UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Natália Rocha Guimarães

IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR *Acinetobacter baumannii* ATIVA CONTRA AMOSTRAS MULTIDROGA RESISTENTES DA BACTÉRIA

Belo Horizonte
2020

Natália Rocha Guimarães

IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR *Acinetobacter baumannii* ATIVA CONTRA AMOSTRAS MULTIDROGA RESISTENTES DA BACTÉRIA

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Coorientador: Luiz de Macêdo Farias

Belo Horizonte

2020

043 Guimarães, Natália Rocha.
Identificação de substância antimicrobiana produzida por *Acinetobacter baumannii* ativa contra amostras multidroga resistentes da bactéria [manuscrito] / Natália Rocha Guimarães. – 2020.
108 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães. Coorientador: Luiz de Macêdo Farias.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. *Acinetobacter baumannii*. 3. Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos. 4. Resistência Microbiana a Medicamentos. 5. Clonagem. I. Magalhães, Paula Prazeres. II Farias, Luiz de Macêdo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis. CRB 6 2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE NATÁLIA ROCHA GUIMARÃES
Nº REGISTRO: 2016658341

Às 8:30 horas do dia 31 de janeiro de 2020 reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Glória Regina Franco, Silvia Helena Sousa Pietra Pedroso, Daniel Moreira dos Santos, Jacques Robert Nicoli e a Profa. Paula Prazeres Magalhães – Orientadora, para julgar o trabalho final "Identificação de substância antimicrobiana produzida por *Acinetobacter baumannii* ativa contra amostras multidroga resistentes da bactéria", da aluna Natália Rocha Guimarães, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Betânia Paiva Drumond - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2020. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Profa. Dra. Glória Regina Franco _____

Dra. Silvia Helena Sousa Pietra Pedroso _____

Dr. Daniel Moreira dos Santos _____

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli _____

Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães (Orientadora) _____

P/ _____

Profa. Betânia Paiva Drumond
Sub-coordenadora

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida, pela ajuda incondicional, estando ao meu lado em todos os momentos, permitindo que prosseguisse e alcançasse mais este sonho.

Aos meus familiares, meu pai, Jorge, minha mãe, Jussara e meu irmão, Marcos, pelo incentivo e apoio. Obrigada por sempre acreditarem em mim, pela euforia e felicidade nos momentos de sucesso e pela acolhida nos momentos de desânimo e incerteza. Não conseguiria sem vocês por perto! A minha amada sobrinha Valentina, que trouxe luz e alegria para nossa família.

Ao André, pelos doze anos de convivência harmoniosa, pelo carinho, companheirismo e paciência. Seu incentivo e ajuda durante esses anos foram essenciais. Obrigada por aceitar e respeitar minha ausência.

À minha querida “mãe científica”, Professora Paula Prazeres Magalhães, por todo carinho, apoio e orientação, dedicando parte do seu tempo em prol das minhas dúvidas e dificuldades. Obrigada pela confiança, por todos os ensinamentos, pelas conversas descontraídas. Minha admiração será eterna, você é um exemplo, como pessoa e profissional. Obrigada por se comportar como uma verdadeira MÃE.

Ao meu querido “pai científico”, Professor Luiz de Macêdo Farias, serei eternamente grata por me conceder a oportunidade de fazer parte deste grupo tão renomado de pesquisa. Agradeço toda a assistência e carinho. Levarei muito de você comigo. Obrigada por compartilhar da minha ansiedade durante a execução dos experimentos e sempre acreditar que alcançaria bons resultados. O cuidado, dedicação e entusiasmo com que cuida do laboratório é admirável. Serei uma profissional de sucesso se conseguir levar comigo um pouquinho do seu jeito organizado, dedicado e incentivador de boas ideias. Seu espírito paternal é encantador.

À Professora Simone, pelo carinho, gentileza e pelas oportunidades. Obrigada por ceder as amostras para realização do estudo. Sem sua contribuição, não conseguiria alcançar resultados tão importantes.

À família MOA (ausentes e presentes), pela harmônica e animada convivência, sendo importantes “válvulas de escape” nos momentos de cansaço e desânimo. Não me atreverei a nomeá-los, todos que passaram ou ainda se encontram por aqui sabem da importância em minha vida.

Às minhas filhotas do coração, Letícia e Maria Gabriela, imprescindíveis para execução dos experimentos. Sem a ajuda delas seria difícil prosseguir e concluir essa etapa. Obrigada pela amizade, conversas animadas, dedicação e disponibilidade em todos os momentos de necessidade.

Ao Jamil, pela disponibilidade, pelos ensinamentos bioquímicos e pela contribuição direta nos processos de purificação. O que seriam dos estudantes do ICB sem o Jamil?

Aos professores Glória Regina Franco e Carlos Augusto Rosa pela contribuição com os insumos para o sequenciamento do plasmídeo, e aos Drs. Thiago Mafra Batista e Rennan Garcias Moreira, pela montagem da biblioteca e análises de bioinformática, respetivamente, essenciais para o desenvolvimento desse estudo. Ao professor Ronaldo Nagen e ao João Luís Reis Cunha por terem cedido gentilmente as amostras bacterianas e os vetores para clonagem. Ao Dr. Rodrigo Araújo pelas análises filogenéticas e a Dra. Danielle Daian pela por me auxiliar no manuseio dos experimentos de *western blotting*.

Aos queridos membros da banca, Dr. Daniel Moreira dos Santos e Professora Glória Regina Franco agradeço as excelentes contribuições no exame de qualificação e por terem aceitado novamente o nosso convite. As considerações serão de grande importância para o fechamento de mais uma etapa. Dra. Silvia Helena Sousa Pietra Pedroso e o Professor Jacques Robert Nicoli, agradeço o aceite e a disponibilidade. Tenho certeza de que a expertise de vocês na área de microbiologia contribuirá muito para o trabalho. Ao Dr. João Fernando Gonçalves Ferreira e a Dra. Márcia Almeida Lana, suplentes da banca examinadora, pelo aceite e disponibilidade.

As minhas “bonitinhas”, Thaysa e Silvinha, agradeço a amizade, as agradáveis conversas e o companheirismo. Vocês foram essenciais nessa caminhada. Em especial, à Thaysa, obrigada pela constante ajuda. Sem você, seria difícil realizar todos os experimentos. Seus ensinamentos e opiniões foram muito importantes.

Às minhas grandes companheiras de república, “irmãs do coração”, à Aninha e à Marli, obrigada pelo companheirismo e amizade. À Anna, em especial, por ajudar-me nos momentos de dificuldade, contribuindo diretamente com conhecimentos e técnicas, pelas conversas descontraídas e divertidas.

Ao Professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes, por toda ajuda intelectual, pela acolhida e por conceder-me a oportunidade de participar de projetos tão interessantes e entusiasmantes. E aos queridos amigos de Viçosa, agradeço a recepção, os ensinamentos, a ajuda e a ótima convivência. Passei com vocês dias incríveis, de trabalho duro, mas, repletos de momentos felizes e descontraídos.

Ao Laboratório Institucional de Pesquisa (LIPq), Centro de Laboratórios Multiusuários (CELAM), Laboratório Multiusuários de Proteômica (LMProt) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Aos meus queridos amigos, Camilinha, Gugu, Renato, Thaís e Thaísa, pelo incentivo e amizade. Vocês são essenciais em minha vida e sabem disso. Ao Renato e à Thaísa, em especial, pelas diversas caronas, confiança e experiências compartilhadas.

À UFMG e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, em especial, aos mestres e aos funcionários do Departamento.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro.

Um Novo Começo

"Depois da noite
Vem um novo dia
Depois da tempestade
Vem a calmaria

Depois de toda a história que acabou
Se foi escrita aos pés da cruz
Foi só um ciclo a mais que se fechou
E uma nova porta vai se abrir, vai se abrir

Em Deus sempre haverá
Um novo começo
A glória da segunda casa
Será maior do que a primeira..."

(Canção de Ludmila Ferber)

RESUMO

A resistência bacteriana é um desafio global. A busca por novos antimicrobianos, principalmente naturais, vem ganhando destaque, devido à emergência de bactérias resistentes a antimicrobianos clássicos. *A. baumannii* é uma bactéria de grande relevância clínica, marcadamente multirresistente e, assim, de difícil controle. O objetivo deste estudo foi identificar uma substância antimicrobiana expressa por uma amostra de *A. baumannii*, em continuação a um estudo prévio que detectou sua atividade contra amostras multidroga resistentes (MDR) da bactéria. Na primeira etapa, foi realizada extração plasmidial, expressão heteróloga em sistema *E. coli* transformado com o plasmídio selvagem isolado de *A. baumannii,* além da avaliação da expressão de antagonismo pelos métodos de sobrecamada e precipitação ácida, para verificar a localização do gene que codifica a substância. O plasmídio foi sequenciado em plataforma Illumina MiSeq e a similaridade das ORFs foi analisada em algoritmo Blast. Na segunda etapa do projeto, foi realizada a clonagem das ORFs em vetores TOPO e pET28aTEV, com o intuito de identificar o gene que codifica a substância. A expressão e a purificação das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE corado por *Coomassie Brilliant Blue* e *western blotting* e a atividade antimicrobiana pelo método de sobrecamada. A substância antimicrobiana ativa foi expressa pelo sistema *E. coli* BL21 transformado, confirmando a presença do gene de interesse no plasmídio selvagem. A montagem do DNA plasmidial gerou um *contig* de 11,060 pb, com doze ORFs. A análise por similaridade permitiu classificar o pequeno plasmídio na família Rep-3, de acordo com a proteína de replicação RepB. Dentre as doze ORFs anotadas, cinco foram sugestivas da substância. Baseando-se em dados obtidos ao longo do desenvolvimento de todo o projeto sugere-se que a proteína hipotética 3 apresenta ação antibacteriana contra amostras MDR de *A. baumannii*.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii.* Peptídio antimicrobiano. Resistência antimicrobiana. Sequenciamento. Clonagem.

ABSTRACT

Bacterial resistance is a global challenge. The search for new antimicrobials, mainly natural substances, has been gaining prominence due to the emergence of bacterial resistance to classic antimicrobial drugs. *A. baumannii* is a bacterium of great clinical relevance that expresses remarkable multidrug resistance and consequently is hard to control. The aim of this study was to identify an antimicrobial substance expressed by *A. baumannii* described during a previous study that demonstrated activity against multidrug resistant strains of the bacterium. In the first stage of this project, plasmid extraction was conducted to determine the location of the gene that codes for the substance. To confirm the results, heterologous expression in *E. coli* transformed with a wild plasmid was performed and evaluation of antagonistic activity by the double-layer diffusion and acid precipitation methods was done. The plasmid was sequenced (Illumina MiSeq) and similarity analysis using the BlastP was performed. In the second stage of the project the cloning of the ORFs was performed on TOPO and pET28aTEV vectors, with the aim to identify the gene that codes for the antimicrobial substance. The expression and purification of the recombinant proteins were evaluated by comassie stained SDS-PAGE and western blotting and evaluated by the double-layer diffusion method. The expression of the active protein was observed in a transformed *E. coli* BL21 system, confirming the presence of the gene of interest in the wild plasmid. The assembly of plasmid DNA generated a contig of 11,060 bp, with twelve ORFs. Similarity analysis allowed the small plasmid to be classified in the Rep-3 family, according to a RepB replication protein. Of the twelve ORFs annoted, five were suggestive of the substance. Based on data obtained throughout the development of the study, it is suggested that the hypothetical protein 3 is responsible for the antibacterial action observed against *A. baumannii* MDR strains.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial peptides. Antimicrobial resistance. Sequencing. Cloning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Sequências dos *primers* e condições da PCR para análise da montagem do plasmídio selvagem e clonagem 48

Figura 1 - Alteração da atividade antimicrobiana de *Acinetobacter baumannii* 397 pelo longo período de armazenamento da cultura em baixa temperatura (4 °C) 61

Figura 2 - Extração plasmidial e transformação em sistema *E. coli* BL21 quimiocompetente 63

Figura 3 - Atividade antimicrobiana dos clones C1 e C2 em diferentes meios de cultura 64

Figura 4 - Titulação dos extratos brutos obtidos a partir do cultivo dos clones C1 e C2 em TSB e LB caldo, com e sem cloranfenicol 65

Figura 5 - Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 32 a 42, representadas pelas corridas: 1 (LB) e 2 (LB + CLO) obtidas por cromatografia de fase reversa, coluna LC-8 Supelcosil™ 67

Figura 6 - Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 32 a 45, aqui representadas pelas corridas: 3 (TSB) e 4 (TSB + CLO), obtidas por cromatografia de fase reversa, coluna LC-8 Supelcosil™ 68

Figura 7 - Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 37, *pools* 1 (LB) e 2 (LB + CLO), obtidas por “recromatografia” de fase reversa, em coluna C-18 Sephasil™ Peptide 69

Figura 8 - Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 36 a 39, *pool* 3 (TSB) e 36 a 38, *pool* 4 (TSB+CLO) obtidas por “recromatografia”, em coluna C-18 Sephasil™ Peptide 70

Figura 9 - Espectro de massas em matriz super DHB das frações 37 (*pool* 2) e 38 (*pool* 3) 72

Figura 10 - Representação esquemática do plasmídio selvagem, linear e circular 75

Figura 11 - Perfil de suscetibilidade das amostras de *E. coli* BL21 transformada (C1) e não transformada e de *A. baumannii* 397 a antimicrobianos 76

Figura 12 - Confirmação da montagem do plasmídio selvagem por PCR e digestão com enzimas de restrição 81
Figura 13 - Etapas da clonagem dos genes *sep, hp1, hp2* e *hp3* em vetores do tipo TOPO e pET28aTEV 85
Figura 14 - Etapas da clonagem dos genes *brnT, brnA* e sistema *brnT-brnA* em vetores do tipo TOPO e pET28aTEV 86
Figura 15 - Análise da sequência da região T7 do vetor recombinante (pET28aTEV^{brnT}) 87
Figura 16 - Perfil eletroforético das proteínas recombinantes em gel de poliacrilamida corado pelo *comassie blue* 89
Figura 17 - Perfil eletroforético das proteínas recombinantes em gel de policrilamida revelado pela técnica de *Western blotting* 90
Figura 18 - Atividade antimicrobiana da amostra *E. coli* BL21 albergando o pET28aTEV^{hp3} 91
Figura 19 - Purificação da proteína HP3 por cromatografia de afinidade a níquel 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primeira sequência de purificação em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™: frações ativas e *pools* correspondentes 66

Tabela 2 - Segunda sequência de purificação: frações ativas originadas da "recromatografia" em coluna de fase reversa LC-18 Sephasil™ Peptide 69

Tabela 3 - Caracterização parcial do plasmídio selvagem: localização, tamanho e predição funcional das ORFs 77

Tabela 4 - Amostras de *E. coli* DH5α transformadas com vetores TOPO recombinantes 83

Tabela 5 - Amostras de *E. coli* DE3 transformadas com vetores pET28aTEV recombinantes 84

Tabela 6 - Massas moleculares das proteínas nativas e recombinantes 89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Acb	Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*
ACM	Acetonitrila
AMP	Peptídios antimicrobianos
BAGEL	*BActeriocin GEnome mining tooL*
BAL	Bactéria do ácido láctico
BHIA-S	Agar Infusão cérebro coração *s*uplementado com 0,5 % de extrato de levedura
Bla	Betalactamase
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial
Da	Dalton
DAB	Tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina
DHB	Matriz de ácido 2,5-di-hidroxibenzoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EGM	Elementos genéticos móveis
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado à enzima
ESKAPE	*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp.)
EUA	*Estados Unidos da América*
GN	Bactérias Gram negativas
HCl	Ácido clorídrico
HP	Proteína hipotética
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IMP	Imipenemase

int1	Integrase classe 1
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactosidase
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IS	Sequências de inserção
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
KPC	*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LB	*Luria Bertani*
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF	*Matrix assisted laser desorption ionization time of flight*
MDR	Multidroga resistente
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
MHA	Ágar Mueller Hinton
NaCl	Cloreto de sódio
NDM	Nova Delhi Metallo beta lactamase
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
OD	*Densidade óptica*
ORF	Janela aberta de leitura
OXA	Oxacilinase
PB	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação de polimerização em cadeia
pCol	Plasmídios colicinogênicos
Rep	Proteína de repicação
RNM	Ressonância nuclear magnética
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TA	Sistema toxina-antitoxina
TBE	Tris/Borato/EDTA

TEV	vírus *etch tabacco*
TFA	Ácido trifluoroacético
Tris	Hidroximetilaminometano
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSB	Caldo Triptona de Soja
UTI	Unidade de terapia intensiva
VIM	Verona Imipenemase
WHO	Organização Mundial da Saúde
X-gal	5-bromo-4chloro-3-indolyl-beta-D-Galactopiranosideo

Abreviações dos resíduos de aminoácidos

A	Alanina (Ala)
C	Cisteína (Cys)
D	Aspartato (Asp)
E	Glutamato (Glu)
F	Fenilalanima (Phe)
G	Glicina (Gly)
H	Histidina (His)
I	Isoleucina (Ile)
K	Lisina (Lys)
L	Leucina (Leu)
M	Metionina (Met)
N	Asparagina (Asn)
P	Prolina (Pro)
Q	Glutamina (Glu)
R	Arginina (Arg)
S	Serina (Ser)
T	Treonina (Thr)
V	Valina (Val)
W	Triptofano (Trp)
Y	Tirosina (Tyr)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

1.1 Espécie *Acinetobacter baumannii* 19

1.1.1 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS GERAIS 19

1.1.2 IMPORTÂNCIA CLÍNICA 20

1.1.3 PLASMÍDIOS DE *A. baumannii* E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL 24

1.2 Peptídios Antimicrobianos (AMPs) 27

1.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS 27

1.2.2 BACTERIOCINAS 28

1.2.3 DIFICULDADES E DESAFIOS INERENTES AOS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AMPS 30

1.2.3.1 Aspectos gerais 30

1.2.3.2 Novas abordagens: Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e clonagem 31

2 JUSTIFICATIVA 36

3 OBJETIVOS 37

3.1 Objetivo Geral 37

3.2 Objetivos Específicos 37

4 MATERIAL E MÉTODOS 38

4.1 Amostras Bacterianas 38

4.1.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS 39

4.2 Localização do Gene 39

4.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL (MINIPREP CASEIRA) 39

4.2.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA 40

4.2.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA 42

4.2.3.1 Pesquisa de atividade antimicrobiana – Técnica de sobrecamada 42

4.2.3.2 Extração Proteica – Técnica de Precipitação ácida 43

4.2.4 PURIFICAÇÃO PARCIAL 44

4.2.4.1 Cromatografia em Colunas de Fase Reversa 44

4.2.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS 44
4.3 Sequenciamento do DNA plasmidial 45
4.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA 45
4.3.2 CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO 46
4.3.3 MONTAGEM E ANOTAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL 46
4.3.4 ANÁLISE DA MONTAGEM 46
4.3.4.1 Construção dos oligonucleotídeos e amplificação dos genes por PCR 47
4.4 Clonagem e Expressão Gênica 49
4.4.1 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE 50
4.4.2 CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR EM SISTEMA TOPO E TRANSFORMAÇÃO 50
4.4.2.1 Análise dos Transformantes – Triagem por PCR de colônia 50
4.4.2.2 Extração dos vetores recombinantes 51
4.4.2.3 Digestão enzimática e purificação dos vetores recombinantes 52
4.4.3 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO – SISTEMA PET28A-TEV 52
4.4.4 TRANSFORMAÇÃO EM *E. COLI* BL21(DE3) 53
4.4.4.1 Sequenciamento dos genes clonados 54
4.4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES 54
4.4.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS 55
4.4.5.2 *Western blotting* 56
4.4.5.3 Purificação das Proteínas Recombinantes 56
4.5 Análises estatísticas 57

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO 58
5.1 Localização do gene 61
5.1.1 EXTRAÇÃO PLASMIDIAL, TRANSFORMAÇÃO E EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM SISTEMA *E. COLI* BL21 61
5.1.2 PURIFICAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSAS 66
5.2 Sequenciamento 73
5.2.1 MONTAGEM *DE NOVO* 73
5.2.2 ANOTAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL 73
5.2.3 CONFIRMAÇÃO DA MONTAGEM DO DNA PLASMIDIAL 80
5.3 Clonagem e Expressão Gênica 81

5.3.1 CLONAGEM DOS GENES EM VETORES DO TIPO TOPO E PET28ATEV 82
5.3.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES 88
5.3.2.1 Teste de atividade antimicrobiana dos clones recombinantes 91
5.3.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HIPOTÉTICA 3 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE 92
5.3.3.1 Teste de atividade das proteínas purificadas 93

6 CONCLUSÕES 94

REFERÊNCIAS 95

APÊNDICES 103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécie *Acinetobacter baumannii*

1.1.1 Taxonomia e Características Gerais

O gênero *Acinetobacter* está, atualmente, inserido no domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Pseudomonadales, família Moraxellaceae (EUZÉBY, 2019a; ROSSAU *et al*., 1991). Os representantes do gênero são cocobacilos Gram negativos, não fastidiosos, imóveis, catalase positivos e oxidase negativos. São aeróbios e incapazes de fermentar carboidratos para obtenção de energia (LEE *et al*., 2017). Utilizam diversos compostos orgânicos como fonte de carbono. O teste de oxidase permite a identificação presuntiva do gênero *Acinetobacter*, contribuindo para a diferenciação entre o grupo e outros microrganismos não fermentadores (JOSHI; LITAKE, 2013).

Nos últimos anos, a taxonomia do gênero *Acinetobacter* foi amplamente modificada, sofrendo sucessivas alterações. Atualmente, o gênero abriga 63 espécies, com conteúdo C+G de 38 a 47% (EUZÉBY, 2019b; JUNI, 2015).

Morfologicamente, apresentam-se como bastonetes curtos e espessos, com diâmetro de 0,9 a 1,6 µm e comprimento de 1,5 a 2,5 µm em fase exponencial de crescimento, tornando-se cocobacilares durante a fase estacionária (JUNI, 2015). Multiplicam-se em meios comumente empregados na rotina laboratorial, como *Tryptic Soy Agar* (TSA) e Ágar Sangue, possuindo requerimentos nutricionais simples (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008) e toleram diferentes valores de pH (LEE; KIM; RHEE, 2010). A temperatura ótima de cultivo é de cerca de 30-35 ºC, mas podem se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura, de 20 a 44 ºC (VEGAS; NIEVES, 2005). Macroscopicamente, formam colônias lisas, branco-acinzentadas ou amarelo-pálidas, mucoides, com diâmetro de 1,5 a 3,0 mm após 24 h de incubação a 37 ºC. Algumas espécies, como *A. haemolyticus*, são hemolíticas (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996).

As espécies que compõem o gênero são ubíquas, estando amplamente distribuídas em ambientes naturais, como solo e água, sendo frequentemente encontradas

colonizando a pele de seres humanos (PELEG; SEIFERT. PATERSON, 2008). Algumas espécies são reconhecidas como importantes organismos patogênicos nosocomiais e estão associadas à resistência a diversas drogas antimicrobianas (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017). São encontradas contaminando a superfície de objetos inanimados e colonizando a pele de indivíduos saudáveis (CHAPARTEGUI-GONZÁLEZ *et al*., 2018), já tendo sido isoladas do trato respiratório e de feridas de pacientes hospitalizados sem sintomatologia (CDC, 2019a).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero, destaca-se *A. baumannii*, que vem sendo frequentemente recuperada de espécimes clínicos, envolvida na colonização e infecção de diversos pacientes admitidos em instituições de assistência à saúde (LEE *et al*., 2017). Cerca de 80 % de todas as infecções nosocomiais associadas a *Acinetobacter* relacionam-se a *A. baumannii*. Entretanto, as demais espécies pertencentes ao Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (*Acb*) (geneticamente distintas, mas fenotipicamente semelhantes, sendo difíceis de serem distinguidas umas das outras por testes fenotípicos convencionais), *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. seifertii e A. dijkshoornia*, mas não *A. calcoaceticus*, vêm sendo recuperadas de amostras clínicas (VIJAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019).

1.1.2 Importância Clínica

Embora seu potencial patogênico tenha sido considerado baixo (ABBOTT *et al*., 2013), atualmente, *A. baumannii* vem sendo reportado como uma das bactérias de maior importância associada às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (WHO, 2017; CDC 2019b). Juntamente com cinco outros patógenos, compõe o grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), constituído por bactérias marcadamente resistentes a várias classes de antimicrobianos, associadas ao desenvolvimento de infecções de difícil tratamento, adquiridas em centros de cuidado a saúde em todo mundo (RICE, 2008; MULANI *et al*., 2019).

Em 2013, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) publicou um relatório categorizando os principais patógenos resistentes a antimicrobianos que ameaçavam a saúde humana nos Estados Unidos (EUA). *Acinetobacter* spp. multidroga resistente (MDR) foi classificado como uma “ameaça grave”, tendo sido proposto monitoramento contínuo e atividades de prevenção (CDC, 2013). Um novo relatório foi divulgado em 2019 e *Acinetobacter* spp resistente aos carbapenêmicos ascendeu de categoria, liderando o grupo de “ameaça urgente” (CDC, 2019b).

Baseado no relatório do CDC de 2013, a *World Heath Organization* (WHO) publicou o documento *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics*, cujo escopo foi identificar as bactérias resistentes a antimicrobianos mais importantes no nível global para as quais há necessidade urgente de desenvolvimento de novas formas de tratamento. *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos lidera o grupo de patógenos com prioridade crítica para síntese de novos antimicrobianos (WHO, 2017).

Em grande parte do mundo, o número de infecções causadas por *A. baumannii* em unidades de assistência à saúde é inferior se comparado com outros patógenos, porém, 45% das amostras recuperadas são MDR. Na América Latina e no Oriente Médio, por exemplo, essa taxa chega a 70% (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017). Nos EUA, em 2017, *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos foi responsável por 8.500 infecções em pacientes hospitalizados, com aproximadamente 700 óbitos notificados (CDC, 2019b).

Diversos estudos demonstram que *A. baumannii* é a espécie do gênero mais comumente envolvida em bacteremias, infecções do trato urinário associadas a cateteres e meningites secundárias. Entretanto, sua maior predominância é como agente de pneumonia, particularmente associada à ventilação mecânica, em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (GARCIA-PATINÕ; GARCIA-CONTRERAS; LICONA-LIMÓN, 2017).

Os fatores de risco envolvidos na aquisição de infecção por *A. baumannii* em ambientes hospitalares são internação por longos períodos, doenças de base com comprometimento do sistema imunológico, procedimentos invasivos e exposição a antimicrobianos de amplo espectro. Estudos têm demonstrado que pacientes

hospitalizados infectados por *A. baumannii* apresentam em torno de 30% de chance de irem a óbito (TIWARI; ROY; TIWARI, 2015).

Um estudo realizado por Martins e colaboradores (2014) avaliou a diversidade genética de 64 amostras de *A. baumannii* oriundas de hemoculturas de diferentes hospitais do Brasil. Os autores sugeriram que grupos clonais específicos estão circulando dentro dos hospitais estudados, demonstrando que a prevalência e os tipos de clones MDR podem variar entre hospitais, ressaltando a importância das medidas de controle adequadas.

Apresenta metabolismo altamente versátil, podendo sobreviver em ambientes com condições físicas adversas, como ambientes secos, com variações de temperatura e substratos, fatores que favorecem a transmissão e dispersão do microrganismo, principalmente, em ambiente hospitalar (CHAPARTEGUI-GONZÁLEZ *et al*., 2018).

Diversos fatores de patogenicidade associados à bactéria vêm sendo identificados por análises genotípicas e fenotípicas. Dentre eles, merecem destaque as porinas de membrana externa, as fosfolipases, as proteases, os lipopolissacarídeos (LPS), os polissacárides capsulares, as vesículas de membrana externa e os sistemas de secreção de proteínas e de aquisição de metais (LEE *et al*., 2017).

A capacidade de colonização de superfícies vivas e inanimadas é o fator primordial para formação de biofilmes estáveis, sendo uma das estratégias de patogenicidade deste microrganismo. Estudos demonstram a existência de correlação entre a formação de biofilme e a resistência a múltiplos fármacos antimicrobianos (AMIN *et al*., 2019).

Amostras de *A. baumannii*, em grande parte dos estudos, foram identificadas por PCR do gene cromossômico intrínseco, o *bla*$_{\text{OXA-51}}$, que codifica uma oxacilinase, enzima que confere resistência aos carbapenêmicos (TURTON *et al*., 2006). Entretanto, esse gene foi encontrado em outras espécies pertencente ao Complexo *Acb*, limitando seu uso independente como marcador espécie-específico. Um estudo desenvolvido por VIJAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN (2019) avaliou as metodologias disponíveis atualmente para identificação e distinção das espécies pertencentes ao gênero, principalmente que compõem o complexo, sendo PCR de *bla*$_{\text{OXA-51}}$ associada ao sequenciamento de *rpoB* foi a mais acurada. Dentre os sistemas automatizados, a identificação e diferenciação por espectrometria de

massas (MALDI-TOF) é precisa, desde que vinculada a um banco de dados amplo e diversificado.

Uma característica importante de *A. baumannii* é sua aptidão para causar surtos, provavelmente, relacionada à outra habilidade da bactéria, a de aquisição de resistência a antimicrobianos, somada à resistência ambiental, principalmente à dessecação. A associação entre resistência intrínseca e adquirida a diversos fármacos antimicrobianos e capacidade de tolerar fatores ambientais adversos favorece as infecções e a dispersão de clones resistentes por todo o mundo (ABBOTT *et al*., 2013).

Acredita-se que a aquisição de marcadores de resistência por *A. baumannii* seja remota. Entretanto, nos últimos anos, esta habilidade vem se dispersando rapidamente (FOURNIER; RICHET, 2006), devido à capacidade do organismo de responder aos desafios impostos pelos agentes antimicrobianos (LEE *et al*., 2017). Dentre os principais mecanismos de resistência, destacam-se a expressão de β-lactamases (especialmente as carbapenemases), redução do influxo de antimicrobianos, modificação do sítio alvo e expressão de bombas de efluxo (LEAN *et al*., 2016). Geralmente, os genes responsáveis pela propriedade surgem por mutação ou recombinação, localizando-se, neste caso, em elementos genéticos móveis (EGM), como plasmídios, transpósons e *integrons* (FOURNIER; RICHET, 2006).

As opções terapêuticas contra *A. baumannii* reduziram-se drasticamente nos últimos anos, em decorrência dos diversos mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos expressos pelo microrganismo (GUZEL *et al*., 2014). Atualmente, os carbapenêmicos são os antimicrobianos mais comumente usados na rotina médica, porém, com aumento desordenado de amostras resistentes a esta classe de fármacos, outras opções terapêuticas vêm sendo empregadas. Destacam-se o uso das polimixinas B e E (colistina), minociclina e tigecilina, além das terapias combinadas (uso de dois antimicrobianos ou um antimicrobiano associado a um inibidor de β-lactamase) (LEE *et al*., 2017).

Apesar de ser relatada como a última opção terapêutica para o tratamento de isolados MDR de *A. baumannii*, mecanismos de resistência a polimixina vêm sendo descritos. As primeiras evidências de resistência estavam relacionadas a mutações

cromossômicas, no entanto, em 2015, Liu e colaboradores descreveram o primeiro marcador de resistência de natureza plasmidial, *mcr-1*, carreado por espécies da família Enterobacteriaceae, recuperadas de porcos na China. Atualmente, mais de 56 sequências variantes já foram depositadas para o *mcr*, sendo *mcr-1* predominante entre os isolados (Ma *et al*., 2019).

Além da problemática relativa à resistência, as polimixinas são de uso restrito ao ambiente hospitalar, devido aos seus efeitos nefro e neurotóxicos. Quando utilizadas, os protocolos de tratamento preconizam, habitualmente, a administração destes antibióticos em combinação com outros (ABBOTT *et al*., 2013).

Deve-se destacar que a suscetibilidade de *A. baumannii* a antimicrobianos varia muito entre regiões geográficas, centros médicos e, até mesmo, entre alas hospitalares. Esta diversidade pode ocasionar o uso de diferentes antimicrobianos, assim como, condições epidemiológicas distintas, bem como medidas e políticas de controle aos antimicrobianos diversas (CISNEROS; RODRÍGUEZ-BAÑO, 2002).

1.1.3 Plasmídios de *A. baumannii* e Resistência Antimicrobiana: Caracterização Estrutural e Funcional

A dispersão de resistência antimicrobiana por bactérias Gram negativas tem sido reconhecida como uma ameaça global. O mecanismo mais prevalente de disseminação é a transferência horizontal de genes de resistência localizados em EGM entre espécies. Plasmídios são moléculas de DNA extracromossômico, capazes de se replicar de maneira autônoma, sendo transferidos de forma vertical e horizontal entre os procariotos (SMALLA; JECHALKE; TOP, 2015). Como um EGM, os plasmídios conferem resistência a grande parte das classes de antimicrobianos disponíveis, por aquisição e mobilização de genes de resistência, sequências de inserção (IS) e *transpósons* (CARATTOLI, 2013).

Os plasmídios carreiam genes acessórios, não essenciais para sobrevivência bacteriana, relacionados a processos metabólicos e outras funções adicionais, diferentemente daqueles presentes no DNA cromossômico. Porém, podem albergar um ou mais genes essenciais, associados, por exemplo, à função replicativa. Apresentam arquitetura mais flexível que o DNA cromossômico, tanto pelo conteúdo,

devido à abundância de elementos transponíveis, como pela organização gênica (FONDI *et al*., 2010).

Uma das características marcantes de *A. baumannii* é a capacidade de albergar um repertório ilimitado de EGM (*open pan genome*), como *integrons*, transpósons e plasmídios, constituídos por alguns genes cujas funções ainda não são conhecidas, de impacto clínico considerável. Essa abundância gênica contribui para a evolução do patógeno, a adaptação a diferentes ambientes e o sucesso no estabelecimento das infecções, particularmente devido à aquisição de determinantes de resistência a múltiplos fármacos antimicrobianos e à capacidade de conjugação (LEAN; YEO, 2017).

Quanto ao tamanho, plasmídios carreados por *A. baumannii* podem apresentar de 2 a mais de 100 kb. Os plasmídios grandes (> 50 kb) são mais frequentemente estudados, devido, principalmente, à presença de múltiplos genes associados à resistência a antimicrobianos, capacidade de conjugação e mecanismos sofisticados de controle do número de cópias (HAMIDIAN; AMBROSE; HALL, 2016).

Já os pequenos plasmídios de *A. baumannii* apresentam tamanho em torno de 2 a 10 kb, são pouco estudados se comparados com os grandes plasmídios, pois albergam um número limitado de genes de resistência, quando presentes, e codificam inúmeras proteínas hipotéticas, de função desconhecida. Entretanto, são facilmente conjugados e mobilizam importantes genes relacionados à resistência antimicrobiana e patogenicidade (LEAN; YEO, 2017).

Dois ou mais plasmídios diferentes, quando presentes na mesma célula, têm o controle da replicação realizado de acordo com seu grupo de incompatibilidade (Inc) (THOMAS *et al*., 2017). Plasmídios do mesmo grupo utilizam a mesma maquinaria de replicação, competindo entre si, sendo incapazes de ser replicados juntos na mesma célula (ROSANO; CECCARELLI, 2014). *A. baumannii* alberga um grupo próprio de plasmídios e, a classificação proposta abriga 19 grupos homólogos (GR1 a GR19), com base na similaridade da sequência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína de replicação (Rep). Os grupos GR2, 4, 6, 8, 12, 14 e 16 são os mais comumente encontrados em sequências de *A. baumannii* depositadas, sendo o GR6 o mais prevalente entre as amostras MDR (LEUNGTONGKAM *et al*., 2018).

Os plasmídios possuem sistema próprio de manutenção, como o sistema toxina-antitoxina (TA), relacionado à distribuição de DNA plasmidial nas células filhas após a divisão celular (YANG; WALSH, 2017). Abrigam genes de resistência, patogenicidade e/ou fatores de adesão, que conferem vantagem para o microrganismo, além de genes de mobilidade, relacionados à conjugação. Atualmente, sabe-se que os plasmídios carreados por *A. baumannii* exercem papel fundamental na disseminação de genes que codificam carbapenemases, principalmente, VIM, IMP, NDM (metalo β-lactamases), KPC (serina carbapenemase) e OXAs (oxacilinases) (CARATTOLI, 2013).

Inúmeras sequências completas de plasmídios de *A. baumannii* são depositadas frequentemente no GenBank. Entretanto, poucos estudos desvendam a funcionalidade das proteínas hipotéticas anotadas (HAMIDIAN; AMBROSE; HALL, 2016).

A escassez de dados relacionados à anotação funcional de genes carreados por plasmídios de *A. baumannii* dificulta o isolamento de possíveis substâncias com potencial de aplicação biotecnológica (LEAN; YEO, 2017), como possíveis peptídios antimicrobianos. Dentre os plasmídios que albergam genes que codificam substâncias antimicrobianas promissoras já descritos para outras espécies bacterianas, citam-se os plasmídios colicinogênicos (pCol), amplamente estudados, responsáveis por carrear *clusters* gênicos relacionados com a expressão de colicinas (bacteriocinas isoladas previamente de amostras de *E. coli*). Os pCol são divididos em duas classes, quais sejam: tipo I, representada por pequenos plasmídios, de 6 a 10 kb, que codificam, principalmente, as colicinas do grupo A, amplamente aplicados na área da biotecnologia; e tipo II, que inclui plasmídios grandes, com apenas uma cópia por célula, tamanho de cerca de 40 kb e que, usualmente, codificam colicinas do grupo B, podendo expressar até duas colicinas diferentes (CASCALES *et al*., 2007).

A habilidade para aquisição de resistência a várias classes de antimicrobianos, associada à escassez de antimicrobianos disponíveis para o tratamento de clones MDR e o aumento do número de óbitos relacionados a *A. baumannii* (LEE *et al*., 2017), têm estimulado a busca por novos compostos alternativos aos fármacos

antimicrobianos clássicos, como peptídios antimicrobianos (AMPs), que atuem contra alvos específicos (GUZEL *et al*., 2014).

1.2 PEPTÍDIOS ANTIMICROBIANOS (AMPS)

1.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

A introdução do primeiro antibiótico na prática clínica, em 1940, revolucionou a medicina, permitindo o tratamento e a cura de pacientes acometidos por diversas doenças infecciosas. Entretanto, o surgimento da resistência antimicrobiana vem restringindo o uso dos antibióticos convencionais e, em paralelo, estimulando a a busca por novas substâncias antimicrobianas, principalmente de ocorrência natural (LING *et al*., 2015).

Inúmeros trabalhos têm sido realizados com o objetivo de isolar e purificar substâncias antimicrobianas de diferentes fontes, tais como, plantas (TIWARI; ROY; TIWARI, 2015), animais (anfíbios) (GOTTLER; RAMAMOORTHY, 2009), organismos marinhos (algas, esponjas) (LAPORT *et al*., 2012; MACHADO *et al*., 2010), microrganismos e outros, que atuem contra um amplo grupo de patógenos (bactérias, fungos e vírus). Produtos naturais isolados de microrganismos têm sido uma das principais fontes de antimicrobianos empregados na prática clínica (HOVER *et al*., 2018). Dentre os compostos, destacam-se os peptídios antimicrobianos (AMPs) (BAINDARA *et al*., 2013).

Os AMPs são ubíquos na natureza, sendo produzidos por uma gama ampla de organismos, incluindo anfíbios, insetos e microrganismos (GOH; PHILLIP, 2015). São representados por moléculas constituídas por sequências curtas de aminoácidos, na maioria das vezes, com grupos funcionais carregados positivamente, sendo, muitas vezes, identificados como peptídios catiônicos (BAMDAD *et al*., 2015).

A classificação dos AMPs baseia-se em suas estruturas tridimensionais, definidas, na maioria das vezes, por ressonância nuclear magnética (RNM) ou cristalografia. A análise estrutural permite conhecer melhor a função e o modo de ação destes compostos (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004).

Geralmente, apresentam-se ativos contra um amplo espectro de patógenos, em baixas concentrações, atuando principalmente sobre a bicamada lipídica da membrana plasmática das células bacterianas. Alvos intracelulares também são descritos, alcançados por penetração ou translocação através da membrana. Todavia, apresentam toxicidade considerável para células hospedeiras e, salvo as exceções, são suscetíveis à ação de proteases (GRECO *et al*., 2019).

Atualmente, as atenções têm sido voltadas para a descoberta de novos AMPs, visando, principalmente, o controle de patógenos multirresistentes a antimicrobianos, podendo vir a ser empregados como ferramentas terapêuticas ou modelos para a síntese de novos fármacos (BAINDARA *et al*., 2013; GOH; PHILLIP, 2015). Diversos AMPs isolados de bactérias vem sendo descritos, dentre os quais merecem destaque os lipopeptídios, como as polimixinas B e E, as diversas classes de bacteriocinas, representadas pela nisina A e as microcinas (J25, C7 e B17), dentre outros (AGEITOS *et al*., 2017).

1.2.2 BACTERIOCINAS

Em termos conceituais, bacteriocinas são definidas como um grupo diversificado de peptídios ou proteínas com atividade antimicrobiana, sintetizados em nível ribossomal. Quanto ao espectro de ação, as bacteriocinas normalmente apresentam atividade antibacteriana restrita, limitada a bactérias taxonomicamente relacionadas à amostra produtora (COTTER; HILL; ROSS, 2005; BENMECHERNENE *et al*., 2013). Porém, algumas bacteriocinas apresentam espectro de atividade mais amplo, sendo capazes de agir contra linhagens filogeneticamente distantes (COTTER; ROSS; HILL, 2013).

As bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram negativas são amplamente estudadas. Destacam-se, dentre elas, as colicinas e as piocinas, sintetizadas por *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp., respectivamente. Diferem daquelas produzidas por bactérias Gram positivas em dois parâmetros principais: geralmente, são liberadas após lise da célula produtora e são, na grande maioria das vezes, dependentes de mecanismos de regulação do tipo SOS. São, habitualmente, codificadas por genes plasmidiais, mas, podem possuir determinação cromossômica, juntamente com os genes que codificam as proteínas de imunidade e

de lise, sendo estes, organizados em *clusters* (RILEY; WERTZ, 2002). Apresentam, ainda, espectro de ação restrito, com algumas exceções, como aquelas sintetizadas por *Pseudomonas*, que atuam sobre diferentes gêneros bacterianos (NAKAMURA *et al*., 1981). Podem ser divididas em três classes, sendo a classe I representada pelas colicinas, a classe II, pelas microcinas e a classe III, pelas bacteriocinas semelhantes a cauda de fagos, sendo a última pouco explorada (CHAVAN; RILEY, 2007).

As colicinas foram as primeiras bacteriocinas descritas, servindo como modelo para bacteriocinas sintetizadas por outras bactérias. Apresentam tamanho em torno de 10 a 92 kDa e são codificadas pelos pCol. Até o momento, já foram relatados 25 tipos diferentes de colicinas, todas isoladas de *E. coli* e amplamente caracterizadas. Em 2019, foi descrita a colicina Z, codificada pelo pColZ, previamente isolado de uma amostra de *E. coli* envolvida em um processo infeccioso. A colicina Z apresenta espectro de ação restrito, sendo ativa contra amostras de *E. coli* enteroinvasivas e de *Shigella* (MICENKOVÁ *et al*., 2019).

Já as microcinas apresentam tamanho inferior a 10 kDa, podem ser codificadas por plasmídios ou pelo cromossomo, são resistentes a proteases, valores extremos de pH e temperatura. Diferentemente de outras bacteriocinas de bactérias Gram negativas, a produção das microcinas não é regulada pelo sistema SOS. Até agora, 15 microcinas já foram descritas, entretanto, apenas oito foram elucidadas quanto à estrutura. Em relação aos principais mecanismos de ação, atuam formando poros na membrana da célula bacteriana e inibindo a DNA girase e a aspartil-tRNA sintetase (BAQUERO *et al*., 2019).

Em termos biotecnológicos, na indústria alimentícia, as bacteriocinas podem ser empregadas como conservantes naturais de alimentos, preservando os nutrientes, bem como as características organolépticas, agindo de forma a impedir ou combater a multiplicação de microrganismos patogênicos que ameaçam a saúde e comprometem a qualidade dos alimentos. O emprego das bacteriocinas contribui, ainda, para a redução do uso de conservantes químicos que causam danos à saúde (GALVEZ *et al*., 2007). A primeira bacteriocina purificada e empregada como conservante alimentar foi descrita em 1933, na Nova Zelândia. Nomeada nisina, foi isolada a partir de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Atualmente, a nisina é autorizada

como aditivo alimentar em 50 países, sendo empregada em uma variedade de alimentos. Além da nisina, diversas outras bacteriocinas, principalmente extraídas de bactérias do ácido láctico (BAL), já foram caracterizadas e/ou purificadas (COTTER, 2012).

Acredita-se ainda que as bacteriocinas possam ser empregadas em substituição aos fármacos antimicrobianos clássicos, de amplo espectro. Seu uso apresenta uma vantagem importante, qual seja possuir espectro limitado de ação, ou seja, agem contra microrganismos específicos, reduzindo a probabilidade de seleção de resistência microbiana (RILEY; WERTZ, 2002).

Ainda que a relevância prática das substâncias naturais seja reconhecida, o número de compostos antimicrobianos comercializados ainda é limitado. A principal razão para o fato é o longo período entre a descoberta do composto e a introdução no mercado, que demora de 10 a 17 anos. Esse tempo está diretamente relacionado às dificuldades para produção, estudos pré-clínicos e clínicos, e claro, a aprovação dos órgãos competentes. Apesar disso, com o avanço da resistência antimicrobiana, abordagens envolvendo *screening* de novos compostos, assim como o reaproveitamento de fármacos já empregados na clínica, porém com outras funções, vêm sendo estimuladas (FARHA; BROWN, 2019).

1.2.3 Dificuldades e desafios inerentes aos processos de obtenção e purificação de AMPs

1.2.3.1 Aspectos gerais

A escassez de novos compostos antimicrobianos no mercado não é, necessariamente, ocasionada pela falta de estudos na área, pelo contrário, o *screening* de novos AMPs tem se tornado cada vez mais comum, tanto pelas possibilidades de aplicação prática dos mesmos, como pelos custos relativamente acessíveis dos métodos de busca (BAMDAD *et al*., 2015).

Dentre as dificuldades encontradas durante a busca por novos compostos, destacam-se as etapas iniciais do processo. Para isolamento e purificação de uma substância, necessita-se de, no mínimo, conhecimento básico sobre a molécula e o

desenvolvimento de um protocolo eficiente, rápido e com custo-benefício favorável, requisitos esses, difíceis de serem alcançados em conjunto e essenciais para a aplicação industrial (PINGITORE *et al*., 2007).

Os métodos de extração apresentam-se como um processo inicial de purificação, sendo que, algumas metodologias, como precipitação com solução ácida ou com concentrações crescentes de sulfato de amônio e extração com solventes orgânicos, entre outras, possibilitam extrair substâncias específicas, com base em características físico-químicas, a partir de uma mistura de compostos (BURIANEK; YOUSEF, 2000). As moléculas exibem características únicas, sendo difícil empregar protocolos específicos para substâncias de natureza heterogênea (PINGITORE *et al*., 2007; RODRIGUEZ *et al*., 2010).

Atualmente, as dificuldades do processo de purificação pós-extração têm estimulado o desenvolvimento de novas metodologias para isolamento e identificação destes compostos. Merecem destaque, as plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) associadas às ferramentas de bioinformática, para busca e identificação, no genoma bacteriano, de sequências gênicas relacionadas à expressão de substâncias antimicrobianas (HOVER *et al*., 2018), como as bacteriocinas (JONG *et al*., 2006), metodologias de isolamento de compostos a partir de amostras não cultiváveis (LING *et al*., 2015) e técnica de genética molecular, para clonagem e expressão (JARI *et al*., 2015) ou alteração no *design* das moléculas (GRECO *et al*., 2019).

1.2.3.2 Novas abordagens: Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e clonagem

Desde o sequenciamento do genoma humano, em meados de 2003, o surgimento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA vem aumentando rapidamente. As plataformas de NGS inovaram as tecnologias de sequenciamento já propostas, por permitirem o sequenciamento em paralelo de múltiplos fragmentos de DNA, em um curto período, com custo reduzido, alto rendimento de dados e precisão na obtenção das sequências (LEVY; MYERS, 2016).

Diversas plataformas de NGS estão disponíveis no mercado, distinguindo-se, basicamente, pela metodologia proposta. A primeira plataforma de nova geração comercializada foi o Sequenciador 454 (Roche), em 2005 e, a partir de então, foram surgindo novos sequenciadores, mais rápidos, que permitem o sequenciamento de sequências maiores e a geração de uma grande quantidade de dados. São classificados como de segunda ou terceira geração. Dentre aqueles de segunda geração, merecem destaque o MiSeq e HiSeq, fabricados pela Illumina, amplamente empregados em pesquisas científicas (SLATKO *et al*., 2018).

Os sequenciadores MiSeq e HiSeq têm, como metodologia básica, o sequenciamento por síntese, ou seja, a reação de sequenciamento é realizada por reação de polimerização em cadeia, empregando dNTPs marcados com diferentes fluoróforos. Os nucleotídios são detectados à medida que são incorporados na nova fita de DNA (GRADA; WEINBRECHT, 2013). O surgimento dessas plataformas foi acompanhado pela criação de inúmeras ferramentas de bioinformática, associadas, principalmente, à montagem das sequências geradas (CHEN *et al*., 2017).

Logo, o desenvolvimento das tecnologias de NGS tem contribuído para o conhecimento mais aprofundado dos microrganismos, permitindo a identificação taxonômica mais acurada e a caracterização mais detalhada do genoma bacteriano (CAO *et al*., 2017). As *reads* obtidas por NGS são, muitas vezes, utilizadas para predição de genes ou *clusters* gênicos relacionados à biossíntese de substâncias bioativas, por comparação com sequências bem caracterizadas depositadas em bancos de dados (HOVER *et al*., 2018).

Diversas metodologias vêm sendo criadas para descoberta e/ou isolamento de novos antimicrobianos, principalmente oriundos de amostras ambientais. Hover e colaboradores (2018) descobriram um novo antimicrobiano, a malacidina, por técnica independente de cultivo, empregando plataformas de NGS, ferramentas de bioinformática e clonagem. A análise de similaridade das sequências obtidas por NGS foi realizada em busca de *clusters* gênicos associados à biossíntese de antimicrobianos dependentes de cálcio, em amostras de DNA ambiental total, isoladas do solo.

Como mencionado, novas ferramentas de bioinformática vêm sendo criadas para análise *in silico* de sequências obtidas em plataformas NGS. O "***BA**cteriocin*

GE**nome mining too**L" (BAGEL), por exemplo, é um algoritmo empregado para buscar regiões conservadas dos genes que codificam bacteriocinas em sequências completas de genomas bacterianos, seja depositada em bancos de dados ou sequenciada especialmente para a análise (JONG *et al*., 2006). Essas análises computacionais fornecem dados importantes sobre possíveis microrganismos produtores de substâncias antimicrobianas, sendo uma alternativa atraente para substituição de ensaios tradicionais, que são extremamente laboriosos (BEGLEY *et al*., 2009).

Além das ferramentas de busca e isolamento independentes de cultivo, plataformas de prospecção de novos antimicrobianos a partir de microrganismos não cultiváveis, principalmente, oriundos de amostras ambientais, vêm sendo desenvolvidas. Ling e colaboradores (2015), por exemplo, descreveram o isolamento de uma nova classe de antimicrobiano, a teixobactina, produzida por uma bactéria não cultivável, isolada de amostras do solo, empregando a plataforma iChip. Essa tecnologia permite o isolamento de microrganismos e compostos antimicrobianos empregando as mesmas condições de cultivo e expressão dos ambientes naturais de origem.

Grande parte das plataformas mais recentes propostas para prospecção de novos antimicrobianos emprega técnicas de clonagem para expressão, purificação e/ou produção em larga escala desses compostos para validação da sua função e aplicabilidade. As técnicas de clonagem permitem o isolamento e a propagação de genes de interesse em vetores plasmidiais comerciais e transformação em sistemas hospedeiros. Essa metodologia tem trazido grandes avanços para a área de biotecnologia, principalmente, no que diz respeito à praticidade de obtenção e ao alto rendimento do produto purificado, favorecendo a caracterização bioquímica e o uso posterior em processos industriais (SHINTANI; SANCHEZ; KIMBARA, 2015).

Para realização das técnicas de clonagem e expressão gênica duas etapas são cruciais, seleção do vetor plasmidial e do sistema hospedeiro mais adequado para expressão da proteína. Os vetores rotineiramente utilizados apresentam múltiplas combinações, o que os tornam bons instrumentos para clonagem, como, diferentes origens de replicação, promotores, marcadores de seleção, sítios múltiplos de clonagem e várias estratégias para purificação da proteína, sendo, aqueles da

família pET, os mais comumente empregados para expressão de proteínas em procariotos (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Vários sistemas hospedeiros são empregados para produção de proteínas recombinantes, incluindo bactérias, fungos e células. A escolha é baseada nas características da proteína de interesse. Por exemplo, proteínas que necessitam de modificações pós-traducionais, como, glicosilação, para serem funcionais, necessitam de sistemas eucariotos, já que sistemas de expressão de procariotos não são capazes de fazer tais modificações. *E. coli* é o organismo procarioto modelo para síntese de proteínas, pois multiplica-se em meios de cultura e condições de incubação básicas, em um curto período, sendo facilmente transformado com DNA exógeno (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Diversas linhagens de *E. coli* modificadas geneticamente vêm sendo utilizadas para expressão de proteínas recombinantes. Entre elas, *E. coli* BL21 (DE3) vem sendo amplamente empregada. A amostra apresenta deficiência de duas proteases, OmpT e a Lon, o que aumenta a estabilidade das proteínas expressas. Além disso, alberga o gene que codifica a RNA polimerase T7, controlado pelo promotor LacUV5 (região DE3), o que permite a superexpressão de proteínas recombinantes, previamente clonadas em vetores contendo o protomor T7, geralmente da família pET. A partir da BL21 (DE3) diversas outras linhagens foram originadas, merecendo destaque a Rosetta (DE3), eficiente na expressão de proteínas constituídas por códons raros, comumente de origem eucariótica e a (DE3) pLysS, que codifica a lisozima T7, indicada para expressão de proteínas tóxicas. A lisozima inibe, de maneira específica a RNA polimerase T7 impedindo a expressão basal das proteínas tóxicas (KOPANIC *et al*., 2013).

A etapa de purificação de proteínas é um dos processos mais difíceis e laboriosos. O desenvolvimento das *"tags* de afinidade", descritas como sequências curtas de aminoácidos com afinidade por componentes químicos ou biológicos específicos, como a cauda de polihistidina, presente em vetores do tipo pET, têm permitido a obtenção de grande quantidade de proteínas recombinantes, em um curto período e de forma simples. Sítios de clivagem das *tags* estão presentes na sequência final da proteína, favorecendo a remoção e a obtenção de proteínas com a sequência primária preservada ou muito semelhante à proteína nativa, embora a obtenção de

proteínas na forma funcional seja um processo complexo, que demanda um longo tempo (ROCCO *et al*., 2008).

A descoberta de uma única proteína bioativa pode dar origem a várias outras. Com a aplicação de técnicas adequadas, é possível a modificação química ou genética de substâncias recentemente descobertas, dando origem a novas proteínas, biologicamente ativas, às vezes, mais estáveis e com espectro estendido de atividade (ENNAHAR *et al*., 2000).

2 JUSTIFICATIVA

Os altos índices de resistência bacteriana a fármacos antimicrobianos vêm se tornando um problema de saúde pública grave e emergente, de proporções mundiais. A ausência de terapias eficazes para o combate e controle de bactérias MDR e das doenças infecciosas associadas tem elevado às taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo.

Dentre as bactérias resistentes mais frequentemente reportadas, *A. baumannii,* membro do grupo ESKAPE, tem sido cada vez mais destacada, sendo considerada um dos patógenos nosocomiais de maior relevância clínica, comumente associado à etiopatogenia de doenças infecciosas graves que acometem seres humanos. Expressa, com frequência, resistência a diversas classes de antimicrobianos, comprometendo, de maneira importante, a possibilidade de sucesso terapêutico.

A Organização Mundial da Saúde incluiu *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos na lista de patógenos que representam grande ameaça a saúde humana, com prioridade crítica para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Esse panorama de resistência a múltiplos fármacos associados às altas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas à infecção pela bactéria reforça ainda mais a necessidade de estudos que visem à descoberta de novos agentes antimicrobianos, principalmente, que atuem contra clones multirresistentes.

Assim, considerando a relevância do tema, a escassez de substâncias antibacterianas produzidas por *A. baumannii* e ativas contra amostras clínicas MDR da bactéria e a experiência prévia do grupo na área de “Substâncias antagonistas sintetizadas por bactérias”, resolveu-se dar continuidade ao estudo iniciado durante o meu mestrado, intitulado “Atividade antagonista de *Acinetobacter baumannii* contra amostras de *Acinetobacter* resistentes a drogas antimicrobianas*”*. A identificação da substância antimicrobiana tem como intuito uma possível aplicação biotecnológica futura, envolvendo, principalmente, o tratamento de pacientes com doenças infecciosas associadas ao microrganismo e o controle da disseminação de amostras da bactéria resistentes a fármacos antimicrobianos clássicos, o que, considerando sua prevalência, tem grande impacto clínico. Além disso, contribui para a compreensão dos mecanismos de patogenicidade do microrganismo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar uma substância antimicrobiana sintetizada por *A. baumannii* ativa contra amostras clínicas multidroga resistentes da bactéria.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a localização cromossômica ou plasmidial do gene que codifica a substância antimicrobiana.
- Sequenciar, montar e analisar a sequência do DNA do plasmídio selvagem.
- Identificar o gene que codifica a substância antimicrobiana por técnicas de clonagem e expressão gênica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto deu continuidade a um estudo prévio que avaliou a expressão de substância antimicrobiana por *A. baumanni,* intitulado “Atividade antimicrobiana de *A. baumannii* contra amostras multirresistentes da bactéria”. Os resultados promissores alcançados estimularam-nos a dar prosseguimento à investigação, visando à identificação da substância antimicrobiana, o que permitirá compreender melhor seu potencial de aplicação prática (APÊNDICE A) (GUIMARÃES, 2016).

As dificuldades inerentes ao processo de purificação da substância antimicrobiana associadas à descoberta de um plasmídio selvagem carreado pela amostra produtora, *A. baumannii* 397, modificaram os objetivos iniciais da proposta doutoral. Desse modo, esse projeto descreve a localização do gene que codifica a substância antimicrobiana (plasmidial ou cromossômica), o sequenciamento do plasmídio selvagem e a clonagem e expressão das janelas abertas de leitura (ORFs) que possivelmente corresponde à substância antimicrobiana.

4.1 Amostras Bacterianas

A. baumannii 397 foi a única, dentre o grupo de amostras testadas, a expressar atividade antimicrobiana. A amostra *A. baumannii* 294 foi a mais suscetível (halo de inibição maior e mais límpido) à ação da amostra produtora (APÊNDICE B), projeto desenvolvido durante o mestrado (GUIMARÃES, 2016).

A identificação das amostras foi confirmada, por métodos bioquímico-fisiológico e de genética molecular, empregando-se o cartão[1] de identificação de bactérias Gram negativas (GN) do sistema automatizado VITEK 2®[2] e reação de polimerização em cadeia (PCR) (GUIMARÃES, 2016) (APÊNDICE C). A identificação das amostras 397 e 294 ainda foi confirmada em espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF[3].

Além das amostras de *Acinetobacter,* foram empregadas, ainda, três linhagens de *E. coli* (BL21 star, DH5α e BL21 DE3), pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG).

[1] BioMérieux, Marcy-lÉtoile, França
[2] BioMérieux
[3] Bruker Daltonics

Todas as amostras vêm sendo mantidas em *freezer* -80 ºC, em *Brucella Broth*[4] acrescido de glicerol[5] à concentração de 10%.

4.1.1 Avaliação do Perfil de Suscetibilidade a Antimicrobianos

As dezenove amostras de *A. baumannii* foram avaliadas quanto ao perfil de suscetibilidade a agentes antimicrobianos[6] (ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, tetraciclina, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, levofloxacina, ciprofloxacina, gentamicina, amicacina e tobramicina) pelo método de disco-difusão. Os antimicrobianos, a metodologia e os critérios para interpretação dos resultados foram definidos de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019) (APÊNDICE D). Os perfis de suscetibilidade de algumas amostras foram comparados empregando o *One-Way* ANOVA, teste Kruskal-Wallis, usando o *GraphPad Prism 5.01* (item 5.2.2, FIG.11).

4.2 Localização do Gene

4.2.1 Extração de DNA Plasmidial (Miniprep Caseira)

A amostra de *A. baumannii* 397 foi submetida à extração de DNA plasmidial por lise alcalina, conforme descrito por BIRNBOIM; DOLY (1979), com adaptações, em duplicata. A amostra foi cultivada em *Luria-Bertani* - LB (1% de *Bacto Triptona*[7], 0,5% de extrato de levedura[8] e 1% de cloreto de sódio - NaCl[9]), sob agitação constante (120 rpm), em aerobiose, a 37 °C, por 24 h. A cultura foi centrifugada a 15000 x g, por 10 min e o *pellet* lavado com água destilada. As células foram homogeneizadas em tampão de ressuspensão pH 8,0 (1 mg/µL de RNase[10], 50 mM de glicose[11], 25 mM de Tris[12]-HCl[13] e 10 mM de EDTA[14]), incubadas por 5 min à

[4] Difco, Sparks, MD, EUA
[5] Sciavicco, Belo Horizonte, MG, Brasil
[6] Cecon, São Paulo, SP, Brasil
[7] Difco
[8] Difco
[9] Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
[10] Promega, Madison, EUA
[11] Vetec Química Fina
[12] Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA
[13] Quimex, São Paulo, SP, Brasil

temperatura ambiente e lisadas pela adição de um tampão de lise alcalina (1M de NaOH[15], 10% SDS[16]). Em seguida, adicionou-se um tampão de neutralização (5M acetato de potássio[17], ácido acético glacial[18]) e homogeneizou-se por inversão até a formação de um precipitado esbranquiçado. O sobrenadante contendo o plasmídio foi transferido para outro microtubo e precipitado com isopropanol[19] gelado (1:1), a -20 °C, por 20 min. O material foi centrifugado a 17530 x g, por 10 min, a 4 °C. Em seguida, adicionou-se etanol[20] 70% gelado e centrifugou-se novamente, por 30 s. O *pellet* contendo o plasmídio foi armazenado em estufa, a 37 °C, por 10 min, para evaporação do etanol residual, e ressuspenso em água livre de DNase e RNase.

O DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 1000[21] e a integridade do plasmídio foi avaliada por eletroforese em gel de agarose[22] a 1% em tampão TBE (0,89 M de Tris base[23], 0,89 M de ácido bórico[24], 0,02 M de EDTA), pH 8,0. A corrida foi realizada a 86 V, por, aproximadamente, 1 h. As bandas foram coradas com *GelRed*[25] (1µL de GelRed, 100 mL de TBE 1X) e visualizadas em *Gel Doc Ez System*[26].

4.2.2 Transformação Bacteriana

Células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 foram preparadas inoculando 50 µL da amostra bacteriana congelada em 5 mL de LB. A cultura foi incubada a 37 °C, sob agitação constante (120 rpm), por 24 h. Todo o volume do pré-inoculo (5 mL) foi vertido em 150 mL de LB e o material foi incubado a 37 °C, sob agitação (120 rpm), por aproximadamente 3 h, até atingir uma densidade óptica entre 0,3 e 0,5, em absorbância de 600 nm. A seguir, a cultura foi submetida a banho de gelo, por 30 min e, em seguida, alíquotas foram centrifugadas a 1250 x g, por 8 min, a 4 °C. O

[14] Promega
[15] Química Moderna, Barueri, SP, Brasil
[16] Promega
[17] Labsynth, Diadema, SP
[18] Isofar, Duque de Caxias, RJ
[19] Ecibra, Santo Amaro, SP
[20] Ecibra
[21] Thermo Scientific, Massachussets, EUA
[22] Kasvi, São José dos Pinhais, PR
[23] Sigma-Aldrich
[24] Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, SP
[25] Thermo Scientific
[26] Bio-Rad, Santo Amaro, SP

sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 0,1 M de $MgCl_2$[27] (cloreto de magnésio) gelado. O material foi novamente centrifugado, nas mesmas condições descritas acima, e os *pellets* ressuspensos em 0,1 M de $CaCl_2$[28] (cloreto de cálcio) gelado. As amostras foram incubadas em banho de gelo por 20 min, centrifugadas e os *pellets* ressuspensos em $CaCl_2$ com glicerol (64:10 v/v) gelado. As amostras foram aliquotadas e armazenadas em *freezer* a -80 °C (LIM *et al*., 2015).

Para transformação, empregou-se protocolo proposto por LIM *et al*. (2015), com modificações. Um total de 200 ng do DNA plasmidial isolado da amostra de *A. baumannii* 397 foi adicionado a uma alíquota de 200 µL de células quimiocompetentes e o material foi incubado em banho de gelo, por 30 min. A amostra foi submetida a choque térmico (banho maria a 42 °C, por 1 min e 30 seg e, em seguida, banho de gelo por 2 min). Posteriormente, acrescentou-se 600 µL de SOC (5 g de extrato de levedura, 20 g de *Bacto triptona*, 0,584 g de NaCl, 0,186 g de KCl[29], 2,4 g de $MgSO_4$[30], 1 L de água, 20 mL de solução de glicose filtrada a 20%) e o conteúdo foi incubado a 37 °C, por 1 h e 30 min, sob agitação constante (120 rpm). As células transformadas foram inoculadas em ágar LB[31] contendo diferentes antimicrobianos (canamicina[32], cloranfenicol[33] e ampicilina[34]), para seleção dos clones que receberam o plasmídio.

Após cultivo, os clones foram inoculados em LB contendo o antimicrobiano de interesse, nas condições descritas acima, acrescido de glicerol e as culturas foram criopreservadas a -80 °C. O DNA plasmidial dos clones transformados foram extraídos por miniprep caseira e sua presença foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%, conforme descrito no item 4.2.1.

[27] Labsynth
[28] Labsynth
[29] Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
[30] Vetec Química Fina
[31] Difco
[32] Sigma-Aldrich
[33] Inlab, Diadema, SP, Brasil
[34] Sigma-Aldrich

4.2.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Os clones transformados foram submetidos às técnicas de sobrecamada e precipitação ácida, para verificação da presença do gene que codifica a substância antimicrobiana estava presente no plasmídio selvagem, conforme explicado nos itens a seguir.

4.2.3.1 Pesquisa de atividade antimicrobiana – Técnica de sobrecamada

Para realização da técnica de sobrecamada (BOOTH; JOHNSON; WILKINS, 1977), as amostras bacterianas foram previamente cultivadas em *Tryptic Soy Broth*[35] (TSB) (incubadas em aerobiose, a 37 °C, por 24 h) e gotejadas em diferentes meios de cultura [*Brain Heart Infusion Agar*[36], suplementado com 0,5% de extrato de levedura (BHIA-S), *Tryptic Soy* Agar[37] (TSA) e ágar LB com e sem extrato de levedura], acrescidos ou não de 50 µg /mL de canamicina, 100 µg /mL de ampicilina ou 30 µg /mL de cloranfenicol. O material foi incubado em aerobiose, a 25 °C e 37 °C, por 24 h. A seguir, as culturas foram expostas a vapor de clorofórmio[38], por 30 min, e, em seguida, as placas foram entreabertas, por 30 min, para evaporação do clorofórmio residual. A amostra reveladora (*A. baumannii* 294) foi cultivada nas mesmas condições descritas previamente para os transformantes. Uma alíquota da amostra reveladora foi inoculada em ágar semissólido (0,75% de ágar[39]) e, então, o volume foi vertido sobre os meios sólidos contendo os transformantes mortos pela ação do clorofórmio (FARIAS *et al*., 1992). O material foi incubado a 37 °C, por 20 h. Após incubação, avaliou-se a presença ou ausência de halo de inibição da amostra reveladora.

Como controle negativo de atividade, a linhagem de *E. coli* BL21 não transformada foi cultivada nas condições descritas acima, para verificar se a mesma não produzia algum composto capaz de inibir a amostra reveladora (*A. baumannii* 294). Como controle positivo de atividade, empregou-se a amostra produtora, *A baumannii* 397.

---

[35] Difco
[36] Difco
[37] Difco
[38] Vetec Química Fina
[39] Difco

4.2.3.2 Extração Proteica – Técnica de Precipitação ácida

Os clones transformados foram, ainda, submetidos à precipitação ácida com HCl 2N, conforme descrito por COOPER *et al.* (1981) e NAKANO; MARAHIEL; ZUBER (1988), com modificações. Três colônias de cada amostra foram inoculadas em diferentes frascos contendo LB e TSB e incubadas em aerobiose, sob agitação constante (120 rpm), a 37 ºC, por 24 h. Uma suspensão de 10% (v/v) do pré-inoculo foi inoculada nos mesmos meios, e incubado nas mesmas condições descritas acima, com exceção da temperatura, que foi alterada para 25 °C.

Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 7.826 x g, por 15 min, a 4 ºC. O sobrenadante (referente a cada clone) contendo ou não a substância antimicrobiana foi coletado e submetido à precipitação com HCl 5 N, pH 2,0. Após incubação *overnight*, a 4 ºC, o sobrenadante foi centrifugado a 7.826 x g, por 30 min, a 4 ºC. Os precipitados foram solubilizados em água destilada esterilizada e o pH ajustado para 7,0 com NaOH 2 N. Os extratos foram aliquotados, liofilizados e armazenados a -80 °C.

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos foi mensurada pela técnica de *spread plate*, conforme descrito por SILVA *et al*. (2014). A amostra de *A. baumannnii* 294 foi previamente ajustada para 0,5 da escala de McFarland e semeada em *Mueller Hinton Agar*[40] (MHA) (CLSI, 2019). A seguir, o meio de cultura foi perfurado (diâmetro de aproximadamente 5 mm) com auxílio de um canudo esterilizado e alíquotas do extrato bruto diluído em água destilada esterilizada foram aplicadas nos poços (titulação). A placa foi incubada *overnight*, a 4 ºC, para difusão da substância antimicrobiana, sendo, em seguida, incubada em condição adequada para a multiplicação da amostra reveladora, conforme descrito acima (item 4.2.3.1).

Após incubação, foi realizada a leitura, avaliando-se a presença de halo límpido de inibição da amostra reveladora. Este teste foi realizado para todos os extratos.

[40] Acumedia, Michigan, EUA

4.2.4 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA

Com base nos resultados de atividade antimicrobiana, foi selecionado um clone transformado, a ser empregado nas etapas subsequentes do estudo.

Os extratos brutos (TSB e LB caldo) oriundos da amostra selecionada, sabidamente ativos, foram submetidos a etapas de cromatografia de fase reversa para purificação da substância. Após cada etapa de purificação, as frações foram submetidas a teste de atividade antimicrobiana, como descrito no item 4.2.3.2.

4.2.4.1 Cromatografia em Colunas de Fase Reversa

Os extratos brutos ativos foram submetidos a *High-performance liquid chromatography* (HPLC) em coluna LC-8 Supelcosil (4,6 mm x 25 cm, 5 µm)[41]. A coluna foi equilibrada com solução A (ácido trifluoroacético - TFA[42] 0,1% v/v em água Milli-Q®) e eluída com solução B (acetonitrila[43] - ACM 80% v/v acrescida de TFA 0,1%). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 e 280 nm. As frações foram coletadas, concentradas por liofilização, solubilizadas em 40 µL de água destilada esterilizada e testadas quanto à expressão de atividade antimicrobiana. Os *pools* das frações ativas foram submetidos a "recromatografia" em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide[44] (4,6 mm x 25 cm, 5 µm) sob as mesmas condições descritas anteriormente. As frações obtidas foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana (item 4.2.3.2) e analisadas por espectrometria de massas.

4.2.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As frações ativas oriundas da "recromatografia" de fase reversa (coluna Sephasil™ Peptide) foram avaliadas por espectrometria de massas. As frações foram liofilizadas, ressuspensas em solução de TFA 0,1 % e dissolvidas em matriz DHB

[41] Shimadzu, Kyoto, Japão
[42] Sigma-Aldrich
[43] Merck Millipore, São Paulo, Brasil
[44] Sigma-Aldrich

(ácido 2,5-di-hidroxibenzoico)[45], na proporção de 1:1 (v/v). Um volume de 1 µL/*spot* foi transferido para uma placa de dados MALDI (MTP AnchorChips 400 x 384)[46] e mantida em temperatura ambiente. A massa molecular foi determinada empregando-se AutoflexTM® III MALDI-TOF/TOF[47] operado em modo linear positivo. A calibração linear foi obtida utilizando-se o padrão de calibração proteico (*Peptide Calibration Standard* mono, *Protein I Calibration Standard e Protein Calibration Standard II*)[48] e o *software* de coleta de dados *Flex Control* 2.4.30.0[49]. Para análise dos dados, empregou-se o programa *Flex Analysis*[50].

4.3 Sequenciamento do DNA plasmidial

4.3.1 Extração de DNA

A amostra selecionada para as etapas subsequentes do estudo foi cultivada em LB acrescido de 30 µg /mL cloranfenicol e incubado a 37 °C, sob agitação constante (120 rpm), por 24 h. O DNA plasmidial foi extraído e purificado empregando o *Geneaid™ Midi Plasmid kit* (*Endotoxin Free*)[51], de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA plasmidial foi quantificado usando espectrofotômetro NanoDrop 1000 e a qualidade do material foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE, pH 8,0. A corrida foi realizada a 86 V por, aproximadamente, 1 h. As bandas foram coradas por GelRed e visualizadas em *Gel Doc Ez System*. O DNA plasmidial foi encaminhado para sequenciamento.

[45] Sigma-Aldrich
[46] Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA
[47] Bruker Daltonics
[48] Bruker Daltonics
[49] Bruker Daltonics
[50] Bruker Daltonics
[51] Geneaid, New Taipei City, Taiwan

4.3.2 Construção das Bibliotecas e Sequenciamento

Para montagem das bibliotecas, o DNA plasmidial foi quantificado com *Qubit 2.0 fluorometer*[52] usando o *Qubit® dsDNA HS assay kit*[53]*.* Para sequenciamento, foram construídas bibliotecas *paired-end* com *Nextera XT DNA Library Preparation Kit*[54]. Os fragmentos foram sequenciados no sequenciador *Illumina MiSeq*[55] com o cartucho V3 600 ciclos[56].

4.3.3 Montagem e Anotação Estrutural e Funcional

A qualidade das *reads* geradas foi analisada utilizando-se o *software* FASTQC (http://www.bioinformatics.bobraham.ac.uk/projects/fastqc). As *reads* que apresentaram valor de qualidade inferior a *phred* 30 foram eliminadas do conjunto de dados (script fastq_quality_filter do pacote FASTx Toolkit). A montagem *de novo* foi realizada utilizando o algoritmo SPAdes 3.10.1.

A busca por regiões codificadoras de proteínas foi realizada empregando-se o Programa Artemis[57]. A busca por similaridade do plasmídio foi realizada utilizando o algoritmo BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e o banco de dados secundário de famílias de proteínas, *pfam* 31.0 (http://pfam.xfam.org/). A busca por genes de resistência a antimicrobianos foi realizada empregando o *ResFinder* 3.0 (www.genomicepidemiology.org) (ZANKARI *et al*., 2012). O desenho esquemático do plasmídio foi realizado no *SnapGene® Viewer* 2.8.1 (http://www.snapgene.com/products/feature_comparison/).

4.3.4 Análise da Montagem

A montagem do DNA plasmidial foi analisada por PCR de algumas ORFs anotadas (MINDLIN *et al*., 2016). Além disso, foi realizada a digestão do plasmídio selvagem

[52] ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA
[53] Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA
[54] Illumina, San Diego, CA
[55] Illumina
[56] Illumina
[57] Sanger Institute, UK, Inglaterra

com duas enzimas de restrição[58] que apresentam sítio único de clivagem na sequência, *XhoI* e *SpeI*, avaliada na *NEBcutter V2.0 da New England BioLabs* (http://nc2.neb.com/NEBcutter2/), conforme recomendações do fabricante. A digestão foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.3.4.1 Construção dos oligonucleotídeos e amplificação dos genes por PCR

A partir da sequência das ORFs foram desenhados (*Oligo Explorer 1.4)* e sintetizados pares de iniciadores (www.idtdna.com[59]) que flanqueavam as extremidades 3' e 5' de oito das doze ORFs anotadas. Os *primers forward* e *reverse* apresentam sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *XhoI*, respectivamente, nas extremidades 5', para facilitar a subclonagem em vetor de expressão (QUADRO 1).

[58] Promega
[59] Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA

QUADRO 1 - Sequências dos *primers* e condições da PCR para análise da montagem do plasmídio selvagem e clonagem

Gene	Sequência dos *primers* (5' - 3')	*Amplicon* (pb)	Condições da reação
sel1	**CATATG**GCTTTAGGAGTTTGCCT **CTCGAG**CTAATTTTCAGACTTATCCCACC	543	Desnaturação inicial: 94 °C, 5 min 30 ciclos: 94 °C por 25 s (desnaturação) °C* por 40 s (anelamento) 72 °C por 50 s (extensão) 72 °C por 6 min (extensão final)
hp1	**CATATG**GACGCAAGTAAAGCCTTT **CTCGAG**CTAACCATAAGGAAGGAAAAAACG	534	
hp2	**CATATG**TTAGGGATGGTTTCCC **CTCGAG**TTATAAATTAAAAAGCTTTCGGTCAC	306	
hp3	**CATATG**GAAGATCCAACACTTAATGAG **CTCGAG**TTACATACCAACTTTAACCACATTG	432	
Sep	**CATATG**AAATTAGCAGAAGCTCTCTT **CTCGAG**TTAGGCTTCAATCAAATCAATTTTCC	462	
brnT	**CATATG**TTTTTTATGGAACAGTATTTTGAATG **CTCGAG**CTAACCATGCTCATATTTGTTTCG	297	
brnA	**CATATG**ATGGTTAGATACTCACACAAAGA **CTCGAG**TTATTGATGATTTTTTAATTCTTTTAGCAT	309	
*cirA***	**CATATG**ATGCTAAATAAAAGTAAACTATTTTTAGC **CTCGAG**CTAGAAATTAAGATTTAAGCCTAAACT	2412	

*, gradiente de temperatura de anelamento utilizado para amplificação dos genes: 50 °C; 50,3 °C; 50,9 °C; 51,8 °C; 53,1 °C; 54,4 °C; 55,6 °C; 56,9 °C; 58,2 °C; 59,1 °C; 59,7 °C; 60 °C; azul, sítio de restrição para a enzima *NdeI*; vermelho, sítio de restrição para a enzima *XhoI*; ***sel1***, gene que codifica a proteína de repetição da família SEL1; ***hp1***, 2 e 3, genes que codificam as proteínas hipotéticas 1, 2 e 3; ***sep***, gene que codifica a septicolisina; ***brnT***, gene que codifica a toxina brnT; ***brnA***, gene que codifica a antitoxina brnA, ***cirA***, gene que codifica um receptor de membrana dependente de TonB; **extensão final de 3 min. O sistema BrnT-BrnA foi amplificado com *primer* F (BrnT) e o R (BrnA).

OBS: A segunda trinca do sítio de restrição da enzima *NdeI* (ATG) foi deletada, sendo utilizado o ATG do próprio gene. Após ligação no vetor de expressão, o sítio será reconstituído, não ocorrerá comprometimento do códon de iniciação, reduzindo uma metionina na constituição final de cada proteína.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O par de *primers* empregado para amplificação da integrase (*int1*), *int1* forward 5'- ACGAGCGCAAGGTTTCGGTGAA - 3' e reverse 5'- AGGTCTGGTCATACATG - 3', e as condições de reação foram aquelas descritas por SU *et al*. (2006).

A extração do DNA plasmidial da amostra selecionada foi realizada conforme descrito no item 4.3.1. O DNA foi quantificado empregando-se espectrofotômetro NanoDrop 1000.

A PCR foi realizada para amplificação de alguns dos genes previamente anotados no plasmídio selvagem. O procedimento foi realizado empregando-se nove pares de iniciadores, conforme descrito anteriormente.

O volume final da reação foi de 20 µL e a composição do *mix* era 20 ng/µL de DNA plasmidial, 1,5 mM de $MgCl_2$[60], 0,8 mM de dNTPs[61], 0,4 mM de cada *primer*[62], 2U de Taq DNA polimerase[63], tampão e água Milli-Q® esterilizada. As sequências dos *primers forward* e *reverse*, as condições de amplificação e o tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se no Quadro 1. Como controle positivo foi usado o plasmídio selvagem.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE. A corrida foi realizada a 100 V, por aproximadamente 1 h e 30 min. As bandas foram coradas com *GelRed* e visualizadas em *Gel Doc Ez System*.

Para cada reação de amplificação foi empregado um gradiente de temperatura de anelamento, como apresentado no Quadro 1. A temperatura que permitiu uma amplificação mais eficiente (bandas de interesse evidentes e ausência de bandas inespecíficas) foi empregada nas etapas subsequentes do projeto.

4.4 Clonagem e Expressão Gênica

As etapas de clonagem e expressão gênica foram realizadas para todos os genes que pudessem codificar ou estar relacionados à expressão da substância com atividade antimicrobiana.

[60] Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil
[61] Ludwig Biotecnologia, Bela Vista, RS
[62] Integrated DNA Technologies
[63] Phoneutria

4.4.1 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE

A PCR foi realizada empregando-se os pares de iniciadores e as condições de amplificação descritos anteriormente (item 4.3.4.1 e QUADRO 1).

4.4.2 CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR EM SISTEMA TOPO E TRANSFORMAÇÃO

O sistema TOPO® TA *Cloning*®[64] é um kit de subclonagem composto por um plasmídio linear que apresenta resíduos de desoxitimidina (T) nas extremidades 3' e uma Topoisomerase I (*Vaccinia* vírus) ligada covalentemente ao DNA de fita dupla. Este sistema permite a ligação direta de produtos de PCR adenilados (a *Taq polimerase* insere uma desoxiadenosina, "A", no final da extremidade 3' do produto de PCR, independente de um molde) (SHUMAN, 1994). A inserção do produto de PCR promove a circularização do sistema TOPO e, consequentemente, a formação de um vetor recombinante. A reação de ligação foi realizada segundo instruções do fabricante.

O vetor recombinante foi inserido em células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α por choque térmico, conforme descrito no item 4.2.2. A seleção dos clones transformantes foi realizada em meio ágar LB acrescido de 50 mg/mL de canamicina ou 100 mg/mL ampicilina e 40 mg/mL de 5-bromo-4chloro-3-indolyl-beta-D-galactopiranosideo[65] (X-Gal). Após 24 h de incubação, a 37 °C, avaliou-se a presença de colônias brancas, possíveis transformantes.

4.4.2.1 Análise dos transformantes - Triagem por PCR de colônia

Para verificar se o inserto foi clonado, os possíveis clones positivos (colônias brancas) foram submetidos a PCR de colônia, conforme descrito pelo fabricante do sistema TOPO® TA *Cloning*, com modificações. O par de *primers* usado, M13 *forward* 5' - GTAAAACGACGGCCAG - 3' e *reverse* 5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3', flanqueiam as extremidades 3' - 5' do sítio múltiplo de clonagem do vetor TOPO e permite a amplificação dos genes clonados associados a duas regiões do vetor, que

[64] Invitrogen
[65] Ludwig Biotecnologia

antecede (112 pb) e sucede (90 pb) o sítio múltiplo de clonagem, sendo observadas bandas com tamanho equivalente ao INSERTO + 202 pb.

Para isso, foram selecionadas no máximo 5 colônias positivas e estas foram submetidas individualmente a PCR (item 4.3.4.1). As condições de amplificação foram desnaturação inicial a 94 °C por 10 min (lise celular e inativação de proteases), seguida por 30 ciclos a 94 °C por 25 s (desnaturação), 55 °C por 40 s (anelamento) e 72 °C por 50 s (extensão) (tempo variou de acordo com o tamanho de cada gene) e extensão final a 72 °C por 6 min, conforme descrito pelo fabricante, com adaptações.

A banda compatível com a região amplificada foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Como controle positivo foi empregado a amostra de DNA fornecida pelo fabricante (952 pb) e, como controle negativo, água.

4.4.2.2 Extração dos vetores recombinantes

Os transformantes contendo o inserto foram cultivados, individualmente, em 5 mL de caldo LB contendo 50 µg/mL canamicina ou 100 µg/mL ampicilina, sob agitação constante (180 rpm), por 24 h, a 37°C. Uma alíquota de 900 µL da cultura foi acrescida de 100 µL de glicerol esterilizado e armazenado a -80 °C.

Outra alíquota da cultura foi submetida à miniprep caseira, para extração do vetor recombinante, conforme descrito no item 4.2.1. Os vetores foram ainda submetidos a PCR empregando o par de iniciadores específico para cada gene (item 4.3.4.1).

Nessa etapa, a região M13 não foi sequenciada. Geralmente, o sequenciamento tem duas finalidades básicas, confirmar a integridade da sequência e verificar se o inserto foi inserido no sentido correto no vetor. Quando os sítios de restrição do vetor são utilizados para clivagem do inserto e subclonagem no sistema de expressão, o sentido correto é essencial. No nosso estudo, os sítios para as enzimas de restrição estão presentes nos *primers*.

4.4.2.3 Digestão enzimática e purificação dos vetores recombinantes

Como descrito previamente, as sequências dos iniciadores eram constituídas por sítios de enzimas de restrição, compatíveis com àqueles presentes no vetor de expressão (item 4.4.3), então, para obtenção de extremidades coesivas, o vetor TOPO recombinante foi submetido à digestão dupla, empregando as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. A reação de digestão foi realizada utilizando 1 µL *XhoI* (10 U/µL), 0,5 µL *NdeI* (10 U/µL), 3 µL do tampão D 10X[66], 1 µg do vetor plasmidial e quantidade de água suficiente para volume final de 30 µL e incubada por 4 h a 37 °C, conforme recomendações do fabricante. A digestão foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%. O fragmento de DNA digerido relacionado ao inserto foi excisado do gel e purificado utilizando o *PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo kit*[67], conforme sugerido pelo fabricante. A purificação da banda foi confirmada novamente por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.4.3 Construção dos Vetores de Expressão - Sistema pET 28a-TEV

Para expressão dos genes amplificados e purificados, foi empregado um vetor plasmidial comercial modificado do sistema pET 28a (TEV)[68] (CARNEIRO *et al*., 2006) especializado na clonagem e expressão de proteínas recombinantes e uma linhagem competente de *E. coli* BL21 (DE3).

O sistema pET 28a (TEV) difere do vetor comercial pET 28a[69] pela presença de um sítio de clivagem para uma protease isolada do *Tabacco etch* virus (TEV) no lugar do sítio de clivagem da trombina, localizada logo após uma sequência de nucleotídios que codifica seis resíduos de histidinas (6 x *His tag*), na extremidade N-terminal da proteína de interesse, o que facilita a purificação da proteína recombinante, por cromatografia de afinidade em resina de níquel (COITINHO *et al*., 2012).

O vetor pET 28a-TEV foi previamente digerido com as enzimas *XhoI* e *NdeI*, conforme descrito para o vetor TOPO recombinante, e a digestão confirmada por

[66] Promega
[67] Invitrogen
[68] Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CeBiME, Campinas, SP)
[69] Novagem, Darmstadt, Alemanha

eletroforese em gel de agarose 1%. A banda correspondente ao vetor digerido foi excisada do gel e purificada, empregando-se o *PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo kit* (item 4.4.2.3).

Os fragmentos de interesse purificados foram ligados no vetor pET 28a-TEV digerido por reação de ligação, empregando a enzima T4 DNA ligase[70], conforme recomendado pelo fabricante: 2 µL do tampão de ligação 10X, 1 µL da enzima T4 DNA ligase, aproximadamente 3 µL do inserto (300 ng), 1 µL do vetor (100 ng) e quantidade de água suficiente para volume final de 20 µL.

4.4.4 TRANSFORMAÇÃO EM *E. COLI* BL21(DE3)

O vetor pET 28a-TEV recombinante foi introduzido em uma linhagem quimiocompetente de *E. coli* BL21 (DE3), por choque térmico (item 4.2.2).

A reação de transformação foi inoculada em ágar LB acrescido de 50 µg/mL de canamicina e 100 mM de isopropil-β-D-tiogalactosidase[71] (IPTG). Após 24 h de incubação, a 37 °C foi avaliada a presença de colônias, possíveis transformantes.

A inserção da sequência de interesse foi confirmada por PCR de colônia dos transformantes, empregando-se, um par de iniciadores[72], T7 *Promoter forward*, 5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3' e *reverse* 5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3', que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do pET 28a-TEV e amplificam fragmentos com tamanhos próximos aos dos genes clonados (INSERTO + 268 pb) (COITINHO *et al*., 2012).

Foram selecionadas até 5 colônias e estas foram submetidas individualmente a PCR de colônia (item 4.3.5.1). As condições de amplificação foram iguais àquelas descritas para o vetor TOPO (item 4.4.2.1).

Além disso, o vetor recombinante foi extraído e submetido novamente a PCR, conforme descrito nos itens acima (4.3.5.1 e 4.4.2.1), porém empregando o par de *primer* específico de cada gene (Quadro 1).

---

[70] Ludwig Biotecnologia
[71] Ludwig Biotecnologia
[72] Integrated DNA Technologies

4.4.4.1 Sequenciamento dos insertos clonados

Foi realizado sequenciamento do sítio múltiplo de clonagem dos vetores pET28aTEV recombinantes, utilizando os iniciadores T7 *promoter forward* e T7 *promoter reverse*. Os vetores foram extraídos por miniprep caseira (item 4.2.1) e a região foi amplificada conforme descrito no item 4.4.4. Os produtos gerados foram purificados com solução de polietilenoglicol (PEG8000)[73] 20% p/v e NaCl 2,5 M e sequenciados por eletroforese capilar em sequenciador automático *ABI 3130* pela Myleus Biotechnology (empresa destinada a fornecer serviço de sequenciamento de DNA). As sequências foram analisadas no programa SeqTrace 0.9.0 e os *contigs* formados foram comparados com sequências montadas manualmente dos vetores pET28aTEV recombinantes no algoritmo Blastn (alinhamento de duas sequências). A fase de leitura da proteína foi verificada no programa ExPASy – *Translate tool* (*Expert Protein Analysis System)* (http://web.expasy.org/translate/).

4.4.5 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes

As etapas de expressão e purificação da proteína recombinante foram realizadas conforme descrito por Coitinho e colaboradores (2012), com modificações. Para expressão, os transformantes foram inoculados em 50 mL de LB caldo acrescido de 50 µg/mL de canamicina, incubados a 37 °C, sob agitação constante (180 rpm), *overnight*. Posteriormente, o pré-inoculo foi transferido para outro frasco contendo 500 mL de caldo LB acrescido de 50 µg/mL de canamicina e a incubação foi feita nas mesmas condições descritas acima, até que uma OD_{600} entre 0,6 e 0,8 fosse atingida. Em seguida, a expressão foi induzida por adição de IPTG na concentração final de 1mM, por, aproximadamente, 4 h.

A cultura foi centrifugada (16.200 g, a 4 ºC, por 25 min), o *pellet* foi ressuspenso em tampão fosfato-salino - PBS (10 mM de Na_2HPO_4[74], 18 mM KH_2PO_4[75], 27 mM KCl e 1,4 M de NaCl) e submetido a sonicação[76], por 10 ciclos de 1 min, a 40 Hz, com intervalos de 1 min, em banho de gelo.

[73] Sigma-Aldrich
[74] Vetec Química Fina
[75] Vetec Química Fina
[76] Branson, Danbury, CT, EUA

Para avaliar a solubilidade, o material sonicado foi centrifugado (16.200 g, a 4 ºC, por 25 min), o sobrenadante correspondeu à porção solúvel e o *pellet* (ressuspenso em PBS 1X), à porção insolúvel. O sobrenadante contendo a proteína de interesse foi coletado, submetido à análise em gel de poliacrilamida e à purificação conforme descrito nos itens 4.4.5.1 e 4.4.5.3.

As massas moleculares das proteínas recombinantes foram estimadas no programa *ProtParam tool* presente no servidor proteômico ExPASy (https://web.expasy.org/protparam/). Cada proteína apresentou 16 aminoácidos (aa) (2000,15 Da) a mais em sua estrutura, relacionados à região do vetor que foi traduzida (cauda de histidina e o sítio de clivagem da enzima TEV) (TAB. 6).

4.4.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS

Para avaliar a expressão e a solubilidade da proteína, uma alíquota da cultura não induzida (tempo zero), induzida por 4 h (após adição de IPTG), a porção solúvel e a porção insolúvel foram submetidas a SDS-PAGE, a 12,5% e 15%, de acordo com o tamanho da proteína (SHAGGER; VON JAGOW, 1987).

Os géis foram feitos em duplicata, as amostras foram acrescidas de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M, SDS 10X, glicerol, betamercaptoetanol[77], azul de bromofenol[78] e água MilliQ), aquecidas a 95 °C, por 5 min. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V, 90 min, um dos géis foi corado por *Coomassie Brilliant Blue* R-250[79] e o outro submetido a técnica de *western blotting* (item 4.4.5.2). Foram empregados quatro padrões de massa molecular, um não-corado, *Unstained Protein* MW[80] (14,4 a 116 kDa) e três pré-corados, *Prestained Protein* MW Marker[81] (6,5 a 266 kDa e 20 a 120 kDa) e *Prestained Protein Kaleidoscope*[82] (10 a 250 kDa).

[77] Vetec Química Fina
[78] GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil
[79] Vetec Química Fina
[80] Thermo Fisher
[81] Thermo Fisher
[82] Bio-Rad

4.4.5.2 *Western blotting*

Para realização da técnica de *western blotting,* as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose[83] (60 V, 400 mA, por 1h), empregando um sistema de transferência semisseco (*Semi Dry Blotter Horitz*[84]). Em seguida, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio [5% de leite em pó[85] solubilizado em TBS 1x T (PBS 1X + 0,05% de Tween 20[86])], *overnight*, a 4°C. Após bloqueio, a membrana foi lavada 3X com TBS 1X T (5 min/ lavagem), e tratada com o anticorpo primário, Anti-6-his Mouse IgG1[87] (diluído 1:5000 em TBS 1x T), por 2 h. A membrana foi novamente lavada, conforme descrito anteriormente, e, então, submetida ao tratamento com o anticorpo secundário, Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase[88] (diluído 1:10.000 em TBS 1X T) por 2 h. Posteriormente, o anticorpo conjugado foi descartado e a membrana lavada. A formação do complexo antígeno-anticorpo foi revelada por método colorimétrico (50 mM de Tris-HCl pH 7,6, 10 mg de DAB- tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina[89] e 10 µL de H_2O_2[90]a 30%). A reação foi visualizada rapidamente e interrompida pela adição de água (KOPANIC *et al*., 2013; FAVACHO *et al*., 2006).

Após confirmação da expressão das proteínas, as próximas etapas foram realizadas apenas com a proteína que exibiu atividade antimicrobiana e/ou que apresentou evidências de ser a molécula ativa contra amostras MDR de *A. baumannii*.

4.4.5.3 Purificação das Proteínas Recombinantes

A purificação das proteínas foi realizada conforme descrito por Torres (2011), com algumas alterações. O sobrenadante foi filtrado em membrana 0,45 µm[91], diluído em tampão de ligação (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl, 20 mM de imidazol[92], pH 7,4, filtrado) e aplicado em uma coluna de afinidade HisTrap[93] HP de

[83] Sigma-Aldrich
[84] Bio-Rad
[85] Bio-Rad
[86] Sigma-Aldrich
[87] Sigma-Aldrich
[88] Sigma-Aldrich
[89] Sigma-Aldrich
[90] Êxodo Científica, Sumaré, São Paulo, Brasil
[91] Millipore
[92] Êxodo Científica

1 mL (previamente equilibrada com tampão de ligação), conectada ao sistema AKTA Purifier UPC-10[94]. Posteriormente, foi realizado um gradiente linear (0-100%) com tampão de ligação e eluição (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl e 500 mM de imidazol, pH 7,4, filtrado), vazão de 1,0 mL/min, para eluição da proteína ligada à coluna. O perfil cromatográfico foi monitorado empregando-se comprimento de onda de 280 nm.

As frações eluídas da coluna de afinidade contendo a proteína recombinante foram dialisadas contra PBS 1X, em membrana 1000Da[95] para remoção do imidazol.

As concentrações das proteínas foram determinadas conforme metodologia descrita por Bradford (1976). Como padrão, foi utilizada solução de soroalbumina bovina (1 mg/mL) e, como corante, o *Coomassie Brilliant Blue* G-250[96]. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços. A curva padrão foi construída utilizando 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 µg da solução padrão. A concentração de proteínas foi determinada pela leitura de absorbância a 595 nm, realizada em leitor de Elisa (Multiskan Spectrum)[97].

Em seguida, as frações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% e 15% (SDS PAGE), de acordo com o tamanho da proteína (item 4.4.5.1) e avaliadas quanto à atividade antimicrobiana (itens 4.2.3.1 e 4.5.1).

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o *GraphPad Prism*, versão 5.01. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

[93] GE Healthcare Life Sciences
[94] GE Healthcare Life Sciences
[95] Sigma-Aldrich
[96] Vetec Química Fina
[97] Thermo Scientific

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por substâncias antimicrobianas vem crescendo de forma marcante nos últimos anos, tanto pela possibilidade de aplicação prática (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008), como para o melhor entendimento da ecologia microbiana, visto que é plausível admitir a existência de relação entre a predominância de determinadas amostras e expressão destas substâncias (O'SHEA *et al.,* 2012). A emergência de microrganismos resistentes bem como de doenças associadas aos mesmos ressalta ainda mais a necessidade de estudos para descoberta de novas substâncias antimicrobianas, oriundas das mais diversas fontes (AMRAOUI *et al.,* 2014).

A capacidade de sintetizar substâncias antimicrobianas parece ser uma propriedade amplamente disseminada entre bactérias. Tanto membros da microbiota indígena (DOBSON *et al.,* 2012), como amostras exógenas isoladas de processos infecciosos (SOUSA *et al.,* 2010) ou amostras ambientais, podem expressar esta capacidade.

A seleção do(s) microrganismo(s) para o *screening* de substância(s) antimicrobiana(s) é a primeira etapa para desenvolvimento de um projeto dessa natureza. Algumas vezes, essa escolha pode estar relacionada ao tipo de "substância" que se tem interesse em isolar e/ou ao tipo de microrganismo que se quer inibir. Neste estudo, a busca por substâncias antimicrobianas a partir de amostras clínicas de *A. baumannii* foi baseada tanto no interesse em se encontrar uma bacteriocina, sintetizada pela bactéria, como na importância clínica de *A. baumannii*, principalmente no que diz respeito à escassez de antimicrobianos eficazes para terapia de pacientes com infecções associadas a amostras MDR da bactéria. Como mencionado anteriormente, bacteriocinas são substâncias que normalmente atuam contra amostras filogeneticamente relacionadas à amostra produtora (BENMECHERNENE *et al*., 2013), ou seja, o *screening* de novas substâncias a partir de amostras de *A. baumannii* poderia levar a descoberta de alguma bacteriocina, que, provavelmente, inibiria amostras da mesma espécie ou gênero da bactéria.

O gênero *Acinetobacter* foi isolado, pela primeira vez, de amostras do solo (HENRIKSEN, 1973), mantendo-se viável em temperatura ambiente, em torno de 25 °C. A competição por nutrientes e espaço, em *habitats* densamente habitados, como

o solo, estimulam os microrganismos a sintetizar diversos produtos naturais, com potencial antimicrobiano (LING *et al.,* 2015). Entretanto, com a migração de espécies do gênero para o ambiente clínico, a bactéria passou a ser exposta a pressões seletivas diversas, entre elas, concentrações elevadas de uma ampla variedade de antimicrobianos e desinfetantes. Assim, é plausível supor que, neste "novo" ambiente, a expressão de outras propriedades tenha passado a ser mais relevante para o organismo. Mas, admite-se que a capacidade de produção de substâncias antimicrobianas tenha sido preservada e sua expressão possa ser detectada em condições adequadas, semelhantes àquelas do ambiente de origem (GUIMARÃES, 2016).

Poucos estudos abordam a busca por novas substâncias antimicrobianas produzidas por *A. baumannnii.* Ao estudarem microrganismos marinhos, Amraoui e colaboradores (2014) isolaram uma amostra de *A. baumannii* e avaliaram seu potencial farmacêutico, quanto à expressão de antagonismo. Os autores observaram que a bactéria expressava atividade antagonista contra todas as amostras reveladoras testadas, incluindo bactérias e fungos, relatando a possível síntese de substância(s) antimicrobiana(s) pela bactéria. Entretanto, o isolamento e a purificação da(s) substância(s) responsável(is) pelo fenômeno não foram realizados.

Além deste estudo, a expressão de antagonismo pelo gênero *Acinetobacter* também foi evidenciada por Andrews (1986). Segundo esta investigação, dentre as 176 amostras de *Acinetobacter* spp. identificadas e testadas, 116 de 154 amostras anteriormente designadas como *A. anitratus* e 1 de 22 amostras de *A. lwoffi* foram capazes de produzir bacteriocinas. Em relação à sensibilidade às substâncias produzidas, 18 amostras de *Acinetobacter* foram inibidas pelas bacteriocinas produzidas por 10 amostras de *A. lwoffi* e oito amostras de *A. anitratus*. Além disso, o estudo associou a produção de bacteriocinas com resistência à gentamicina; 96% das amostras resistentes à gentamicina produziram bacteriocinas.

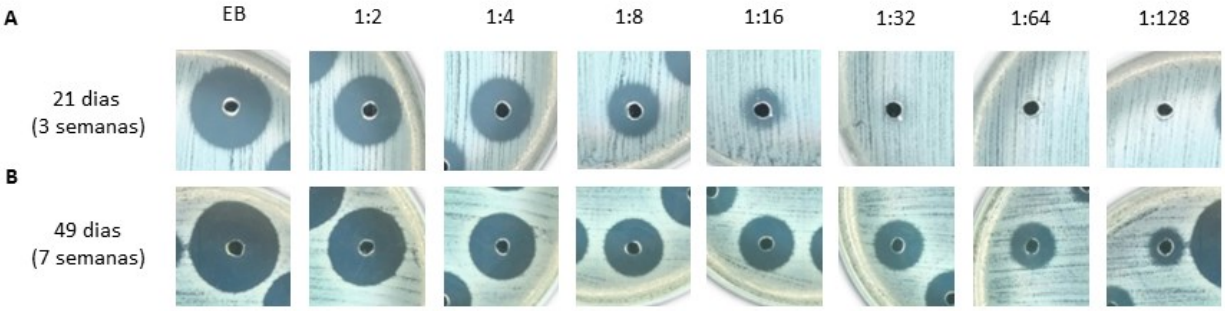
Conceição e colaboradores (2018) avaliaram dezesseis amostras do Complexo *Acb* quanto à produção de substâncias com potencial antimicrobiano e, dentre todas, três apresentaram atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares de relevância. Uma dessas amostras foi, ainda, capaz de inibir quinze amostras de *Acinetobacter*, sendo 12 MDR. Entretanto, as amostras produtoras e reveladoras pertencentes ao gênero não foram identificadas no nível de espécie, assim como a(s) substância(s)

responsável pelo fenômeno. Diferentemente do que foi descrito por Guimarães (2016), a produção da(s) substância(s) foi detectada em maior proporção quando a amostra do Complexo *Acb* foi cultivada a 37 °C, em ágar Casoy (meio simples). Quanto ao espectro de ação, observou-se atividade contra amostras filogeneticamente distintas, como *Bacillus cereus*, *Salmonela enterica* Typhi, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris*. Similarmente ao nosso estudo, a espécie produtora não foi inibida pela ação da própria substância, sendo hipotetizado, por Conceição *et al*. (2018), a presença de um mecanismo de imunidade semelhante àquele observado em bem bactérias produtoras de bacteriocinas.

Assim, a expressão de antagonismo já foi descrita para o gênero *Acinetobacter.* Porém, estudos que abordem a identificação e a caracterização das substâncias antimicrobianas não estão disponíveis na literatura, o que parece estar associado, principalmente, às dificuldades relacionadas aos processos de obtenção e purificação.

No presente estudo, a produção de substância antimicrobiana por *A. baumannii* 397 em concentrações significativas (atividade antimicrobiana até 1:16) ocorreu após três repiques semanais sucessivos da amostra produtora em TSA (GUIMARÃES, 2016). O uso de uma amostra no terceiro repique armazenada há sete semanas à temperatura de 4 °C demonstrou um aumento significativo na atividade antimicrobiana, passando de 1:16 (FIG. 1a) para 1:128 (FIG. 1b). Acredita-se que essa alteração esteja relacionada ao estímulo à síntese da substância como resposta ao estresse imposto à amostra produtora pelo longo período de armazenamento à temperatura de 4 °C.

FIGURA 1 – Alteração da atividade antimicrobiana de *Acinetobacter baumannii* 397 pelo longo período de armazenamento da cultura em baixa temperatura (4 °C)



Atividade antimicrobiana de *A. baumannii* 397, método de *spread plate*, em *Mueller Hinton* Ágar - MHA, extrato bruto diluído (1:2 a 1:128) em água MilliQ, incubado a 37 °C, por 20 h. **A**, atividade antimicrobiana do extrato bruto obtido após 21 dias de armazenamento a 4°C (atividade até 1:16); **B**, atividade antimicrobiana do extrato bruto obtido após 49 dias de armazenamento a 4°C (atividade até 1:128). EB, extrato bruto, amostra reveladora, *A. baumannii* 294.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1 Localização do gene

A nossa primeira hipótese foi de que o gene que codifica a substância antimicrobiana estivesse localizado em um plasmídio, visto que grande parte das substâncias antagonistas são codificadas por genes plasmidiais (CASCALES *et al*., 2007; CHAVAN, M. A.; RILEY, M. A, 2007; MICENKOVÁ, L. *et al*., 2019). Como a amostra produtora é resistente a várias classes de antimicrobianos (APÊNDICE 1) e grande parte dos genes de resistência são carreados por plasmídios (CARATTOLI, 2013), a hipótese de que ela albergue plasmídio(s) é plausível. Para verificar esta hipótese, a amostra de *A. baumannii* 397 foi submetida à miniprep caseira, para extração do possível plasmídio.

5.1.1 Extração plasmidial, transformação e expressão heteróloga em sistema *E. coli* BL21

A amostra *A. baumannii* 397 foi submetida à extração plasmidial por lise alcalina e durante a análise do gel de agarose a 1%, observou-se a presença de uma banda com altura próxima à banda de 12 kb do padrão de massa molecular (FIG. 2a), revelando a presença de um plasmídio. Entretanto, apenas esta confirmação não

seria suficiente para responder à pergunta sobre a localização do gene que codifica a substância antimicrobiana.

Após comprovação de que a amostra *A. baumannii* 397 albergava um plasmídio selvagem, uma linhagem de *E. coli* (BL21 star) sabidamente resistente à substância e incapaz de produzi-la (FIG. 3) foi transformada com o plasmídio selvagem. A reação de transformação foi semeada em ágar LB contendo, individualmente, três diferentes antimicrobianos, canamicina, ampicilina e cloranfenicol. O emprego de três antimicrobianos deve-se à ausência de informações relacionadas ao(s) gene(s) associado(s) à resistência antimicrobiana carreado(s) pelo plasmídio selvagem.

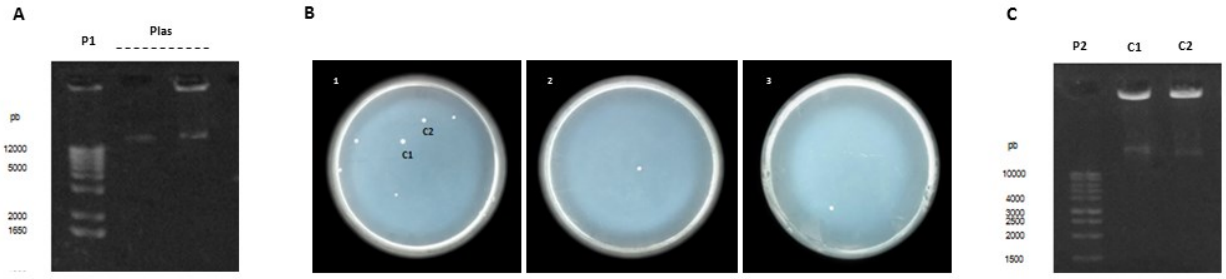
Após incubação nas condições necessárias para se avaliar a eficiência da transformação, observou-se a presença de colônias em todas as placas. Na placa contendo canamicina (FIG. 2b1), foram recuperadas seis colônias e nas placas contendo cloranfenicol e ampicilina (FIG. 2b2 e 2b3), recuperou-se apenas uma colônia em cada. Dentre todas as colônias isoladas, foram selecionadas duas colônias recuperadas do meio com canamicina para os testes subsequentes, sendo denominadas de clone 1 (C1) e clone 2 (C2) (FIGURA 2c).

Os clones C1 e C2 expressaram atividade antimicrobiana em todos os meios de cultura empregados, à temperatura de 25 °C (FIG.3), característica condizente com aquela descrita em trabalho prévio conduzido pelo nosso grupo (GUIMARÃES, 2016). Esse resultado confirma que o gene que codifica a substância antimicrobiana está localizado no plasmídio selvagem.

Dentre todos os meios de cultura empregados, BHIA-S permitiu a formação de halos de inibição maiores e mais límpidos. Porém, é um meio de cultura rico do ponto de vista nutricional, o que dificultaria as etapas posteriores de purificação da substância. Por esta razão, não foi empregado nas etapas subsequentes do estudo.

A canamicina inibiu a amostra reveladora (*A. baumannii* 294), sendo excluída do estudo. Os testes de atividade foram realizados com meios de cultura contendo cloranfenicol, com exceção do BHIA-S. Resultados satisfatórios foram obtidos em TSA e ágar LB. Assim, estes meios de cultura foram selecionados para emprego nas etapas posteriores do estudo (FIG.3).

FIGURA 2 – Extração plasmidial e transformação em sistema *E. coli* BL21 quimiocompetente



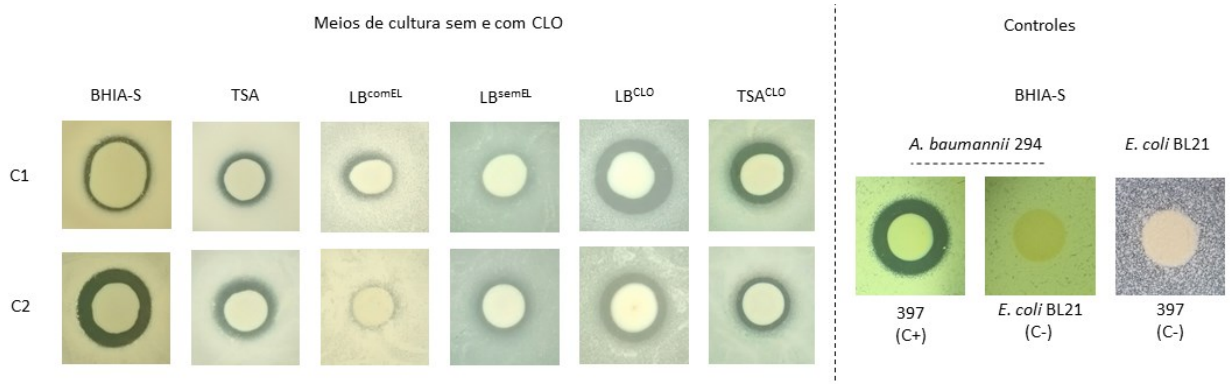
DNA plasmidial isolado da amostra *A. baumannii* 397 e transformação em sistema *E. coli* BL21 quimiocompetente. A e C, gel de agarose a 1%, corado com *GelRed,* visualizado em *Gel Doc Ez System*. **A**, miniprep caseira realizada em duplicata, presença de uma banda com peso molecular próximo a 12 kb, sugestiva de um plasmídio. P1, padrão de massa molecular 1kb *plus DNA ladder* (100 a 12000 pb, Invitrogen); Plas, amostras de DNA em duplicata extraídas de *A. baumannii* 397 por lise alcalina; pb, pares de base. **B**, BL21 transformada com plasmídio selvagem por choque térmico, semeada em ágar LB com diferentes antimicrobianos, **b1**, reação de transformação semeada em ágar LB ágar com canamicina, onde é possível observar a presença de seis colônias; **b2** e **b3**, reação de transformação semeada em ágar LB com cloranfenicol e ampicilina, respectivamente, com a presença de uma colônia em cada placa. C1 e C2, colônias selecionadas para emprego nas próximas etapas do estudo. **C**, presença de bandas com massa molecular superior a 10 kb, semelhante àquela observada na imagem A. P2, padrão de massa molecular 1kb *DNA Ladder* (250 a 10000 pb, Promega); C1 e C2, DNA plasmidial extraído dos clones C1 e C2, respectivamente, por lise alcalina.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre as substâncias antimicrobianas codificadas por plasmídios, merecem destaque as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas, codificadas por pCol, já tendo sido relatadas em diversos gêneros bacterianos clinicamente relevantes, como *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia, Shigella* e *Enterobacter,* dentre outros (CASCALES *et al*., 2007).

Damaceno e colaboradores (2015), associaram a produção de substâncias antimicrobianas por bactérias resistentes a antimicrobianos à presença de plasmídios. Os autores estudaram quinze amostras de bactérias Gram negativas isoladas de queijo, dessas, quatro foram identificadas como pertencentes ao Complexo *Acb* e albergavam pequenos plasmídios, sendo três MDR. Todas as amostras foram ativas contra *Salmonella entérica* ATCC 19214 e *E. coli* ATCC 25922. Os resultados do presente estudo corroboram esses dados, com exceção do

espectro de ação, já que *A. baumannii* 397 e *E. coli* transformada são ativas apenas contra amostras de *A. baumannii*.

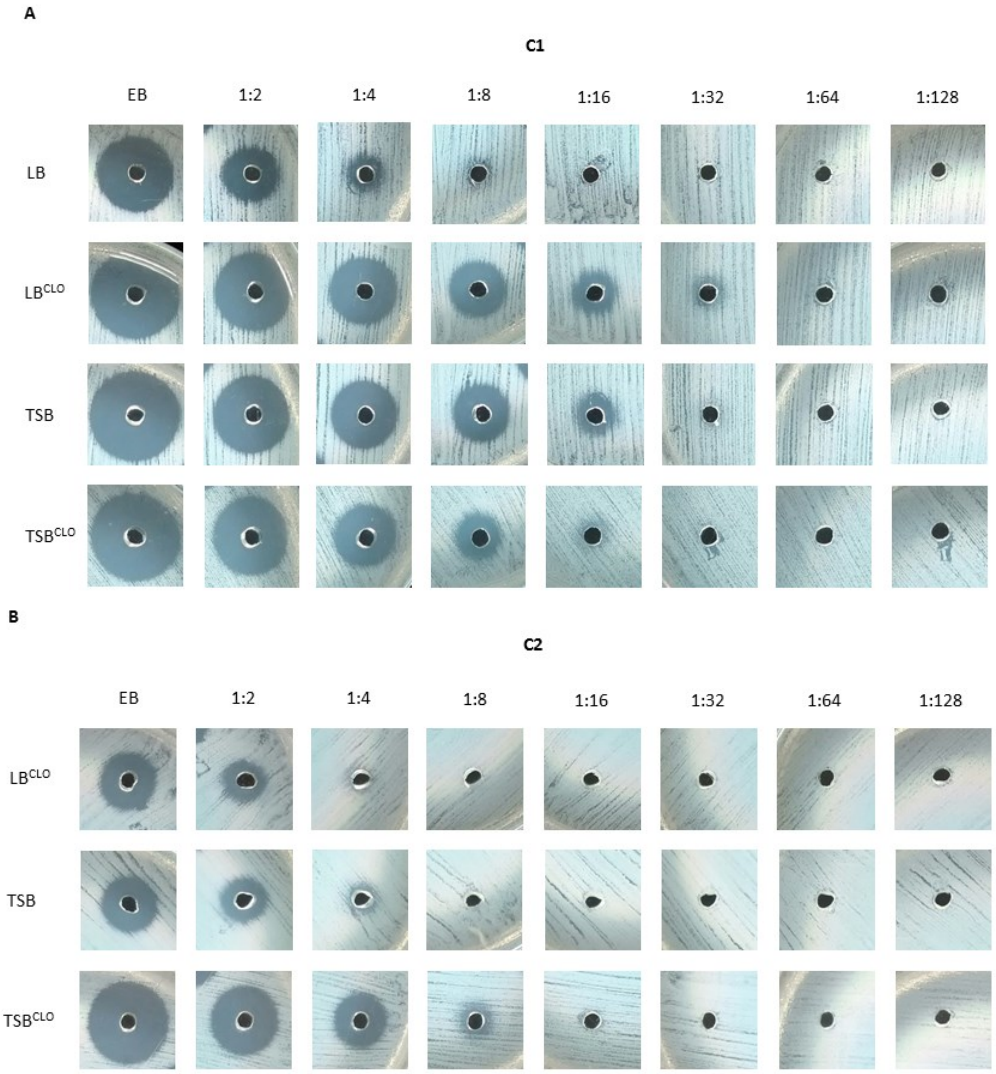
FIGURA 3 – Atividade antimicrobiana dos clones C1 e C2 em diferentes meios de cultura



Atividade antimicrobiana dos clones C1 e C2, em diferentes meios de cultura, com e sem a adição de cloranfenicol. Presença de halos de inibição da amostra reveladora (*A. baumannii* 294) em todas as placas. Técnica de sobrecamada, incubação a 25 °C, por 20 h. C1, clone C1; C2, clone C2; BHIA-S, *Brain Heart Infusion* Ágar suplementado com extrato de levedura; TSA, *Tryptic Soy* Ágar; $LB^{com\ EL}$, *Luria Bertani* com extrato de levedura; $LB^{sem\ EL}$, *Luria Bertani* sem extrato de levedura; LB^{CLO}, *Luria Bertani* com cloranfenicol; TSA^{CLO}, *Tryptic Soy* Ágar com cloranfenicol. Controles, teste de sobrecamada em BHIA-S, 397 (C+), controle positivo, *A. baumannii* 397 contra *A. baumannii* 294; *E. coli* BL21 não transformada (C-), controle negativo, *E. coli* BL21 não transformada contra *A. baumannii* 294; *A. baumannii* 397 (C-), controle negativo, *A. baumannii* 397 contra BL21 não transformada.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os clones C1 e C2 foram, então, submetidos à técnica de precipitação ácida, empregando-se os meios TSB e caldo LB com e sem cloranfenicol. Os extratos brutos obtidos a partir do clone C1 (FIG. 4a) foram mais ativos, quando comparados com aqueles obtidos pelo clone C2 (FIG. 4b). O extrato bruto obtido a partir do clone C2 cultivado em LB sem cloranfenicol não apresentou atividade detectável, o que pode ser decorrente da baixa concentração da substância.

FIGURA 4 – Titulação dos extratos brutos obtidos a partir do cultivo dos clones C1 e C2 em TSB e LB caldo, com e sem cloranfenicol



Titulação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos a partir dos clones C1 e C2 cultivados em caldo LB e TSB com e sem cloranfenicol, técnica de *spread plate*. A titulação foi realizada em meio MHA, incubado a 37 °C, por 20 h, amostra reveladora *A. baumannii* 294. C1, clone C1; C2, clone C2; CLO, cloranfenicol. **A**, atividade antimicrobiana de C1: caldo LB, 1:4, caldo LB com cloranfenicol, 1:16; TSB, 1:16; TSB com cloranfenicol, 1:8. **B**, atividade antimicrobiana de C2: caldo LB com cloranfenicol, 1:2; TSB, 1:2; TSB com cloranfenicol, 1:4.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A expressão da substância pelo sistema *E. coli* BL21 transformado apresentou algumas vantagens quando comparado com a expressão por *A. baumannii* 397, tais como, maior rendimento, baixo risco de manipulação, já que *A. baumannii* expressa diferentes mecanismos de patogenicidade (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017), e síntese da substância em meios de cultura básicos. Com base no rendimento e

titulação dos extratos brutos, optou-se por dar continuidade ao estudo empregando-se apenas o clone C1.

5.1.2 PURIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os extratos brutos sabidamente ativos obtidos a partir da amostra C1, previamente cultivada em TSB e caldo LB com e sem cloranfenicol, foram submetidos a etapas de cromatografia de fase reversa. Para cada meio de cultura, foram realizadas duas corridas cromatográficas em coluna LC-8 Supelcosil™ (TAB. 1), sendo geradas 11 frações ativas para caldo LB com e sem antibiótico (frações 32 a 42) (FIG. 5a e b), e 14 frações ativas para TSB com e sem antibiótico (frações 32 a 45) (FIG. 6 a e b).

Os *pools* das frações ativas (TAB. 2) foram encaminhados para "recromatografia" de fase reversa, em coluna C-18 Sephasil™ Peptide. A partir dessas corridas, foram recuperadas as seguintes frações ativas: fração 37 (LB com e sem cloranfenicol) (FIG. 7) e frações 36 a 39 (TSB com e sem cloranfenicol) (FIG. 8). *Pools* foram gerados em decorrência do baixo rendimento do processo, sendo necessária a obtenção de um volume considerável para aplicação na etapa cromatográfica subsequente.

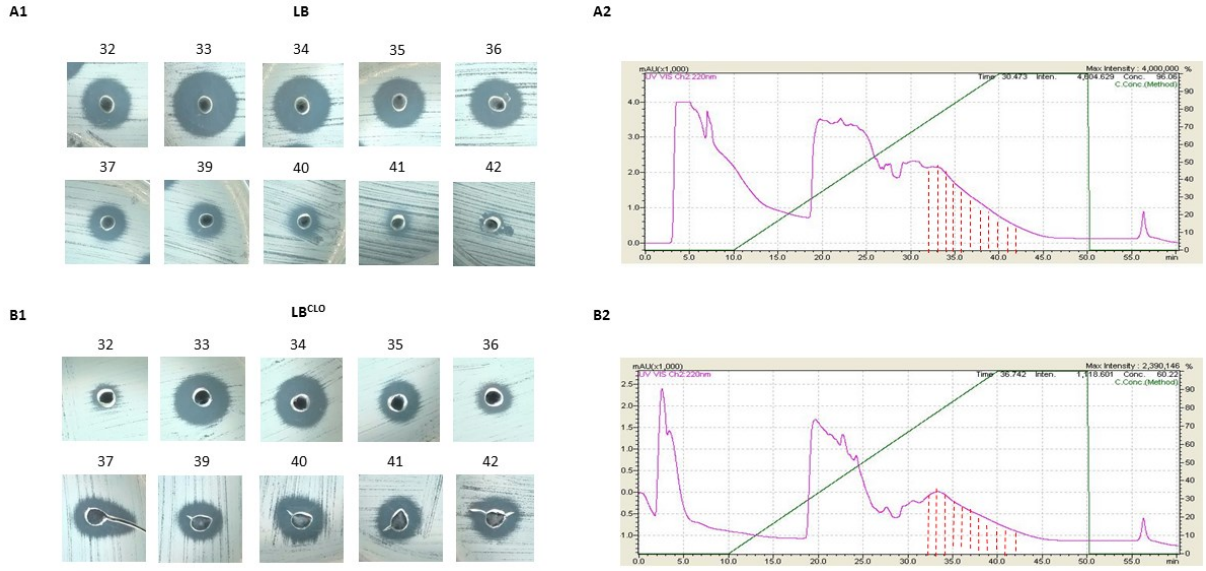
TABELA 1 – Primeira sequência de purificação em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™: frações ativas e *pools* correspondentes

CORRIDAS	FRAÇÕES ORIGINADAS DA CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA COLUNA C-8	**FRAÇÕES ATIVAS**	*POOLS* GERADOS E ENCAMINHADOS PARA "RECROMATOGRAFIA" DE FASE REVERSA COLUNA C-18
1 (LB)	Frações 1 a 60	32 a 42	*Pool* 1
2 (LB + CLO)	Frações 1 a 61	32 a 42	*Pool* 2
3 (TSB)	Frações 25 a 50	32 a 45	*Pool* 3
4 (TSB + CLO)	Frações 25 a 50	32 a 45	*Pool* 4

LB, caldo *Luria Bertani*; CLO, cloranfenicol; TSB, *Tryptic Soy Broth*

Fonte: Elaborado pelo autor.

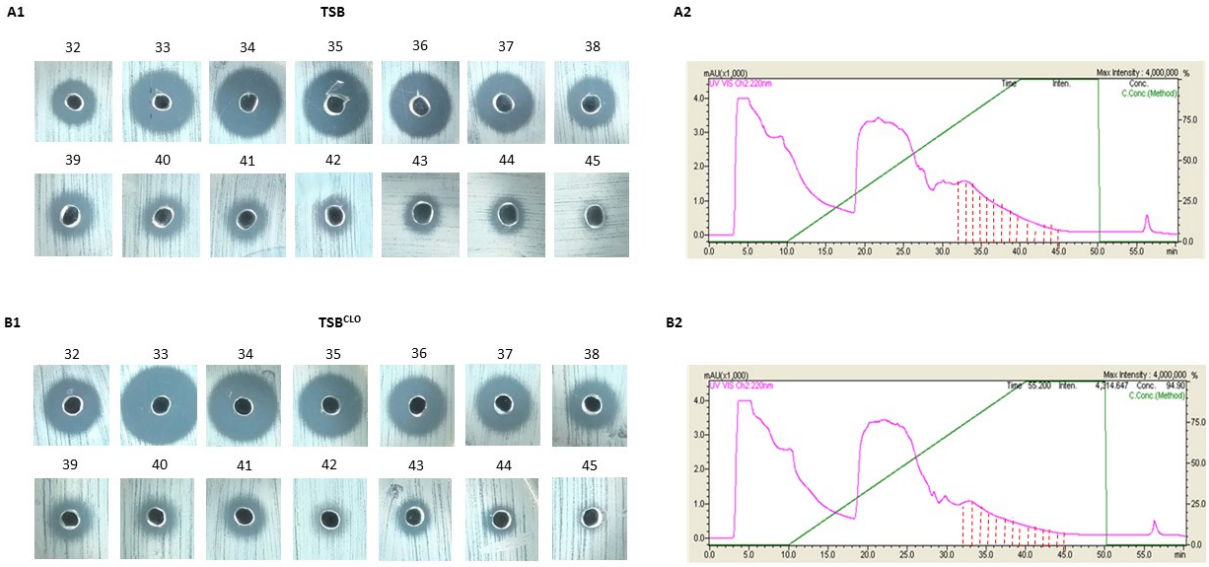
FIGURA 5 – Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 32 a 42, representadas pelas corridas: 1 (LB) e 2 (LB + CLO) obtidas por cromatografia de fase reversa, coluna LC-8 Supelcosil™



Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 32 a 42, aqui representadas pelas corridas: 1, LB e 2, LB + CLO, obtidas por cromatografia de fase reversa, coluna LC-8 Supelcosil™. Amostra reveladora *A. baumannii* 294. Técnica de *spread plate*, meio base MHA, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 20 h. LB, caldo *Luria Bertani*; CLO, cloranfenicol; TSB, *Tryptic Soy Broth,* MHA, *Muller Hinton Ágar.* **A, a1**, atividade antimicrobiana das frações obtidas em LB; **a2**, perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™ da corrida 1; frações ativas 32 a 42, eluídas com solução B (acetonitrila - acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa) e gradiente de acetonitrila 0 a 100% (verde), a 25 °C. **B, b1**, atividade antimicrobiana das frações obtidas em LB + CLO; **b2**, perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™ da corrida 2; frações ativas 32 a 42, eluídas nas mesmas condições descritas em a2. Presença de um pequeno pico entre as frações 33 a 35.

Fonte: Elaborado pelo autor.

FIGURA 6 – Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 32 a 45, representadas pelas corridas: 3 (TSB) e 4 (TSB + CLO), obtidas por cromatografia de fase reversa, coluna LC-8 Supelcosil™



Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 32 a 45, aqui representadas pelas corridas: 3, TSB e 4, TSB + CLO, obtidas por cromatografia de fase reversa, coluna LC-8 Supelcosil™. Amostra reveladora *Acinetobacter baumannii* 294. Técnica de *spread plate*, meio base MHA, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 20 h. CLO, cloranfenicol; TSB, *Tryptic Soy Broth,* MHA, *Muller Hinton Ágar.* **A**, **a1**, atividade antimicrobiana das frações obtidas em TSB; **a2**, perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™ da corrida 3; frações ativas 32 a 45, eluídas com solução B (acetonitrila - acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C. **B**, **b1**, atividade antimicrobiana das frações obtidas em TSB + CLO; **b2**, perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™ da corrida 4; frações ativas 32 a 45, eluídas nas mesmas condições descritas em a2.

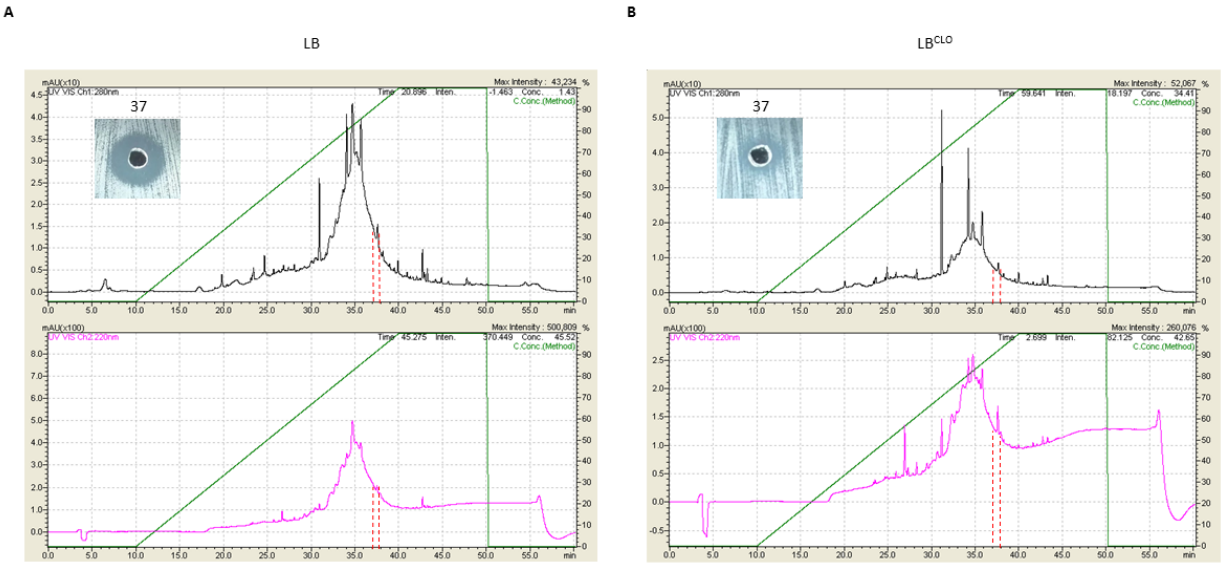
Fonte: Elaborado pelo autor.

TABELA 2 – Segunda sequência de purificação: frações ativas originadas da "recromatografia" em coluna de fase reversa LC-18 Sephasil™ Peptide

***POOLS*/ CORRIDAS**	FRAÇÕES ORIGINADAS DA "RECROMATOGRAFIA" DE FASE REVERSA COLUNA C-18	**FRAÇÕES ATIVAS**
Pool 1	Frações 1 a 60	37
Pool 2	Frações 1 a 61	37
Pool 3	Frações 25 a 45	36 a 39
Pool 4	Frações 25 a 45	36 a 38

Fonte: Elaborado pelo autor.

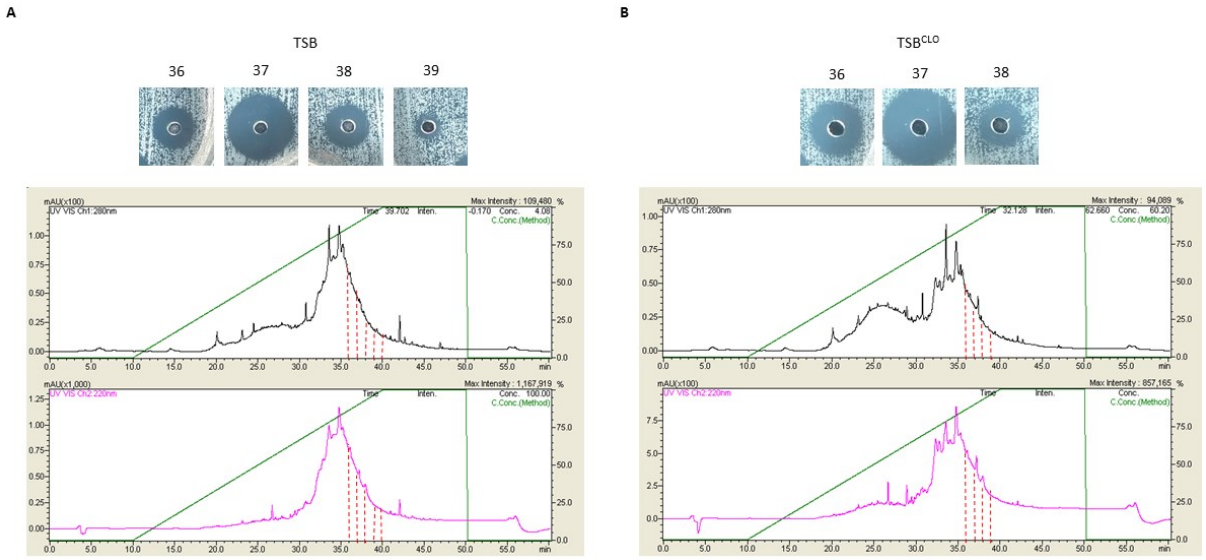
FIGURA 7 – Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 37, *pools* 1 (LB) e 2 (LB + CLO), obtidas por "recromatografia" de fase reversa em coluna C-18 Sephasil™ Peptide



Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 37, obtidas por "recromatografia" em coluna C-18 Sephasil™ Peptide. Amostra reveladora *Acinetobacter baumannii* 294. Técnica de *spread plate*, meio base MHA (*Muller Hinton Ágar)*, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 20 h. **A**, *pool* 1, fração ativa 37; **B**, *pool* 2, fração ativa 37. As frações foram eluídas com solução B (acetonitrila - acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 280 nm (preto), 220 (rosa) e gradiente de acetonitrila 0 a 100% (verde), a 25 °C.

Fonte: Elaborado pelo autor.

FIGURA 8 – Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações 36 a 39, *pool* 3 (TSB) e 36 a 38, *pool* 4 (TSB + CLO) obtidas por "recromatografia", em coluna C-18 Sephasil™ Peptide



Atividade antimicrobiana e perfil cromatográfico das frações das frações 36 a 39, *pool* 3; e 36 a 38, *pool* 4, obtidas por "recromatografia" em coluna C-18 Sephasil™ Peptide. Amostra reveladora *Acinetobacter baumannii* 294. Técnica de *spread plate*, meio base MHA (*Muller Hinton Ágar)*, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 20 h. **A**, *pool* 3, frações ativas 36 a 39; **B**, *pool* 4, frações ativas 36 a 38. As frações foram eluídas com solução B (acetonitrila - acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 280 nm (preto), 220 (rosa) e gradiente de acetonitrila 0 a 100% (verde), a 25 °C.
Fonte: Elaborado pelo autor.

As frações ativas contra *A. baumannii* 294 recuperadas durante todo o processo de cromatografia apresentaram maior tempo de retenção em coluna de fase reversa, tendo sido eluídas com altas concentrações de acetonitrila (80 a 100%), sugerindo caráter hidrofóbico da molécula ativa.

Como não existe uma padronização específica para o processo de purificação de proteínas "desconhecidas", o procedimento foi realizado às escuras, de acordo com algumas características da substância, desvendadas ao longo do estudo. O método de extração foi o primeiro parâmetro analisado. Acredita-se que a técnica de precipitação ácida represente uma etapa preliminar de purificação, partindo-se do pressuposto de que poucas substâncias manteriam-se estáveis em pH 2. A sequência de purificação empregando diferentes tipos de cromatografia não foi

seguida. Como estratégia de purificação, realizou-se apenas a cromatografia líquida de fase reversa, empregando-se duas colunas distintas, a LC-8 Supelcosil™ e a C-18 Sephasil™ Peptide.

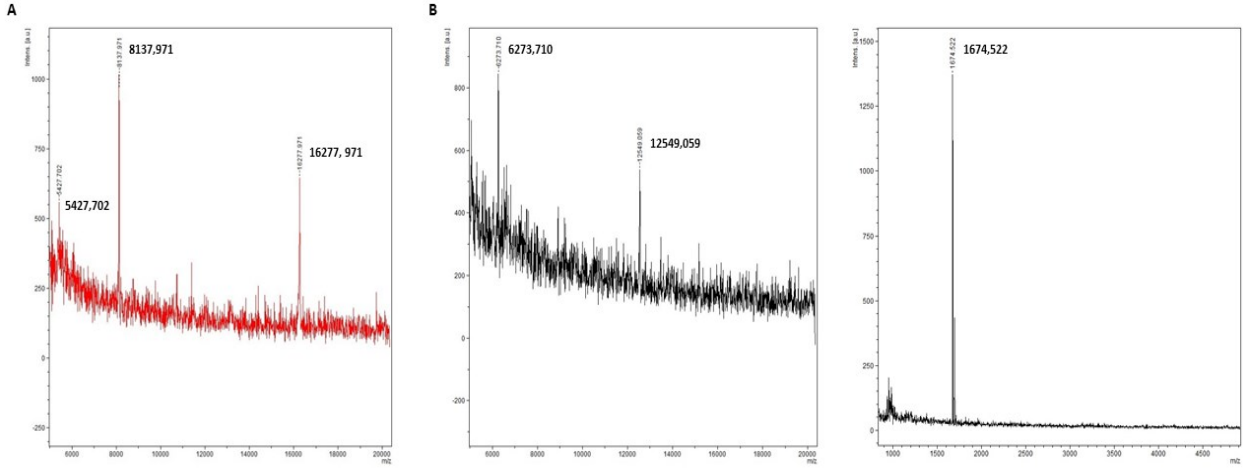
Apesar dos perfis cromatográficos obtidos na última etapa de cromatografia não sugerirem a presença de frações purificadas, optou-se, mesmo assim, por analisá-las em espectrometria de massas e compará-las com os espectros recuperados nas mesmas condições durante purificação do extrato bruto de *A. baumannii* 397 por Guimarães (2016).

Durante análise por espectrometria de massas em matriz DHB, a fração 37 (*pool 1*) não apresentou nenhum íon. Já a fração 37 (*pool* 2), apresentou três íons, de 5427,702, 8137,971 e 16277,971 Da (FIG.9a).

As frações obtidas a partir do *pool* 3, apresentaram os seguintes íons: fração 36, íon de 1672 Da; fração 37, íons de 1694 Da e 1333,74 Da e fração 38, íons de 1674,522; 6273 e 12649 Da (FIG.9b). As frações 36 a 38, *pool* 4, não apresentaram nenhum íon. Íons inferiores a 1 kDa, provavelmente, estão relacionadas a sinais da matriz empregada para análise (SMIRNOV *et al*., 2004).

Dentre todos os espectros analisados, é possível verificar a presença de uma fração purificada, a fração 37, oriunda do *poo*l 2 (LB + CLO). Os íons de 8137,971 e 5427,702 Da são dicarga (+2) e tricarga (+3), respectivamente, do íon de 16277,971 Da (monocarga, +1). Entretanto, a intensidade de sinal desfavorável impossibilitou a fragmentação e o sequenciamento em espectrômetro de massa. Perfis de íons semelhantes foram observadas durante expressão em *A. baumannii* 397, sendo, 6.232,067; 8445,047; 12466,319 e 16890,599 Da. Neste momento, todas os íons estavam presentes em uma mesma fração (GUIMARÃES, 2016) (APÊNDICE Eb2).

FIGURA 9 – Espectro de massas em matriz DHB das frações ativas obtidas por cromatografia de fase reversa em coluna C-18 Sephasil^{TM} Peptide



Espectros de massas em matriz DHB (ácido 2,5-di-hidroxibenzoico) das frações obtidas na última etapa de cromatografia em coluna C-18 Sephasil^{TM} Peptide. **A**, fração 37 (*pool* 2), presença de três íons de 5427,702; 8137,971 e 16277,971 Da. **B**, fração 38 (*pool* 3), presença dois íons, 6273,710; 12649 Da (esquerda) e 1674,522 Da (direita). Intensidade relativa *versus* função massa sobre carga (m/z).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar da produção da substância em *E. coli* BL21 C1 ter sido possível em meios de cultura básicos e o rendimento ter sido significativo, o que favoreceria a obtenção de uma fração pura, a baixa concentração da fração purificada comprometeu o sequenciamento e a identificação da substância por espectrometria de massas. O baixo rendimento do protocolo de purificação pode ser atribuído a uma questão técnica.

Além disso, o baixo rendimento da fração purificada impossibilitaria a caracterização futura da substância, o que inviabilizou o emprego do sistema *E. coli* BL21 transformado com o plasmídio selvagem nas etapas posteriores do estudo. A partir desses resultados, optou-se por sequenciar o plasmídio em busca do gene que codifica a substância.

5.2 Sequenciamento

5.2.1 MONTAGEM *DE NOVO*

O sequenciamento do plasmídio selvagem, isolado inicialmente de uma amostra clínica de *A. baumannii,* empregando o sequenciador Illumina MiSeq, gerou 8004 *reads*, com comprimento de 301 pb/cada (2 x 301), totalizando 4.818.408 pares de bases, com cobertura estimada em 436 vezes (número de vezes, em média, que cada base foi sequenciada). A montagem *de novo* originou um único *contig* de 11.060 pb, com conteúdo de G+C de 36,2%. O cálculo de cobertura foi realizado empregando-se o total de pares de bases sequenciados dividido pelo tamanho do genoma.

A sequência plasmidial apresentou 100% de identidade com uma região de 6809 pb de uma outra sequência plasmidial de *A baumannii* (19808 pb) depositada no *GenBank* (número de acesso MK323042). Essa sequência foi depositada por pesquisadores do Laboratório Nacional de Computação Científica, de Petrópolis, Rio de Janeiro, mas os dados ainda não foram publicados.

Normalmente, plasmídios isolados de *A. baumannii* apresentam conteúdo GC de, aproximadamente, 40% (DORTET *et al*., 2016; JONES *et al*., 2015), concentração próxima àquela encontrada no plasmídio selvagem sequenciado nesse estudo.

5.2.2 ANOTAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL

Plasmídios isolados de *A. baumannii* são amplamente estudados. Diversas sequências plasmidiais são depositadas rotineiramente em bancos de dados, mas, os estudos abordam a busca de novos genes associados à resistência a antimicrobianos e/ou possíveis variantes de genes já caracterizados. Como mencionado, poucos estudos exploram a anotação funcional dos genes encontrados, principalmente daqueles cuja função é desconhecida (HAMIDIAN; AMBROSE; HALL, 2016), comprometendo, assim, a descoberta de novas substâncias bioativas.

Foram anotadas 12 ORFs no plasmídio selvagem sequenciado (TAB. 3 e FIG. 10). Três ORFs codificam proteínas hipotéticas, nomeadas proteína hipotética 1 (HP1),

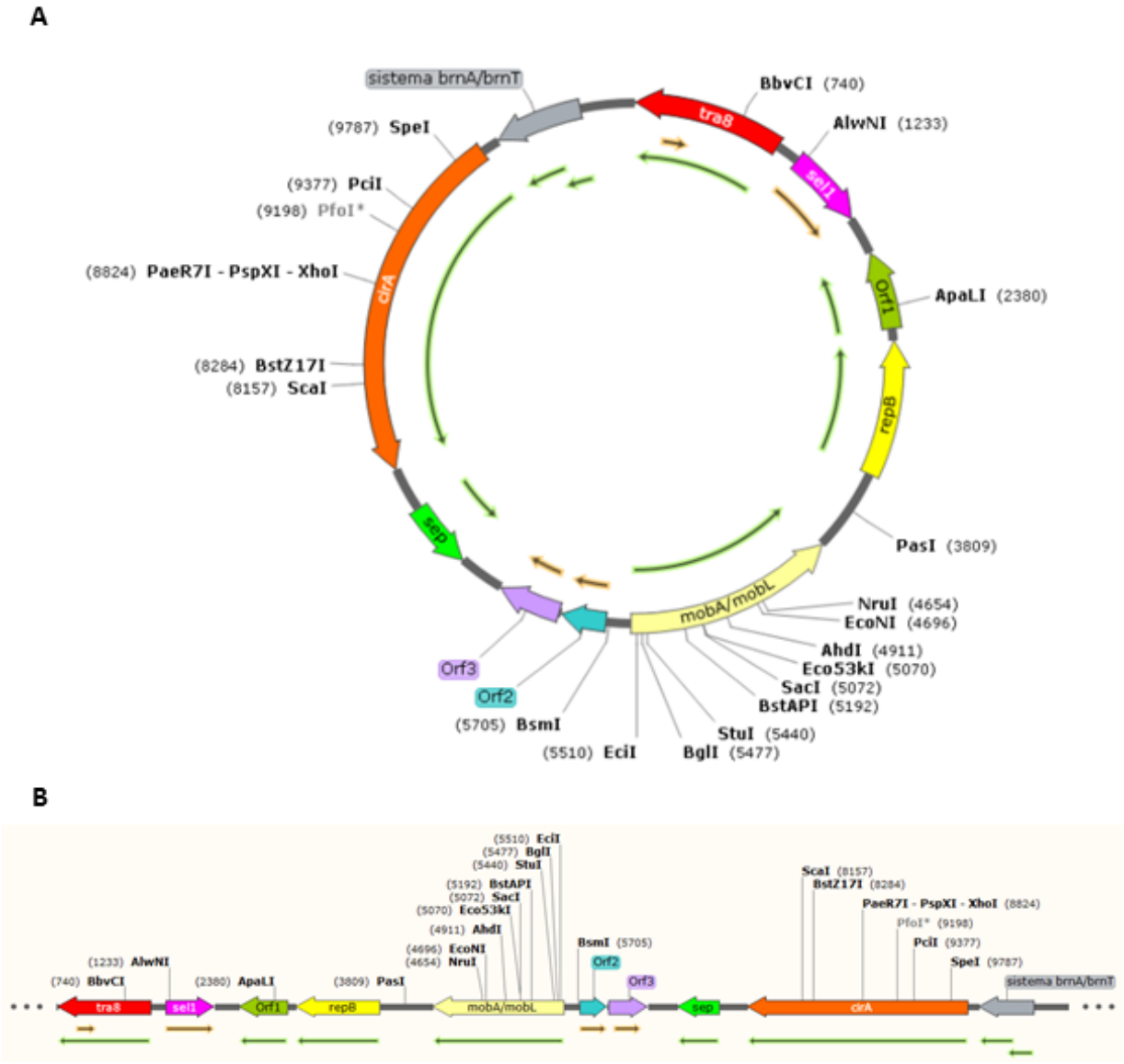
proteína hipotética 2 (HP2) e proteína hipotética 3 (HP3). Duas ORFs codificam proteínas essenciais para a manutenção do plasmídio, uma proteína que inicia a replicação do DNA plasmidial, da família RepB, e uma proteína de mobilização (mobA/mobL). Duas ORFs estão relacionadas a sistemas versáteis de aquisição e dispersão de genes, transposase e integrase. Além dessas, foram identificadas duas ORFs relacionadas à patogenicidade, *cirA* e *septicolysin*, uma ORF que codifica uma proteína de repetição, *sel1*, e duas ORFs envolvidas no sistema de segregação plasmidial eficiente (sistema toxina antitoxina BrnT/BrnA).

Pequenos plasmídios carreados por *A. baumannii* apresentam tamanho e anotação estrutural e funcional similares, com pequenas modificações. Por exemplo, o plasmídio pAB52, isolado por Chang e colaboradores (2015) de uma amostra da bactéria identificada em um hospital na China, apresenta 8893 pb, 10 ORFs, sendo todas semelhantes àquelas encontradas nesse estudo. O que as diferem são as proteínas hipotéticas e o tipo de sistema toxina-antitoxina (SpIT/SpIA). Resultados semelhantes também foram obtidos por Lean e colaboradores (2015 e 2016), relativos aos plasmídios pAC12, pAC29a e pAC30a.

Não foi detectado nenhum gene que codifica resistência a antimicrobianos no plasmídio selvagem. Em contraste, a amostra de *E. coli* BL21 transformada (C1) foi resistente a quase todas as classes de antimicrobianos testadas, padrão muito discrepante daquele da amostra não transformada, *E. coli* BL21 ($p < 0,05$), que apresenta perfil de suscetibilidade semelhante à amostra de *A. baumannii* 397 que alberga naturalmente o plasmídio (FIG. 11 e APÊNDICE D).

A ausência de gene(s) que codificam resistência antimicrobiana em plasmídios selvagens carreados por amostras de *A. baumannii* foi reportada por Lean e colaboradores (2016). Dois pequenos plasmídios, pAC29a e pAC30a, ambos do mesmo tamanho, isolados de duas amostras nosocomiais de *A. baumannii*, de diferentes pacientes, não apresentaram genes associados à resistência a antimicrobianos. Eram constituídos por nove ORFs, na grande maioria, similares às descritas no presente estudo.

FIGURA 10 – Representação esquemática do plasmídio selvagem, linear e circular

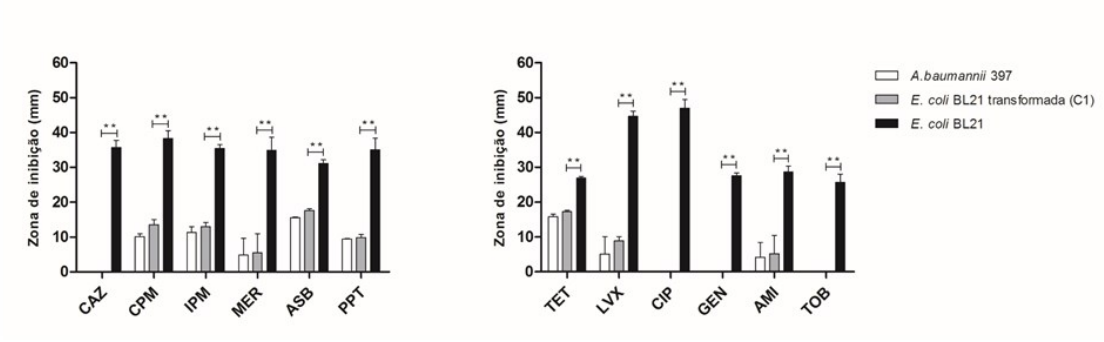


Representação esquemática do plasmídio selvagem, circular (A) e linear (B), com os respectivos sítios para enzimas de restrição (em preto). Setas finas alaranjadas, ORFs preditas sentido 5’ - 3’; setas finas verdes, ORFs preditas sentido 3’ - 5’; setas espessas coloridas, genes e/ou sistemas anotados; traços cinzas, sequências não codificadoras de proteínas; o nome dos genes e os respectivos produtos encontram na tabela 3. Desenhos do plasmídio foram realizados no *SnapGene*® *Viewer* 2.8.1.

Fonte: Elaborado pelo autor.

FIGURA 11 – Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras de *Escherichia coli* BL21 transformada (C1) e não transformada e de *Acinetobacter baumannii* 397

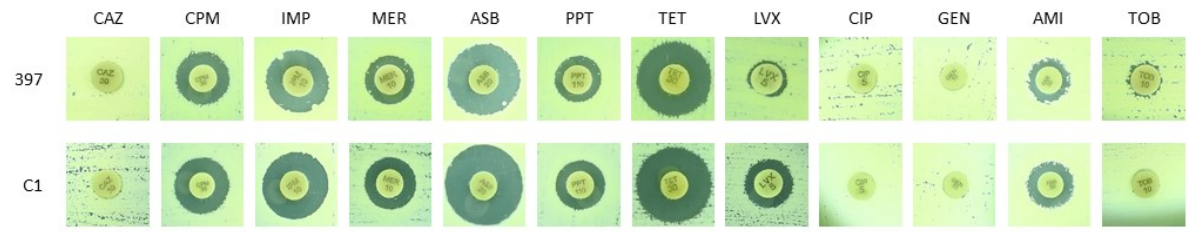
A1



A2

Amostras	Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos											
	CAZ	CPM	IPM	MER	TET	ASB	PPT	LVX	CIP	GEN	AMI	TOB
E. coli BL21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E. coli BL21 - T	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
A. baumannii 397	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R

B



Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras de *E. coli* BL21 transformada (C1) e não transformada com o plasmídio selvagem e de *A. baumannii* 397 que alberga naturalmente a molécula. **A, a1**, comparação do diâmetro das zonas de inibição das amostras contra diferentes antimicrobianos. Eixo y, diâmetro (mm) das zonas de inibição das amostras; eixo x, antimicrobianos de seis diferentes classes utilizados para avaliar do perfil de suscetibilidade, ceftazidima (CAZ), cefepime (CPM), imipenem (IMP), meropenem (MER), ampicilina-sulbactam (ASB), piperacilina-tazobactam (PPT), tetraciclina (TET), levofloxacina (LVX), ciprofoxacina (CIP), gentamicina (GEN), amicacina (AMI), tobramicina (TOB). A ausência de barras indica zona de inibição igual 0,00 mm; **, representa a diferença estatística observada entre a amostra de *E. coli* BL21 transformada (C1) e *E. coli* BL21 (*One-way* ANOVA, *p <0,01, GraphPad* Prism 5.01). **a2**, resistente (R, vermelho); sensível (S, verde). A amostra de *E. coli* não transformada foi sensível a todos os antimicrobianos testados, já as amostras que albergam o plasmídio foram sensíveis apenas a TET e ASB. **B**, ilustra a similaridade do perfil de suscetibilidade das amostras de *A. baumannii* 397 e *E. coli* transformada (C1) no teste de disco difusão.

Fonte: Elaborado pelo autor.

TABELA 3 – Caracterização parcial do plasmídio selvagem: localização, tamanho e predição funcional das ORFs

Nome do Gene[a]	Localização (nt)	Comprimento (nt/aa)	Produto	n° de acesso *subject*	n° de acesso *pfam* e cd *query*
tra8	8 – 1033	1026/341	Transposase da família *ISAba125*, elemento como o IS30	WP_079284757.1	pfam13936
int1	211 – 438	228/75	Integrase (Superfamília rve)	WP_079284757.1	pfam00665
sel1	1191 – 1733	543/180	Proteína de repetição da família Sel 1	WP_001988126.1	pfam08238
orf 1	1997 – 2530	534/177	Proteína hipotética[1]	WP_033107830.1	Adc
repB	2615 – 3538	924/307	Proteína iniciadora da replicação de plasmídios da família Rep-3	WP_033107831.1	pfam01051
mobA/mobL	4114 – 5550	1437/478	Proteína de mobilização (nickase)	WP_033107832.1	pfam03389
orf 2	5721 – 6026	306/101	Proteína hipotética[2]	WP_000901332.1	Adc
orf 3	6044 – 6475	432/143	Proteína hipotética[3]	WP_000390052.1	Adc
Sep	6792 – 7253	462/153	Septicolisina (Família de citolisinas dependentes de colesterol)	WP_042784638.1	cd12208
cirA	7558 – 9969	2412/803	Receptor dependente de TonB	WP_012754356.1	pfam00593
brnA antitoxin	10097 – 10405	309/102	Componente antitoxina BrnA (sistema toxina-antitoxina)	WP_088774142.1	pfam14384
brnT toxin	10398 – 10694	297/98	Toxina da família BrnT (sistema toxina-antitoxina)	WP_000465836.1	pfam04365

[a], análise por similaridade em BlatP (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov); nt, nucleotídio; aa, aminoácido; *subject*, sequência com identidade superior a 90%, depositada no BlastP; adc, ausência de domínio conservado; [1], proteína hipotética 1; [2], proteína hipotética 2; [3], proteína hipotética 3; cd, *Conserved Domains* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd); pfam, *Protein Families Database* (http://pfam.xfam.org). Fonte: Elaborado pelo autor.

Plasmídios de *A. baumannii* têm sido classificados de acordo com a proteína iniciadora da replicação (Rep), já tendo sido descritos 19 grupos (GR1 a GR19). Grande parte dos plasmídios isolados albergam proteínas da família Rep3, algumas codificadas por *repB*. O gene, geralmente, é precedido por três a seis sequências de repetição (aproximadamente 19 a 22 nt). Em enterobactérias, essas regiões atuam como origem de replicação (BERTINI *et al*., 2010; LEAN; YEO, 2017). Plasmídios da superfamília Rep3 têm constituição similar, apresentando todos os genes previamente descritos nesse estudo.

Em *A. baumannii* e outras bactérias, receptores dependentes de TonB estão associados com aquisição de ferro, infecção e persistência da bactéria na corrente sanguínea, apresentando papel fundamental na patogenicidade da bactéria (HUJER *et al*., 2017). O plasmídio selvagem foi recuperado de uma amostra de *A. baumannii* isolada de hemocultura de um paciente internado em UTI; a presença da bactéria nesse sítio pode ser favorecida pela expressão desses receptores.

Outro gene relacionado à patogenicidade e que vem sendo reportado frequentemente em plasmídios da espécie é o *sep*, que codifica a septicolisina, toxina formadora de poros, membro da família das citolisinas dependente de colesterol, tendo sido bem estudada em *Clostridium septicum*, *Bacillus anthracis* e *Streptococcus pneumoniae* (LEAN *et al*., 2016), sendo prevalente em amostras clínicas. Chang e colaboradores (2015) sugerem que esse sistema favoreça a presença e a viabilidade da bactéria na corrente sanguínea e nos pulmões.

Sequências de aproximadamente 3.000 pb, constituídas pelos genes que codificam os receptores dependentes de TonB e a septicolisina, foram evidenciadas em mais de 30 sequências plasmidiais de *A. baumannii* depositadas, com mais de 99% de identidade. Essas sequências são, geralmente, encontradas em plasmídios que albergam genes associados à resistência aos carbapenêmicos (*bla*$_{OXA}$) (HUJER *et al*., 2017).

O sistema BrnT/BrnA é constituído por dois genes que codificam uma toxina e uma antitoxina, associados à manutenção do plasmídio, o que garante uma segregação eficiente. Apenas a célula filha que recebe o plasmídio mantêm-se viável. Caso a progênie não receba o plasmídio, a antitoxina é rapidamente degradada, devido à

sua instabilidade. Já a toxina, que é altamente estável, permanece e causa a morte celular. O *óperon* que codifica esse sistema tem sido descrito em mais de 40% dos plasmídios de *Acinetobacter* spp. (HUJER *et al*., 2017; LEAN; YEO, 2017). HEATON e colaboradores (2012) relataram, pela primeira vez, esse sistema, em amostra de *Brucella abortus,* caracterizando-o quanto a estrutura, bioquímica e função. É classificado como pertencente ao sistema toxina-antitoxina (TA) tipo II. Apresenta-se como um complexo tetramérico, que autorregula a expressão, mediado por estresse. Exibe organização gênica peculiar, com o gene da toxina *upstream* à antitoxina, apresentando ou não sobreposição de nucleotídeos, com função ribonucleásica *in vitro* e controle da bacteriostase *in vivo*.

O papel dos sistemas TA em bactérias patogênicas ainda não foi elucidado, acredita-se que esteja relacionado com a persistência da bactéria na infecção e a tolerância ao tratamento com fármacos antimicrobianos e mudanças ambientais (ACOSTA *et al*., 2011). Plasmídios que albergam esse sistema contribuem para a evolução da resistência a antimicrobianos, principalmente, em patógenos oportunistas, como *A. baumannii*.

LEAN *et al*. (2016) descreveram a presença do gene que codifica a proteína de repetição Sel1 em dois plasmídios isolados de amostras de *A. baumannii*. Em ambos, a proteína era flanqueada por sítios de recombinação XerC/XerD, em uma formação repetida invertida. Proteínas necessárias para essa recombinação são, geralmente, observadas intrinsecamente em *A. baumannii* e podem promover a mobilização de genes específicos, como *sel1*, no mesmo plasmídio ou entre plasmídios. Apesar dessas evidências, a função de Sel1 ainda é desconhecida. Entretanto, autores apontam algumas funções biológicas distintas para a proteína, relacionando-a com a montagem de complexos macromoleculares e com a interação entre as células do hospedeiro e o patógeno (LEAN; YEO, 2017).

Os genes mobA/mobL codificam proteínas relacionadas à mobilização do plasmídio, como a nickase, reportada frequentemente em pequenos plasmídios. Essas proteínas são necessárias para o reconhecimento e a clivagem do sítio *nic*, direcionando o transferossoma por um elemento conjugativo (BERTINI *et al*., 2010).

As principais β-lactamases reportadas em *A. baumannii* pertencem à classe D de Ambler, as oxacilinases. Os genes que codificam essas enzimas vêm sendo associados a sequências de inserção (IS), principalmente do tipo ISA*ba1*, localizadas flanqueando esses genes em posições opostas (HUJER *et al*., 2017). Sequências de inserção *upstream* a genes associados à resistência podem atuar como promotores fortes, promovendo a superexpressão da enzima e, consequentemente, resistência (DORTET *et al*., 2016; LEAN *et al*., 2016). As IS podem ser encontradas em elementos transponíveis, facilitando sua disseminação (HUJER *et al*., 2017), conforme demonstrado nesse estudo.

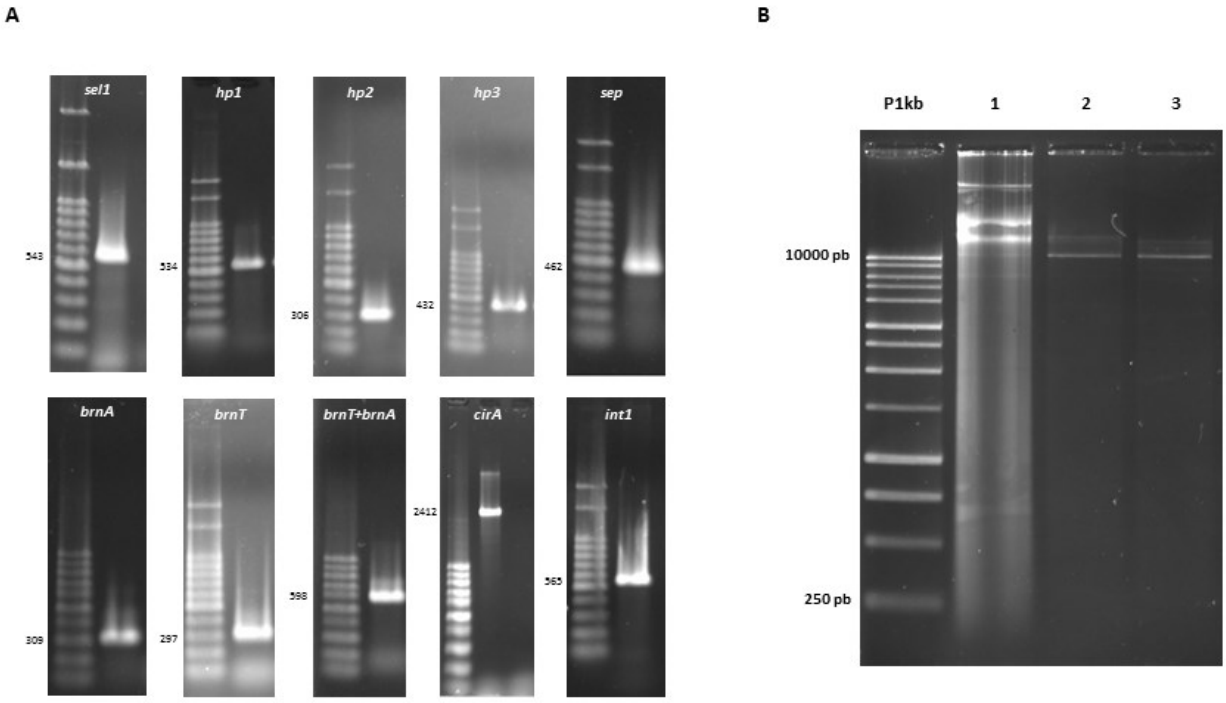
Dentre as doze ORFs anotadas e analisadas, cinco são sugestivas da substância antimicrobiana, quais sejam, as ORFs que codificam proteínas hipotéticas (1, 2 e 3), toxina BrnT e a septicolisina. Essas hipóteses são baseadas em análise funcional da ORFs anotadas e resultados anteriores de espectrometria de massas (item 5.1.2) (GUIMARÃES, 2016).

5.2.3 CONFIRMAÇÃO DA MONTAGEM DO DNA PLASMIDIAL

A montagem do DNA plasmidial foi confirmada por amplificação de nove das 12 ORFs anotadas, sendo, *sel1*, *hp1*, *hp2*, *hp3*, *sep*, *brnT*, *brnA*, *cirA*, *int1* e um sistema, *brnT-brnA*. Foi realizado um gradiente de temperatura de anelamento para cada par de iniciador, com intervalo entre 50 e 60 °C (12 diferentes temperaturas). A temperatura ótima de amplificação para cada gene foi àquela onde foi possível visualizar uma banda nítida e ausência de bandas inespecíficas, sendo, *sel1* (56,9 °C), *hp1* (59,1°C), *hp2* (55,6°C), *hp3* (54,4°C), *sep* (55,6 °C), *brnA* (55,6 °C), *brnT* (51,8 °C), *cirA* (54,4 °C), *int* (55 °C), e *brnT+brnA* (54,4 °C). Os produtos de amplificação gerados estão demonstrados na FIG. 12a.

Além disso, o DNA plasmidal foi clivado com *XhoI* e *SpeI*, enzimas que apresentam sítio único de clivagem no plasmídio selvagem quando analisadas na *NEBcutter V2.0*. Para ambas as enzimas, observou-se a presença de duas bandas, uma equivalente ao plasmídio digerido e a outra ao plasmídio não digerido (localizada na mesma altura da banda de uma das isoformas do plasmídio não clivado) (FIG.12b).

FIGURA 12 – Confirmação da montagem do plasmídio selvagem por PCR e digestão com enzimas de restrição



Confirmação da montagem do plasmídio selvagem por PCR e digestão com duas enzimas de restrição. A, amplificação de nove ORFs e um sistema anotados no plasmídio selvagem, *sel1* (543 pb), *hp1* (534 pb), *hp2* (306 pb), *hp3* (432 pb), *sep* (462 pb), *brnA* (309 pb), *brnT* (297 pb), *brnT+brnA* (598 pb), *cirA* (2412 pb), *int1* (563 pb); P, padrão 100 pb. B, digestão do plasmídio com duas enzimas de restrição, *XhoI* e *SpeI,* que apresentam sítio único de clivagem no plasmídio selvagem. P, padrão de 1kb plus (250 pb a 10000 pb); 1, plasmídio não digerido; 2, reação de digestão do plasmídio com *XhoI*; 3, **r**eação de digestão do plasmídio com *SpeI*, análise em gel de agarose a 1%.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Clonagem e Expressão Gênica

Dentre os nove genes amplificados e o sistema, BrnT-BrnA (FIG. 12a), foram submetidas as técnicas de clonagem àqueles que foram sugestivos de codificar a substância antimicrobiana, quais sejam, *hp1, hp2, hp3, sep, brnA*, *brnT* e *brnT+brnA*.

O sistema *brnT+brnA* foi selecionado para clonagem porque a toxina BrnT apresenta função ribonucleásica e, assim, sua expressão isoladamente poderia vir a comprometer a viabilidade da célula hospedeira (HEATON *et al*., 2012). Os

resultados obtidos na etapa de clonagem foram descritos para todos os genes concomitante.

5.3.1 CLONAGEM DOS GENES EM VETORES DO TIPO TOPO E PET28ATEV

Todos os produtos de PCR foram clonados em vetores do sistema TOPO linearizados. A enzima *Taq* DNA polimerase adiciona uma desoxiadenosina (A) na extremidade 3' do produto de PCR após amplificação. Assim, os produtos são capazes de interagir com as desoxitimidina (T) livres presentes na extremidade 3' do vetor TOPO linear, circularizando-o, formando assim, o vetor recombinante (SHUMAN, 1994).

O sistema TOPO foi utilizado nesse estudo com finalidade de aumentar o número de cópias de cada inserto e, consequentemente, facilitar a etapa de dupla digestão. Ainda, ele serviria como sítio de ancoragem para as enzimas de restrição.

Os vetores TOPO recombinantes foram utilizados para transformação de *E. coli* DH5α por choque térmico. Após incubação das reações de transformação, foram recuperados vários transformantes de *E. coli* DH5α, alguns azuis e outros brancos. Os clones brancos foram selecionados e submetidos a PCR de colônia, empregando o par de *primers* M13. A presença dos insertos nos vetores foi confirmada pelo tamanho dos produtos da PCR (FIG. 13a e 14a) conforme descrito na tabela 4. Produtos de PCR de 202 pb representam a amplificação da região do sítio múltiplo de clonagem (SMC) sem a presença do inserto.

Uma colônia positiva para cada gene foi cultivada e os vetores TOPO recombinantes extraídos e submetidos à dupla digestão com *XhoI* e *NdeI*. A clivagem permitiu obter insertos com extremidades coesivas, facilitando a posterior subclonagem em vetores de expressão do tipo pET28aTEV. Em todos os géis de agarose analisados, foi possível visualizar duas bandas, uma de aproximadamente 3,9 kb, condizente com o vetor TOPO linearizado, e outra do tamanho do gene de interesse. A banda relacionada ao gene foi excisada e purificada. A pureza e integridade dos insertos foi analisada por eletroforese em gel de agarose (FIG. 13b e 14b).

TABELA 4 – Amostras de *E. coli* DH5α transformadas com vetores TOPO recombinantes

Genes	N° de colônia(s)		Produto da PCR (*primer* M13)
	Azul(is)	Branca(s)	
sep	4	6	664 pb
hp1	-	2	736 pb
hp2	1	21	508 pb
hp3	-	28	634 pb
brnT	-	3	499 pb
brnA	36	21*	511 pb
brnT-brnA	1	335	800 pb

N° de colônia (s), número de colônias; *Colônias brancas com o centro azul
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os insertos purificados foram ligados a vetores pET 28aTEV previamente digeridos com as mesmas enzimas de restrição (extremidades coesivas complementares) e transformados em *E. coli* DE3 quimiocompetentes. Os transformantes recuperados foram analisados por PCR de colônia, empregando o par de *primers T7 promoter*. O número de colônias e o tamanho dos produtos da PCR (FIG. 13c e 14c) obtidos estão descritos na tabela 5. Produtos de PCR de 268 pb equivalem à amplificação do SMC do pET28aTEV sem o inserto.

Os vetores pET28aTEV recombinantes extraídos dos clones positivos foram submetidos a PCR, empregando os pares de *primers* específicos de cada gene (FIG. 13d e 14d).

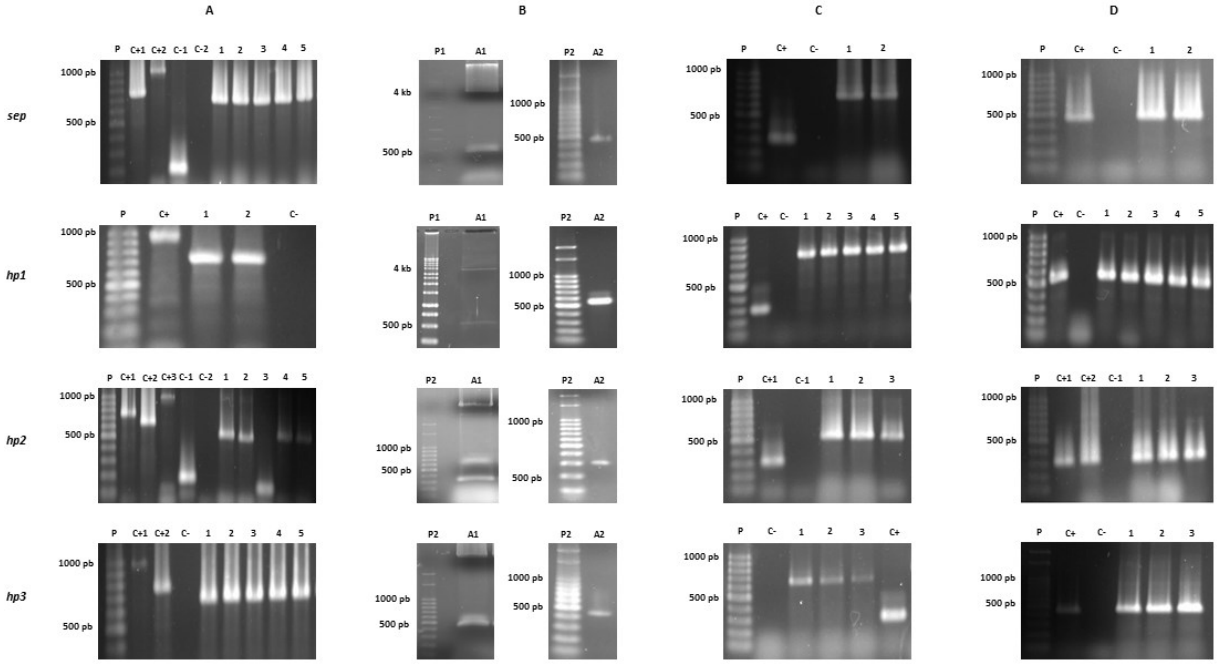
TABELA 5 – Amostras de *E. coli* DE3 transformadas com vetores pET28aTEV recombinantes

Genes	N° de colônia(s)	Produto da PCR (*primer* T7)
sep	2	730 pb
hp1	224	802 pb
hp2	3	574 pb
hp3	3	700 pb
brnT	18	565 pb
brnA	16	577 pb
brnT-brnA	5	866 pb

N° de colônia(s), número de colônias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

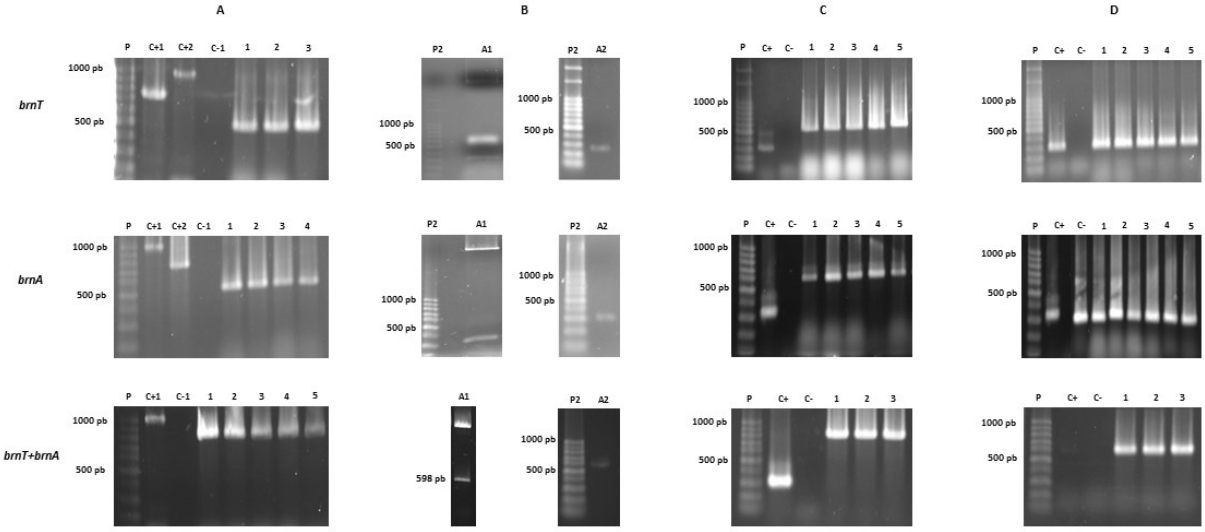
FIGURA 13 – Etapas da clonagem de *sep, hp1, hp2* e *hp3* em vetores do tipo TOPO e pET28aTEV



Etapas da clonagem de *sep, hp1, hp2* e *hp3* em vetores do tipo TOPO e pET28aTEV. As colunas de A a D representam as etapas da clonagem e as linhas, os genes. P, padrão de 100 pb; C+, controle positivo; C-, controle negativo; P1, padrão de 1 kb *plus* (250 pb a 10 kb); P2, padrão de 100 pb (100 pb a 2 kb); A1, TOPO recombinante clivado com *XhoI* e *NdeI*; A2, inserto excisado, eluído e purificado do gel de agarose a 1%. **A**, PCR das colônias de *E. coli* DH5α brancas transformadas com vetores TOPO recombinantes, empregando o par de *primers* M13. Gene *sep*: C+1, TOPO+*hp*1 (736 pb); C+2, fornecido pelo fabricante (952 pb); C-1, colônia azul (TOPO sem inserto, 202 pb); C-2, água; 1 a 5, colônias brancas positivas (664 pb). Gene *hp*1: C+, fornecido pelo fabricante (952 pb); C-, água; 1 e 2, colônias brancas positivas (736 pb). Gene *hp2*: C+1, TOPO+*hp*1 (736 pb); C+2, TOPO+*hp*3 (634 pb); C+3, fornecido pelo fabricante (952 pb); C-1, colônia azul (TOPO sem inserto, 202 pb); C-2, água; 1 a 5, colônias brancas positivas (508 pb), com exceção da colônia 3, presença do TOPO vazio (202 pb). Gene *hp3*: C+1, fornecido pelo fabricante (952 pb); C+2, TOPO+*hp*1 (736 pb); C-, água; 1 a 5, colônias brancas positivas (634 pb). **B**, Reação de dupla digestão dos vetores TOPO recombinantes (esquerda) e confirmação da purificação dos insertos (direita). Gene *sep*: A1, bandas de 3,9 kb (TOPO) e 462 pb (*sep*); A2, banda purificada, 462 pb. Gene *hp1*: A1, bandas de 3,9 kb (TOPO) e 534 pb (*hp1*); A2, banda purificada, 534 pb. Gene *hp2*: A1, bandas de 3,9 kb (TOPO) e 306 pb (*hp2*); A2, banda purificada, 306 pb. Gene *hp3*: A1, bandas de 3,9 kb (TOPO) e 432 pb (*hp3*); A2, banda purificada, 432 pb. **C**, PCR das colônias de *E. coli* DE3 transformadas com vetores pET28aTEV recombinantes, empregando o par de *primer* T7 promoter. C+, pET28aTEV vazio (347 pb); C-, água. Gene *sep*: 1 e 2, colônias positivas (730 pb). Gene *hp*1: 1 a 5, colônias positivas (802 pb). Gene *hp2*: 1 a 3, colônias positivas (574 pb). Gene *hp3*: 1 a 3, colônias positivas (700 pb). **D**, PCR dos vetores pET28aTEV recombinantes, empregando o par *primer* específico de cada gene. C+, plasmídio selvagem; C-, água. Gene *sep*: 1 e 2, colônias positivas (462 pb). Gene *hp*1: 1 a 5, colônias positivas (534 pb). Gene *hp2*: 1 a 3, colônias positivas (306 pb). Gene *hp3*: 1 a 3, colônias positivas (432 pb).

Fonte: Elaborado pelo autor.

FIGURA 14 – Etapas da clonagem de *brnT, brnA* e sistema *brnT-brnA* em vetores do tipo TOPO e pET28aTEV

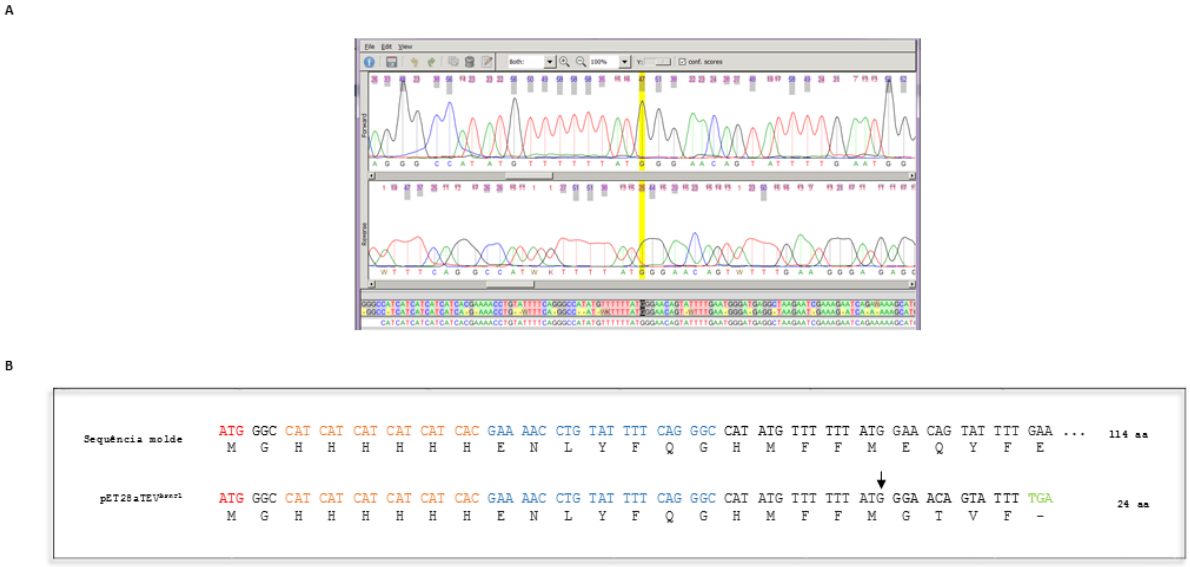


Etapas da clonagem de *brnT, brnA* e sistema *brnT-brnA* em vetores do tipo TOPO e pET28aTEV. As colunas de A a D representam as etapas da clonagem e as linhas, os genes. P, padrão de 100 pb; C+, controle positivo; C-, controle negativo; P1, padrão de 1kb *plus* (250 pb a 10kb); P2, padrão de 100 pb (100pb a 2kb); A1, TOPO recombinante clivado com *XhoI* e *NdeI*; A2, inserto excisado, eluído e purificado do gel de agarose a 1%. **A**, PCR das colônias de *E. coli* DH5α brancas transformadas com vetores TOPO recombinantes, empregando o par de *primer* M13. Gene *brnT*: C+1, TOPO+*hp*1 (736 pb); C+2, fornecido pelo fabricante (952 pb); C-, água; 1 a 3, colônias brancas positivas (499 pb). Gene *brnA*: C+1, fornecido pelo fabricante (952 pb); C+2, TOPO+*hp*1 (736 pb); C-, água; 1 a 4, colônias brancas positivas (511 pb). Sistema *brnT-brnA*: C+, fornecido pelo fabricante (952 pb); C-, água; 1 a 5, colônias brancas positivas (800 pb). **B**, Reação de dupla digestão dos vetores TOPO recombinantes (esquerda) e confirmação da purificação dos insertos (direita). Gene *brnT*: A1, bandas de 3,9 kb (TOPO) e 297 pb (*brnT*); A2, banda purificada, 297 pb. Gene *brnA*: A1, bandas de 3,9 kb (TOPO) e 309 pb (*brnA*); A2, banda purificada, 309 pb. Sistema *brnT-brnA*: A1, bandas de 3,9 kb (TOPO) e 598 pb (*brnT-brnA*); A2, banda purificada, 598 pb. **C**, PCR das colônias de *E. coli* DE3 transformadas com vetores pET28aTEV recombinantes, empregando o par de *primer* T7 promoter. C+, pET28aTEV vazio (347 pb); C-, água. Gene *brnT*: 1 a 5, colônias positivas (565 pb). Gene *brnA*: 1 a 5, colônias positivas (577 pb). Sistema *brnT-brnA*: 1 a 3, colônias positivas (866 pb). **D**, PCR dos vetores pET28aTEV recombinantes, empregando o par *primer* específico de cada gene. C+, plasmídio selvagem; C-, água. Gene *brnT*: 1 a 5, colônias positivas (297 pb). Gene *brnA*: 1 a 5, colônias positivas (309 pb). Sistema *brnT-brnA*: 1 a 3, colônias positivas (598 pb).
Fonte: Elaborado pelo autor.

As sequências de nucleotídios da região T7 dos vetores pET28aTEV recombinantes foram sequenciadas e comparadas com as sequências moldes (região T7 do vetor contendo as ORFs, previamente montadas no processador de texto Microsoft Word) no algoritmo Blastn, para avaliar a integridade do gene clonado e a presença da cauda de histidina para purificação. Nas regiões T7 clonadas com *sep*, *hp1*, *hp2*,

hp3 e *brnA* não foram encontradas deleções, inserções e/ou alterações de nucleotídios. Entretanto, na região T7 contendo *brnT* observou-se a inserção de uma guanina (G) entre a posição 60 a 62 da sequência obtida (a sequência já era composta por duas G sequenciais, não sendo possível afirmar o local exato da inserção), alterando a fase de leitura da proteína, gerando um *stop* códon precoce e, consequentemente, uma proteína de 24 aminoácidos (aa), ao invés de 114 aa (TAB. 6). Essa mutação foi visualizada na sequência dos cinco clones recuperados (FIG. 15). O gene *brnT* foi novamente clonado, três clones foram selecionados e sequenciados, porém todos apresentaram alterações e/ou deleções de nucleotídeos e, consequentemente, alteração da sequência de aminoácidos (dados não apresentados).

FIGURA 15 – Análise da sequência da região T7 do vetor recombinante (pET28aTEV^{brnT})



Análise da região T7 do vetor recombinante pET28aTEV^{brnT} isolado da amostra de *E. coli* DE3 clone 1. **A**, análise de qualidade e montagem do *contig* equivalente a sequência de nucleotídios da região T7 do vetor pET28aTEV^{brnT1} em Programa *SeqTrace*. Destaque em amarelo (posição 60), marcação ilustrativa do possível sítio de inserção de uma G na sequência de nucleotídios. **B**, alinhamento entre a sequência molde e a sequência da região T7 do vetor pET28aTEV^{brnT}. Abaixo da sequência de nucleotídeos encontram-se os resíduos de aminoácidos correspondentes a cada *códon*. A inserção de uma G alterou a fase de leitura da proteína, gerando um *stop códon* precoce e, consequentemente, uma proteína truncada de apenas 24 resíduos de aa. Destaques: em vermelho, *códon* que origina a metionina inicial; em laranja, cauda de histidina N-terminal; em azul, sítio de clivagem da enzima TEV; em verde, *stop códon* precoce. Seta, provável sítio de inserção da G; três pontos, continuidade da sequência. Fonte: Elaborado pelo autor.

A região T7 do vetor recombinante contendo o sistema *brnT-brnA,* quando analisada, evidenciou *(i)* substituição dos primeiros nucleotídios da sequência do gene *brnT*, *(ii)* quinze deleções ao longo da sequência e *(iii)* ausência da região que codifica a *tag*, alterando por completo a sequência de aa do sistema, sendo descartado do estudo.

5.3.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Dentre as cinco proteínas recombinantes clonadas, apenas quatro foram expressas, HP1, HP2, HP3 e SEP. Todos os clones de DE3 albergando o pET28aTEV^{brnt} apresentaram mutações significativas, sendo inviável a utilização. Novas transformações serão realizadas posteriormente, porém, empregando-se *E. coli* DE3 pLysS, específica para expressão de produtos tóxicos.

Todas as proteínas recombinantes expressas apresentaram aumento de 2.000,15 Da (16 aa) da massa molecular (TAB. 6), condizente com a região do vetor expressa juntamente com a proteína.

As células transformadas com os vetores pET28aTEV albergando *hp1*, *hp2*, *hp3* e *sep* foram lisadas após indução por 4 h com IPTG. Em corrida eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS corado pelo *Comassie blue, e* foi possível verificar a presença de bandas com massas moleculares equivalentes a todas as quatro proteínas. A proteína hipotética 1 apresentou banda apenas na porção insolúvel, sendo totalmente solubilizada com 8M de ureia (imagem não apresentada). As outras proteínas foram visualizadas nas frações solúvel e insolúvel, apesar da menor intensidade da banda na fração solúvel (FIG. 16).

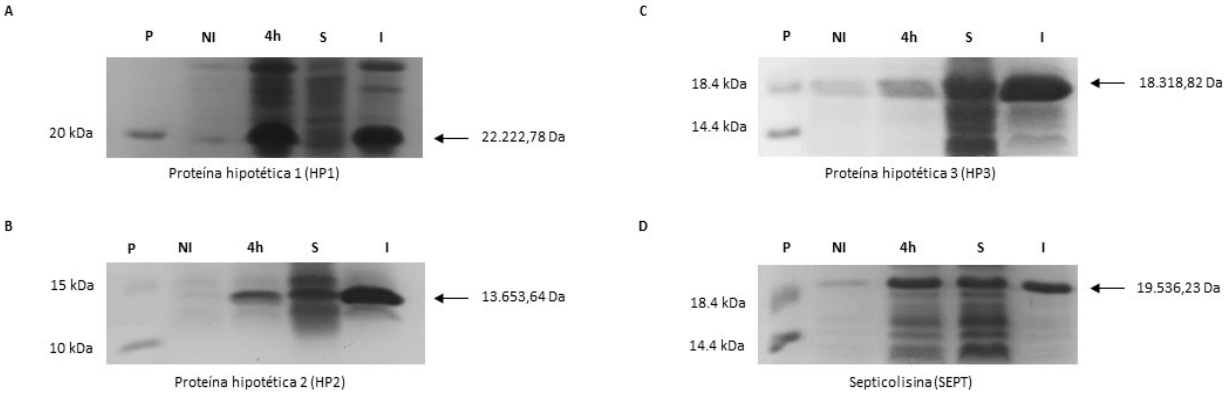
Para confirmar a expressão das proteínas recombinantes, as culturas induzidas com IPTG por 4 h foram submetidas à técnica de *western blotting*. As proteínas contendo a cauda de histidina apresentaram interações específicas com o anticorpo primário anti-6-his, sendo possível visualizar bandas nas alturas esperadas (FIG. 17).

TABELA 6 – Massas moleculares das proteínas nativas e recombinantes

Genes	Proteínas nativas		Proteínas recombinantes	
	n° aa	MM (Da)	n° aa	MM (Da)
sep	153	17536,08	169	19536,23
hp1	177	20222,63	193	22222,78
hp2	101	11653,49	117	13653,64
hp3	143	16318,67	159	18318,82
brnT	98	11729,26	114	13729,41
brnA	102	11990,57	118	13990,71

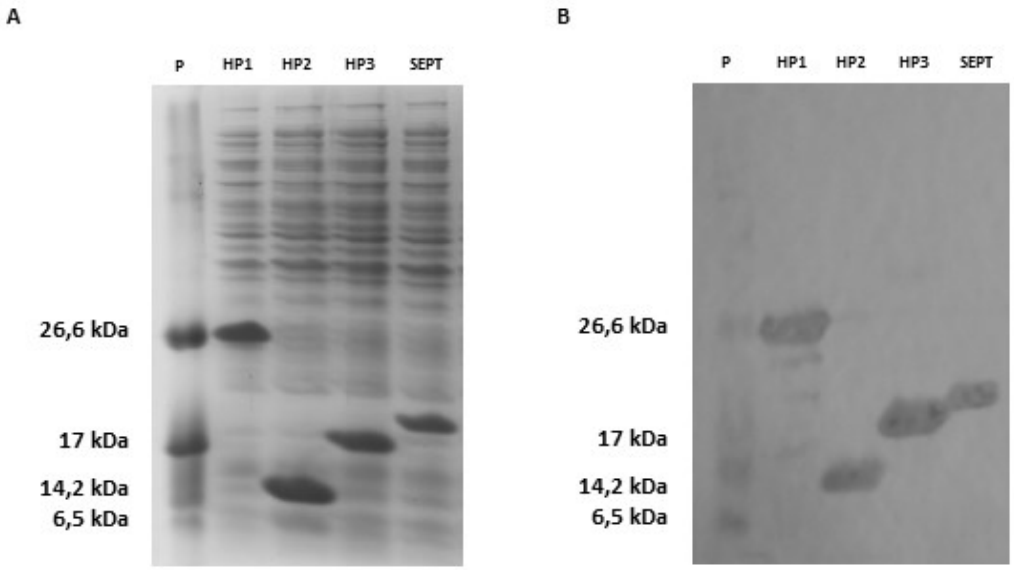
n° aa, número de aminoácidos, MM, massa molecular; Da, daltons. O tamanho das proteínas foi estimado no programa *ProtParam tool* presente no servidor proteômico ExPASy Fonte: Elaborado pelo autor.

FIGURA 16 - Perfil eletroforético das proteínas recombinantes em gel de poliacrilamida corado pelo *Comassie blue*



Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12,5 (A, C e D) e 15% (B) das proteínas recombinantes HP1, HP2, HP3 e septicolisina, corado por C*omassie blue*. P, padrão de massa molecular (pré-corado 10 a 250 kDa – A e B e não corado 14,4 a 116 kDa – C e D); kDa, massa molecular em KiloDaltons; NI, cultura não induzida com IPTG; cultura induzida por 4 h com 1 mM de IPTG; S, sobrenadante obtido após sonicação da cultura induzida por 4 h com 1 mM de IPTG (fração solúvel); I, *pellet* da cultura obtido após sonicação da cultura previamente induzida com 1 mM de IPTG (fração insolúvel). **A**, Gel de poliacrilamida da proteína hipotética 1 evidenciando a presença de uma banda de 22.222,78 Da, presente apenas na porção insolúvel. **B**, Gel de poliacrilamida da proteína hipotética 2 evidenciando a presença de uma banda de 13.653,64 Da, presente nas porções solúvel e insolúvel. **C**, Gel de poliacrilamida da proteína hipotética 3 evidenciando a presença de uma banda de 18.318,82 Da, presente nas porções solúvel e insolúvel. **D**, Gel de poliacrilamida da septicolisina, evidenciando a presença de uma banda de 19536,23 Da, presente nas porções solúvel e insolúvel. Fonte: Elaborado pelo autor.

FIGURA 17 - Perfil eletroforético das proteínas recombinantes em gel de poliacrilamida revelado pela técnica de *Western blotting*



Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12,5% das proteínas recombinantes HP1, HP2, HP3 e septicolisina, corado por *comassie blue* (A) e revelado pela técnica de *western blotting* (B). Bandas obtidas a partir das culturas induzidas por 4 h com 1 mM de IPTG. Para técnica de *western blotting,* as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, incubada com anticorpo anti-6-his Mouse IgG1 e com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com uma peroxidase, revelado por método colorimétrico (DAB). **A** e **B**, proteína hipotética 1, banda de 22.222,78 Da; proteína hipotética 2, banda de 13.653,64 Da; proteína hipotética 3, banda de 18.318,82 Da; septicolisina, banda de 19536,23 Da. P, padrão de massa molecular pré-corado de 6,5 a 266 kDa; kDa, massa molecular em KiloDaltons.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os clones para os quais a expressão da proteína foi confirmada foram submetidos a teste para avaliação de atividade antimicrobiana, empregando-se o método de sobrecamada, conforme descrito no item 4.2.3.1. A partir dessa etapa, foram empregados apenas os clones que apresentaram atividade antimicrobiana ou cuja proteína apresentava evidências de ser a substância (baseado em função e resultados prévios), tendo em vista o curto prazo para apresentação da tese.

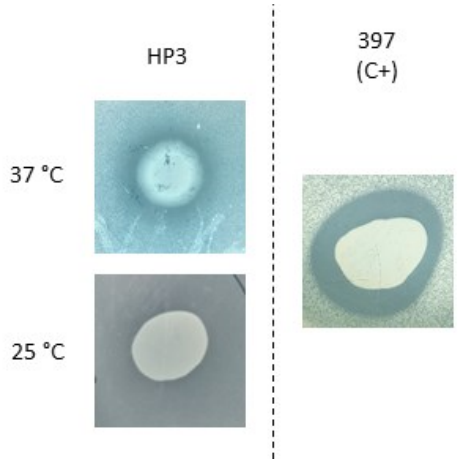
5.3.2.1 Teste de atividade antimicrobiana dos clones recombinantes

As amostras de *E. coli* DE3 albergando os plasmídios pET28aTEV recombinantes foram submetidas a teste de atividade pela técnica de sobrecamada, conforme descrito no item 4.2.3.1, com algumas modificações. Os testes foram realizados em ágar LB, sem adição de antibiótico, porém acrescido de 40 µL de IPTG a 100 mM, incubado a 25 e 37 °C.

Dentre as 4 amostras testadas (HP1, HP2, HP3 e SEP), apenas o clone carreando o gene que codifica a proteína hipotética 3 foi capaz de inibir a amostra reveladora *A. baumannii* 294, a 25 e 37 °C (FIG. 18). Porém, os halos gerados foram bem menores se comparados com os demais observados ao longo do estudo.

A sequência da proteína hipotética 3 nativa, analisada no preditor *ProtParam,* apresenta massa molecular de 16318, 76 Da, valor muito semelhante àquele da fração 37 purificada a partir do extrato bruto obtido a partir da amostra de *E. coli* BL21 transformada (C1), de 16277,971 Da, com variação relativa 0,25%.

FIGURA 18 – Atividade antimicrobiana da amostra *E. coli* BL21 albergando o pET28aTEV^{hp3}



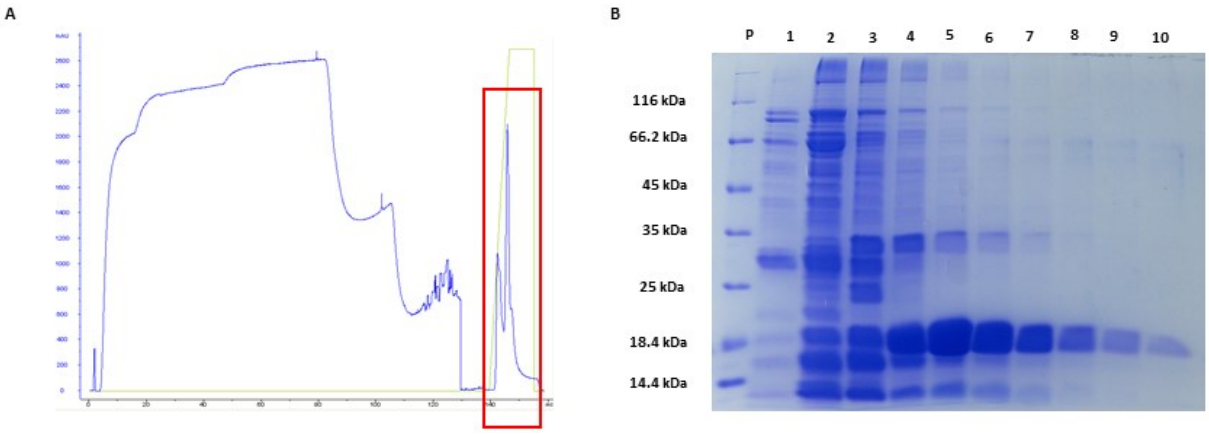
Atividade antimicrobiana da amostra *E. coli* BL21 albergando o pET28aTEV^{hp3} em LB ágar a 37 e 25°C, com IPTG. Presença de halos de inibição da amostra reveladora *A. baumannii* 294 nas placas incubadas a 25°C e 37°C. Técnica de sobrecamada, incubação por 20 h. C+, controle positivo, amostra de *A. baumannii* 397 cultivada em BHIA-S, *Brain Heart Infusion* Ágar suplementado com extrato de levedura, a 25°C, por 20 h, contra *A. baumannii* 294. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HIPOTÉTICA 3 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

O sobrenadante obtido após sonicação da cultura de DE3 + pET28aTEV^{hp3}induzida foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna HisTrap constituída por grupos quelantes carregados com íons Ni^{2+}, com afinidade pela cauda de histidina presente na proteína recombinante. A proteína foi eluída com gradiente linear de imidazol até 500 mM, sendo coletadas 10 frações de 1mL cada (FIG. 19a).

As frações coletadas apresentam banda correspondente à proteína HP3 recombinante (aproximadamente,18 kDa) em gel de poliacrilamida-SDS a 12,5% corado pelo *Comassie blue*. As frações purificadas (8 a 10) foram eluída com 100% de imidazol (FIG. 19b).

FIGURA 19 – Purificação da proteína HP3 por cromatografia de afinidade a níquel



Perfil cromatográfica (A) e eletroforético (B) da proteína hipotética 3 (HP3) purificada (A). **A**, perfil cromatográfico em coluna de afinidade a níquel (HisTrap de 1 mL), amostra injetada na coluna (linha em azul,), frações de 1 a 10 (linha vermelha) eluídas com concentrações crescentes de imidazol (linha verde). **B**, gel de poliacrilamida - SDS a 12,5%, presença de uma banda de aproximadamente 18 kDa condizente com a proteína HP3 recombinante (18.318,82) P, padrão de massa molecular não-corado de 14,4 a 116 kDa; kDa, massa molecular em KiloDaltons;
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi realizado um *pool* das frações 8 a 10 (FIG. 19b). O *pool,* dosado pelo método de Bradford apresentou concentração proteica de 177,3 mg/mL. Entretanto, quando dialisada contra PBS 1X nenhuma proteína foi detectada. Não temos explicação para a perda total da proteína purificada.

5.3.3.1 Teste de atividade das proteínas purificadas

A fração purificada contendo imidazol foi submetida à avaliação da atividade antimicrobiana, mas, não houve a formação de halo de inibição da amostra reveladora *A. baumannii* 294. Dentre as hipóteses levantadas, cita-se: *(i)* alta concentração de imidazol (sal) e *(ii)* presença de 16 resíduos de aa relacionados à expressão de uma região do vetor pET, que não fazem parte da estrutura nativa da proteína.

O mecanismo de ação e a seletividade dos AMPs são influenciados diretamente pela constituição de aa e estrutura. Dentre as propriedades que mais afetam essas características, destacam-se a natureza catiônica e o grau de hidrofobicidade. Os AMPs geralmente apresentam carga líquida de +2 a +13, relacionado à presença de resíduos de lisina (Lys) e arginina (Arg) e, algumas vezes, de histidina (His). A carga desses compostos tem sido correlacionada com a atividade antimicrobiana, demonstrando que o aumento da carga de um AMP de +3 para +5 aumenta significativamente a atividade antimicrobiana, porém, o aumento de +6 ou +7 promove perda da atividade antimicrobiana e redução da seletividade (aumento da atividade hemolítica). Acredita-se que o comprometimento da atividade possa estar relacionado à forte interação entre o peptídio e os fosfolipídios de membrana, dificultando a translocação do peptídio para o interior da membrana (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

Conforme mencionado anteriormente, a proteína hipotética 3, quando expressa em pET28aTEV, adquire 16 resíduos novos de aa, dentre esses, sete resíduos de histidina, o que poderia comprometer sua estrutura e, consequentemente, a atividade antimicrobiana da proteína.

Como perspectivas, será realizada diálise da proteína purificada e clivagem com a protease TEV, o que resultará em uma proteína semelhante à nativa, com apenas um resíduo de glicina complementar, que, provavelmente, não afetará a estrutura primária e função biológica.

6 CONCLUSÕES

- Os resultados confirmam que o gene que codifica a substância antimicrobiana ativa contra amostras MDR de *A. baumannii* possui localização plasmidial.
- A descoberta de um plasmídio selvagem modificou a proposta inicial, criando perspectivas para identificação e caracterização mais detalhada da substância. Entretanto, a baixa concentração da substância purificada impossibilitou o sequenciamento e identificação da substância antimicrobiana expressa pelo sistema *E. coli* BL21 transformado, tendo sido necessário o sequenciamento do plasmídio selvagem.
- A análise de similaridade da sequência do plasmídio permitiu classificar o plasmídio na superfamília Rep3, evidenciou doze regiões que codificam proteínas, das quais cinco foram sugestivas da proteína antimicrobiana, sendo, três proteínas hipotéticas, uma toxina (BrnT) e uma citolisina (septicolisina).
- A ausência de genes que codificam resistência antimicrobiana no plasmídio parece estar em desacordo com resultados de testes de suscetibilidade antimicrobiana das amostras que albergavam o plasmídio selvagem. A elucidação dessa questão poderá ser obtida a partir do sequenciamento completo do genoma de *A. baumannii* 397.
- Estudos de clonagem e expressão gênica permitem-nos sugerir que a proteína hipotética 3 esteja relacionada com a atividade antimicrobiana contra amostras MDR de *A. baumannii*. Entretanto, novos experimentos são necessários para confirmação desta hipótese.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, I. *et al*. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, v. 11, n. 4, 2013.

ACOSTA, J. *et al*. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011.

AGEITOS, J. M. *et al*. Antimicrobial peptides (AMPs): ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem. Pharmacol*, v. 133, p. 117-138, 2017.

AMIN, M. *et al*. Association Between Biofilm Formation, Structure, and the Expression Levels of Genes Related to biofilm formation and Biofilm-Specific Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Burn Infectin in Ahvaz, Iran. *Infect. Drug Resist.*, v. 12, p. 3867–3881, 2019.

AMRAOUI, B. E. *et al*. Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms. *Ann. Pharm. Fr.*, v. 72, p. 107-11, 2014.

ANDREWS, H. J. *Acinetobacter* bacteriocin typing. *J. Hosp. Infect.*, v. 7, p. 169-175, 1986.

BAINDARA, P. *et al*. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express*, v. 3, n. 1, 2013.

BAMDAD, F. *et al*. Preparation and characterization of antimicrobial cationized peptides from barley (*Hordeum vulgare* L.) proteins. *Food Sci. Techn*., v. 63, p. 29-36, 2015.

BAQUERO, F. *et al*. Microcins in Enterobacteriaceae: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Front. Microbiol.*, 2019.

BEGLEY, M. *et al*. Identification of a Novel Two-Peptide Lantibiotic, Lichenicidin, following Rational Genome Mining for LanM Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.,* v. 75, n. 17, p. 5451-5460, 2009.

BENMECHERNENE, Z. *et al*. Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Pat. DNA Seq*., v. 7, n. 1, p. 66-73, 2013.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 9, p. 148-165, 1996.

BERTINI, A. *et al*. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.,* v. 54, n. 10, p. 4168-4177, 2010.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., v. 7, n. 6, 1979.

BOOTH, S. J.; JOHNSON, J. L.; WILKINNS, T. D. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of theses strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrob. Agents Chemother*., v. 11, n. 4, p. 718-724, 1977.

BRADFORD, M. M. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BURIANEK, L. L.; YOUSEF, A. E. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Lett. Appl. Microbiol*., v. 31, p. 193 -197, 2000.

CAO, Y. *et al*. A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Front. Microbiol.,* v. 8, 2017.

CARATTOLI, A. Plasmid and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.,* v. 6-7, p. 298-304, 2013.

CARNEIRO, F. R. G. et al. Spectrscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* v. 343, p. 260-268, 2006.

CASCALES, E. *et al*. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*., v. 71, p. 158-229, 2007.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2013. Disponível em: https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf. Acesso em: 10 de maio de 2018.

_____. *Acinetobacter* in healthcare settings, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019a. Disponível em: https://www.cdc.gov/hai/organisms/acinetobacter.html. Acesso em: 20 de dezembro de 2019.

_____. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019b. Disponível em: https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html. Acesso em: 26 de dezembro de 2019.

CHAVAN, M. A.; RILEY, M. A. Molecular Evolution of Bacteriocins in Gram-Negative. Bacteria, In: RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. Bacteriocins: *Ecology and Evoltion*. Heidelberg, Germany, 2007, p. 5-18.

CHEN, S. *et al*. Direct and convenient measurement of plasmid stability in lab and clinical isolates of *E. coli*. *Sci. Rep*., v. 7, 2017.

CISNEROS, J. M.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin. Microbiol. Infec.*, v. 8, n. 11, p. 687-693, 2002.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. *29th ed.* CLSI *supplement* M100-ED29 (ISBN 1-56238-839-8 [*online*]), Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.

CHANG, Y. *et al*. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a Chinese teaching hospital. *Front. Microbiol*., v. 6, 2015.

CHAPARTEGUI-GONZÁLEZ, I. *et al*. *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *PLOS ONE*, v. 13, n. 8, 2018.

COITINHO, J. B. *et al*. Expression, purification and preliminary crystallographic studies of NahF, a salicylaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* G7 involved in naphthalene degradation. Acta*. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun*., v. 68, p. 93-97,2012.

CONCEIÇÃO, C. S. *et al*. Pathogen killing pathogen: antimicrobial substance from *Acinetobacter* active against foodborne pathogens*. J. Infect. Devel. Coutries*., v. 12, n. 5, p. 297-304, 2018.

COOPER, D. G. *et al*. Enhanced production of surfactin *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. R. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

COTTER, P. D. Bioengineering: a bacteriocin perspective. *Bioengineered*, v. 3, n. 6, p. 313-319, 2012.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 11, n.2, p. 95-105, 2013.

DAMACENO, H. F. B. *et al*. Antibiotic resistance versus antimicrobial substances production by Gram-Negative foodborne pathogens isolated from minas frescal cheese: heads or tails? *Foodborne Pathog. Dis*., v. 12, n. 4, p. 297-301, 2015.

DOBSON, A. *et al*. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol*, v. 78, n.1, p. 1-6, 2012.

DORTET, L. *et al*. First occurrence of OXA-72 producing *Acinetobacter baumannii* in Serbia. *Antimicrob. Agents Chemother*., v. 60, n. 10, 2016.

ENNAHAR, S. et al. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev*., v. 24, p. 85 -106, 2000.

EUZÉBY, J. P. Classification of domains and phyla – hierarchical classification of prokaryotes. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature:* 2019a. Disponível em: http://www.bacterio.net/-classifphyla.html#Proteobacteria. Acesso em: 26 de dezembro de 2019.

_____. Genus *Acinetobacter*. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature:* 2019b. Disponível em: http://www.bacterio.net/acinetobacter.html. Acesso em: 26 de dezembro de 2019.

FARHA, M. A.; BROWN, E. D. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nat. Microbiol.,* 2019.

FARIAS, L. M. *et al*. Bacteriocin-like activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. *Res. Microbiol*., v. 143, n. 2, p. 151-159, 1992.

FAVACHO, A. R. M. *et al*. Cloning, expression, and purification of recombinant bovine rotavirus hemagglutinin, VP8*, in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif. n*, v. 46, n. 2, p. 196–203, 2006.

FONDI, M. *et al*. Exploring the evolutionary dynamics of plasmids: the *Acinetobacter* pan-plasmidome. *BMC Evol. Biol.,* v. 10, n. 59, 2010.

FOURNIER, P. E.; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.,* v. 42, n. 5, p.692-699, 2006.

GALVEZ, A. *et al*. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 120, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

GARCÍA-PATIÑO, M. G.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; LICONA-LIMÓN, P. The immune response against *Acinetobacter baumannii*, an emerging pathogen in nosocomial infections. *Front. Immunol*., v. 8, n. 441, 2017.

GRADA, A.; WEINBRECHT, K. Next-Generation Sequencing: Methodology and *Application. J. Invest. Dermatol.*, v. 133, n. 8, p. 1–4, 2013.

GOH, H. F.; PHILIP, K. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confuse* A3 of dairy origin. *Plos one*, v. 16, 2015.

GOTTLER, L. M.; RAMAMOORTHY, A. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan – A highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochim. Biophys. Acta*., v. 1788, n. 8, p. 1680-1686, 2009.

GRECO, I. *et al*. Characterization, mechanism of action and optimization of activity of a novel peptide-peptoid hybrid against bacterial pathogensinvolved in canine skin infections. *Sci.Rep.*, 2019.

GUIMARÃES, N. R. *Atividade antagonista de Acinetobacter baumannii contra amostras multirresistentes da bactéria*. 2016. 137f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

GUZEL, C. B. *et al*. Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from bacteremia patients. *Biomed. Res. Int.*, p. 1-5, 2014.

HAMIDIAN, M.; AMBROSE, S. J.; HALL, R. M. A large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid carrying the *sul2* sulphonamide and *str AB* streptomycin resistance genes. *Plasmid*, v. 87, 2016.

HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat. Rev. Microbiol*., v.16, n. 2, p. 91-102, 2017.

HEATON, B. E. et al. Molecular structure and function of the novel BrnT/BrnA toxin-antitoxin system of *Brucella abortus*. *J. Biol. Chem*., v. 287, n. 15, 2012.

HENRIKSEN, S. D. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol. Rev.*, v. 37, n. 4, p. 522-561, 1973.

HOVER, B. M. *et al*. Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Nat. Microbiol*., v. 3, p. 415-422, 2018.

HUJER, A. M. *et al*. Nosocomial outbreak of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates containing bla$_{\text{OXA-237}}$ carried on a plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother*., v. 61, n. 11, 2017.

JARI, M. *et al*. Cloning and expression of Poly 3-Hydroxybutyrate Operon into *Escherichia coli*. *Jundishapur J. Microbiol*., v. 8, n. 2, 2015.

JONES, L. S. *et al*. Characterization of plasmids in extensively drug-resistant *Acinetobacter* strains isolated in India and Pakistan. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 59, n. 2, 2015.

JONG, A. *et al*. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res.,* v. 34, p. 273 – 279, 2006.

JOSHI, S. G.; LITAKE, G, M. *Acinetobacter baumannii*: an emerging pathogenic threat to public health. *World J. Clin. Infec. Dis.*, v. 3, n. 3, p. 25-36, 2013.

JUNI, E. *Acinetobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. *Bergey's Manual Trust*, p. 1-26, 2015. In: EUZÉBY, J. P. Genus *Acinetobacter*. *Bergey's Manual Systematics of Archaea and Bacteria (BMSAB):* 2019b. Disponível em: http://www.bacterio.net/acinetobacter.html. Acesso em: 7 de outubro de 2019.

KOPANIC, J. L. *et al*. An Escherichia coli strain for expression of the connexin45 carboxyl terminus attached to the 4th transmembrane domain. *Front. Pharmacol.*, 2013.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial Peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules*, v. 8, 2018.

LAPORT, M. S. *et al*. Antimicrobial activity of marine sponges against coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol*., v. 155, n. 2-4, p. 362-368, 2012.

LEAN, S. S. *et al*. Whole-genome analysis of an extensively drug-resistant clinical isolate of Acinetobacter baumannii AC12: insights into the mechanisms of resistance of an ST195 clone from Malaysia. *Int. J. Antimicrob. Agents*., v. 45, n.2, p. 178-182, 2015.

LEAN, S. S. *et al*. Comparative genomics of two ST 195 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with different susceptibility to polymyxin revealed underlying resistance mechanism. *Front. Microbiol*., v. 6, 2016.

LEAN, S. S.; YEO, C. C. Small, enigmatic plasmids of the nosocomial pathogen, *Acinetobacter baumannii*: good, bad, who knows? *Front. Microbiol*., v. 8, 2017.

LEE, C. R. *et al*. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front. Cell. Infect. Microbiol*., v. 7, n. 55, 2017.

LEE, K. H.; KIM, K. W.; RHEE, K. H. Identification of *Streptomyces* sp. KH29, which produces an antibiotic substance processing an inhibitory activity against multidrug-resistant *Acinetobacter bumannii*. *J. Microbiol. Biotechnol*., v. 20, n. 12, p. 1672-1676, 2010.

LEVY, S. E.; MYERS, R. M. Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, v. 17, p. 95–115, 2016.

LEUNGTONGKAM, U. *et al*. Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 *integrons* of *Acinetobacter baumannii. PLOS ONE*, v. 13, n. 12, 2018.

LIM, G. *et al*. Differential transformation efficiencies observed for pUC19 and pBR322 in *E. coli* may be related to calcium chloride concentration. *JEMI*, 2015.

LING, L. L. *et al*. A new antibiotic kills pathogen without detectable resistance. *Nature*, v. 517, n. 22, p. 455-459, 2015.

LIU, Y.-Y. *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.*, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016.

MA, F. *et al*. Identification of a novel plasmid carrying mcr-4.3 in an *Acinetobacter baumannii* strain in China. *Antimicrob. Agents Chemother*., v. 63, n. 6, 2019.

MACHADO, F. L. S. *et al*. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Rev. Bras. Farmacogn*., v. 20, n.3, p. 441-452, 2010.

MAGIORAKOS, A. P. *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect*., v. 18, p. 268-281, 2012.

MARTINS, H. S. I. *Avaliação fenotípica e molecular da resistência a antimicrobianos de amostras de Acinetobacter spp. e Pseudomonas aeruginosa recuperadas de hemocultura em diferentes Hospitais de Belo Horizonte*, *Minas Gerais*. 2012. 147f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MARTINS, H. S. I. *et al*. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 11, p. 1465-1478, 2014.

MICENKOVÁ, L. *et al*. Colicin Z, a structurally and functionally novel colicin type that selectively kills enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Sci. Rep.*, v. 9, 2019.

MINDLIN, S. *et al*. Resistance of permafrost and modern *Acinetobacter lwoffii* strains to heavy metals and arsenic revealed by genome analysis. *Biomed Res. Int.,* 2016.

MULANI, M. S. *et al*. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol.*, 2019.

NAKAMURA, T. *et al*. Bacteriocin-like substance (melaninocin) from oral *Bacteroides melaninogenicus*. *Infect. Immu.*, v. 31, p. 28-32, 1981.

NAKANO, M. M.; MARAHIEL; M. A.; ZUBER, P. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, v. 170, n. 12, p. 5662-5668, 1988.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. *Braz. J. Food Technol*., v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

O'SHEA, E. F. *et al*. Prodution of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int. J. Food Microbiol*., v. 152, n. 3, p. 189-205, 2012.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii:* emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.

PINGITORE, E. V. *et al*. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). *Trends Appl. Microbiol*., 2007.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perpectives. *Biochimie*, v. 84, n. 5-6, p. 357-364, 2002.

ROCCO, C. J. *et al*. Construction and use of new cloning vectors for the rapid isolation of recombinant proteins from Escherichia coli. *Plasmid*, v. 59, n. 3, p. 231–237, 2008.

RODRIGUEZ, N. *et al*. Alternatives for biossurfactants and bacteriocins extraction from *Lactococcus lactis* cultures produced under different pH conditions. *Lett. Appl. Microbiol*., v. 51, p. 226 -233, 2010.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Front. Microbiol.,* v. 5, n. 172, 2014.

ROSSAU, R. *et al*. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 41, n. 2, p. 310-319, 1991.

REDDY, K. V.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents*., v. 24, n. 6, 2004.

RICE, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.*, v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 2008.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.*, v.166, p. 368-79. 1987.

SHINTANI, M.; SANCHEZ, Z. K.; KIMBARA, K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front. Microbiol*., v. 6, 2015.

SILVA, J. J. *et al*. In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* linné and *Annona crassiflora* mart. against oxacillin resistant *Staphyloccus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. *Rev. Inst. Med. Trop*., v. 56, n. 4, p. 333-340, 2014.

SLATKO, B. E.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr. Protoc.Mol. Biol.*, v. 122, 2018.

SMALLA, K..; JECHALKE, S.; TOP, E. M. Plasmid Detection, Characterization, and Ecology. *Microbiol. Spectr.,* v. 3, 2015.

SMIRNOV, I. P. *et al*. Suppression of r-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Matrix Clusters and Reduction of Chemical Noise in MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem*., v. 76, p. 2958-2965, 2004.

SOUSA, M. A. B. *et al*. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea. *APMIS*, v. 118, p. 125-135, 2010.

SHUMAN, S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using Vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem*., v. 269, n. 51, 1994.

SU, J. *et al*. Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli in* China during the last six years. *FEMS Microbio. Lett.*, v. 254, p. 75–80, 2006

TIWARI, V.; ROY, R.; TIWARI, M. Antimicrobial active herbal compounds against *Acinetobacter baumannii* and other pathogens. *Front. Microbiol.*, v. 6, 2015.

THOMAS, C. M. *et al*. Annotation of plasmid genes. *Plasmid*, v. 91, p. 61-67, 2017.

TORRES, F. S. *Clonagem e expressão heteróloga de PnTx2-6, uma toxina ativa na função erétil: obtenção e caracterização parcial de seus mutantes*. 2011. 111f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

TURTON, J. F. *et al*. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett*, v. 258, p. 72–77, 2006.

VEGAS, E. Z. S.; NIEVES, B. *Acinetobacter* spp.: aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiologia*, v. 25, p. 64-71, 2005.

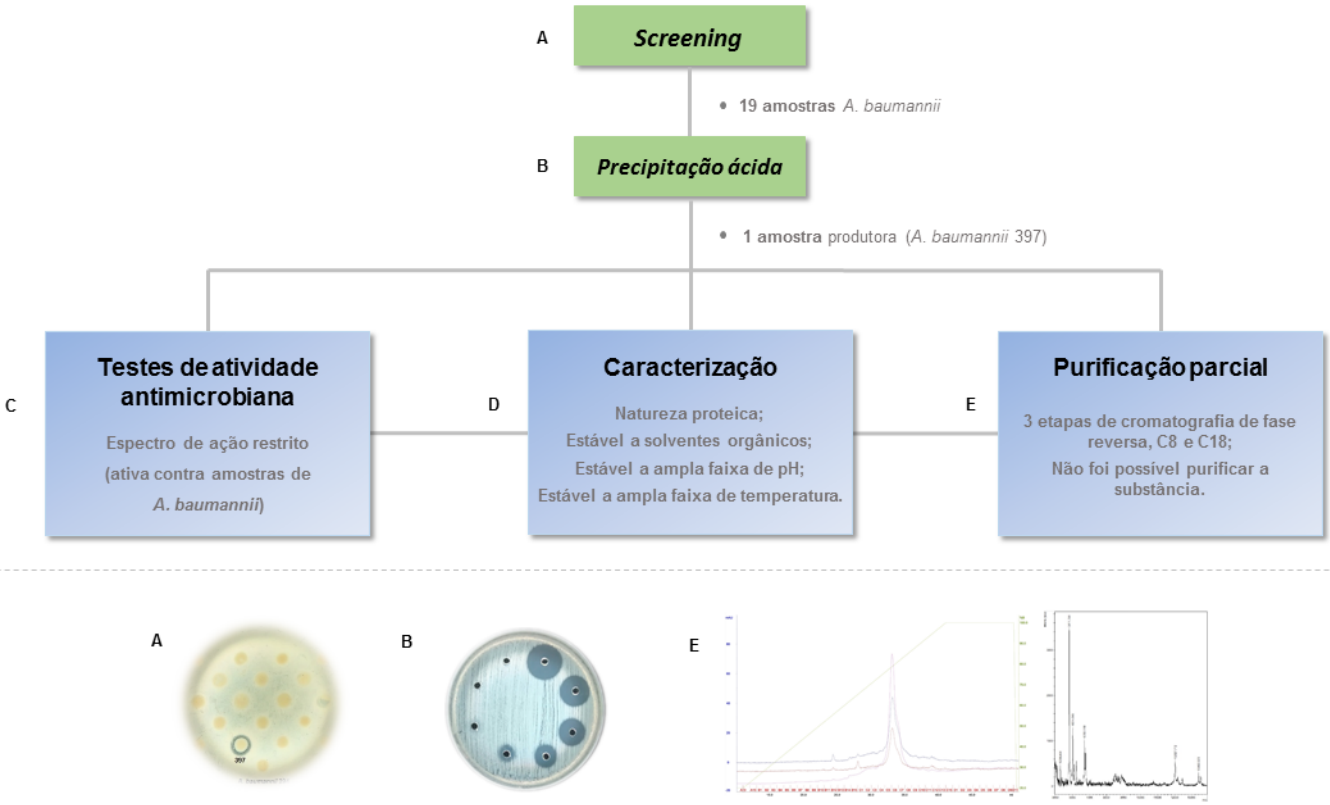
VIJAYAKUMAR, S.; BISWAS, I.; VEERARAGHAVAN, B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. *Future Sci. OA.*, v. 5, n. 6, 2019.

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf. Acesso em: 10 de setembro de 2017.

YANG, Q. E.; WALSH, T. R. Toxin–antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 41, n. 3, p. 343–353, 2017.

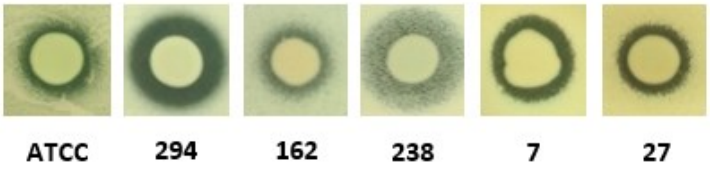
ZANKARI, E. *et al*. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother*., v. 67, n. 11, 2012.

APÊNDICE A - Fluxograma do projeto realizado durante o mestrado



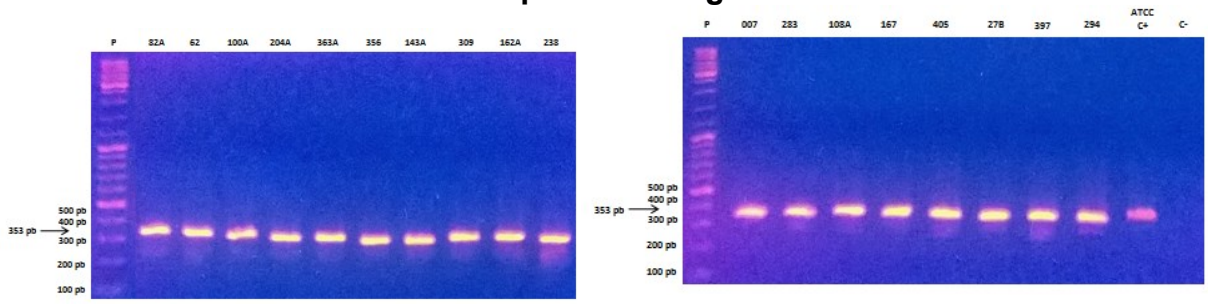
Representação esquemática das etapas do projeto realizadas durante o mestrado: *screening* (A), extração (B), espectro de ação (C), caracterização (D) e purificação parcial (E) de substância antimicrobiana produzida por *A. baumannii* e ativa contra amostras MDR da mesma espécie. **A**, o *screening* foi realizado com 19 amostras de *A. baumannii*, em diferentes condições de cultivo, empregando, como reveladoras, as próprias amostras produtoras (teste de sobrecamada). Dentre as 19 amostras testadas, apenas uma produziu algo que inibiu, no primeiro momento, algumas amostras de bactéria, em *Brain Heart Infusion* Agar suplementado com extrato de levedura, a 25 °C. Dentre todas as amostras sensíveis, foi selecionada aquela que apresentou halo de inibição maior e mais límpido. **B**, a produção da substância foi otimizada e, em seguida, a amostra produtora foi submetida à precipitação ácida com HCl 5 N, até pH 2,0, obtendo extrato ativo até 1:16. **C**, os testes de atividade antimicrobiana com o extrato bruto foram realizados contra 37 clones de *A. baumannii*, sendo 35 MDR e 38 amostras de referência de bactérias de importância clínica. Observou-se atividade contra todas as 37 amostras de *A. baumannii* (halos grandes e límpidos). **D**, a substância ativa presente no extrato bruto foi caracterizada quanto à natureza proteíca (inativada por diferentes enzimas proteolíticas - tripsina, proteinase K, pepsina, papaína e α-quimiotripsina), estabilidade ao tratamento com solventes orgânicos por 3 h (acetona, acetonitrila, álcool isopropílico, metanol, etanol e hexano), uma ampla faixa de pH (2 a 12) (tempo máximo dos testes, 2 meses) e temperatura (-80 a, aproximadamente, 100 °C), com variação do período de estabilidade para cada temperatura. Merece destaque a estabilidade por 7 dias a 25 °C (temperatura de produção) e 37 °C (temperatura de cultivo das amostras suscetíveis). **E**, o extrato bruto, sabidamente ativo e parcialmente caracterizado, foi submetido a 3 etapas de cromatografia de fase reversa, usando colunas C8 (uma etapa) e C18 (2 etapas), as frações ativas obtidas na última etapa de cromatografia foram analisadas no espectro de massas e observou-se a presença de duas massas, difíceis de serem separadas e consequentemente, identificadas (GUIMARÃES, 2016). Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE B - Seleção da amostra reveladora de *Acinetobacter baumannii* empregada nas etapas de caracterização e purificação parcial da substância antimicrobiana



Suscetibilidade das amostras de *A. baumannii* contra *A. baumannii* 397 (produtora da substância antimicrobiana), avaliada em meio *Brain Heart Infusion* Agar, suplementado com extrato de levedura, a 25°C, por 20 h. Dentre as 19 amostras testadas como reveladoras, nessa ilustração, são apresentadas apenas aquelas cujos halos puderam ser mensurados, sendo, ATCC 19606 (10,07 mm), 294 (15,84 mm), 162 (10,52 mm), 238 (13,09 mm), 7 (12,37 mm) e 27 (11,08 mm). A amostra *A. baumannii* 294 foi a mais suscetível (GUIMARÃES, 2016).
Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE C - Identificação genotípica das 19 amostras de *Acinetobacter baumannii* por PCR do gene *bla*$_{OXA51}$



Detecção de *bla*$_{OXA51}$, gene intrínseco de *A. baumannii*, por PCR; *amplicons* de 353 pb observados em todas as amostras. C+, controle positivo: *A. baumannii* ATCC 19606; C -, controle negativo: água. P, padrão de massa molecular (100 pb); pb, pares de bases (GUIMARÃES, 2016).
Fonte: Elaborado pelo autor.

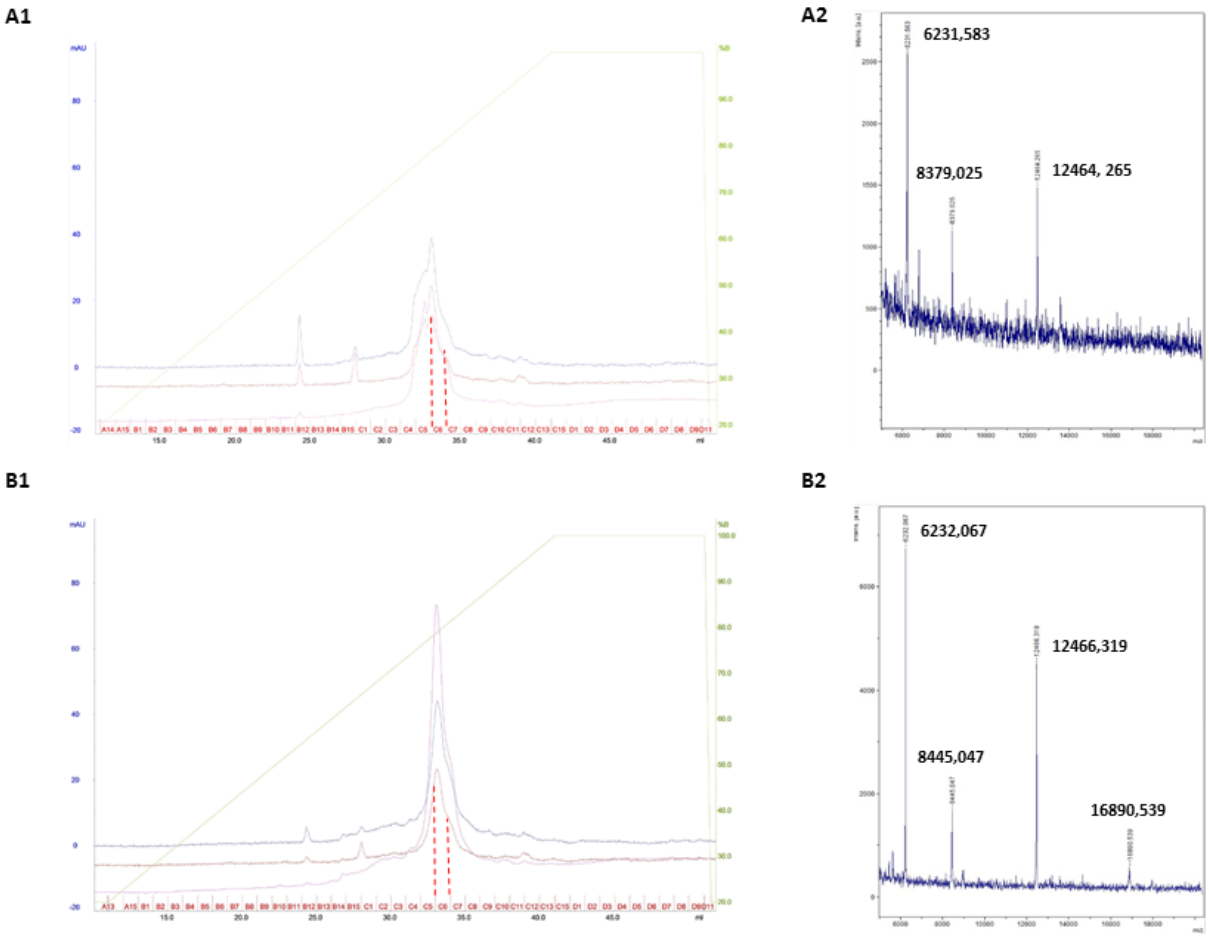
APÊNDICE D - Perfil de suscetibilidade das amostras de *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli*

AMOSTRAS	DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm)[1] Classes dos agentes antimicrobianos												PADRÃO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA (n° de antimicrobianos (R-n°)/n° de classes)[3,4]
	Cefalosporinas		*Carbapenêmicos*		*Tetraciclinas*	*β-lactâmicos + I*[2]		*Fluoroquinolonas*		*Aminoglicosídeos*			
	CAZ	CPM	IPM	MER	TET	ASB	PPT	LVX	CIP	GEN	AMI	TOB	
E. coli BL21	37,75	40,50	36,51	38,64	27,43	32,16	38,36	46,14	49,49	28,41	30,36	28,08	0
E. coli BL21 - T	0,00	12,20	14,16	10,94	16,85	18,14	10,74	10,13	0,00	0,00	10,45	0,00	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - GEN - AMI- TOB (R10) / 5 classes
A. baumannii 397	0,00	10,91	12,99	9,60	15,14	15,33	9,43	0,00	0,00	0,00	8,48	0,00	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - GEN - AMI- TOB (R10) / 5 classes
A. baumannii 294	18,00	21,88	31,74	23,00	15,97	25,99	22,67	26,65	26,00	22,01	23,14	20,82	0
A. baumannii 167	23,57	13,83	13,21	9,86	22,99	15,28	11,33	30,53	30,53	22,48	23,22	25,65	CPM - IPM - MER - PPT (R4) / 3 classes
A. baumannii 108	22,40	15,00	13,29	9,83	24,42	18,35	13,19	15,65	0,00	8,74	23,73	21,61	IPM - MER - PPT - CIP - GEN (R5) / 4 classes
A. baumannii 62	0,00	9,80	11,05	9,01	19,27	13,29	9,90	9,42	0,00	20,41	15,00	25,87	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP (R7) / 4 classes
A. baumannii 283	12,82	13,30	29,27	22,75	17,78	20,13	17,00	8,47	0,00	0,00	7,43	0,00	CAZ - CPM - PPT - LVX - CIP - GEN - AMI - TOB (R8) / 4 classes
A. baumannii 100A	0,00	10,15	10,81	7,39	18,73	0,00	9,80	11,02	0,00	0,00	12,35	17,55	CAZ - CPM - IPM - MER - ASB - PPT - LVX - CIP - GEN - AMI (R10) / 5 classes
A. baumannii 143A	0,00	0,00	12,89	7,46	21,19	13,01	0,00	13,00	0,00	14,00	18,12	15,00	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP (R7) / 4 classes
A. baumannii 204	0,00	11,98	12,85	8,96	19,96	10,94	11,44	13,00	0,00	0,00	11,42	17,19	CAZ - CPM - IPM - MER - ASB - PPT - LVX - CIP - GEN - AMI (R10) / 5 classes
A. baumannii 309	0,00	9,91	11,42	0,00	16,71	11,00	9,82	10,08	0,00	0,00	13,04	18,21	CAZ - CPM - IPM - MER - ASB - PPT - LVX - CIP - GEN - AMI (R10) / 5 classes
A. baumannii 363A	19,59	7,71	11,04	7,93	19,47	18,72	12,42	18,09	9,88	18,94	21,83	24,42	CPM - IPM - MER - PPT - CIP (R5) / 4 classes
A. baumannii 007	0,00	10,63	13,59	8,20	20,57	16,57	11,31	10,40	0,00	0,00	20,98	11,72	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - GEN - TOB (R9) / 5 classes
A. baumannii 82A	0,00	10,76	12,98	8,34	19,20	15,98	12,86	10,23	0,00	18,76	12,15	24,78	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - AMI (R8) / 5 classes
A. baumannii 162	0,00	12,51	29,39	23,81	19,85	22,55	19,67	9,42	0,00	15,65	11,72	23,35	CAZ - CPM - LVX - CIP - AMI (R5) / 3 classes
A. baumannii 238B	0,00	0,00	10,65	7,30	19,67	10,81	0,00	11,42	0,00	13,03	23,35	18,72	CAZ - CPM - IPM - MER - ASB - PPT - LVX - CIP (R8) / 4 classes
A. baumannii 356A	0,00	0,00	11,81	7,13	20,90	13,19	0,00	12,15	0,00	13,00	12,28	18,90	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - AMI (R8) / 5 classes
A. baumannii 27B	0,00	10,10	12,57	0,00	18,05	17,57	11,39	8,97	0,00	16,97	20,56	22,70	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP (R7) / 4 classes
A. baumannii 405	0,00	12,36	12,75	8,40	18,18	15,33	11,13	14,00	0,00	19,49	12,38	24,01	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - CIP - AMI (R7) / 5 classes
A. baumannii 24	0,00	8,63	14,75	10,36	20,46	19,15	10,39	9,90	0,00	16,99	8,93	24,22	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - AMI (R8) / 5 classes
A. baumannii 16	0,00	11,25	12,06	9,64	21,10	17,59	12,62	13,00	0,00	20,23	15,96	25,20	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP (R7) / 4 classes
A. baumannii 32	10,99	0,00	13,14	7,21	22,40	15,00	8,62	15,24	0,00	16,99	15,82	13,25	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - CIP (R6) / 4 classes
A. baumannii 21	0,00	10,94	12,14	7,21	19,05	14,00	9,75	11,15	0,00	18,94	15,00	24,72	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP (R7) / 4 classes
A. baumannii 22	0,00	8,55	9,36	0,00	19,24	12,00	8,53	8,63	0,00	18,34	13,64	24,21	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - AMI (R8) / 5 classes
A. baumannii 12	22,52	12,26	10,49	7,89	21,70	16,93	13,93	14,36	8,44	19,27	22,57	26,23	CPM - IPM - MER - PPT - CIP (R5) / 4 classes
A. baumannii 43	18,00	8,53	11,87	0,00	13,25	0,00	0,00	0,00	0,00	9,71	9,67	16,67	CPM - IPM - MER - ASB - PPT - LVX - CIP - GEN - AMI (R9) / 5 classes
A. baumannii 3	0,00	8,75	9,89	7,31	18,70	16,43	12,30	9,69	0,00	16,26	18,85	20,74	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP (R7) / 4 classes
A. baumannii 5	19,05	10,95	13,61	0,00	13,37	0,00	0,00	8,42	0,00	10,20	10,57	17,30	CPM - IPM - MER - ASB - PPT - LVX - CIP - GEN - AMI (R9) / 5 classes
A. baumannii 2	20,14	13,87	15,86	10,51	15,70	19,49	13,33	13,00	0,00	13,16	11,67	18,72	CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - AMI (R7) / 5 classes
A. baumannii 6	0,00	9,78	9,05	0,00	19,64	13,14	10,38	9,37	0,00	16,65	20,91	23,96	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP (R7) / 4 classes
A. baumannii 1	0,00	14,00	13,73	9,13	20,51	19,09	12,42	18,68	0,00	19,84	15,00	15,00	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - CIP (R6) / 4 classes
A. baumannii 15	0,00	11,10	11,46	9,22	18,96	17,95	12,39	13,00	0,00	18,60	13,41	23,10	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - AMI (R8) / 5 classes
A. baumannii 10	18,00	7,96	9,34	0,00	17,33	12,65	7,92	15,79	10,03	16,57	19,85	22,26	CPM - IPM - MER - PPT - CIP (R5) / 4 classes
A. baumannii 30	0,00	10,63	12,22	7,65	20,05	15,23	10,97	11,15	0,00	19,66	13,93	24,12	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - AMI (R8) / 5 classes
A. baumannii 34	19,36	12,04	13,83	10,98	15,39	18,51	12,22	10,57	0,00	13,00	11,14	18,50	CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - AMI (R7) / 5 classes
A. baumannii 37	0,00	8,49	10,37	0,00	17,83	12,11	8,42	9,82	0,00	17,84	12,79	24,31	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP - AMI (R8) / 5 classes
A. baumannii 39	0,00	11,41	15,43	11,71	18,44	17,87	11,95	10,98	0,00	18,49	15,32	24,83	CAZ - CPM - IPM - MER - PPT - LVX - CIP (R7) / 4 classes
A. baumannii ATCC	22,52	20,33	33,61	26,10	25,79	33,36	26,65	29,61	23,28	14,00	18,21	22,50	0

[1], milímetros; [2], β-lactâmicos combinados com inibidores de β-lactamases; [3], número de agentes antimicrobianos a qual a amostra é resistente/número de classes a que a amostra é resistente; CAZ, ceftazidima; CPM, cefepime; IPM, imipenem; MER, meropenem; TET, tetraciclina; ASB, ampicilina - sulbactam; PPT, piperacilina - tazobactam; LVX, levofloxacina; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; AMI, amicacina; TOB, tobramicina; vermelho, resistente; verde, sensível; amarelo, resistência intermediária (CLSI, 2018); [4], Amostras resistentes a pelo menos um antimicrobiano de três diferentes classes são classificados como multidroga resistentes (MDR) (MAGIORAKOS *et al*., 2012)
E. coli BL21 - T, amostra transformada com plasmídio selvagem. Fabricante dos antimicrobianos, Cecon, com exceção do IPM e TOB, Laborclin.

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE E - Espectros de massas da fração C6 em matriz DHB



Espectro de massas da fração C6, oriunda das corridas 40 (A) e 41 (B) obtida da última etapa de cromatografia do extrato bruto isolado de *A. baumannii* 397. **A1** e **B1**, perfis cromatográficos em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 40 (A) e 41 (B), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de acetonitrila 0 a 100% (verde), a 25 °C. **A2** e **B2**, espectros de massas em matriz DHB da fração C6, corrida 40 (A2) e corrida 41 (B2). A2, presença de três íons moleculares, sendo, 6.231, 583; 8.379, 025 e 12464,265 Da. B2, presença de quatro íons, sendo, 6.232,067; .8445, 047; 12466,319 e 16890,599 Da. Intensidade relativa *versus* função massa sobre carga (m/z) (GUIMARÃES, 2016).

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE F - Teste de suscetibilidade a antimicrobianos dos clones recombinantes em busca do gene de resistência relacionado ao plasmídio selvagem

Para verificar se a resistência antimicrobiana estava relacionada a uma das quatro proteínas recombinantes, os clones de DE3 que expressaram as proteínas hipotéticas 1, 2 e 3 e a septicolisina foram avaliados quanto ao perfil de suscetibilidade a agentes antimicrobianos, conforme descrito previamente no item 4.1.1, com diferenças apenas nos critérios usados para interpretação dos resultados. Foram utilizados os valores fornecidos para bactérias da família Enterobacteriaceae (CLSI, 2019).

Os clones foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados, com exceção da canamicina, marcador de seleção do pET28aTEV.