas de produtos naturais

As tecnologias de nova geração são formas rápidas e baratas para a caracterização de genomas completos, bem como o perfil de mRNAs, pequenos RNAs, regiões de fatores de transcrição, estrutura da cromatina e fatores de metilação do DNA (ANSORGE, 2009). O transcriptoma é o termo que define o conjunto completo de transcritos, e a quantidade dos mesmos, em um dado estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica de uma célula. Por ser a análise do RNA total, o transcriptoma, inclui o RNA codificante (mRNA) e não codificante (rRNA, tRNA, RNA estrutural, RNA regulatório e outros tipos de RNAs) (WANG, GERSTEIN, SNYDER, 2009). As análises transcriptômicas permitem a elucidação das rotas metabólicas de síntese dos produtos naturais, já que conseguimos compreender o mecanismo de transcrição das células. Assim, o entendimento das alterações nos níveis de expressão, que estão diretamente relacionados às modificações fisiológicas e metabólicas, podem ser relacionados aos possíveis genes associados à produção do novo composto (VAN VLIET, 2010)

O sequenciamento do RNA (RNA-seq) é aplicado à muitas plataformas de sequenciamento de nova geração capazes de gerar perfis completos do transcriptoma. De maneira geral, para o processamento do RNA-seq, há o isolamento do material genético (RNA total ou específico), que é então

fragmentado, convertido em cDNA e ligado a adaptadores (em apenas uma ou ambas extremidades); então uma etapa de amplificação seguida de sequenciamento dos fragmentos é realizada. Após, obtemos os *reads* (sequências) que podem ser *single-ends* (advindas do extremo de um fragmento) ou *paired-ends* (dos dois extremos). Os *reads* são então montados e analisados por ferramentas de bioinformática (figura 5). Atualmente as plataformas de sequenciamentos mais utilizadas são a 454 e a Illumina, entretanto, todas as plataformas de sequenciamento de nova geração são capazes de realizar o RNA-seq (BURGES, 2014).

Figura 5. Fluxo de trabalho aplicado à tecnologia de RNA-seq. Os quadrados azuis representam o fluxograma experimental e os vermelhos a descrição dos processos e algumas opções metodológicas disponíveis no mercado



Fonte: Andreotti, 2011

3.4.2.2 Metodologias de “reconstrução do genoma”

Coletivamente, nos referimos aos processos de montagem de transcriptoma como reconstrução de transcriptoma. A reconstrução é uma tarefa computacional difícil por três razões principais. Primeiramente porque os genes podem ser expressos em níveis diferentes, onde alguns genes podem

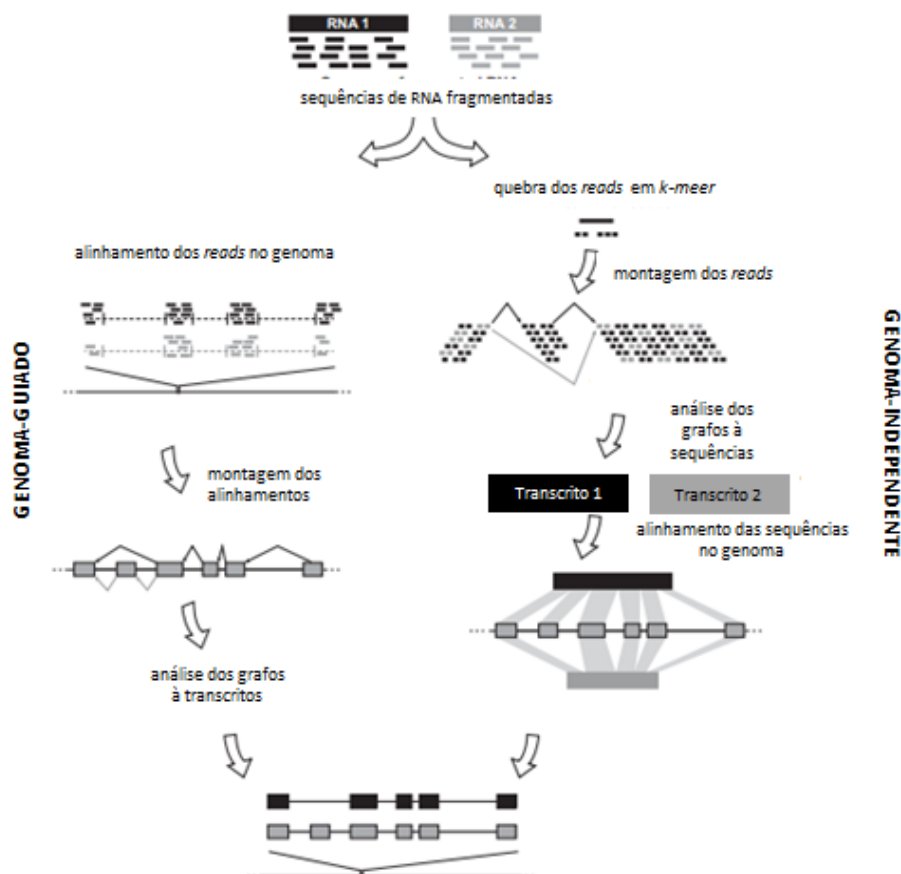
ser representados por poucos *reads*. Em segundo lugar, quando pensamos em eucariotos, devemos considerar que os *reads* podem ser originários de sequências de mRNA maduras (que possuem apenas os éxons) ou por sequências onde o *splicing* não foi realizado, contendo também os íntrons. Em terceiro lugar os *reads* são curtos e os genes podem ter muitas isoformas, fazendo com que a determinação de qual isoforma produziu os *reads* seja difícil (GARBER, GRABHERR, GUTTMAN, TRAPNELL, 2011). Podemos dividir os métodos de reconstrução de transcriptoma em duas classes principais: a análise guiada e a análise independente (montagem *de novo*). Os métodos guiados por genoma contam com um genoma de referência para o mapeamento dos *reads*, lendo o genoma de referência antes de montar a sobreposição dos transcritos. Por outro lado, os métodos independentes do genoma montam diretamente os *reads* em potenciais transcritos, sem usar uma referência (MARTIN, WANG, 2011).

A estratégia de montagem guiada pode ser realizada para as espécies que possuem genomas sequenciados. Nesse caso, a partir da obtenção dos *reads*, eles serão alinhados ao genoma de referência utilizando alinhadores do tipo *splice-aware*, que podem trabalhar em duas vertentes distintas. A primeira vertente consiste em extrair uma pequena sequência de cada um dos *reads* tentando encontrar no genoma os locais onde elas se alinhem perfeitamente. Após o alinhamento, o programa tenta estender todo o *read* na posição encontrada, utilizando o algoritmo de Smith-Waterman (SMITH, WATERMAN, 1981). A segunda vertente é realizar o alinhamento pelo processamento estatístico de Burrows-Wheeler. Esses algoritmos são otimizados para alinhar os *reads* cometendo uma taxa de erros baixa (LI, DURBIN, 2009). Após a sobreposição dos *reads* em cada região é clusterizada, construindo grafos de diferentes isoformas, que serão então sistematizadas, resolvendo as isoformas individuais (MARTIN, WANG, 2011).

A montagem sem referência é ideal para diversas espécies não-modelo. Ela funciona analisando a redundância dos *reads*, criando sobreposições e montando os transcritos. Para essa abordagem os grafos De Bruijn são utilizados. Os *k*-mers (sequências de bases com tamanho *k*) representam os nós do grafo; os pares de nós são conectados através da sobreposição de sequências de exatamente (*k*-1). O pós-processamento é feito pela fusão dos

contigs (seqüências consenso) e remoção da redundância (figura 6) (GRABHERR et al., 2011).

Figura 6 - Esquemas das montagens de RNA-seq. O esquema à esquerda representa a montagem por genoma guiado e à direita por genoma independente



Fonte: Adaptado de Garber, Grabherr, Guttman, Trapnell (2011)

3.4.2.3 Expressão diferencial

Através do RNA-seq podemos calcular o nível de expressão para determinados RNAs, essa análise é muito importante quando pensamos na caracterização das vias biossintéticas de PN, principalmente dos advindos de bactérias e fungos. Como geralmente esses compostos bioativos são isolados do metabolismo secundário, a análise do RNA expresso durante a produção desses compostos, em detrimento de sua ausência, é a chave para a

descoberta das rotas metabólicas. Para a estimativa da expressão é necessário a normalização das contagens de *reads* pelo tamanho dos transcritos gerados, correlacionando uma expressão significativa entre transcritos longos (mapeados por muitos *reads*) e curtos (mapeados por poucos *reads*) (GARBER et al., 2011). Para essa normalização, as principais métricas utilizadas são: o RPKM (*reads* por kilobase de transcrito, por milhão de *reads* mapeados), para dados single-ends e FPKM (fragmentos por kilobase de transcrito, por milhão de *reads* mapeados) (MORTAZAVI et al., 2008).

3.4.2.4 Anotação dos transcritos

Uma vez que os transcritos foram montados, eles necessitam ser identificados, processo que chamamos de anotação dos transcritos. Na anotação descobrimos os componentes do genoma, como os genes e seus produtos, adicionando a eles análises e interpretações necessárias para identificar sua importância biológica, colocando-os no contexto dos processos biológicos. Ou seja, a etapa de anotação nos permite atribuir um conjunto ou tipo de características para cada produto de um gene, dado fundamental para estudos específicos de famílias de genes ou genes envolvidos em vias metabólicas específicas (STEIN, 2001).

Inferir funções às sequências dos genes transcritos só é possível a partir da busca de suas similaridades com sequências previamente depositadas em bancos de dados, para isso, as ferramentas de bioinformática são utilizadas. O GenBank, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), o DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) e o EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute*) são os bancos de dados públicos que armazenam a maior quantidade de dados de sequência de proteínas e nucleotídeos. Juntos, eles formam o INSDC, *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, conjunto de bancos que trabalha para estabelecer formatos de dados e protocolos que facilitem a submissão segura de dados, proporcionando seu intercâmbio em todo o mundo (NAKAMURA et al., 2012).

Para a busca das sequências nos bancos de dados, a ferramenta mais conhecida é a BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que utiliza o

algoritmo de Smith e Waterman (1981) para promover diversos tipos de alinhamento entre as sequências consulta e as sequências contidas nas diversas bases de dados disponíveis. Diferentes tipos de busca, baseadas em similaridade, são oferecidas pela BLAST: BlastN (utilizado para pesquisar sequências de nucleotídeos), BlastX (traduz uma sequência nucleotídica em produtos proteicos, comparando-os com proteínas de bancos de dados) e o BlastP (pesquisa sequências de proteínas similares) (SETUBAL, 2004).

3.4.3 Compostos naturais em *Pseudomonas* spp.

Membros do gênero *Pseudomonas* possuem uma grande versatilidade metabólica e fisiológica, permitindo a colonização de diversos habitats terrestres e aquáticos, sendo de grande interesse devido à sua importância como causadores de doenças humanas e em plantas, e seu crescente potencial em aplicações biotecnológicas (SILBY, 2011). Em contrapartida, *Pseudomonas* spp. se destaca como um dos mais estudados agentes de biocontrole na produção de antibióticos na última década, atuando contra fitopatógenos e bactérias de interesse hospitalar (KERBAUY, 2016; MA, 2016; ZACHOW, 2015; SPAGO, 2014; TUPE, 2014; CARDOZO, 2013; ZHOU, 2012).

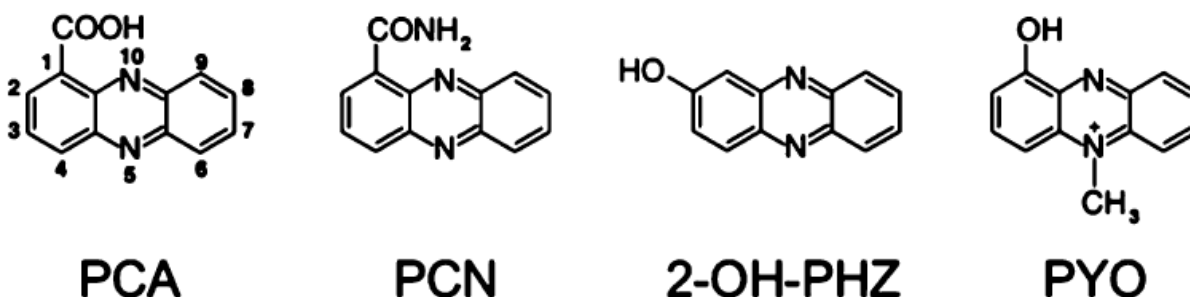
Numerosas cepas produtoras de compostos antimicrobianos foram isoladas a partir de plantas cultivadas em solos de diferentes regiões geográficas, existindo diversas razões para abundância de estudos com esse gênero: sua diversidade de habitats, facilidade de isolamento, utilização de uma ampla gama de substratos, fácil cultivo e manipulação genética (LOPER, 2012). Os antibióticos mais estudados produzidos por *Pseudomonas* spp. são: *2,4-diacetylphloroglucinol* (DAPG), *hydrogen cyanide* (HCN), pirrolnitrina, pioluteorina e fenazinas. As fenazinas são os compostos, derivados do metabolismo secundário e implicados no biocontrole, mais importantes em *Pseudomonas* spp. (ARSENEAULT, FILION, 2016).

Fenazinas são compostos redox-ativos que provocam a formação de espécies reativas de oxigênio, reduzindo diretamente o oxigênio molecular, assim possuem atividade antibiótica e podem ser consideradas fatores de virulência (MAVRODI, BLANKENFELDT, THOMASHOW, 2006). A produção de fenazinas pode contribuir para a competição e biocontrole, matando

diretamente agentes patogênicos (PARVIN et al., 2106; DASGUPTA et al., 2015; TUPE et al., 2014) ou através de outros mecanismos, como a indução de sinalização em plantas para aumentar as respostas de defesa (AUDENAERT et al., 2002) e redução de agentes patogênicos de virulência por meio da alteração da transcrição de genes essenciais nesses patógenos (ARSENEAULT et al., 2013).

As fenazinas existem em diversas formas químicas, produzidas a partir da fenazina-1-carboxilica (PCA), que pode então ser convertida em outras formas, fenazina-1-carboxamida (PCN), piocianina (PYO), hidroxifenazinas (OH-PHZ), através da expressão gênica e produção de diferentes enzimas (figura 7). A PCA apresenta uma coloração amarelada, a OH-PHZ vermelho-alaranjada, PCN verde e a PYO azul-esverdeada. Um conjunto conservado de genes está relacionado à biossíntese das fenazinas. Estes genes são normalmente agrupados em dois operons, *phzA1-G1* e *phzA2-G2*, que codificam sete enzimas necessárias para a geração da fenazina precursora, PCA. Os operons trabalham em conjunto na regulação da via, em um padrão de amplificação de feedback (BLANKENFELTDT, PARSONS, 2014; LI et al, 2011).

Figura 7 – Fenazinas associadas ao biocontrole produzidas por *Pseudomonas* spp. Fenazina-1-carboxilica (PCA), fenazina-1-carboxamida (PCN), piocianina (PYO) e hidroxifenazinas (OH-PHZ).



Fonte: Arseneault, Filion, 2016.

REFERÊNCIAS

AMINOV, R. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontier in microbiology**, v.1, p. 1-7, dezembro 2010.

ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 195-203, 2009.

ARSENEAULT, T., FILION, M. Phenazine-producing *Pseudomonas* spp. as biocontrol agentes of plant pathogens. In: SINGH, D. P., SINGH, H. B., PRABHA, R. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**. Springer, 2016. p. 53-68.

BASSETTI, M., RIGHI, E. New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections. **Curr Opin Crit Care**. 2015;21(5):402-11.

BHANOT, A., SHARMA, R., NOOLVI, M. N. Natural sources as potential anti-cancer agentes: a review. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 9-26, 2011.

BLANKENFELTDT, W., PARSONS, J. F. The structural biology of phenazine biosynthesis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 29, p. 26-33, dezembro, 2014.

BONNIN, R.A., NORDMANN, P., POIREL, L. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 2013; 11(6):571-83.

BOSCH, F., ROSICH, L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. **Pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 171-179, outubro 2008.

BURGESS, D. J. A global assessment of RNA-seq performance. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, setembro, 2014.

CARDOZO, V. F., de OLIVEIRA, A. G., NISHIO, E. K., PERUGINI, M. R. E., ANDRADE, C. G. T. J., SILVEIRA, W. D., DÚRAN, N., ANDRADE, G., KOBAYASHI, R. K. T., NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 12, p. 1-8, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Antibiotic resistance threats in the United States. Atlanta, 2013.

CHEAH, S.E., JOHNSON, M.D., ZHU, Y., TSUJI, B.T., FORREST, A., BULITTA, J.B., BOYCE, J.D., NATION, R.L., LI, J. Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Genetic Mutations and Transcriptomic Changes in Response to Clinically Relevant Dosage Regimens. **Sci Rep**. 2016; 19;6:26233.

CHOPRA, I. New drugs for the superbugs. **Microbiology Today**, v. 27, p. 4-6, 2000.

CHUNG, J.H., BHAT, A., KIM, C.J., YONG, D., RYU, C.M. Combination therapy with polymyxin B and netropsin against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Sci Rep**. 2016;6:28168.

DASGUPTA, D. KUMAR, A., MUKHOPADHYAY, B., SENGUPTA, T. K. Isolation of phenazine 1,6-di-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain HRW.1-S3 and its role in biofilm-mediated crude oil degradation and cytotoxicity against bacterial and cancer cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n.20, p. 8653-8665, outubro, 2015.

DAVIES, J., DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, setembro, 2010.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 185-201, fevereiro, 2014.

DEVI, K., MISHRA, S. K., SAHU, J., PANDA, D., MODI, M. K., SEN, P. Genome wide transcriptome profiling reveals differential gene expression in secondary metabolite pathway of *Cymbopogon winterianus*. **Scientific reports**, v. 6, p. 1-11, fevereiro, 2016.

DURANTE-MANGONI, E., ZARRILLI, R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 407-422, abril, 2011.

ESTERLY, J. S., RICHARDSON, C. L., ELTOUKHY, N. S., QI, C., SCHEETZ, M. H. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 45, n. 2, p. 218-228, fevereiro 2011.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL
ANTIMICROBIAL RESISTANCE INTERACTIVE DATABASE – EARS-NET.
2013.

EHRlich, P., DIGGLE, S. P. Die experimentelle chemotherapie der spirilosien. **Julius Springer**, v. 8, 1910.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **Bull World Health Organ**, v. 79, p. 780-790.

FRIEDMAN, N. D., TEMKIN, E., CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 416-422, maio 2016.

GALES, A.C., CASTANHEIRA, M., JONES, R.N., SADER, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2012; 73(4):354-60.

GALES, A. C., JONES, R. N., SADER, H. S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 2070-2074, setembro, 2011.

GARBER, M., GRABHERR, M. G., GUTTMAN, M., TRAPNELL, C. Computational methods for transcriptome annotation and qualification using RNA-seq. **Nature Methods**, v. 8, p. 468-477, maio, 2011.

GIDDINGS, L. A., NEWMAN, D. J. H. Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, n. 11, p. 1181-1210, Novembro, 2013.

GONZALEZ-VILLORIA, A.M., VALVERDE-GARDUNO, V. Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen. **J Pathog.** 2016; 7318075.

GRABHERR, M. G., HASS, B. J., YASSOUR, M., LEVIN, J. Z., THOMPSON, D. A., AMIT, I., ADICONIS, X., FAN, L., RAYCHOWDHURY, R., ZENG, Q., CHEN, Z., MAUCELI, E., HACOEN, N., GNIRKE, A., RHIND, N., DI PALMA, F., BIRREN, B. W., NUSBAUM, C., LINDBLAD-TOH, K., FRIEDMAN, N., REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2011.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v.33, p.667-679, 2010.

HOLMES, A. H., MOORE, L. S., SUNDSFJORD, A., STEINBAKK, M., REGMI, S., KARKEY, A., GUERIN, P.J., PIDDOCK, L.J. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, novembro, 2015.

KATZ, I., BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, presente, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 155-176, março, 2016.

KAYE, K.S., POGUE, J.M. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. **Pharmacotherapy**. 2015; 35(10):949-62.

KERBAUY, G., VIVAN, A. C. P., SIMÕES, G. C., SIMIONATO, A. S., PELISSON, M., VESPERO, E. C., COSTA, S. F., ANDRADE, C. G. T. J., BARBIERI, D. M., MELLO, J. C. P., MOREY, A. T., YAMAUCHI, L. M., YAMADA-OGATTA, S. F., de OLIVEIRA, A. G., ANDRADE, G. Effect of metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) – producing *K. pneumoniae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 389-397, 2016.

KIM, W.Y., MOON, J.Y., HUH, J.W., CHOI, S.H., LIM, C.M., KOH, Y., CHONG, Y.P., HONG, S.B. Comparable Efficacy of Tigecycline versus Colistin Therapy

for Multidrug-Resistant and Extensively DrugResistant *Acinetobacter baumannii* Pneumonia in Critically Ill Patients. **PLoS One**. 2016;11(3).

KIM, U. J., KIM, H. K., AN, J. H., CHO, S. K., PARK, K. -H., JANG, H. -C. Update on the epidemiology, treatment, and outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. **Chonnam Medical Journal**, v. 50, n. 2, p. 37-44, julho, 2014.

LI, Y., DU, X., LU, Z. J., WU, D., ZHAO, Y., REN, B., HUANG, J., XU, Y., XU, Y. Regulatory feedback loop of two phz gene clusters through 5' -untranslated regions in *Pseudomonas* sp. M18. **PLoS One**, v. 6, p. 1-12, abril, 2011.

LI, H., DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754-1760, 2009.

LOB, S. H., HOBAN, D. J., SAHM, D. F., BADAL, R. E. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. **International Health Management Associates**, v. 47, n. 4, p. 317-323, abril, 2016.

LOPER, J. E., HASSAN, K. A., MAVRODI, D. V., DAVIS II, E. W., LIM, C. K., SHAFFER, B. T., ELBOURNE, L. D. H., STOCKWELL, V. O., HARTNEY, S. L., BREAKWELL, K., HENKELS, M. D., TETU, S. G., RANGEL, L. I., KIDARSA, A. T., WILSON, N. L., VAN DE MORTEL, J. E., SONG, C., BLUMHAGEN, R., RADUNE, D., HOSTETLER, J. B., BRINKAC, L. M., DURKIN, A.S., KLUEPFEL, D. A., WECHTER, W. P., ANDERSON, A. J., KIM, Y. C., PIERSON III, L. S., PIERSON, E. A., LINDOW, S. E., KOBAYASHI, D. Y., RAAIJMAKERS, J. M., WELLER, D. M., THOMASHOW, L. S., ALLEN, A. E., PAULSEN, I. T. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: Insight into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. **Plos Genetics**, v. 8, n. 7, p. 1-27, julho 2012.

MA, Z., GEUDENS, N., KIEU, N. P., SINNAEVE, D., ONGENA, M., MARTINS, J. C., HÖFTE. Biosynthesis, chemical structure, and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-16, março, 2016.
MAHONEY, J., ARNOLD, R., HARRIS, A. Penicillin treatment of early syphilis. A preliminar report. **Verer. Dis. Inform.**, v. 24, p. 355-357, 1943.

MARTIN, J. A., WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews**, v. 12, p. 671-682, 2011.

MAVRODI, D. V., BLANKENFELDT, W., THOMASHOW, L. S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* Spp. biosynthesis and regulation. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 417-445, maio, 2006.

MEDEMA, M. H., FISCHBACH, M. A. Computational approaches to natural product discovery. **Nature Chemical Biology**, v. 11, p. 638-648, agosto 2015.

MENEGUCCI, T.C., ALBIERO, J., MIGLIORINI, L.B., ALVES, J.L., VIANA, G.F., MAZUCHELI, J., CARRARA-MARRONI, F.E., CARDOSO, C.L., TOGNIM, M.C. Strategies for the treatment

of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Int J Antimicrob Agents**. 2016;47(5):380-5.

MORTAZAVI, A., WILLIAMS, B. A., McCUE, K., SCHAEFFER, L., WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptome by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, n. 7, p. 621-628, 2008.

NAKAMURA, Y., COCHRANE, G., KARSCH-MIZRACHI, I., On behalf of the international nucleotide sequence database collaboration. The International Nucleotide Sequence Database Collaboration. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D21- D24, 2012.

NEMEC, A., KRIZOVA, L., MAIXNEROVA, L., VAN DER REIDJEN, T. J., DESCHAGHT, P., PASSET, V. VANEECHOUTTE, M., BRISSE, S., DIJKSHOORN, L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic 13 TU). v. 162, n. 4, p. 393-404, maio, 2011.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NOWAK, P., PALUCHOWSKA, P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance – role of carbapenemases. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 54, n. 2, p. 61-74, julho, 2016.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations – The Review on Antimicrobial Resistance. **Review on Antimicrobial Resistance**, p. 1-20, dezembro, 2014.

de OLIVEIRA, A. G., SPAGO, F. R., SIMIONATO, A. S., NAVARRO, M. P., SILVA, C. S., BARAZETTI, A. R., CELY, M. V. T., TISCHER, C., SAN MARTIN, J. A., ANDRADE, C. G. T. J., NOVELLO, C. R., MELLO, J. C. P., ANDRADE, G. Active organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-12, fevereiro, 2016.

PARVIN, W., OTHMAN, R., JAAFAR, H., WONG, M. -Y. Detection of phenazine from UPMP3 strain of *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic effects against *Ganoderma boninense*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 18, n. 3, p. 483-488, dezembro, 2014.

PELEG, A. Y., POTOSKI, B. A., REA, R., ADAMS, J., SETHI, J., CAPITANO, B., HUSAIN, S., KWAK, E. J., BHAT, S. V., PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. **The Journal of Antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 128-131, janeiro, 2007.

RAO, G. G., LY, N. S., DIEP, J., FORREST, A., BULITTA, J. B., HOLDEN, P. N., NATION, R. L., LI, J., TSUJI, B. T. Combinatorial pharmacodynamics of polymyxin B and tigecycline against heteroresistant *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, julho, 2016.

ROBERTS, R. R., HOTE, B., AHMAD, I. SCOTT, R. D., FOSTER, S.D., ABBASI, F., SCHABOWSKI, S., KAMPE, L.M., CIAVARELLA, G. G., SUPINO, M., CORDELL, R., LEVY, S. B., WEINSTEIN, R. A. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implication for antibiotic stewardship. **Clinical Infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 8, p. 1175-1184, 2009.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, maio, 2011.

RUDOLF, J. D., YAN, X., SHEN, B. Genome neighborhood network reveals insights into enediyne biosynthesis and facilitates prediction and prioritization for discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 261-276, março, 2016.

SARAVANA KUMAR, P., DURAI PANDIYAN, V., IGNACIMUTHU, S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *S treptomyces* sp. SCA 7. **Kaohsiung J Med Sci**. 2014;30(9):435-46.

SETUBAL, J. C. Bioinformática. In: MIR, L. (Ed). **Genômica**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 105-117, 2004.

SILBY, M. W., WINSTANLEY, C., GODFREY, S. A. C., LEVY, S. B., JACKSON, R. W. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. 652-680, julho, 2011.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n.1, p. 71-109, janeiro 2011.

SMANSKI, M. J., SCHLATTER, D. C., KINKEL, L. L. Leveraging ecological theory to guide natural product discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 115-128, março, 2016.

SMITH, T. F.; WATERMAN, M.S. Identification of common molecular subsequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 147, p. 195-197, 1981.

SPAGO, F. R., ISHII-MAURO, C. S., de OLIVEIRA, A. G., BERANGER, J. P. O., CELY, M. V. T., STANGANELLI, M. M., SIMIONATO, A. S., SAN MARTIN, J. A. B., ANDRADE, C. G. T. J., MELLO, J. C. P., ANDRADE, G. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. **Crop Protection**, v. 62, p. 46-54, agosto, 2014.

STEIN, L. Genome annotation: from sequence to biology. **Nature Reviews**, v. 2, n. 7, p. 493-503, julho, 2001.

SUN, F., OU, Q., WANG, Q., FENG, W., QIU, X., CHEN, J., LIU, Y., XIA, P. The resistance and transmission mechanism of *Acinetobacter baumannii* isolates in a tertiary care hospital, China. **J Chemother.** 2016; 30:1-6.

TAN, S. Y., TATSUMURA, Y. Alexander Fleming (1881-1955]: Discoverer of penicillin. **Singapore Medical Journal**, v. 56, n. 7, p. 366-367, 2015.

TIETZ, J. I., MITCHELL, D. A. Using genomics for natural product structure elucidation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 15, p. 1645-1694, 2015.

THABIT, A. K., CRANDON, J. L., NICOLAU, D. P. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 159-177, dezembro, 2014.

TUPE, S. G., KULKARNI, R. R., SHIRAZI, F., SANT, D. G., JOSHI, S. P., DESHPANDE, M. V. Possible mechanism of antifungal phenazine-1-carboxiamide from *Pseudomonas* sp. against dimorphic fungi *Benjaminiella poistrasii* and human pathogen *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 1., p. 39- 48, janeiro, 2015.

VAN BOEKEL, T. P., GANDRA, S., ASHOK, A., CAUDRIN, Q., GRENFELL, B.T., LEVIN, S.A., LAXMINARAYAN, R. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. **The Lancet – Infectious diseases**, v.14, n. 8, p. 742-750, agosto, 2014.

VAN VLIET, A. H. M. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 302, p. 1-7, 2010.

WANG, Z.; GERSTEIN, M., SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57-63, 2009.

WATKINS, R. R., BONOMO, R. A. Overview: Global and local impact of antibiotic resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, p. 313-322, 2016.

WEBER, T., BLIN, K., DUDELA, S., KRUG, D., KIM, H. U., BRUCCOLERI, R., LEE, S. Y., FISCHBACH, M. A., MÜLLER, R., WOHLLEBEN, W., BREITLING, R., TAKANO, E., MEDEMA, M. H. anti-SMASH 3.0 – a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research**, abril, 2015.

WEBER, B.S., HARDING, C.M., FELDMAN, M.F. Pathogenic *Acinetobacter*: from the Cell Surface to Infinity and Beyond. **J Bacteriol.** 2015; 198(6):880-7.

WEINSTEIN, M. J. Micromonospora antibiotic discovery at Schering/Schering Plough. **SIM News**, v. 54, p. 56-66, 2004.

ZACHOW, C., JAHANSHAH, G., BRUIJN, I., SONG, C., IANNI, F. PATAJ, Z., GERHARDT, H., PIANET, I., LÄMMERHOFER, M., BERG, G., GROSS, H.,

RAAIJMAKERS. The novel lipopeptide poaemide of the Endophyte *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 is involved in pathogen suppression and root colonization. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v.28, n. 7, p. 800-810, julho, 2015.

ZILBERBERG, M.D., NATHANSON, B.H., SULHAM, K., FAN, W., SHORR, A.F. Multidrug resistance, inappropriate empiric therapy, and hospital mortality in *Acinetobacter baumannii* pneumonia and sepsis. **Crit Care**. 2016; 20(1):221.

ZHOU, T., CHEN, D., LI, C., SUN, Q., LI, L., LIU, F., SHEN, Q., SHEN, B. Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components. **Microbiological research**, v. 167, n. 7, p. 388-394, julho, 2012.

ARTIGO A

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE UMA CEPA AMBIENTAL DE *Pseudomonas aeruginosa* PRODUTORA DE UM COMPOSTO ORGANOMETÁLICO BIOATIVO

Resumo

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um grande problema que acomete diversas regiões do mundo e poucos novos fármacos estão em fase de desenvolvimento. O estudo dos microrganismos antagonistas isolados do solo é uma fonte promissora de pesquisa de novos antimicrobianos frente a falta de opções terapêuticas. Os novos compostos ativos provêm, na maioria das vezes, do metabolismo secundário de microrganismos e conferem vantagens adaptativas aos mesmos. O conhecimento das vias biossintéticas de novos compostos permite a otimização da produção e purificação do mesmo. Dessa forma, abordagens relacionadas ao estudo dos transcriptomas dos microrganismos, como o RNA-seq, são fundamentais para esse processo. Uma cepa ambiental de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) é capaz de produzir um composto organometálico bioativo quando cresce na presença do íon metálico cobre. Após a análise da expressão gênica diferencial da cepa LV quando crescida em meio de cultivo na ausência/presença do íon metálico cobre observou-se a hiperexpressão diferencial de nove genes. Três genes foram relacionados à sistemas de efluxo, um relacionado à chaperonas ligadas ao cobre e um regulador de transcrição; possivelmente esse conjunto gênico está associado à expulsão ativa do cobre no meio intracelular. Além disso, três genes evidenciaram proteínas hipotéticas e um gene correlato à via metabólica das fenazinas, sugerindo uma possível ligação dessa via à formação do composto organometálico bioativo, como forma de biorremediar o cobre presente em excesso no meio intracelular.

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema global que cresce de maneira emergente, acometendo às comunidades e os ambientes hospitalares. Nesse aspecto, os microrganismos multirresistentes tem um impacto significativo sobre a mortalidade, o tempo de internação e os custos associados ao tratamento, gerados pelas infecções que causam (RUNDRAMURTHY et al, 2016). O cenário atual apresenta altos índices de disseminação da multirresistência bacteriana, o que representa uma séria ameaça para a saúde pública e coloca em ênfase alguns questionamentos sobre um possível retorno a uma era pré-antibiótica e à necessidade de estudos e desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos (BASSETTI et al, 2013). O solo é uma excelente fonte pesquisa de microrganismos antagonistas, que são uma excelente estratégia para a purificação de novos compostos antimicrobianos e uma necessidade frente à falta de opções terapêuticas para microrganismos multirresistentes (FERNANDES, 2015). Isolados do metabolismo secundário de procariotos são muito estudados e utilizados na pesquisa do controle de doenças na medicina, na agricultura; desempenhando funções antimicrobianas e antifúngicas (STIERLE, 2015; THI, 2016; DEPOORTER, 2016; ORLOVA, 2016).

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina mostraram que um composto antimicrobiano natural produzido pela bactéria ambiental *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) é capaz de atuar contra a bactéria multiresistente *Klebsiella pneumoniae*, produtora da carbapenemase KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), entre outras bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (CARDOZO et al, 2013). Esse composto, classificado como um organometálico é um metabólito secundário produzido pela cepa LV e induzido pela presença do cobre no meio cultivo (OLIVEIRA et, 2016).

Com a metodologia do RNA-seq (sequenciamento de RNA), podemos analisar o transcriptoma de microrganismos, entendendo suas vias metabólicas envolvidas na síntese de novos compostos com atividade através da análise

das regiões funcionais dentro do genoma da espécie e os elementos genéticos envolvidos na produção dos possíveis agentes (GRABHERR et al., 2011).

O presente trabalho tem como objetivo a utilização da metodologia de RNA-seq juntamente com o pacote computacional CLC Genomics Workbench versão 8.5.1 (CLC bio, Denmark), para análise, através da abordagem de mapeamento, da expressão gênica diferencial da CEPA LV de *P. aeruginosa* sob duas condições de crescimento presença/ausência do íon metálico cobre. A análise tem como finalidade a busca da função dos transcritos diferencialmente expressos e seu papel no metabolismo espécie, para contextualizar a via de síntese do composto bioativo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das Células

O processo de obtenção das células da bactéria *P. aeruginosa* (Cepa LV) nas diferentes condições (presença/ausência do íon Cobre) foi realizado de acordo com a patente registrada: Patente PI0803350-1 – INPI 12/09/20092008; <http://www.inpi.gov.br>, com a modificação no tempo de cultivo, para 24hrs. As produções foram realizadas em triplicata biológica (três amostras para cada situação de crescimento, correspondendo a cada um dos três experimentos, separados espacial e temporalmente). Após o cultivo as células foram separadas por centrifugação em Centrífuga Jouan CR3 (9.000 rpm/20 min., 4°C) e estocadas a -80°C acrescidas de trizol em tubos de centrifugação de polipropileno. Após, o sobrenadante produzido foi testado quanto ao efeito antibiótico.

2.2 Extração do RNA Total

Após as condições descritas para a obtenção das células nas diferentes condições a serem analisadas, o RNA total foi isolado utilizando o kit *illustra RNAspin* (Ge Healthcare, Reino Unido), segundo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi determinada em gel de agarose (1,5%) em

condições desnaturantes e a quantidade do RNA foi mensurada em espectrofotômetro BioTek Sinergy HT.

2.3 Depleção do RNA Ribossômico

O RNA total extraído das triplicatas biológicas foi submetido à depleção utilizando o kit RiboMinus™ transcriptoma Kits (ThermoFisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. A remoção do RNA ribossômico aumenta a representação dos transcritos de RNA mensageiro, melhorando a acurácia dos transcritos. Após, a integridade e a quantidade do RNA depletado, foram determinadas em gel de agarose (1,5%) em condições desnaturantes em espectrofotômetro BioTek Sinergy HT, respectivamente.

2.4 Construção da Biblioteca e Sequenciamento do RNA

A construção das bibliotecas foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (Campus Belo Horizonte, MG). O mRNA resultante da depleção foi utilizado como base para a construção das Bibliotecas de RNA-Seq utilizando o kit TruSeq® RNA Sample Preparation v.2 (Illumina, USA), o protocolo foi adaptado na fase inicial para utilizar o mRNA depletado como substrato para o kit. As bibliotecas foram quantificadas com o kit KAPA Library Quantification Illumina® (KAPA Biosystems) através de uma reação de qPCR. Em seguida as bibliotecas foram normalizadas para a concentração de 4 nM e unidas para a realização do sequenciamento, que foi feito no sequenciador MiSeq (Illumina) com o kit MiSeq Reagent v3 (600 ciclos) em estratégia paired-end 2x300.

2.5 Checagem da Qualidade dos *Reads*

Na plataforma CLC Genomics Workbench versão 8.5.1 (CLC bio, Denmark) os *reads* obtidos tiveram sua qualidade analisada. O corte de qualidade foi o phred 0 já que nosso interesse é analisar o máximo de

informações possíveis sobre as sequências, e encontrar a maior quantidade de proteínas de interesse.

2.6 Mapeamento dos *Reads*

O mapeamento dos reads foi a partir do genoma de referência da cepa *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (NCBI Reference Sequence: NC_002516.2) os *reads* trimados foram mapeados, utilizando os parâmetros padrões da plataforma computacional CLC Genomics Workbench versão 8.5.1 (CLC bio, Denmark).

2.7 Medida dos Níveis de Expressão e Análise da Expressão Diferencial

Os dados gerados foram analisados pela plataforma CLC Genomics Workbench versão 8.5.1 (CLC bio, Denmark) para a quantificação da expressão por valores de RPKM (*Reads per Kilobase per Million of Mapped Reads*). Basicamente a plataforma realiza a normalização dos dados mapeados obtidos para comparar as amostras com maior acurácia, calculando os níveis de expressão e, finalmente, realizando os testes estatísticos para verificar as diferenças de expressão. Para determinar os genes que apresentavam diferenças nos níveis de expressão entre as duas situações de crescimento, foi utilizada a ferramenta *Empirical analysis of DGE* (Robinson e Smyth, de 2008), hospedada na plataforma CLC. Na mesma plataforma, os genes diferencialmente expressos com significância estatística foram identificados a partir de uma filtragem aplicando-se a correção *Fold Change* (usada para a comparação do nível de expressão de RNAm de um gene de entre duas condições distintas) maior que 1,5 e p-valor menor que 0,001. A lista de genes com expressões significantes obtidas foi transformada, normalizada e utilizada para confecção dos gráficos de análise de dispersão.

2.8 Anotação Funcional dos Genes Diferencialmente Expressos

Os transcritos mais expressos foram submetidos aos programas de anotação BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), INTERPRO (*Protein*

Sequence Analysis & Classification), UNIPROT (*Universal Protein Resource*) e PFAM (*Protein Domain Database*) individualmente para possível classificação manual em categorias funcionais de acordo com a descrição da sequência baseada na maior similaridade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas as análises da expressão gênica diferencial da Cepa LV de *P. aeruginosa* na presença/ausência do íon metálico cobre para identificar a função dos transcritos hipereexpressos e o seu papel no metabolismo espécie. Com os resultados obtidos inferiu-se os possíveis genes envolvidos na produção de um metabólito secundário com função antimicrobiana produzido pelo microrganismo.

3.1 Obtenção dos *Reads*

Após todas as etapas de extração do RNA, depleção do RNA, síntese do cDNA, construção e sequenciamento das bibliotecas genômicas, obtivemos aproximadamente 30 milhões de *reads* para a análise, conforme o demonstrado na Figura 1.

As *reads* selecionadas estavam separadas em dois tratamentos distintos, os que foram obtidos através do cultivo da Cepa LV acrescida de cobre no meio de cultivo e os que foram cultivados sem a presença do mesmo no meio. Para o tratamento A (sem cobre no meio de cultivo) foram obtidas 14,783,618 *reads*, enquanto para o tratamento B (cobre acrescido ao meio) o total foi de 15,091,252 *reads*.

3.2 Mapeamento dos *Reads*

Após o agrupamento das triplicatas os tratamentos foram mapeados pelo genoma anotado de *P. aeruginosa* (NCBI Reference Sequence: NC_002516.2), que possui 5.697 genes e 6264404 pb. O número total de *reads* obtidos em cada tratamento é demonstrado na tabela 1 e o maior tamanho obtido para cada triplicata foi de 301 pb. A cobertura média de cada tratamento

foi superior a 100X, demonstrando um número de *reads* adequado para análise de expressão.

As análises das médias dos tratamentos revelaram que, para o tratamento A (condição sem cobre) aproximadamente 63% dos *reads* foram mapeadas e 37% não foram mapeadas. Para o tratamento B (condição com cobre) os *reads* mapeados foram 65% e os não mapeados 35%, aproximadamente (Tabela 1).

Figura 1 - Fluxo de trabalho das etapas de extração do RNA, depleção do RNA, síntese do cDNA, construção e sequenciamento das bibliotecas genômicas.

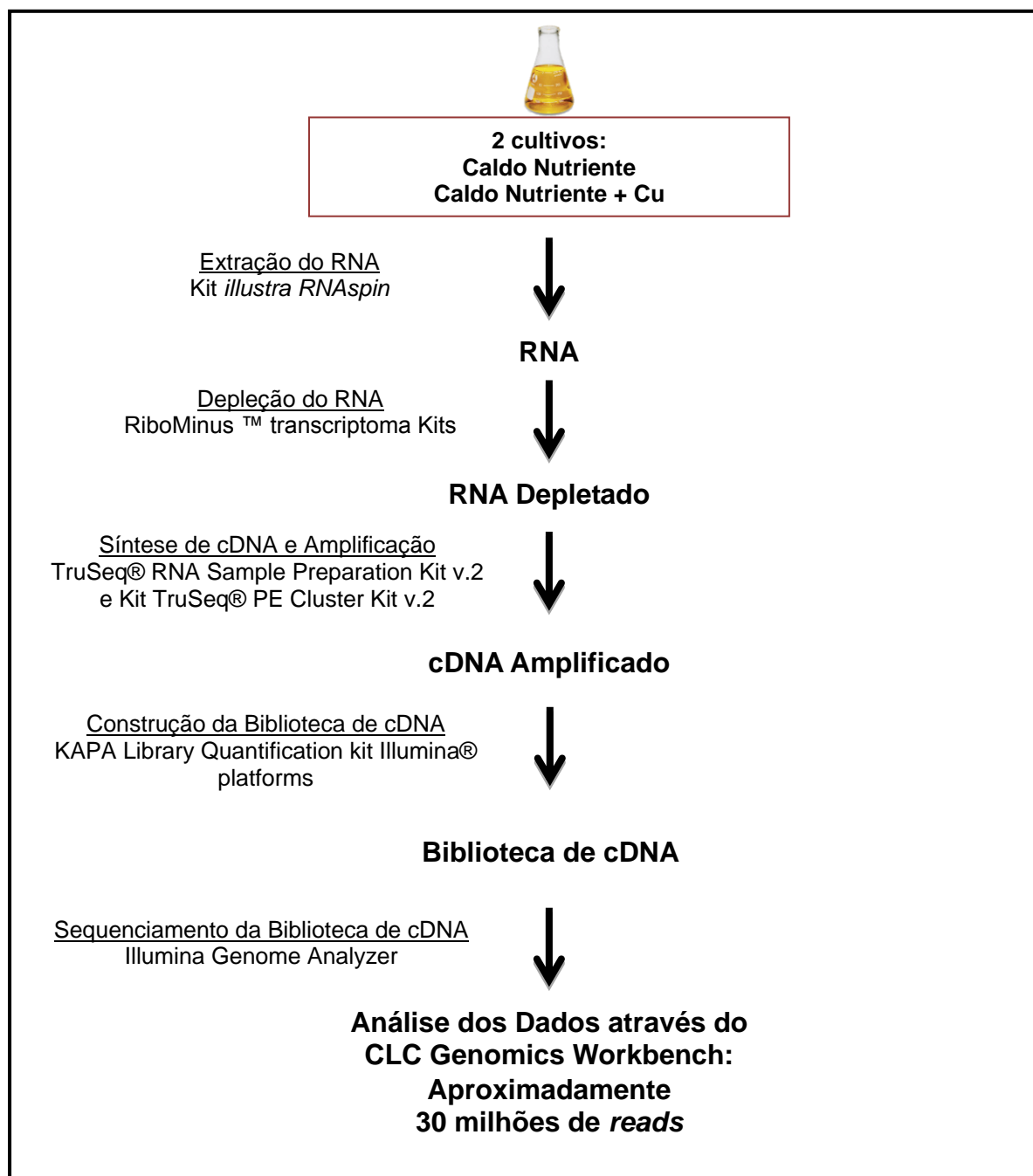


Tabela 1 - A tabela demonstra o número e a porcentagem de *reads* mapeados e não mapeados das triplicatas de cada tratamento.

		Reads Mapeadas em Pares		Reads Não-Mapeadas		Total ^(a)	
		Nº de reads	%	Nº de reads	%	Nº de reads	%
Tratamento	A1	4.080.686	77,29	1.060.775	20,09	5.279.934	100,00
A	A2	3.077.138	62,52	1.723.699	35,02	4.921.736	100,00
(sem cobre)	A3	1.753.948	38,28	2.694.837	58,81	4.581.948	100,00
Tratamento	B1	3.081.482	63,97	1.592.615	33,06	4.816.716	100,00
B	B2	3.511.134	68,74	1.469.480	28,77	5.107.976	100,00
(com cobre)	B3	2.878.158	55,71	2.164.010	41,88	5.166.560	100,00

(a) A soma dos valores de *reads* mapeados e não mapeados não corresponde ao total de *reads* demonstrados pois os *reads* mapeados em pares quebrados foram ocultados da tabela.

3.3 Medida dos Níveis de Expressão e Análise da Expressão Diferencial

Para a quantificação da expressão gênica os valores de RPKM foram utilizados. Os dados mapeados obtidos entre os dois tratamentos foram comparados, calculando seus níveis e diferenças de expressão. Após o tratamento estatístico nove genes foram detectados (figura 2). De acordo com o gráfico os nove genes com diferença estatística estão no tratamento B (sem cobre). Essa relação pode ser explicada pela presença do cobre no meio de cultivo e a produção do composto organometálico, que acontece nessa condição. Dessa forma, podemos dizer que possivelmente esses genes hiperexpressos podem estar relacionados à síntese do composto.

3.4 Análise Funcional

Os genes hiperexpressos com significância estatística foram filtrados em uma tabela e classificados manualmente em categorias funcionais de

acordo com a descrição da sequência baseada na maior similaridade. A curadoria foi realizada em ferramentas de busca distintas (tabela 2).

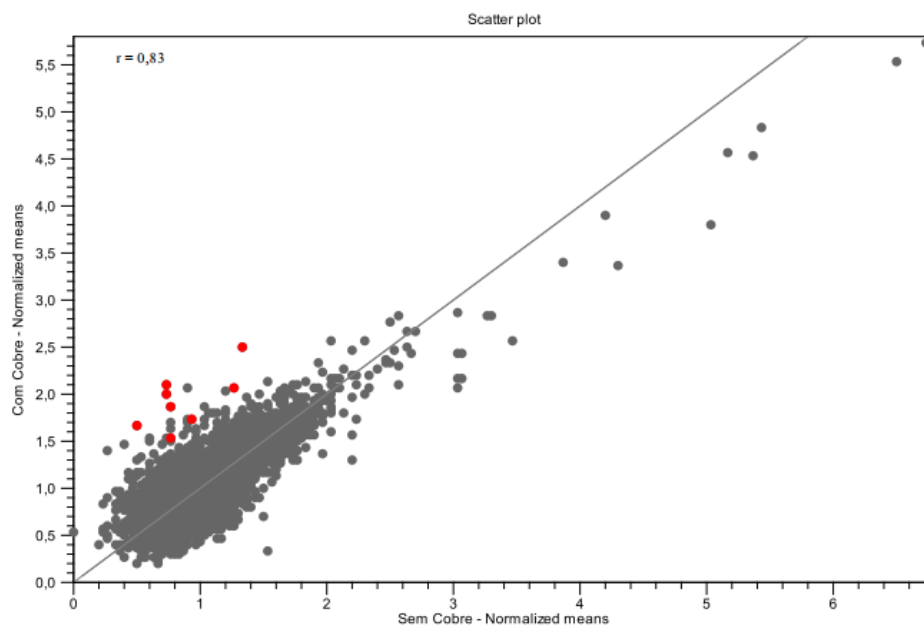


Figura 2 - Dispersão dos genes expressos entre os tratamentos quando comparados com o genoma de referência PA01. Os pontos vermelhos indicam os genes hipereexpressos com menores níveis de significância.

Dentre os genes anotados três (PA2691, PA4141 e PA4782) não foram caracterizados em nenhum dos bancos utilizados, sendo classificados como proteínas hipotéticas. Outros três genes foram relacionados ao transporte de íons metálicos (PA3521, PA3523 e PA3920); 1 gene (PA3574a) associado ao grupo de chaperonas ligadas ao cobre e um gene (PA4872) classificado como um regulador de transcrição. Por fim, um dos genes (phzA2) foi relacionados à via biosintética das fenazinas.

3.4.1 Genes relacionados ao excesso de cobre no meio intracelular

Alguns metais pesados são importantes, em pequenas concentrações, para o crescimento bacteriano, entretanto, quando em excesso são considerados tóxicos. Altas concentrações de cobre podem causar toxicidade na célula bacteriana devido à sua interação com os ácidos nucleicos ou porque

atuam na peroxidação dos lipídeos da membrana, alterando a permeabilidade celular, levando à morte. Por outro lado, o cobre complexado organicamente é relativamente não tóxico para os microrganismos (TEITZEL et al, 2006). As bactérias possuem diversos mecanismos para evadir-se do estresse causado pelo cobre como a perda de porina, a redução ou oxidação do metal para formas menos tóxicas e os sistemas de efluxo. Os sistemas de efluxo constituem o principal aspecto da resistência a esses metais, transportando os cátions metálicos para o citosol ou para o espaço periplasmático (NIES, 2003).

Dentre os genes hiperexpressos encontrados em nosso estudo, três estão relacionados à sistemas de efluxo (PA3521, PA3523 e PA3920) e um gene (PA3574a) está relacionado à expressão de uma chaperona transportadora de cobre, a CopZ. De maneira específica o gene PA3920 está relacionado ao transporte de metais pesados em *Pseudomonas* sp. Ele pertence ao subgrupo P_{1B-1} da família dos transportadores do tipo P-type ATPases. Nesse sistema, o efluxo do cobre ocorre na presença de ATP, quando as Cu⁺-chaperonas translocam o íon para as proteínas transmembranas. Então, ocorre a fosforilação catalítica da enzima transmembrana, que move o cobre para o espaço periplasmático ou para o meio extracelular. Após o metal ser liberado a enzima retorna à sua condição inicial (GONZÁLEZ-GUERREIRO et al, 2010). Sabe-se que *P. aeruginosa* possuem sistemas de efluxo constitutivos que podem ser expressos em múltiplas cópias com a presença de um estímulo. A presença do cobre no meio de cultivo no tratamento B, em nosso estudo, explica a hiperexpressão desses genes relacionados ao efluxo, uma vez que o a presença do íon é um estímulo ambiental particular para o aumento da expressão desses sistemas, principalmente aos relacionados ao transporte de metais pesados.

O gene PA4878 está relacionado à família MerR, que englobam proteínas reguladoras relacionadas a ativação de sistemas de efluxo. Essas proteínas estão envolvidas na modulação da ativação da transcrição da sua própria expressão, bem como a dos seus genes-alvo em resposta a um indutor (LIAO et al, 2013). Os altos valores de expressão dessa proteína reguladora apresentado em nosso estudo estão relacionados com o conjunto de mecanismos que a cepa LV vale-se para a eliminação do cobre de seu interior.

Tabela 2 - Categorias funcionais dos genes hiperexpressos com significância estatística, para os quatro bancos de dados analisados e seus respectivos acessos.

Genes Hiperexpressos	BLAST		INTERPRO		UNIPROT		PFAN	
	Acesso	Descrição	Acesso	Descrição	Acesso	Descrição	Acesso	Descrição
PA2691	NP_251381.1	hypothetical protein	NP_251381.1	None predicted	Q9I0F1	Uncharacterized protein	119AC74A-4308-11E6-911D-1D4195374F7B	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
PA3521	NP_252211.1	hypothetical protein	NP_252211.1	Outer membrane efflux protein	Q9HY88	Probable outer membrane protein	8C838970-4307-11E6-8525-AA236FECAC22	Outer membrane efflux protein
PA3523	NP_252213.1	resistance-nodulation-cell division (RND) / efflux membrane fusion protein	NP_252213.1	RND efflux pump, membrane fusion protein	A0A0H3R045	Efflux transporter, RND family, MFP subunit	E7D46600-4307-11E6-AB34-2E4195374F7B	Barrel-sandwich domain of CusB or HlyD membrane-fusion
PA3574a	YP_008719768.1	copper chaperone CopZ	YP_008719768.1	None predicted	A0A0H3QZK8	Uncharacterized protein	96066EEE-4308-11E6-80EB-32246FECAC22	HMA domain (heavy-metal-associated domain)
PA3920	NP_252609.1	metal transporting P-type ATPase	NP_252609.1	P-type ATPase	A0A0H3R5R9	Heavy metal translocating P-type ATPase	BF3D3A22-4308-11E6-8366-95635F09777C	HMA domain (heavy-metal-associated domain)
PA4141	NP_252830.1	hypothetical protein	NP_252830.1	None predicted	A0A0E1AMZ0	Uncharacterized protein	E93E4DAC-4308-11E6-A9B7-1C4195374F7B	We did not find any Pfam-A matches to your search sequence
PA4782	NP_253470.1	hypothetical protein	NP_253470.1	None predicted	A0A0E1AZX2	Uncharacterized protein	0F91632C-4309-11E6-A6CF-1D4195374F7B	We did not find any Pfam-A matches to your search sequence
PA4878	NP_253565.1	transcriptional regulator	NP_253565.1	None predicted	A0A0E1B2A9	Transcriptional regulator	29269938-4309-11E6-B71C-1C4195374F7B	MerR HTH family regulatory protein
phzA2	NP_250590.1	phenazine biosynthesis protein PhzA	NP_250590.1	Phenazine biosynthesis protein A/B	V6AFZ3	Phenazine biosynthesis protein phzA 2	3E312AE6-4309-11E6-9A91-32246FECAC22	Phenazine biosynthesis protein A/B

Nesse caso essa proteína responde ao estímulo ambiental do aumento de cobre no meio de cultivo, sendo hiperexpressa e auxiliando à transcrição dos sistemas de efluxo para o transporte do cátion para o meio extracelular.

3.4.2 Gene relacionado à via metabólica das fenazinas e genes não caracterizados

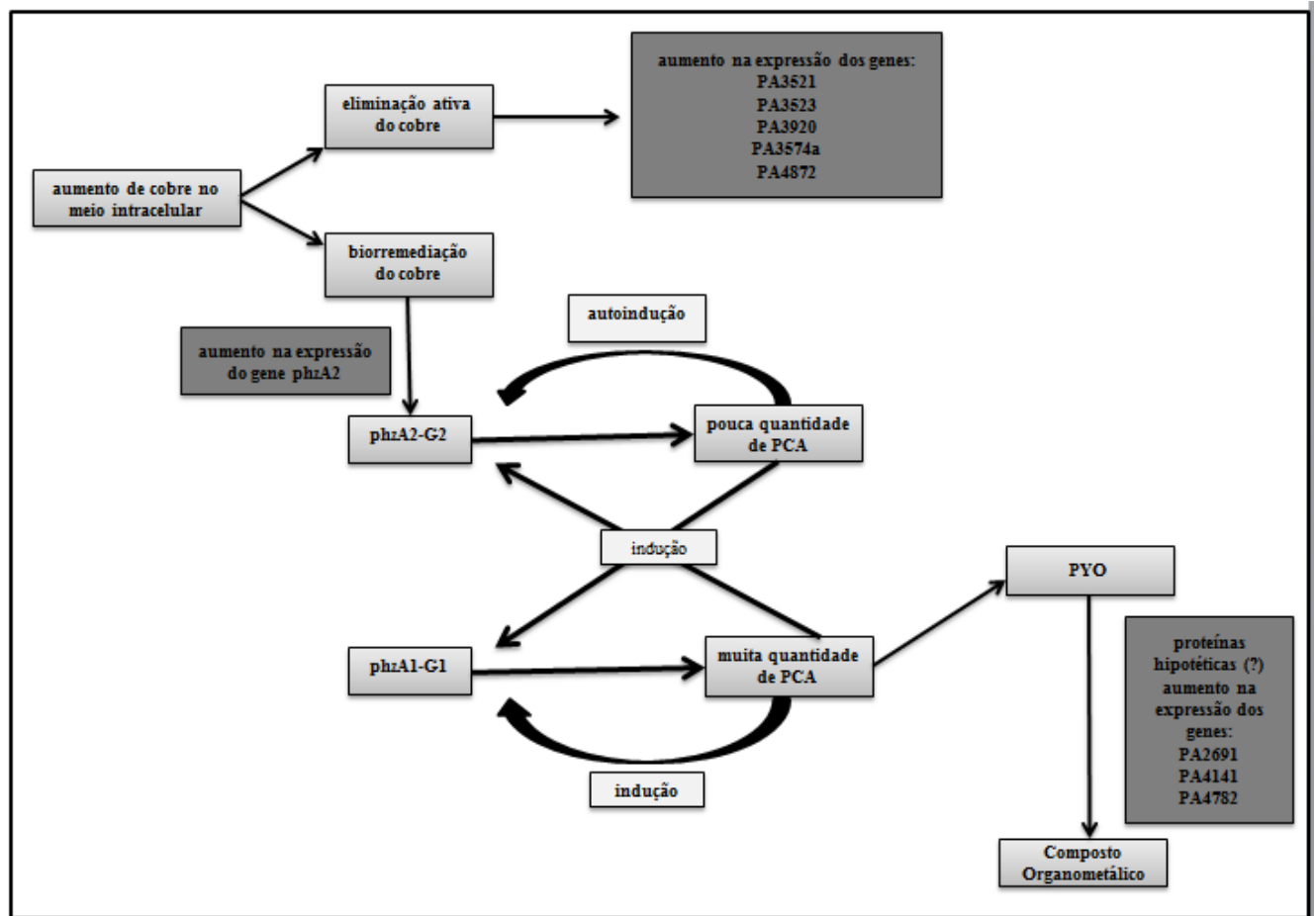
Fenazinas são importantes compostos heterocíclicos contendo nitrogênio com atividade redox biossintetizadas e secretadas naturalmente por algumas cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. São produtos do metabolismo secundário desse grupo de microrganismos e, por seu pequeno tamanho, penetram facilmente todos os tipos de células. O anel aromático que possuem é substituído por diferentes grupos funcionais, resultando em derivadas cores. Quatro fenazinas principais foram identificadas em *P. aeruginosa*: fenazina-1-carboxílica (PCA, possui uma pigmentação amarelada), que é produzida através do ácido corísmico. A PCA, molécula precursora, é ainda modificada em piocianina (PYO, pigmento azul), 1-hidroxifenazina (1-HP, pigmento laranja), e à fenaniza-1-carboxiamida (PCN, pigmento amarelo) (BRIARD et al, 2015). Esses compostos funcionam como antimicrobianos naturais, supressores de patógenos de plantas, e virulência em hospedeiros humanos e animais; desempenhando um importante papel na competitividade microbiana (DASGUPTA et al, 2015; GARRISON et al, 2016; MORRISON et al, 2015; BRIARD et al 2015; CHEN et al, 2014).

A biossíntese de PCA em *P. aeruginosa* é realizada por dois operons de sete genes *phz1* (*phzA1B1C2D1E1F1G1*) e *phz2* (*phzA2B2C2D2E2F2G2*). Segundo Li (2011), há uma regulação conjunta desses dois operons para a eficiência da síntese dessa fenazina. O agrupamento de genes *phzA2-G2* só pode produzir PCA em pequenas quantidades, a maioria das moléculas de PCA são produzidas a partir do agrupamento *phzA1-G1*. Entretanto, de acordo com o autor, a expressão dos dois operons em conjunto é que proporcionam a produção eficiente de PCA, em um padrão de amplificação de feedback. O mecanismo ocorre quando o operon *phz2* produz uma quantidade basal de PCA, essa auto-induz o mesmo operon a continuar a biossíntese e induz a ativação da expressão do operon *phz1*. Além disso, a produção de PCA pelo

operon *phzA1* também induz a expressão do operon *phzA2* a continuar sua biossíntese.

No presente estudo encontramos uma hiperexpressão do gene *phzA2*, pertencente ao operon *phz2*. Dentre os nove genes detectados esse é o único que está relacionado à uma via metabólica. A alta expressão do gene *phzA2* possivelmente induz à uma maior expressão na quantidade de PCA, já que seu mecanismo de biossíntese está relacionado à quantidade do mesmo no meio intracelular. A presença do cobre no meio de cultivo provoca um estresse no microrganismo, esse tenta eliminá-lo através dos sistemas de efluxo hiperexpressos, além disso, sugerimos que parte dessa concentração do íon é biorremediada, sendo convertido no composto organometálico com atividade antimicrobiana. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a PYO é isolada nos cultivos sem a presença do íon cobre e não está presente na quando o mesmo é adicionado ao meio (dados não publicados), sugerindo assim que a PCA produzida é convertida em PYO e essa biorremediada no composto bioativo. Possivelmente as três proteínas hipotéticas detectadas possam estar relacionadas à conversão da PCA em PYO e participem ativamente do processo de biorremediação da PYO no composto organometálico bioativo (Figura 2). Mais estudos estão sendo conduzidos para a confirmação da hipótese.

Figura 3 - Relação integrada dos genes hiperexpressos quando há um aumento de cobre no meio de cultivo e as possíveis hipóteses de sua expulsão: eliminação ativa e biorremediação.



REFERÊNCIAS

- BASSETTI, M.; MERELLI, M., TEMPERONI, C.; ASTILEAN, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrobiol.** 2013; 28:12-22.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics.** 2005; 58:1-26.
- BRIARD, B.; BOMME, P.; LECHNER, B.E.; MISLIN, G.L.; LAIR, V.; PRÉVOST, M.C.; LATGÉ, J.P.; HAAS, H.; BEAUVAIS, A. *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. **Scie. Rep.** 2015; 10: 8220-8225.
- BUTLER, M.S.; BLASKOVICH, M.A.; COOPER, M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 3013. **The J. of Antitibiotcs.** 2013; 66:571-591.
- CARDOZO, V.F.; OLIVEIRA, A.G.; NISHIO, E.K.; PERUGINI, M.R.; ANDRADE, C.G.; SILVEIRA, W.D.; DURÁN, N.; ANDRADE, G.; KOBAYASHI, R.K.; NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** 2013; 17:12-24.
- CHEN AL DOLBEN, E.F., OKEGBE, C., HARTY, C.E., GOLUB, Y., THAO, S., H.A. D.G., WILGER, S.D., O'TOOLE, GA, HARWOOD CD, DIETRICH LE, HOGAN DA. *Candida albicans* ethanol stimulates *Pseudomonas aeruginosa* WspR-controlled biofilm formation as part of a cyclic relationship involving phenazines. **PLoS Pathog.** 2014; 10: 1-10.
- DASGUPTA D, KUMAR A, MUKHOPADYAY B, SENGUPTA TK. Isolation of phenazine 1,6-di-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain HRW.1-S3 and its role in biofilm-mediated crude oil degradation and cytotoxicity against bacterial and cancer cells. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2015; 99:8653-8665.
- DEPOORTER E, BULL MJ, PEETERS C, COENVE T, VANDAMME P, MAHENTHIRALINGAM E. Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2016; 100:5215-5229.
- De OLIVEIRA AG, SPAGO FR, SIMIONATO AS, NAVARRO MO, da SILVA CS, BARAZETTI AR, CELY MV, TISCHER CA, SAN MARTIN JA, de JESUS ANDRADE CG, NOVELLO CR, MELLO JC, ANDRADE G. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. **Fron. Microbiol.** 2016; 7:113-136.
- FERNANDES P. The global challenge of new classes of antibacterial agents: an industry perspective. **Curr. Opin. Pharmacol.** 2015; 24:7-11.

GARRISON AT, ABOUELHASSAN Y, NORWOOD VM 4th, KALLIFIDAS D, BAI F, NGUYEN MT, ROLFE M, BURCH GM, JIN S, LUESCH H, HUIGENS RW 3rd. Structure-Activity relationships of a diverse class of halogenated phenazines that targets persistent, antibiotic-tolerant bacterial biofilms and *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Med. Chem.** 2016; 59:3808-3825.

GRABHERR MG, HAAS BJ, YASSOUR M, LEVIN JZ, THOMPSON DA, AMIT I, ADICONIS X, FAN L, TAYCHOWDHURY R, ZENG Q, CHEN Z, MAUCELI E, HACOEN N, GNIRKE A, RHIND N, di PALMA F, BIRREN BW, NUSBAUM C, LINDBLAD-TOH K, FRIEDMAN N, REGEV A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. **Nat. Biotechnol.** 2011; 29:644-652.

GONZÁLEZ-GUERRERO M, RAIMUNDA D, CHENG X, AEGÜELLO JM. Distinct functional roles of homologous Cu⁺ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.** 2010; 78:1246-1258.

GUIMARÃES DO, MOMESSO LS, PUPO MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova.** 2010; 33:667-679.

LI Y, DU X, LU ZJ, WU D, ZHAO Y, REN B, HUANG J, HUANG X, XU Y, XU Y. Regulatory feedback loop of two *phz* gene clusters through 5'-untranslated regions in *Pseudomonas* sp. M18. **PLoS One.** 2011; 6:1-12.

LIAO J, SCHURR MJ, SAUER K. The MerR-like regulator BrIR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **J. Bacteriol.** 2013; 195:3352-3362.

MORRISON CK, NOVINSKAK A, GADKAR VJ, JOLY DL, FILION M. Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* LBUM636, a strains with biocontrol capabilities against late blight of potato. **Genome Announc.** 2016; 26:4-7.

NIES DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiol. Rev.** 2003; 27:313-339.

ORLOVA TI, BULGAKOVA VG, POLIN AN. Secondary metabolites from marine microorganisms. I. Secondary metabolites from marine actinomycetes. **Antibiot. Khimioter.** 2015; 60:47-59.

ROBINSON MD, SMYTH GK. Small-sample estimation of negative binomial dispersion with applications to SAGE data. **Bioinformatics.** 2008; 9:321-332.

RUNDRAMURTHY GR, SWAMY MK, SINNI AH UR, GHASEMZADEH A. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. **Molecules.** 2016; 27: 21-28.

STIERLE AA, STIERLE DB. Bioactive secondary metabolites produced by the fungal endophytes of conifers. **Nat. Prod. Commun.** 2015; 10:1671-1682.

TEITZEL GM, GEDDIE A, DE LONG SK, KIRISITS MJ, WHITELEY M, PARSEK MR. Survival and growth on the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** 2006; 188:7242-7256.

THI QV, TRAN VH, MAI HD, LE CV, HONG MLE T, MURPHY BT, CHAU VM, PHAM VC. Secondary metabolites from an Actinomycete from Vietnam's East Sea. **Nat. Prod. Commun.** 2016; 11:401-404.

ARTIGO B**SYNERGISTIC ACTION OF POLYMYXIN B AND A ORGANOCOPPER
COMPOUND PRODUCED BY A STRAIN OF *Pseudomonas aeruginosa*
AGAINST MULTIRESTANT *Acinetobacter baumannii* ISOLATES****Abstract**

Acinetobacter baumannii is emerging as highly multiresistant clinical pathogen with increased prevalence. In recent years, the limited number of antimicrobial agents available for treatment of infections with multidrug-resistant strains reinforced the tendency for discovery of novel antimicrobial agents or treatment strategies. Polymyxin are last-resort antibiotic for treating infections for *A. baumannii* and the recent emergence of polymyxin B-resistant strains, however, urgently demands clinical optimisation of use of this drug to minimise further evolution of resistance. The aim of the study was to determine antimicrobial effectiveness of one organocopper compound produce by a environmental *Pseudomonas aeruginosa* strain, alone and in combination with imipenem or polymyxin B, against multidrug-resistant *A. baumannii*. The results obtained highlighted the occurrence of good antibacterial effect of the organocopper compound when administered alone. In the combination with imipenem, two strains showed antagonistic effect with the compound and four no effect, however, to polymyxin B, in all isolates proved synergism effect. The viability curve method confirmed efficacy of organocopper compound and polymyxin B combination, with complete reduction of bacterial count after 14 h. The results offer an opportunity for future development of treatment strategies for potentially lethal wound infections caused by multidrug-resistant *A. baumannii*.

1 Introduction

Acinetobacter baumannii has emerged as a significant nosocomial pathogen worldwide. A multitude of infections can be caused by this microorganism, including ventilator-associated pneumonia, line-associated bloodstream infections, meningitis, catheter-associated urinary tract infections, and skin and soft tissue infections. The intrinsic antimicrobial resistance, the persistence of the bacterial organism on surfaces as well as its ability to rapidly developed antibacterial resistance represents a significant challenge to patients and healthcare systems (GNIADEK, CARROLL, SIMNER, 2016)

For treatment of serious infections due multidrug resistant (MDR) *A. baumannii*, until recently, the carbapenems could be effectively used. However, nowadays the dissemination of carbapenem-resistance *A. baumannii* strains resulted in limited available clinical options and led to resurgence of polymyxins as last-resort antibiotics treatments

With respect to use of polymyxins to treat MDR infections due to *A. baumannii*, an important characteristic of the organisms is heteroresistance. Clinical strategies, including novel dosing regimens and combination antibiotic therapy, have been proposed as a solution to prevent this emerging resistance. The possible advantages of polymyxin combined therapy in comparison to monotherapy comprise a broader antibacterial spectrum, synergistic effects, and decreased risk for emerging resistance during therapy (DIAS et al, 2016) (CHUNG et al., 2016; RAO et al., 2016).

The synthesis of new bioactive compounds derived from soil microorganisms is a prop in modern medicine since the last century. (TRAXLER, KOLTER, 2015). Soil is a living and dynamic ecosystem, and the interactions that dominate their biology are often mediated resulting compounds of secondary metabolism of organisms present there (ZHANG, LORIA DING, 2015). Among the microorganisms that produce groups of bioactive compounds *Pseudomonas* genus is known to produce a wide range of such agents (Ligon et al, 2000).

In the present study, we evaluate the in vitro antimicrobial effect of an organocopper antibiotic compound (OAC) produced by an environmental isolate

of *Pseudomonas aeruginosa* (LV strain) against MDR *A. baumannii* strains, alone or when combined with imipenem or polymyxin B.

2 Methods

2.1 Production, collection and purification of Organocopper Antibiotic Compound (OAC)

The production process, obtaining and purifying of the OAC was performed according to the methodology described by Oliveira et al. (2016).

2.2 Bacterial isolates

Four isolates of *A. baumannii* represent genes encoding carbapenem-hydrolyzing Class-D β -lactamases (CHDL) in *Acinetobacter*, namely *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-72} and one *A. baumannii* encoding *bla*_{OXA-231} gene and a clinical isolate, called Ac S171/5, sensitive to antimicrobials (used as reference strain), was kindly provided by Prof. Dr. Ana Cristina Gales (Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina), and by Prof. Dr. Elaine Floristher Carrara-Marroni (Laboratório do Hospital da Clínicas – Universidade Estadual de Londrina), respectively.

All isolates were stored in Nutrient Broth (NB) containing glycerol (v/v 30%) at -70°C. For all experiments the isolates were inoculated on Mueller Hinton Broth (MHB) and cultured overnight at 37°C. After, they were grown on Mueller Hinton Agar (MHA) under the same conditions of time and temperature.

2.4 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The antimicrobial agents tested in this study include the OAC and two commercial antimicrobials: Imipenem and Polymyxin B (Sigma, USA). The MIC were determined by the Microdilution Broth Method, in accordance with the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). To evaluate the antimicrobial activity of the OAC was incorporated into the compound dilution, a final concentration of $\leq 0.8\%$ DMSO (Sigma, USA) (v/v) in diluent (culture

medium). The OAC concentrations were performed in two repetitions in serial dilutions to concentrations ranging from 62.5 to 0.9 μ g/ml and for commercial antibiotics in serial dilutions of two replicates with concentrations ranging from 0.125 to 512 μ g/ml. All experiments were performed in triplicate.

2.5 Synergism Test

The MIC of the combination, which is the lowest concentration of polymyxin B that, when combined with the lowest concentration of OAC, were determined. To evaluate the interaction between both antibiotics, the fractionated inhibitory concentration index (FICI) was used as described by Chin and collaborators (1998): $FICI = MIC (POL B \text{ or } IMI + OAC) / MIC (POL B \text{ or } IMI) + MIC (POL B \text{ or } IMI + OAC) / MIC (OAC)$. Where MIC (POL B or IMI + OAC) is the MIC of polymyxin B or imipenem combined with the OAC, MIC (POL B or IMI) and MIC (OAC) is the MIC of the polymyxin B or imipenem and MIC OAC alone, respectively. FICI were interpreted according Odds (2003) as follows: $FICI \leq 0.5 =$ synergic interaction; $FICI > 0.5-4 =$ no interaction and $FICI > 4.0 =$ antagonist interaction.

2.6 Curve of growth and viability

To quantify the effect of compounds on the bacterial growth, a time-response growth curve was obtained in the presence of polymyxin B, OAC and the combination polymyxin B+OAC. Briefly, one culture of *A. baumannii* (strain *bla*_{OXA-23}) was adjusted to 0.5 index in MacFarland scale and inoculated at a cell density of 10⁶CFU/ml in four distinct tubes containing in 5 ml of MHB. The cultures receives the antibiotics: polymyxin B and OAC (in distinct tubes) and polymyxin B in combination with OAC, in their MIC concentration. A culture, used as a control, had no added antibiotics. The bacterial cultures were then incubated at 37°C. In different times (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 24 and 48 hours), an aliquot of the broth was collected, diluted in saline solution, plated on MHA and grown for 18 h at 37°C in order to determine the total CFU of each culture.

3 Results

3.1 CIM and Synergism Test

Among the conventional antimicrobials, all isolates, with the exception of strain control, showed resistance to imipenem. The efficiency of polymyxin B was higher, with only two resistant isolates (Table 1). OAC showed inhibitory activity at a concentration of 3.9µg/ml for control and 7.8µg/ml for others strains (Table 1). Drug combination effects of commercial antimicrobial and OAC according to FICI are also shown in Table 1. The combination Imi vs OAC presented with antagonist interaction for the strains *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA143} and no interaction to the other isolates. However in combination Pol B vs OAC all isolates showed synergistic effect. In these combinations, the MIC of *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-231} decreased their values by three times. The *bla*_{OXA-72} isolate declined by four times the MIC and a decreased of five times was verified for *bla*_{OXA-143} strain. The control also showed synergistic combination results in Pol B vs OAC with MIC decreased twice.

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the six isolates of *A. baumannii* to commercial antibiotics, OAC, the synergic actions between them and the FICI. (R) resistant, (S) sensitive, (AE) antagonistic effect, (NE) no effect, (SE) synergistic effect effect. Values MIC are given in µg/mL.

Strains	MIC (alone)			MIC (combinated)		FICI	
	Imipenen	Polymyxin B	OAC	Imi vs OAC	Pol B vs OAC	Imi vs OAC	Pol B vs OAC
<i>bla</i> _{OXA-23}	128 (R)	4 (R)	7.8	64 (R)	0.5 (S)	8.7 (AE)	0.19 (SE)
<i>bla</i> _{OXA-58}	16 (R)	1 (S)	7.8	8 (R)	0.125 (S)	1.5 (NE)	0.14 (SE)
<i>bla</i> _{OXA-72}	32 (R)	2 (S)	7.8	16 (R)	0.125 (S)	2.5 (NE)	0.08 (SE)
<i>bla</i> _{OXA-143}	128 (R)	4 (R)	7.8	64 (R)	0.125 (S)	8.7 (AE)	0.05 (SE)
<i>bla</i> _{OXA-231}	64 (R)	1 (S)	7.8	32 (R)	0.125 (S)	4.6 (NE)	0.14 (SE)
Ac	0.125 (S)	1 (S)	3.9	0.0625	0.25 (S)	0.6 (NE)	0.31 (SE)
S171/5				(S)			

3.2 Curve of growth and viability

The kill curves were made for the commercial antimicrobial polymyxin B, for the OAC and the combination Pol B vs OAC (figure 1). The standard growth curve was used as positive control. The four curves made can be seen in Figure 1. In the curve of polymyxin B observed a reduction in CFU count during the first 2 hours, with a decline until 8 hours. However, after 10 hours of incubation was possible to note an increase in CFU count. The beginning of decline in CFU counts for OAC were slower than those for polymyxin B, approximately six hours and after 14 hours of culture there is no more microbial growth. The combination of Pol B vs OAC presented a similar curve, a gradual reduction in CFU counts, reaching the kill of the microorganism in 16 hours.

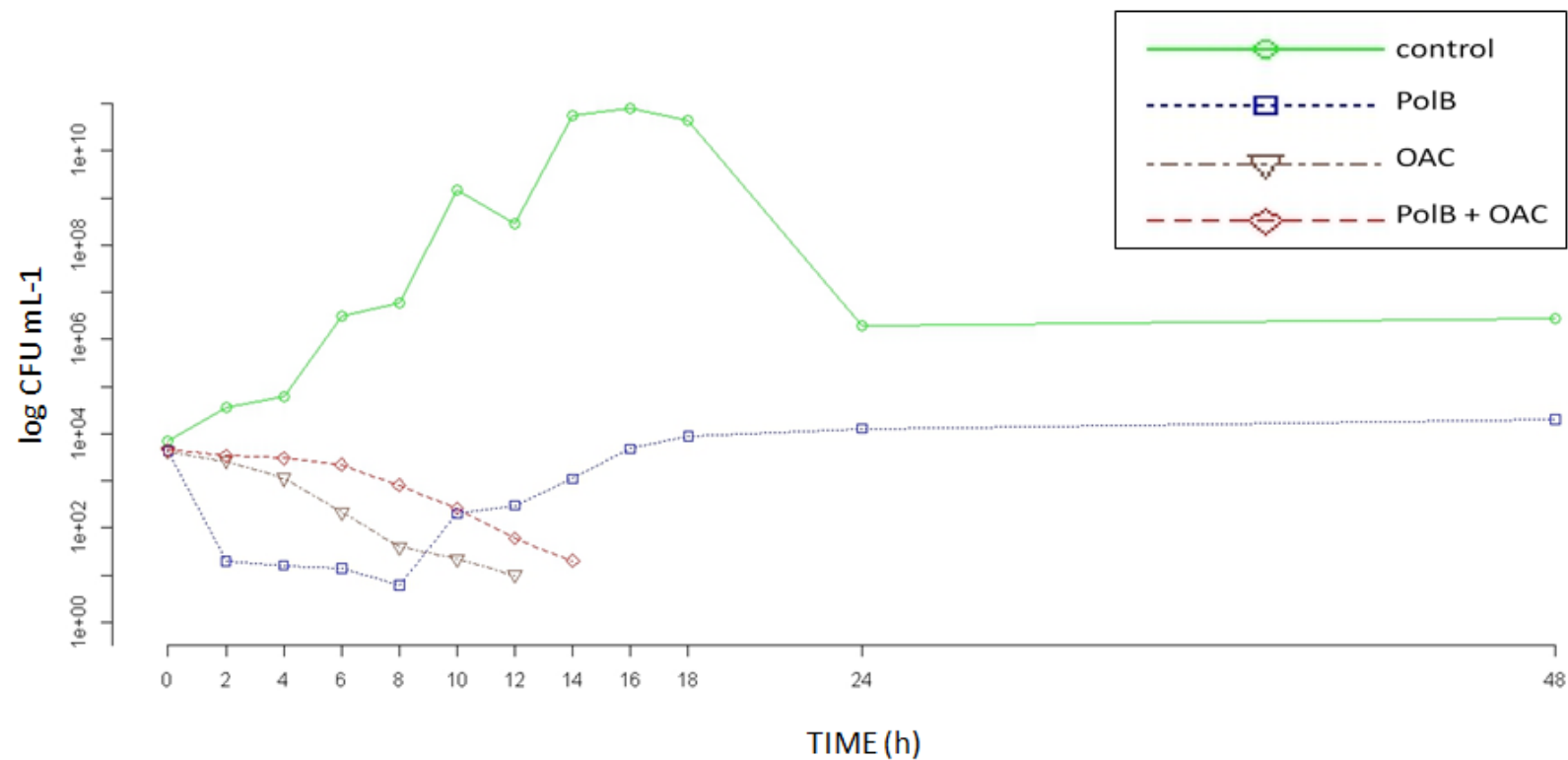


Figure 1. Curves of growth and *viability* for the isolated *A. baumannii* *bla*_{OXA-23}. The green line represents the control (growth curve), the blue line is the counts for polymyxin B, in purple for OAC and pink the combination Pol B vs OAC. The time is given in hours and each point on the graph is the sum of 2 hours from the inoculation time.

4 Discussion

While carbapenems have been regarded as antimicrobials of last-resort in infections caused by multidrug-resistant *A. baumannii*, increased rates of carbapenem resistance were observed for this microorganism worldwide (DIAS et al., 2016; MOGHADAN et al., 2016; MATHLOUTHI et al., 2016; AHMED et al., 2016). In Brazil, the carbapenem-resistance rates are higher than 50% (KIN). All the isolates used in our study were resistant to imipenem, except the control strain Ac S171/5, which it was susceptible to the all antimicrobials tested. As the high rate of carbapenem-resistance in *A. baumannii* has been observed on a global scale, the few remaining therapeutic options include tigecycline and “old” polymyxins, despite previous withdrawal because of reports nephrotoxicity and neurotoxicity presented (NATION et al., 2015). However, in the last few years a large number of reports have demonstrated decreased sensibility for polymyxin B in *A. baumannii*, highlight the alarming occurrence of pan-resistance (CHEAH et al., 2016; FREIRE et al., 2014; BARIN et al., 2013). Among the isolates tested, we have identified two strains resistant to polymyxin B.

Two distinct resistance phenotypes has been observed to polymyxins, the first being due to induction by the presence of the drug (called heteroresistance) and a second resistance phenotype designed as "natural" not correlated to prior exposure to polymyxins (FALAGAS, RAFAILIDIS, MATTHAIYOU, 2010; CAI et al., 2012). Heteroresistance occurs when is detected the emergence of a resistant subpopulation in a population of isolates susceptible to an antimicrobial. Inappropriate antimicrobial use is a risk factor, both for the emergence of heteroresistance, as to the emergence of induction of resistance phenotypes in clinical isolates (SKIADA et al., 2011). Cases of polymyxin B heteroresistance in *A. baumannii* have been described (BRIAN et al., 2016; QURESHI et al., 2015; BARIN et al., 2013; LI et al., 2006). In the time kill curve assay performed with polymyxin B, a decline of the inoculum was verified up to 8 hours of cultivation. However, after this time, an exponential regrowth was observed until 24 hours. In fact, an abolition of the bactericidal effect and selection of a resistant subpopulation was observed, indicating a possible heteroresistance on the tested isolate.

Faced with lack of therapeutic options against multidrug-resistant organisms, new natural compounds have been tested against these pathogens, including *A. baumannii*. The organometallic compound extracted from a *P. aeruginosa* strain used in this study has been tested against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* (KERBAUY et al., 2016; CARDOZO et al., 2013). According Kerbauy et al. (2016) MIC of the organometallic compound for *K. pneumoniae* is 3.9 µg/mL. A similar result was found in this study: the MICs obtained were 7.8 µg/mL and 3.9µg/mL for the isolates carrying the CHDL genes and standard strain, respectively. The effective antimicrobial activity of the compound against multiresistant isolates of *A. baumannii* makes this substance a great candidate to develop new antibiotic to use in the control of infections caused by this pathogen.

Important benefits has been reported with the use of combined therapies with polymyxin B against multiresistant pathogens, especially to prevent the emergence of polymyxin B heteroresistance during monotherapy (CAI et al., 2016; DURANTE-MANGONI et al., 2013; KVIKTO et al., 2011; PAUL et al., 2010). The synergistic effect of polymyxin B in combination with commercial antimicrobial agents and new natural compounds in multiresistant microorganisms are reported in many studies (KNEZEVIC et al., 2016; BETTS, et al., 2016; NI et al., 2014). Chung et al (2016) have observed synergistic effect of polymyxin B in combination with a compound of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. in Gram-negative bacterial isolates, the combination therapy of these compounds was highly effective against clinical isolates of *A. baumannii*. In this study the combination of polymyxin B with the organometallic compound presented a synergistic effect for all isolates of *A. baumannii* tested. Two isolates resistant to polymyxin B in monotherapy showed susceptibility in combination therapy. In additional, in the time kill curve of the combined compounds was not verified a polymyxin B resistant subpopulation, different from what occurred in the polymyxin B isolate assay. These data reinforce the efficacy in the treatment of *A. baumannii* with polymyxin B when this antimicrobial is administered in combination therapy.

In conclusion, the combination therapy of polymyxyn B and the organometallic compound, extracted from the secondary metabolism of *P. aeruginosa* (strain LV), furnish a prospective alternative to limited use of polymyxin in the treatment of *A.*

baumannii multiresistant strains, especially to avoid the selection of heteroresistance subpopulations.

References

- AHMED, S.S., ALP, E., ULU-KILIC, A., DINC, G., AKTAS, Z., ADA, B., BAGIROVA, F., BARAN, I., ERSOY, Y., ESEN, S., GUVEN, T.G., HOPMAN, J., HOSOGLU, S., KOKSAL, F., PARLAK, E., YALCIN, A.N., YILMAZ, G., VOSS, A., MELCHERS, W. Spread of carbapenem-resistant international clones of *Acinetobacter baumannii* in Turkey and Azerbaijan: a collaborative study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2016;4.
- BARIN, J., MARTINS, A.F., HEINECK, B.L., BARTH, A.L., ZAVASCKI, A.P. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** 2013;12:15
- BETTS, J.W., SHARILI, A.S., LA RAGIONE, R.M., WAREHAM, D.W. In Vitro Antibacterial Activity of Curcumin-Polymyxin B Combinations against Multidrug-Resistant Bacteria Associated with Traumatic Wound Infections. **J Nat Prod.** 2016;79(6):1702-6.
- CARDOZO, V.F., OLIVEIRA, A.G., NISHIO, E.K., PERUGINI, M.R., ANDRADE, C.G., SILVEIRA, W.D., DURÁN, N., ANDRADE, G., KOBAYASHI, R.K., NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Ann. Clin. Microbiol Antimicrob.** 2013; 17:12:12.
- CAI, Y., LIM, T.P., TEO, J., SASIKALA, S., LEE, W., HONG, Y., CHAN, E.C., TAN, T.Y., TAN, T.T., KOH, T.H., HSU, L.Y., KWA, A.L. In vitro Activity of Polymyxin B in Combination with Various Antibiotics against Extensively-Drug Resistant *Enterobacter cloacae* with Decreased Susceptibility to Polymyxin B. **Antimicrob Agents Chemother.** 2016;20.
- CAI, Y., CHAI, D., WANG, R., LIANG, B., BAI, N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **J Antimicrob Chemother.** 2012;67(7):1607-15.
- CHEAH, S.E., LI, J., TSUJI, B.T., FORREST, A., BULITTA, J.B., NATION, R.L. Colistin and Polymyxin B Dosage Regimens against *Acinetobacter baumannii*: Differences in Activity and the Emergence of Resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** 2016;60(7):3921-33.
- CHIN, N.X., WEITZMAN, I., DELLA-LATTA, P. In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with flucanazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother.** 1997;41(4):850-2.

CHUNG, J.H., BHAT, A., KIM, C.J., YONG, D., RYU, C.M. Combination therapy with polymyxin B and netropsin against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Sci Rep**. 2016;6:28168

Dias, V.C., Diniz, C.G., Peter, A.C., Bastos, A.N., Bastos, V.Q., Bastos, L.Q., Da Silva, V.L. EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AMONG CARBAPENEM-RESISTANT NON-FERMENTING BACTERIA IN BRAZIL. **J Infect Dev Ctries**. 2016;10(6):544-53.

DURANTE-MANGONI, E., SIGNORIELLO, G., ANDINI, R., MATTEI, A., DE CRISTOFORO, M., MURINO, P., BASSETTI, M., MALACARNE, P., PETROSILLO, N., GALDIERI, N., MOCVERO, P., CORCIONE, A., VISCOLI, C., ZARRILLI, R., GALLO, C., UTILI, R. Colistin and rifampicin compared with colistin alone for the treatment of serious infections due to extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a multicenter, randomized clinical trial. **Clin Infect Dis**. 2013;57(3):349-58.

FALAGAS, M.E., RAFAILIDIS, P.I., MATTHAIU, D.K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resist Updat**. 2010;13(4-5):132-8.

FREIRE, M.P., VAN DER HEIJDEN, I.M., DO PRADO, G.V., CAVALCANTE, L.S., BOSZCZOWSKI, I., BONAZZI, P.R., ROSSI, F., GUIMARÃES, T., D'ALBUQUERQUE, L.A., COSTA, S.F., ABDALA, E. Polymyxin use as a risk factor for colonization or infection with polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* after liver transplantation. **Transpl Infect Dis**. 2014 Jun;16(3):369-78.

GNIADAK, T.J., CARROLL, K.C., SIMNER, P.J. Carbapenem-Resistant Non-Glucose-Fermenting Gram-Negative Bacilli: the Missing Piece to the Puzzle. **J Clin Microbiol**. 2016;54(7):1700-10.

GROSSO, F., QUINTEIRA, S., PEIXE, L. Emergence of an extreme-drug-resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii* carrying bla_{OXA-23} in a patient with acute necrohaemorrhagic pancreatitis. **J Hosp Infect**. 2010; 1:82-3.

KERBAUY, G., VIVAN, A.C., SIMÕES, G.C., SIMIONATO, A.S., PELISSON, M., VESPERO, E.C., COSTA, S.F., ANDRADE, C.G., BARBIERI, D.M., MELLO, J.C., MOREY, A.T., YAMAUCHI, L.M., YAMADA OGATTA, S.F., de OLIVEIRA, A.G., ANDRADE, G. Effect of a Metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. **Curr Pharm Biotechnol**. 2016;17(4):389-97

KIM, U.J., KIM, H.K., AN, J.H., CHO, S.K., PARK, K.H., JANG, H.C. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. **Chonnam Med J**. 2014;50(2):37-44.

KNEZEVIC, P., ALEKSIC, V., SIMIN, N., SVIRCEV, E., PETROVIC, A., MIMICA-DUKIC, N. Activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Ethnopharmacol**. 2016;178:125-36.

KVITKO, C.H., RIGATTO, M.H., MORO, A.L., ZAVASCKI, A.P. Polymyxin B versus other antimicrobials for the treatment of pseudomonas aeruginosa bacteraemia. **J Antimicrob Chemother.** 2011;1:175-9.

LI, J., RAYNER, C.R., NATION, R.L., OWEN, R.J., SPELMAN, D., TAN, K.E., LIOLIOS, L. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2006;50(9):2946-50.

MAHAMAT, A., BERTRAND, X., MOREAU, B., HOMMEL, D., COUPPIE, P., SIMONNET, C., KALLEL, H., DEMAR, M., DJOSSOU F., NACHER, M. Clinical epidemiology and resistance mechanisms of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, French Guiana, 2008-2014. **Int J Antimicrob Agents.** 2016;48(1):51-5.

MATHLOUTHI, N., AL-BAYSSARI, C., BAKOUR, S., ROLAIN, J.M., CHOUCANI, C. Prevalence and emergence of carbapenemases-producing Gram-negative bacteria in Mediterranean basin. **Crit Rev Microbiol.** 2016; 7:1-19.

MOGHADAM, M.N., MOTAMEDIFAR, M., SARVARI, J., SEDIGH, E.S., MOUSAVI, S.M., MOGHADAM, F.N. Emergence of Multidrug Resistance and Metallo-beta-lactamase Producing *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients in Shiraz, Iran. **Ann Med Health Sci Res.** 2016;6(3):162-7.

NATION, R.L., LI, J., CARS, O., COUET, W., DUDLEY, M.N., KAYE, K.S., MOUTON, J.W., PATERSON, D.L., TAM, V.H., THEURETZBACHER, U., TSUJI, B.T., TURNIDGE, J.D. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. **Lancet Infect Dis.** 2015;15(2):225-34.

NI, W., SHAO, X., DI, X., CUI, J., WANG, R., LIU, Y. In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. **Int J Antimicrob Agents.** 2015;45(1):8-18.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J Antimicrob Chemother.** 2003;52(1):1.

PAUL, M., BISHARA, J., LEVCOVICH, A., CHOWERS, M., GOLDBERG, E., SINGER, P., LEV, S., LEON, P., RASKIN, M., YAHAV, D., LEIBOVICI, L. Effectiveness and safety of colistin: prospective comparative cohort study. **J Antimicrob Chemother.** 2010;65(5):1019-27.

QURESHI, Z.A., HITTLE, L.E., O'HARA, J.A., RIVERA, J.I., SYED, A., SHIELDS, R.K., PASCULLE, A.W., ERNST, R.K., DOI, Y. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. **Clin Infect Dis.** 2015;60(9):1295-303.

RAO, G.G., LY, N.S., DIEP, J., FORREST, A., BULITTA, J.B., HOLDEN, P.N., NATION, R.L., LI, J., TSUJI, B.T. Combinatorial pharmacodynamics of polymyxin B and tigecycline against heteroresistant *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents.** 2016;16:30161-3.

SKIADA, A., MARKOGIANNAKIS, A., PLACHOURAS, D., DAIKOS, G.L. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicrob Agents**. 2011;37(3):187-93.

TSUJI, B.T., LANDERSDORFER, C.B., LENHARD, J.R., CHEAH, S.E., THAMLIKITKUL, V., RAO, G.G., HOLDEN, P.N., FORREST, A., BULITTA, J.B., NATION, R.L., LI, J. Paradoxical Effect of Polymyxin B: High Drug Exposure Amplifies Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2016;60(7):3913-20

ZHANG, Y., LORIA, R., DING, Y. Applications of natural products from soil microbes. *Soil Ecosystems Services*. 2015.

CONCLUSÃO

- A cepa LV de *P. aeruginosa* produtora de um composto com atividade antimicrobiana quando cultivada na presença do íon cobre apresenta um transcriptoma distinto do cultivo na ausência do cobre;
- As análises da expressão gênica diferencial mostraram que possivelmente o excesso de cobre no meio intracelular leva o microrganismo a eliminá-lo por duas vias distintas: hiperexpressão de sistemas de efluxo e desvio da rota biossintética das fenazinas (possível remediação);
- O composto organometálico possui atividade contra *A. baumannii*;
- Quando combinado com o antimicrobiano comercial polimixina B o composto bioativo possui ação sinérgica;
- A ação sinérgica da combinação POLB vs CAO diminui a CIM de dois isolados de *A. baumannii* R a POLB (tornando-os S), não apresentando na curva de viabilidade subpopulações heterorresistentes;
- A combinação dos compostos pode vir a ser uma alternativa ao uso limitado da polimixina B no tratamento das infecções por *A. baumannii*