

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Frederico Gabriel de Carvalho Oliveira

**GENÔMICA COMPARATIVA E TRANSCRIPTÔMICA DE *ACINETOBACTER*
BAUMANNII EM RESPOSTA AO PEPTÍDEO LYETX I MNAK**

Belo Horizonte

2025

Frederico Gabriel de Carvalho Oliveira

**GENÔMICA COMPARATIVA E TRANSCRIPTÔMICA DE *ACINETOBACTER*
BAUMANNII EM RESPOSTA AO PEPTÍDEO LYETX I MNAK**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica e
Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Glória Regina
Franco

Coorientadora: Dra. Katharina de Oliveira
Barros

Belo Horizonte

2025

043

Oliveira, Frederico Gabriel de Carvalho.

Genômica comparativa e transcriptômica de *Acinetobacter baumannii* em resposta ao peptídeo LyeTx I Δ mn [manuscrito] / Frederico Gabriel de Carvalho Oliveira. – 2025.

90 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Glória Regina Franco. Coorientadora: Dra. Katharina de Oliveira Barros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. *Acinetobacter baumannii*. 3. Peptídeos Antimicrobianos. 4. Genômica. 5. Transcriptoma. I. Franco, Glória Regina. II. Barros, Katharina de Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FREDERICO GABRIEL DE CARVALHO OLIVEIRA. Aos vinte e cinco dias do mês de março de 2025 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Genômica comparativa e transcriptômica de *Acinetobacter baumannii* em resposta ao peptídeo LyeTXI mnΔK", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Glória Regina Franco, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Flávia Figueira Aburjaile (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Katharina de Oliveira Barros - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Glória Regina Franco - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

☒ APROVADO
☐ REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 25 de março de 2025.

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

Dra. Flávia Figueira Aburjaile (UFMG)

Dra. Katharina de Oliveira Barros - Coorientadora (UFMG)

Dra. Glória Regina Franco - Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha namorada, Amanda Cristina. Obrigado por ser minha duplinha desde a graduação e iniciação científica. Por fazer todos esses momentos mais especiais. Por sempre acreditar em mim e me fazer esforçar para ser um melhor cientista e uma melhor pessoa a cada dia. Sou muito feliz de compartilhar minha vida com você durante todo esse tempo e também no nosso futuro na USP.

À Thais Bassani, sou extremamente grato por ter te conhecido durante o surto que foi a matéria de bases moleculares da estrutura e função celular. Obrigado pela sua amizade e apoio em todos os momentos que compartilhamos desde então. Gratidão por fazer do mestrado algo muito mais leve.

Ao professor Erich Tahara por ter me aceito na IC em 2019 e acreditado em mim durante todo esse tempo. Obrigado por todos os conselhos, pela amizade, por me ensinar o que é ciência, por me fazer apaixonar por isso. Tenho certeza absoluta que nada disso teria acontecido sem você em minha vida. Por ser uma das minhas maiores inspirações, uma das pessoas que mais admiro e espero poder continuar contando com você pelo resto da vida.

Um grande agradecimento a Chefa, por me ensinar o que é a bioinformática, por todas as discussões que tivemos, ensinamentos de vida e de ciência, pelas chamadas de atenção que foram importantíssimas e por sempre acreditar que podemos fazer um trabalho cada vez melhor. Agradeço por ser o exemplo de cientista e professora que você é.

Agradeço ao LGB, que é minha casa desde 2019, pelas amizades, conversas, diversões geradas ao longo dos anos. Aos professores Andréa Macedo e, em especial, Carlos Renato por sua dedicação ao laboratório e ao curso de Ciências Biológicas, sua inspiradora vontade de ensinar bioquímica e discutir ciência. Aos alunos que conheci ao longo dos anos, em especial a Lorrane Diniz, Wesley Ferreira, Bruno Rezende, Daniela de Laet, Heron Hilário, Adalberto Sales, Verônica Santana e Amanda Carolina, por todos os momentos especiais, pelos ensinamentos e protocolos compartilhados, e por deixar a convivência no lab sempre mais leve.

Agradeço de maneira especial a minha coorientadora Katharina Barros por todos os ensinamentos, esse trabalho não existiria sem você. Obrigado pelas

risadas, chamadas de atenção extremamente necessárias e principalmente por acreditar nesse trabalho e em mim também.

Aos Gloriosos pelo acolhimento, discussões e ensinamentos durante o período do mestrado, em especial as pessoas que se tornaram parte essencial da minha vida, Bárbara Marinho, Gabrielle Melo, Dáfne Oliveira, Gabriel Mendes, André Rodrigues, Júlia Raspante e Ícaro Castro. Obrigado por cada momento, pelas risadas, scripts e por tornarem a vida no lab mais fácil e divertida com vocês por perto. Tenho absoluta certeza que não conseguiria passar por esse período sem vocês.

Aos professores Marina Quezado e Lucas Bleicher por todos os momentos compartilhados, conselhos e, em especial, as jogatinas no LBM a noite.

Aos meus pais, Cássia Fátima e Enio de Oliveira, pelos sacrifícios que foram feitos ao longo dos anos para que eu pudesse me dedicar exclusivamente aos meus estudos. Pelo apoio dado durante todo esse tempo.

Agradeço ao CafaTM: Filipe Martins, Luiz Guilherme, Christian Rodrigues, Gabriel Júlio, Cristiano Dutra, André Marisguia, Aleksander Rocha e Arthur Coelho. Obrigado pela amizade desde o ensino médio, por todas as conversas, risadas, encontros, loucuras, rolês e por poder contar com vocês nos meus melhores e piores momentos. Tenho certeza que não estaria aqui sem vocês em minha vida.

Agradeço aos meus amigos Marina Andrade, Marcus Vinícius, Pedro Palmeira, Julia Rodrigues e Daniela Luciana por todo apoio dado durante esse período.

Agradeço aos funcionários do ICB, em especial ao Alexandre por sempre estar disposto a ajudar durante os muitos momentos de dúvida na pós-graduação. E a também a Patrícia por todas as conversas e fofocas nos corredores do ICB.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia por todo o conhecimento que contribuíram para a minha formação profissional. Também agradeço à FAPEMIG pelo financiamento da minha bolsa durante este período.

Por fim, agradeço a UFMG por ser minha casa desde 2017, por me acolher, trazer sentido e pertencimento.

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um importante patógeno envolvido em infecções associadas à assistência à saúde caracterizado por infecções em pacientes imunossuprimidos, que podem causar, dentre outras complicações, pneumonia. O tratamento é desafiador, devido a seleção de microrganismos resistentes aos medicamentos comumente utilizados. Uma alternativa são os peptídeos antimicrobianos, tal como LyeTx I mn Δ K, que apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos, além de demonstrar sinergia com outros antibióticos utilizados clinicamente, como o meropenem. Portanto, nosso objetivo é caracterizar o genoma de uma nova linhagem de *A. baumannii* AC37 multirresistente e avaliar o efeito antimicrobiano do peptídeo LyeTx I mn Δ K, do meropenem e da combinação do peptídeo com o meropenem através da análise do transcriptoma bacteriano. Após a montagem e anotação do genoma, com os programas Unicycler e pgap, foram identificados 31 genes associados à resistência a antibióticos através do RGI. Adicionalmente, foram realizadas análises filogenéticas com outros 122 genomas de *A. baumannii* e identificamos 3 genes exclusivos do isolado AC37. Através de análises do mobiloma bacteriano, utilizando o TNCentral, identificamos 13 genes associados a regiões de elementos genéticos móveis, sendo 2 dos 3 genes exclusivos de AC37, sugerindo eventos de transferência horizontal entre diferentes espécies. Para as análises dos transcriptomas, o mapeamento e contagem dos genes foram realizados com os programas Bowtie2 e FeatureCounts, respectivamente. Foi observado que o tratamento com o peptídeo gerou o maior número de genes diferencialmente expressos, seguido pelo sinergismo e, por último, o meropenem. Analisamos também a expressão dos genes de resistência identificados no genoma e observou-se a superexpressão de 2 operons relacionados aos sistemas de efluxo ativo bacteriano. Através de análises de enriquecimento funcional, observamos ativação de processos celulares como a produção, exportação e secreção de proteínas; resistência a β -lactâmicos no tratamento com o LyeTx I mn Δ K, demonstrando a plasticidade da resposta bacteriana a estresses externos. Este estudo ajuda na caracterização de um novo isolado de *A. baumannii* além da compreensão da resposta bacteriana a um possível novo alvo terapêutico.

Palavras-chaves: *Acinetobacter baumannii*; peptídeos antimicrobianos; transcriptômica; genômica

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a major pathogen involved in healthcare-associated infections, characterized by infections in immunosuppressed patients, which can lead to complications such as pneumonia. Treating infections caused by these bacteria is challenging, as the hospital environment favors the selection of microorganisms resistant to commonly used drugs. An alternative is antimicrobial peptides, such as the Toxin I peptide from *Lycosa erythrognatha* (LyeTx I), which exhibits antimicrobial activity against bacteria and fungi. Its derived form, LyeTx I mnΔK, composed of 16 amino acids, demonstrates synergy with other clinically used antimicrobials, such as meropenem, in *in vitro* assays for the treatment of *A. baumannii* infections. Therefore, our objective is to characterize the genome of a new multidrug-resistant *A. baumannii* strain, AC37, and evaluate the antimicrobial effect of the LyeTx I mnΔK peptide, meropenem, and the combination of the peptide with meropenem through bacterial transcriptome analysis. After genome assembly and annotation using the Unicycler and PGAP programs, 31 genes associated with antibiotic resistance were identified through RGI. Additionally, phylogenetic analyses were conducted with 122 other *A. baumannii* genomes, identifying three unique genes in the AC37 isolate. Through bacterial mobilome analyses, we identified 13 genes associated with mobile genetic element regions, with two of the three unique genes in AC37, suggesting horizontal transfer events between different species. For transcriptome analyses, gene mapping and counting were performed using Bowtie2 and FeatureCounts, respectively. It was observed that treatment with the peptide resulted in the highest number of differentially expressed genes, followed by the synergy treatment, and lastly, meropenem. We also analyzed the expression of the resistance genes identified in the genome and observed the overexpression of two operons related to bacterial active efflux systems. Through functional enrichment analyses, we identified cellular processes such as protein production, export, and secretion, as well as β -lactam resistance activation during treatment with LyeTx I mnΔK. This study contributes to the identification of a new *A. baumannii* isolate and enhances the understanding of bacterial response to a potential new therapeutic target.

Key-words: *Acinetobacter baumannii*; antimicrobial peptides; transcriptomics; genomics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismos de aquisição de material genético.....	15
Figura 2. Principais classes de elementos genéticos móveis que contribuem para a resistência a antimicrobianos em <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
Figura 3. Mecanismos moleculares da resistência à antibióticos.....	18
Figura 4. Diagrama esquemático dos peptídeos antimicrobianos no combate a infecções bacterianas resistentes a medicamentos.....	21
Figura 5. Estrutura obtida por RMN do peptídeo LyeTx I.....	21
Figura 6. Representação esquemática do pipeline utilizado para as análises de genômica.....	25
Figura 7. Representação esquemática do pipeline utilizado para as análises de genômica.....	29
Figura 8. Qualidade dos sequenciamentos.....	33
Figura 9. Completude do genoma via BUSCO.....	35
Figura 10. Visualização do genoma montado pelo Unicycler através do Bandage...	36
Figura 11. Plasmídeo NZ_CP131945.1 identificado no PLSDB.....	36
Figura 12. Genes de resistência à antibióticos.....	38
Figura 13. Genes de virulência.....	39
Figura 14. Identificação e classificação dos elementos genéticos móveis do isolado AC37.....	40
Figura 15. Árvore filogenética de 124 linhagens <i>Acinetobacter baumannii</i>	42
Figura 16. Comparação dos genes de resistência à antibióticos em 123 linhagens de <i>Acinetobacter baumannii</i>	43
Figura 17. Comparação dos genes de virulência em 123 linhagens de <i>Acinetobacter baumannii</i>	44
Figura 18. Qualidade dos sequenciamentos.....	46
Figura 19. Perfil de variação das amostras.....	47
Figura 20. Comparação do número de genes diferencialmente expressos entre as condições experimentais.....	48
Figura 21. Expressão dos genes de resistência.....	49
Figura 22. Processos biológicos enriquecidos nos tratamentos com o peptídeo LyeTx I mnΔK e Sinergismo.....	51
Figura 23. Gráficos Volcanos do estudo PRJNA548006.....	52
Figura 24. Gráficos Volcanos do estudo PRJNA787205.....	54
Figura 25. Expressão dos genes de resistência nos estudos baixados do SRA.....	55
Figura 26. Processos biológicos enriquecidos nos tratamentos com Meropenem no projeto PRJNA787205e.....	56
Figura 27. Representação da estrutura terciária de AAC(6')-Ib'.....	59
Figura 28. Mecanismo de hidrólise enzimática por β-lactamases da classe C (AmpC).....	60
Figura 29. Mecanismo de ação de adeB.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos peptídeos derivados de LyeTx I.....	22
Tabela 2 - Comparação das montagens do genoma do isolado AC37 pelos programas SPAdes e Unicycler.....	34
Tabela 3 - Comparação das anotações do genoma do isolado AC37 pelos programas pgap e Prokka.....	37
Tabela 4 - Descrição dos dados de sequenciamento de RNA.....	45
Tabela 5 - Percentual de mapeamento das reads nos programas STAR e Bowtie2..	46
Tabela 6 - Características dos estudos de <i>Acinetobacter baumannii</i> tratada com Meropenem depositadas no SRA.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC37	Isolado de <i>Acinetobacter baumannii</i> de cateter central venoso
Acb	Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>
AMP	<i>Antimicrobial peptides</i> - Peptídeos antimicrobianos
AMR	<i>Antimicrobial resistance</i> - Resistência antimicrobiana
CARD	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CDS	<i>Coding sequence</i> - Região Codificadora
CRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenêmicos
DEGs	<i>Differentially expressed genes</i> - Genes diferencialmente expressos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-Seq	Sequenciamento de DNA
ESKAPE	Grupo de bactérias gram-negativas patogênicas de importância clínica
GC	Bases nitrogenadas Guanina e Citosina
gDNA	DNA genômico
GTA	<i>Phage-like transfer agents</i> - Agentes de transferência semelhante aos fagos
ID	Identificador
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> - Concentração mínima inibitória
MGE	Mobile Genetic Elements - Elementos genéticos móveis
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Open Read Frame</i> - Fase de janela aberta
pb	Pares de bases
PBPs	<i>Penicillin-binding proteins</i> - Proteínas de ligação à Penicilina
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> - Análise de componente principal
PLSDB	<i>Plasmid Database</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
Sub-MIC	Concentração mínima sub-inibitória
VFDB	<i>Virulence Factors Database</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> - Sequenciamento de genoma completo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	13
1.2 Mecanismos de resistência em <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
1.3 Peptídeos antimicrobianos.....	19
1.4 LyeTx I e seus derivados.....	21
1.5 Genômica e transcriptômica no estudo de microrganismos.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Genômica.....	25
3.1.1 Fluxo de trabalho resumido.....	25
3.1.2 Aquisição dos dados de sequenciamento de DNA genômico (gDNA).....	25
3.1.3 Montagem, anotação e completude.....	26
3.1.4 Análise filogenética.....	27
3.1.5 Identificação de genes de resistência e virulência, e elementos móveis.....	28
3.2 Transcriptômica.....	29
3.2.1 Fluxo de trabalho resumido.....	29
3.2.2 Aquisição dos dados de sequenciamento de RNA e controle de qualidade... 29	
3.2.2 Mapeamento do transcriptoma.....	30
3.2.3 Análises de expressão diferencial de genes e enriquecimento funcional....	31
3.2.4 Meta-análise de transcriptomas de <i>Acinetobacter baumannii</i> tratadas com Meropenem.....	31
3.3 Recursos computacionais.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1 Genômica.....	33
4.1.1 Controle de qualidade, montagem, completude e anotação do genoma de <i>Acinetobacter baumannii</i> AC37.....	33
4.1.2 Identificação de genes de resistência.....	37
4.1.3 Identificação de genes de virulência.....	38
4.1.4 Identificação de elementos genéticos móveis.....	39
4.1.5 Árvore filogenética.....	40
4.1.6 Comparação dos genes de resistência entre as linhagens de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	42
4.1.7 Comparação dos genes de virulência entre as linhagens de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	43
4.2 Transcriptômica.....	44
4.2.1 Controle de qualidade, mapeamento e contagem de genes.....	44
4.2.2. Expressão diferencial de genes.....	47
4.2.3 Enriquecimento funcional.....	49

4.2.4. Dados públicos de RNA-Seq.....	51
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS.....	68
8. APÊNDICES.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Acinetobacter baumannii*

O gênero *Acinetobacter* pertence à família Moraxellaceae e à ordem Pseudomonadales. Ele foi descrito pela primeira vez em 1954 por Brisou e Prévot, que o separaram de outros grupos de bactérias gram-negativas (BRISOU; PREVOT, 1954). Este gênero é composto por bactérias estritamente aeróbicas, não móveis, catalase-positivas, negativas para a produção de índole, desprovidas da enzima citocromo oxidase, citrato-positivas e com conteúdo GC variando entre 39-47% (ALMASAUDI, 2018).

Atualmente, é composto por mais de 80 espécies distribuídas em uma ampla diversidade de ambientes (PARTE et al., 2020). Essas incluem espécies de vida livre e associadas ao solo, água, esgoto, alimentos e animais incluindo, seres humanos, e podem ser tanto bactérias patogênicas quanto não patogênicas (DOUGHARI et al., 2011).

Espécies não patogênicas podem desempenhar papéis relevantes em processos fermentativos, contribuindo para o sabor e a preservação de alimentos (UZEH; OHENHEN; ROJUGBOKAN, 2006; KOOHI et al., 2014). Além disso, estão envolvidas na degradação de fenóis, auxiliando na biorremediação de solos contaminados (LIU et al., 2016, 2020). Por outro lado, espécies patogênicas estão associadas a diversas comorbidades em seres humanos como pneumonia, meningite, diarreia, hemólise e bacteremia (MULESHKOVA et al., 2024).

Os isolados com relevância clínica do gênero *Acinetobacter* podem ser agrupados e classificados filogeneticamente no complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb). Neste grupo estão presentes 5 linhagens patogênicas, *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. seifert* e *A. dijkshoorniae* (também conhecida por *A. lactucae*), assim como uma linhagem não patogênica, *A. calcoaceticus* (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). Dentre elas, *A. baumannii* é a mais estudada devido à forte associação com infecções oportunistas em ambientes hospitalares (RAMIREZ; BONOMO; TOLMASKY, 2020; IBRAHIM et al., 2021).

A. baumannii pode colonizar diferentes tecidos, incluindo a pele, trato urinário, feridas e até o sistema nervoso central. Contudo, as infecções mais frequentes e associadas aos maiores índices de mortalidade envolvem a colonização dos vasos sanguíneos e, principalmente, dos pulmões, o que resulta em pneumonia severa (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014; LEE et al., 2017).

As infecções por essa bactéria são frequentemente facilitadas em pacientes recém-operados ou que apresentam infecções concomitantes. Em ambientes hospitalares, ela é facilmente introduzida no organismo através de feridas, cateteres intravasculares e ventiladores pulmonares (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014)

Aproximadamente 45% dos isolados de *A. baumannii* são classificados como multirresistentes a antimicrobianos, uma das maiores porcentagens entre as bactérias do grupo ESKAPE (GIAMMANCO et al., 2017). Este grupo inclui *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* Em regiões subdesenvolvidas, os valores podem chegar a 70% dos isolados identificados como multirresistentes (IBRAHIM et al., 2021).

1.2 Mecanismos de resistência em *Acinetobacter baumannii*

A resistência bacteriana a antimicrobianos (do inglês, AMR - *Antimicrobial Resistance*) representa um desafio à saúde pública global (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). O tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas é desafiador devido à impermeabilidade da membrana externa, que atua como uma barreira protetora contra diversos agentes antimicrobianos. Superar essa barreira é necessário para aumentar a concentração intracelular do antibiótico, potencializando sua eficácia e melhorando o prognóstico das infecções (Whittle et al., 2021).

Bactérias apresentam alta plasticidade genética, em especial sob estresse, permitindo-lhes desenvolver ou adquirir uma ampla gama de mecanismos de resistência, como enzimas capazes de degradar ou alterar fármacos, bombas de efluxo, alteração da permeabilidade celular e diversos outros mecanismos (GORDON; WAREHAM, 2010; CERCEO et al., 2016). Os genes de resistência podem ser intrínsecos, já presentes no genoma e sujeitos a mutações, ou adquiridos por meio de elementos genéticos móveis (do inglês MGE - *Mobile Genetic*

Elements), como plasmídeos, transposons e integrons. (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; RUMBO-FEAL et al., 2013).

A aquisição de material genético em bactérias está representada na Figura 1 e pode ocorrer por 3 vias clássicas: transformação, transdução e conjugação (OLIVEIRA et al., 2017). A transformação consiste na captação de fragmentos de DNA disponíveis no ambiente; a transdução ocorre por meio da transferência de material genético mediada por bacteriófagos; e a conjugação envolve o contato direto entre duas bactérias, permitindo a transferência de plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis. Além das vias clássicas, a transferência de material genético pode ocorrer por mecanismos alternativos, como vesículas membranares, estruturas semelhantes ao pilus (nanotubos), ou por agentes que mimetizam a transferência mediada por fagos (do inglês, GTA - *phage-like gene transfer agents*) (ARNOLD; HUANG; HANAGE, 2022).

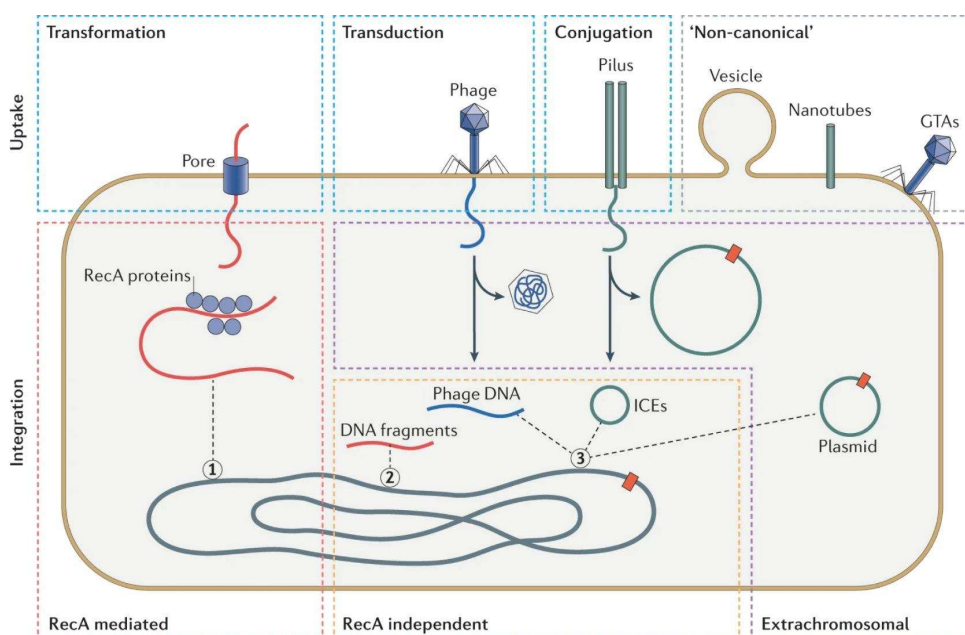


Figura 1. Mecanismos de aquisição de material genético. Os mecanismos clássicos assim como as formas “não canônicas” estão representadas no painel. Depois de adentrar a célula, o material genético pode se integrar ao genoma bacteriano. A integração pode ocorrer dependente de RecA, proteína que se associa ao material genético exógeno e busca por homologia no DNA bacteriano. Também pode ocorrer a integração independente de RecA, onde o material genético exógeno poderia hibridizar em locais de não homologia. Fonte: Arnold, B. J.; Huang, I.-T.; Hanage, 2022.

Os MGEs podem carregar genes de resistência a antibióticos e metais pesados, virulência e catabólicos, sendo essenciais para a disseminação de fenótipos de resistência entre diferentes espécies de bactérias (TOKUDA; SHINTANI, 2024). Os principais elementos genéticos móveis em *A. baumannii* são

as sequências de inserção (do inglês, IS - *Insertion sequences*), os transposons e os integrons e estão representados na Figura 2.

Os elementos de inserção (do inglês IS - *Insertion Elements*), são os menores e mais simples elementos transponíveis, com cerca de 1 kb. Apresentam duas sequências invertidas terminais e uma ou duas ORFs (*Open Read Frame*) que codificam transposases, enzimas responsáveis pela excisão e integração desses elementos no genoma (NOEL; PETREY; PALMER, 2022). Já os transposons apresentam uma estrutura semelhante aos IS, mas se diferenciam pela capacidade de carrear genes passageiros, especialmente genes de resistência à antibióticos (PARTRIDGE et al., 2018). No caso dos integrons, são elementos genéticos móveis capazes de adquirir pequenos cassetes gênicos, geralmente associados à resistência antimicrobiana. Sua estrutura é composta por três regiões principais, um gene que codifica a integrase (*intI1*), um sítio de recombinação (*attI*), onde os cassetes gênicos são inseridos e um promotor (*Pc*), responsável pela expressão dos genes adquiridos (TOKUDA; SHINTANI, 2024).

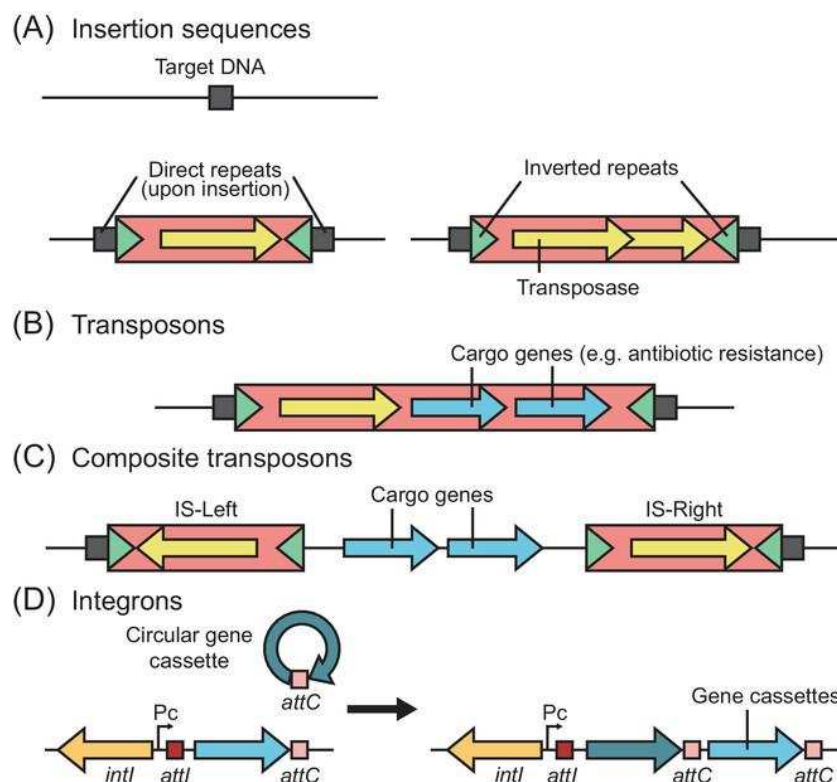


Figura 2. Principais classes de elementos genéticos móveis que contribuem para a resistência a antimicrobianos em *Acinetobacter baumannii*. Representação de mecanismos de aquisição de genes de resistência através de elementos móveis. Painel A: sequências de inserção representadas pelas sequências invertidas terminais e os genes codificadores de transposases; Painel B: representação geral de um transposon de DNA, similar às IS, mas carregando genes passageiros em sua estrutura primária; Painel C: outro tipo de transposon onde os genes passageiros agora são flanqueados por uma IS e não apenas por sequências invertidas terminais; Painel D: representação da estrutura de um integron e a inserção de um cassete gênico a sua sequência. Adaptado de: Noel; Petrey; Palmer, 2022.

A Figura 3 resume os principais mecanismos de resistência em bactérias. A inativação de antibióticos ocorre por meio de enzimas que degradam ou modificam suas moléculas. No caso da degradação enzimática, há hidrólise de grupos funcionais específicos do antibiótico, tornando-o ineficaz. Já as enzimas modificadoras transferem grupos químicos, como acetil, fosforil ou adenil, para a molécula do antibiótico, bloqueando sua interação com o alvo. A alteração do sítio-alvo envolve mudanças estruturais no alvo do antibiótico que reduzem sua afinidade de ligação. Durante o desvio de alvo, uma nova proteína funcional, não inibida pelo antibiótico, assume a função do alvo original, tornando este último redundante e o antibiótico ineficaz. A redução no influxo ocorre devido a modificações na membrana bacteriana, como a regulação negativa de porinas, proteínas transmembranares responsáveis pelo transporte passivo de compostos hidrofílicos menores que 600 Da, incluindo alguns antibióticos. Já o efluxo ativo é mediado por bombas de efluxo transmembranares, que exportam os antibióticos para fora da célula. Por fim, a proteção do alvo envolve a interação de proteínas de proteção com o alvo do antibiótico, mitigando a inibição causada por ele e preservando sua função celular (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017; DARBY et al., 2023; DE PASCALE; WRIGHT, 2010).

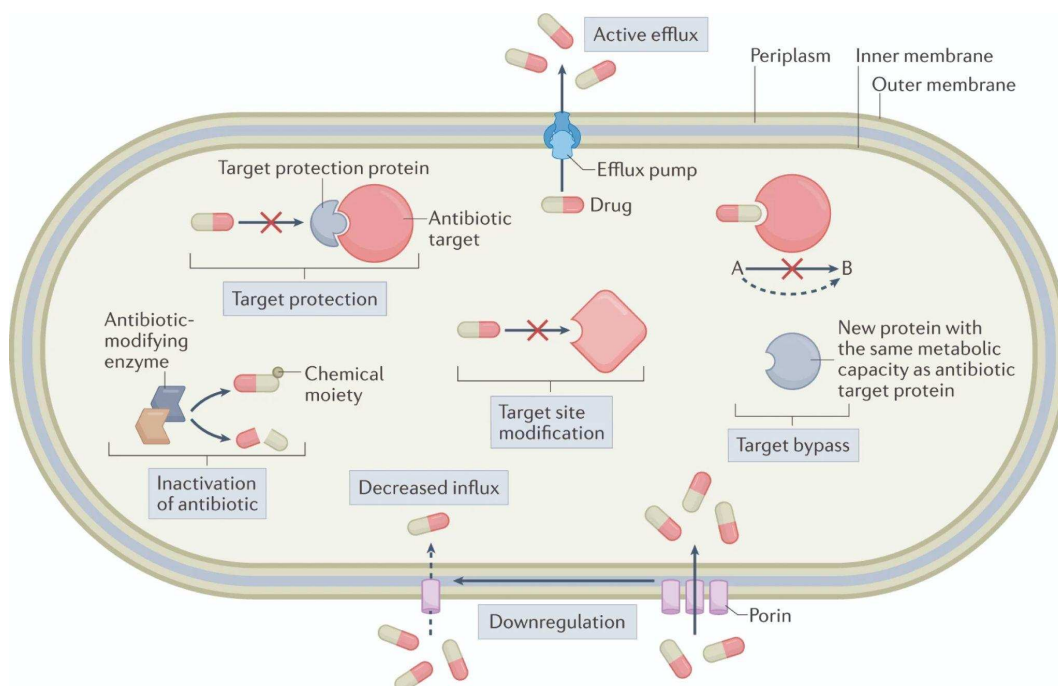


Figura 3. Mecanismos moleculares da resistência à antibióticos. Representação das principais categorias dos genes associados à resistência à antibióticos. Fonte: Darby et al., 2023.

O tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* multirresistente foi, inicialmente, baseado no uso de carbapenêmicos, como Meropenem e Imipenem. Esse grupo de fármacos, introduzido em 1985, representou um avanço no controle e tratamento de infecções por *A. baumannii* (MICHALOPOULOS; FALAGAS, 2010). O Meropenem é um β -lactâmico pertencente à classe dos carbapenêmicos, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de parede celular bacteriana, através da ligação à proteínas de ligação à penicilina (do inglês PBPs - *Penicillin-binding proteins*), impedindo a formação de ligações entre os peptidoglicano, e, consequentemente, há a formação da parede celular defeituosa (ZHANEL et al., 2007; STEFFENS et al., 2021).

No entanto, o uso inadequado e indiscriminado desses antibióticos, associados à falta de diagnóstico rápido, contribuíram para o aumento de bactérias resistentes a carbapenêmicos (DOI, 2019). Atualmente, os polipeptídeos da classe das polimixinas, como a colistina, são os principais fármacos utilizados para o tratamento das infecções por *A. baumannii*. Apesar de sua eficácia, esses medicamentos estão associados a efeitos colaterais, incluindo nefrotoxicidade e neurotoxicidade, o que limita sua aplicação clínica e ressalta a necessidade de alternativas terapêuticas (KYRIAKIDIS et al., 2021; NORDMANN; POIREL, 2019).

Conforme dados da Rede de Vigilância Antimicrobiana da China (CHINET - Antimicrobial Surveillance Network China), a porcentagem de isolados resistentes ao Meropenem aumentou significativamente, passando de aproximadamente 31% em 2005 para cerca de 77% em 2022 (HU et al., 2016; YANG et al., 2023). No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cerca de 83% dos isolados clínicos de *A. baumannii* apresentam resistência a carbapenêmicos em 2023 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA], 2023).

De acordo com o *Centers for Disease Control* (CDC), as infecções por *A. baumannii* estão associadas a períodos prolongados de hospitalização, especialmente em pacientes do gênero masculino e de idade avançada. Dessa forma, a CDC classificou *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (do inglês, CRAB - *Carbapenem Resistant Acinetobacter baumannii*) como prioridade máxima na busca por novos tratamentos (Center for Disease Control and Prevention [CDC], 2021; World Health Organization [WHO], 2017).

1.3 Peptídeos antimicrobianos

A resistência bacteriana a antimicrobianos (AMR) é um fenômeno que confere insensibilidade aos tratamentos devido ao uso amplo de antibióticos. Esse fenômeno é especialmente crítico em ambientes hospitalares e estima-se que, até 2050, as infecções por bactérias resistentes poderão causar cerca de 10 milhões de óbitos (XUAN et al., 2023). Nesse cenário, a busca por novas alternativas terapêuticas se mostram necessárias

Peptídeos antimicrobianos (do inglês, AMPs - *Antimicrobial peptides*) surgem como uma promissora solução terapêutica. Esses peptídeos são pequenas moléculas, geralmente menores que 100 resíduos de aminoácidos, encontradas naturalmente no sistema imune inato de diversos organismos (MALLAPRAGADA; WADHWA; AGRAWAL, 2017). Os AMPs são caracterizados por apresentarem carga positiva e estrutura anfifílica, que permitem interações específicas com componentes hidrofóbicos da parede e membrana celulares de microrganismos (LI et al., 2022).

A superfície externa da membrana dos microrganismos é geralmente carregada negativamente, o que decorre das porções externas de seus fosfolipídeos (MATSUZAKI, 2001). Em contraste, as membranas de células de eucariotos superiores são compostas, predominantemente, por lipídeos neutros, enquanto lipídeos carregados encontram-se, em sua maioria, voltados para o citoplasma

celular. Essa diferença na composição das membranas possibilita que os AMPs interajam com as membranas de microrganismos por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Por outro lado, a interação com as membranas de eucariotos superiores ocorre principalmente por interações hidrofóbicas (ZASLOFF, 2002).

Além de sua eficácia na eliminação de uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários unicelulares e vírus, os AMPs desempenham um papel imunomodulador. Eles são capazes de potencializar a resposta imune do hospedeiro e contribuindo significativamente para o controle de infecções (BIN HAFEEZ et al., 2021).

A Figura 4 mostra um diagrama esquemático da estrutura, metodologias e desafios enfrentados na síntese e tratamento com peptídeos antimicrobianos em infecções microbianas.

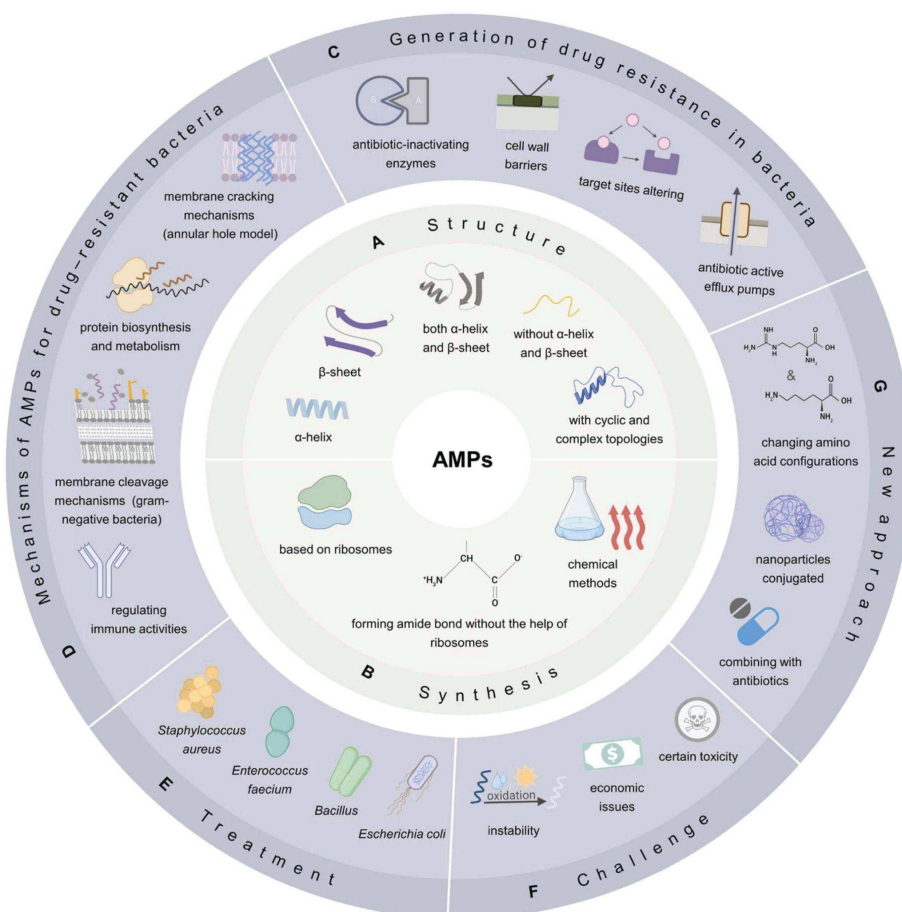


Figura 4. Diagrama esquemático dos peptídeos antimicrobianos no combate a infecções bacterianas resistentes a medicamentos. (A) Estrutura e classificação dos AMPs. (B) Metodologias utilizadas para a síntese de AMPs. (C) Mecanismos de geração de bactérias resistentes. (D) Mecanismo de ação dos AMPs em bactérias resistentes. (E) Exemplos do uso de AMPs no tratamento de infecções bacterianas. (F) Desafios da utilização de AMPs como método terapêutico. (G) Novas abordagens e estratégias disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas resistentes a medicamentos. Fonte: Xuan et., 2023.

1.4 LyeTx I e seus derivados

O peptídeo antimicrobiano LyeTx I foi originalmente isolado do veneno da aranha *Lycosa erythrogna* e possui uma estrutura primária composta por 25 aminoácidos (H-IWLTALKFLGKNLGKHLAKQQLAKL-NH₂) e pode ser visualizada na Figura 5. Sua estrutura secundária, predominantemente formada por α -hélices, é uma característica comum aos AMPs. LyeTx I demonstrou atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*; e leveduras, como *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*. No entanto, o peptídeo apresentou atividade hemolítica em altas concentrações *in vitro*, o que limita seu potencial como candidato para novos tratamentos terapêuticos. (SANTOS et al., 2010).

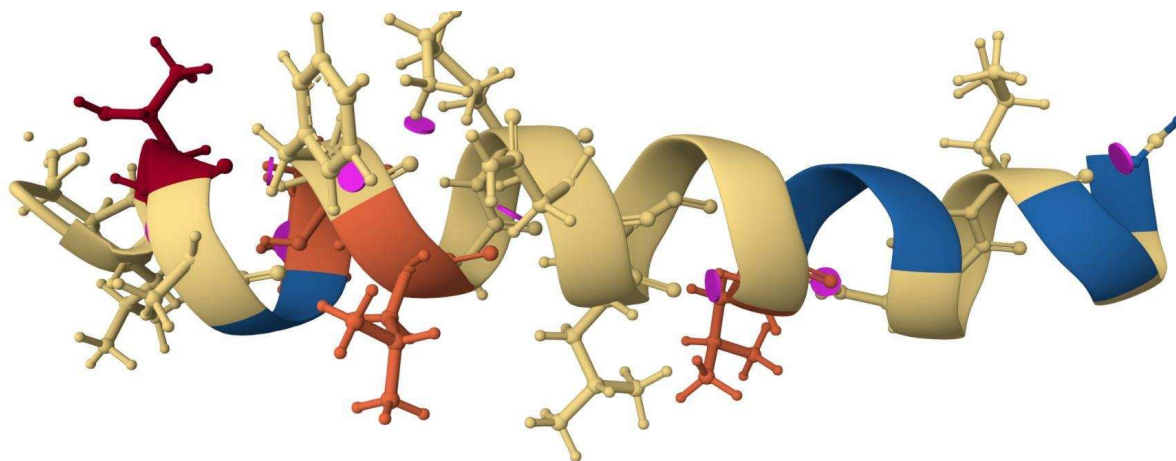


Figura 5. Estrutura obtida por RMN do peptídeo LyeTx I. A estrutura primária do LyeTx I é composta pela sequência: H-IWLTALKFLGKNLGKHLAKQQLAKL-NH₂. Resíduos hidrofóbicos estão representados em creme enquanto resíduos carregados estão em laranja. Visualização realizada com o Mol*(WebGL) no PDB. PDB: 7MMM.

Na tentativa de minimizar os efeitos hemolíticos, diminuir o custo da síntese dos peptídeos, aumentar sua estabilidade *in vivo* e, possivelmente, reduzir os efeitos colaterais, foram sintetizados derivados menores do peptídeo LyeTx I (Tabela 1). Os novos peptídeos foram submetidos a uma série de experimentos, incluindo avaliação da atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e

alguns fungos, além de testes de atividade hemolítica e citotóxica em células de mamíferos, bem como ensaios *in vivo*. Entre os derivados, o peptídeo LyeTx I mnΔK destacou-se por apresentar as melhores proporções entre as médias geométricas das atividades antimicrobiana e hemolítica, além de apresentar menor toxicidade celular, redução da carga bacteriana e diminuição da inflamação em experimentos *in vivo* (FUSCALDI et al., 2021).

Tabela 1 - Comparação dos peptídeos derivados de LyeTx I. Adaptado de: Shortened derivatives from native antimicrobial peptide LyeTx I: In vitro and in vivo biological activity assessment. (Fuscaldi et al., 2021).

Peptídeo	Massa molecular (Daltons)	Estrutura primária	pH teórico
LyeTx I	2830.7	H-IWLTALKFLGKNLGKHLAKQQLAKL-NH₂	10.6
LyeTx I mn	1700.0	H-IWLTALKFLGKNLGK-NH₂	10.3
LyeTx I mnΔK	1828.1	H-IWLTKALKFLGKNLGK-NH₂	10.5
LyeTx I mnΔKAc	1871.1	Ac-IWLTKALKFLGKNLGK-NH₂	10.5

O derivado LyeTx I mnΔK foi testado no tratamento de linhagens de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos, demonstrando efeito antimicrobiano contra todas as linhagens avaliadas. Além disso, esse peptídeo apresentou redução na formação de biofilmes e não exibiu aumento na concentração mínima inibitória (MIC, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) ao longo de um período de tratamento de 14 dias. Adicionalmente, foi observado que LyeTx I mnΔK possui efeito sinérgico com dois antimicrobianos amplamente utilizados, a Colistina e o Meropenem (LIMA et al., 2021).

O sinergismo entre o peptídeo LyeTx I mnΔK e o Meropenem apresenta potenciais benefícios, como o aumento da eficácia terapêutica, redução da concentração necessária de ambos os fármacos, diminuição da resistência ao antibiótico e prolongamento da vida útil desses agentes antimicrobianos. Além disso, essa combinação pode contribuir para a redução da formação de biofilmes, diminuição da toxicidade e menores custos de síntese e produção (HILL; COWEN, 2015; MHLONGO et al., 2023).

1.5 Genômica e transcriptômica no estudo de microrganismos

Apesar dos mais de 34 mil genomas de *A. baumannii* depositados no NCBI, a caracterização de um novo isolado permanece importante devido aos processos de microevolução e mutações que ocorrem nessa espécie, os quais podem influenciar diretamente o fenótipo de resistência, virulência e patogenicidade (ARTUSO et al., 2022). As linhagens de *A. baumannii* exibem elevada plasticidade genômica, caracterizada pela facilidade em adquirir ou perder material genético. Esse fenômeno é evidenciado pelo elevado número de genes exclusivos, sem ortólogos identificados em outras linhagens (Wijers et al., 2021).

Bactérias possuem uma notável capacidade de adaptação a novas condições ambientais por meio de alterações rápidas na expressão gênica. Essa resposta é determinante em situações de estresse, como mudanças no ambiente extracelular, redução na disponibilidade de nutrientes e exposição a antibióticos. Notavelmente, essas adaptações podem ocorrer em questão de minutos após a exposição às condições adversas, permitindo às bactérias sobreviverem em ambientes adversos (AHMED, 2020; COLGAN; CAMERON; KRÖGER, 2017).

Neste contexto, a montagem, anotação e identificação de genes relacionados aos mecanismos de virulência e resistência são fundamentais para o entendimento das particularidades de um novo isolado bacteriano. De forma complementar, a análise do transcriptoma dessas bactérias sob tratamento com uma possível nova alternativa terapêutica apresenta-se como estratégia promissora para a compreensão da resposta bacteriana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o genoma do isolado multirresistente de *Acinetobacter baumannii* AC37 e avaliar o efeito antimicrobiano do peptídeo LyeTx I mn Δ K, isolado e em combinação com Meropenem, por meio da análise dos transcriptomas das bactérias tratadas.

2.2 Objetivos específicos

1. Montar, anotar e avaliar a qualidade do genoma do isolado AC37;
2. Identificar genes de resistência, virulência e elementos genéticos móveis no genoma montado e comparar com outros genomas de *A. baumannii* depositados no NCBI;
3. Analisar o efeito dos tratamentos com o peptídeo LyeTx I mn Δ K, Meropenem e a combinação dos antimicrobianos na expressão diferencial de genes;
4. Identificar vias metabólicas moduladas pelos tratamentos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Genômica

3.1.1 Fluxo de trabalho resumido

O fluxo de trabalho resumido utilizado na seção de genômica neste trabalho é apresentado na Figura 6.

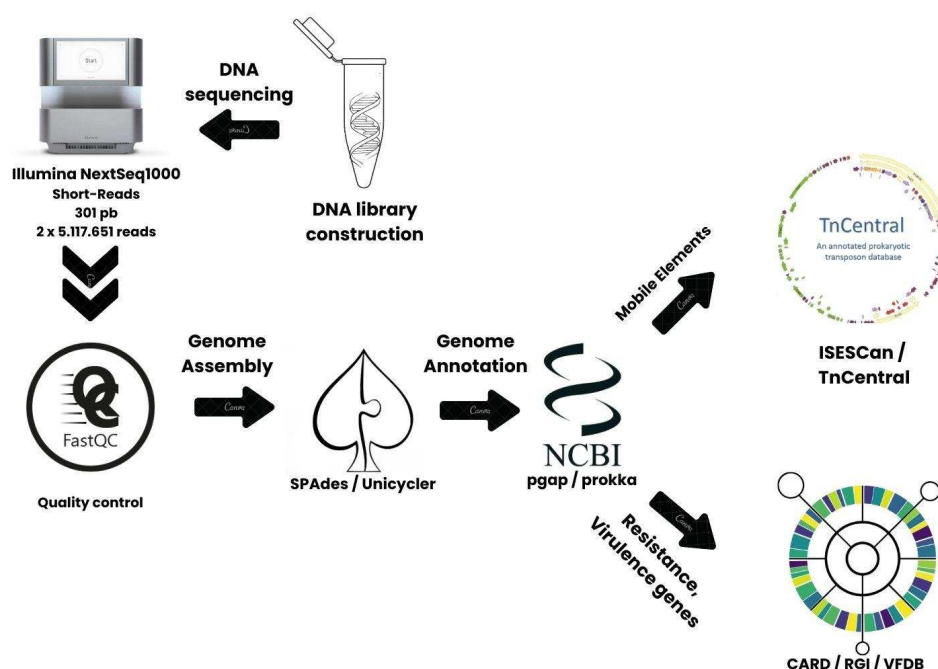


Figura 6. Representação esquemática do pipeline utilizado para as análises de genômica.

3.1.2 Aquisição dos dados de sequenciamento de DNA genômico (gDNA)

O sequenciamento do DNA da linhagem de *A. baumannii* AC37 isolado de um cateter venoso central foi realizado no equipamento Illumina NextSeq 1000. O cultivo, preparação, construção das bibliotecas e sequenciamento foram realizados por colaboradores do Laboratório de Genética e Bioquímica em associação ao Laboratório de Microbiologia aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

A busca de dados de sequenciamento de DNA (DNA-Seq) de *A. baumannii* foi realizada na seção de genomas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) a partir da sua interface *web* a fim de selecionar genomas completos para as análises filogenéticas. Os critérios para a seleção das bibliotecas para este estudo foram: dados depositados entre o intervalo de 1 de janeiro de 2024 a 14 setembro de 2024, genomas completos, exclusão de genomas provenientes de

dados de metagenômica e exclusão de genomas atípicos. Além disso, foi adicionado o genoma de referência de *A. baumannii* ATCC 19606 (*assembly* ASM903584v1) e de *Acinetobacter nosocomialis* (*assembly* XH1679), espécie próxima utilizada como *outgroup* para as análises filogenéticas conforme descrito por Migliaccio et al., 2023.

O *download* dos arquivos foi realizado utilizando o script *genbank_assembly_downloader.py* disponível em: <https://github.com/thiagomaframg/bioinfo/>, utilizando uma lista dos códigos de montagem (*assembly*) dos 124 genomas selecionados.

As linhagens foram classificadas como resistentes e não resistentes de acordo com as informações depositadas na página *web* de cada montagem.

3.1.3 Montagem, anotação e completude

A montagem do genoma do isolado AC37 foi realizada utilizando o programa Unicycler v. 0.5.1 (WICK et al., 2017). Esse programa é utilizado de maneira exclusiva para a montagem de genomas bacterianos e utiliza *short-reads* (≤ 500 pb) geradas pela plataforma Illumina. O Unicycler é utilizado, principalmente, como um otimizador do SPAdes (BANKEVICH et al., 2012). Em resumo, o Unicycler aprimora as montagens geradas pelo SPAdes, incorporando metodologias que melhoram a qualidade final da montagem, além de aprimoração da resolução de estruturas extracromossômicas, como os plasmídeos.

Para comparação das melhores métricas de montagem, também foi utilizado o programa SPAdes v. 4.4.0 e PEAR (*Paired-end reAd mergeR*) (ZHANG et al., 2014), o último tendo a função de unir as leituras *paired-end* que apresentam sobreposição. As montagens realizadas com o Unicycler foram utilizadas os parâmetros: `--noiniasm`, `--spades_options "--isolate"`, `--no_simple_bridges` e `--no_long_read_aligment`. Nas montagens realizadas com o SPAdes, foram utilizadas as *tags*: `--isolate` ou `--careful`, `--cov-cutoff 80` ou `auto` e `-s`, `-1` e `-2` para as montagens utilizando as *reads* do *output* do PEAR.

A visualização das métricas de montagem foi realizada com o script *scaffold_stats.pl* (disponível em: https://github.com/sujaikumar/assemblage/blob/master/scaffold_stats.pl). As melhores montagens foram selecionadas de acordo com o número de *contigs*, N50 e L50. O N50 indica o tamanho do menor *contig* necessário para cobrir pelo menos 50% do genoma montado. Dessa forma, um valor alto de N50 indica que o genoma

está pouco fragmentado e com contigs grandes. O L50 é a soma dos *contigs* necessários para cobrir 50% do genoma. Um valor baixo de L50 indica que a montagem apresenta está contígua e com *contigs* grandes. A comparação das montagens está descrita na Tabela 2.

A identificação de plasmídeos foi realizada por meio da interface web do PLSDb (*Plasmid Database*, disponível em: <https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb2025/>), utilizando os parâmetros: max_pvalue = 0.01, min_ident = 99, winner_takes_all = false.

A anotação do genoma do isolado AC37 foi utilizado o programa pgap (NCBI *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*, v. build7555) (TATUSOVA et al., 2016). Também foi utilizado o programa Prokka v. 1.13 (SEEMANN, 2014), para a comparação das anotações geradas por cada programa. A comparação entre as anotações utilizando os 2 *softwares* está descrita na Tabela 3.

A avaliação da completude dos genomas foi feita com o programa BUSCO v.5.5.0 (*Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*) (SIMÃO et al., 2015), que realiza a busca por proteínas ortólogas esperadas para espécies dentro de um táxon. Foi utilizado o banco de dados de referência para a classe de Gammaproteobacteria (identificador: gammaproteobacteria_odb10, contendo 366 genes ortólogos), a qual está inserida a família Moraxellaceae e o gênero *Acinetobacter*. O *output* do BUSCO traz informações sobre o número de proteínas em cópia única, múltiplas cópias, fragmentadas e incompletas.

3.1.4 Análise filogenética

As proteínas ortólogas completas de cópia única foram selecionadas utilizando o script BUSCO_phylogenomics.py (disponível em: https://github.com/jamiemcg/BUSCO_phylogenomics), que realiza o alinhamento múltiplo de sequências com o programa MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) e a remoção das extremidades não alinhadas com o trimAL e gera a matriz de dados utilizada na construção da árvore filogenética.

O programa IQ-TREE2 v. 2.0.7 (MINH et al., 2020) foi utilizado para a construção da árvore filogenética por máxima verossimilhança. Foi realizado *bootstrap* de 1000 réplicas e identificação automática do melhor modelo de fusão dos dados de alinhamento. O *output* no formato NEXUS foi visualizado e editado utilizando a ferramenta em interface web ITOL (LETUNIC; BORK, 2024). Ao final,

123 genomas de *A. baumannii* e o genoma de referência de *A. nosocomialis*, *outgroup*, foram utilizados para a análise filogenética.

3.1.5 Identificação de genes de resistência e virulência, e elementos móveis

A identificação dos genes de resistência foi realizada com o programa RGI v. 6.0.3 (*The Resistance Gene Identifier*) (ALCOCK et al., 2023), que utiliza o banco de dados CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) como referência para a predição do resistoma bacteriano.

O RGI analisa sequências de DNA ou proteínas sob 3 orientações: modo Perfeito (*Perfect*) o qual detecta de correspondências perfeitas com as sequências de referência curadas do CARD; modo Estrito (*Strict*) realiza a detecção de variantes previamente desconhecidas com pelo menos 95% de identidade entre as sequências correspondentes no CARD; e, por último, o modo Solto (*Loose*) que faz uma tentativa de predição de novos genes homólogos de resistência aos antimicrobianos. Foi utilizado o modo "Estrito" para as análises de identificação de genes de resistência em todos os genomas utilizados neste trabalho.

Para a identificação dos genes de virulência, utilizou-se da ferramenta BLASTx v. 2.16.0+ (ALTSCHUL et al., 1990) com o banco de dados VFDB (*Virulence Factor Database*) (LIU et al., 2021). O VFDB apresenta 2 variações do seu banco de dados, o *core dataset*, que inclui cerca de 4.200 genes associados aos fatores de virulência comprovados experimentalmente; e o *full dataset*, inclui cerca de 28.000 genes preditos. Foi utilizado o core dataset para as análises de identificação de genes de virulência, além disso, adicionou-se filtros de 80% de identidade e, no mínimo, 75% de sobreposição do *hit* em relação ao melhor alinhamento do banco de dados.

A identificação de elementos genéticos móveis foi realizada por meio do BLASTn contra o TNCentral (ROSS et al., 2021), um banco de dados curado de transposons procarióticos que fornece informações do organismo ou isolado identificado, dos transposons anotados e dos genes passageiros associados à região de transposição. O *output* gerado pelo BLASTn foi analisado manualmente nas páginas web do TNCentral e ISFinder (SIGUIER et al., 2006), a fim de remover redundâncias. A curadoria manual envolveu a verificação dos *hits* do *output*, comparando as coordenadas genômicas dos genes identificados com os tamanhos esperados nos bancos de dados mencionados.

3.2 Transcriptômica

3.2.1 Fluxo de trabalho resumido

O fluxo de trabalho resumido utilizado na seção transcriptômica neste trabalho é apresentado na Figura 7.

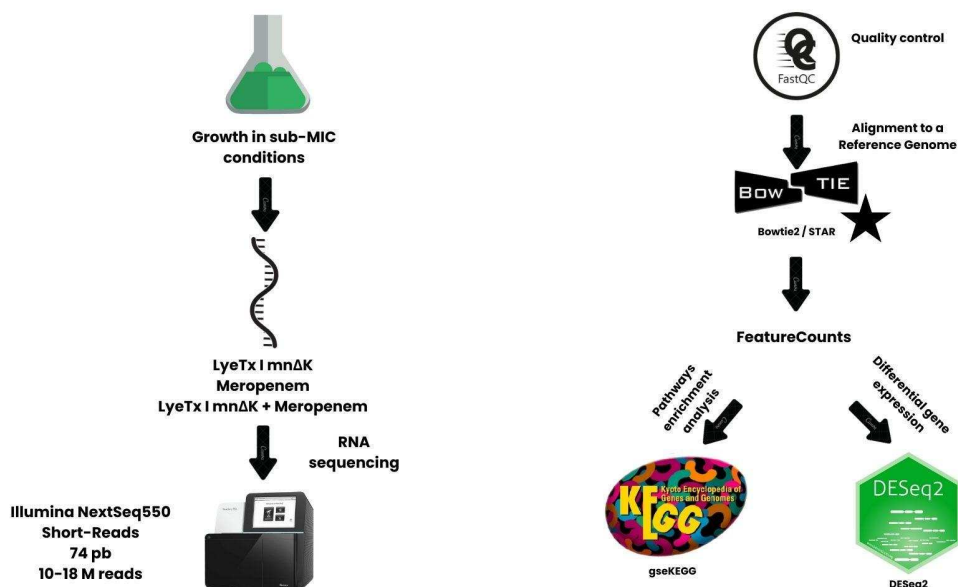


Figura 7. Representação esquemática do pipeline utilizado para as análises de genômica.

3.2.2 Aquisição dos dados de sequenciamento de RNA e controle de qualidade

O sequenciamento do RNA (RNA-Seq) do isolado AC37 foi realizado utilizando a plataforma Illumina NextSeq 550, abrangendo a condição não tratada (controle) e as condições tratadas com concentrações subinibitórias de crescimento (Sub-MIC) com o peptídeo LyeTx I mnΔK, o antibiótico Meropenem e a combinação de ambos. O cultivo, preparação, construção das bibliotecas e sequenciamento foram realizados por colaboradores do laboratório de Genética e Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG; em associação a Faculdade Santa Casa de Belo Horizonte. As curvas de crescimento realizadas nas condições experimentais podem ser visualizadas no Anexo 1.

A busca por dados de sequenciamento de RNA de *A. baumannii* tratada com Meropenem foi conduzida no *Sequence Read Archive* (SRA), o maior repositório público de dados brutos de sequenciamento oriundos de diversas plataformas. Foram utilizados termos MeSH (*Medical Subject Headings*) associados à

“*Acinetobacter baumannii*” e “Meropenem” a fim de selecionar bibliotecas que seriam relevantes para este estudo.

A busca resultou em 7 estudos. As bibliotecas obtidas possuíam características diversas, como linhagem utilizada, tamanho dos fragmentos de leitura, concentração de Meropenem, profundidade do sequenciamento, tipo de leitura (*single-end* e *paired-end*) e o número de replicatas como é observado na Tabela 6. Para garantir maior homogeneidade e proporcionar comparações com os dados gerados pelos nossos colaboradores, selecionamos os estudos de acordo com os tipos de leitura, *paired-end*, e pelo menos 3 replicatas por condição para cada experimento. Ao final, 2 estudos que estão de acordo com esses critérios foram selecionados.

O *download* de todas as bibliotecas foi realizado por meio da ferramenta *fasterq-dump* v. 3.0.1, do pacote de SRA Toolkit disponível no NCBI.

O controle de qualidade das bibliotecas de DNA-Seq e RNA-Seq foi realizado com a ferramenta FastQC v. 0.11.9 (Babraham Bioinformatics,). A compilação e visualização dos resultados foi realizada com o programa MultiQC v. 1.13.dev0 (EWELS et al., 2016). As leituras que apresentaram o valor de qualidade igual ou superior a *phred* 30 (probabilidade de ocorrer erro em 1 nucleotídeo a cada 1000 nucleotídeos sequenciados) foram consideradas de boa qualidade.

3.2.2 Mapeamento do transcriptoma

A seleção da ferramenta para o mapeamento das *reads* das bibliotecas de RNA-Seq foi realizada pela comparação entre os valores das porcentagens de mapeamento entre o STAR v. 2.7.10b (DOBIN et al., 2013) e Bowtie2 v.2.5.0 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012), (Tabela 5). Ambos os programas foram utilizados em sua modalidade *default*. Todos os mapeamentos foram realizados contra o genoma do isolado AC37 que foi sequenciado neste trabalho.

A conversão e ordenação dos arquivos BAM para SAM foi realizada com a ferramenta Samtools v. 1.16.1 (DANECEK et al., 2021). A contagem do número de *reads* mapeadas em cada gene foi feita com o FeatureCounts v. 2.0.3 (LIAO; SMYTH; SHI, 2014), utilizando as tags: -p, -t CDS, -g ID; identificando as *reads* como *paired-end*, as *features* como CDS e retornando os IDs como *meta-features*.

Para visualização do comportamento das amostras tratadas com os antimicrobianos frente ao controle, foi realizada a análise de componente principal

(PCA). O *output* do FeatureCounts foi importado para o programa R e utilizado para a geração de uma matriz. A função *prcomp*, do pacote *stats*, foi executada para a realização da análise de PCA.

3.2.3 Análises de expressão diferencial de genes e enriquecimento funcional

A análise da expressão diferencial de genes foi realizada no programa R utilizando o pacote DESeq2 v.1.40.2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). O valor de corte utilizado para considerar um gene como diferencialmente expresso (*DEG*) foi o valor absoluto $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$, ou seja, pelo menos 2 vezes maior expressão em comparação a condição não tratada (controle); e p-valor ajustado (*padj*) < 0.05 .

A análise de enriquecimento funcional foi realizada com a função *gseKEGG* do pacote *clusterProfiler* v.4.8.3. Essa função realiza o ranqueamento de todos os genes utilizando as vias anotadas no banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (KANEHISA; GOTO, 2000). Para a utilização dessa função em junção ao KEGG, é necessário, obrigatoriamente, a utilização de um dos genomas de referência disponíveis em: <https://www.genome.jp/kegg/tables/br08606.html>.

A seleção do melhor genoma de referência foi realizada de acordo com os parâmetros citados na seção 3.2.2. As leituras das bibliotecas dos tratamentos com o peptídeo LyeTx I Δ mn Δ K, Meropenem e o sinergismo entre eles foram mapeados em todos os genomas disponíveis de *A. baumannii* na página *web* acima utilizando o programa Bowtie2. Foi selecionado o genoma da linhagem AB0057, que apresentou a melhor média de porcentagens de mapeamento (Apêndice 4).

3.2.4 Meta-análise de transcriptomas de *Acinetobacter baumannii* tratadas com Meropenem

A seleção dos estudos de RNA-Seq de *A. baumannii* tratadas com Meropenem foi realizada de acordo com a seção 3.2.1. As características de todos os estudos estão representadas na Tabela 6. Ao final, 2 projetos atenderam os critérios de seleção e foram utilizados neste estudo.

Todas as bibliotecas desses 2 projetos selecionados foram mapeadas no genoma de AC37, conversão dos arquivos SAM para BAM e a contagem dos genes foi realizada de acordo com a seção 3.2.2.

Para a expressão diferencial de genes utilizou-se o pacote DESeq2. O enriquecimento funcional de vias do KEGG foi realizado utilizando a função gseKEGG.

3.3 Recursos computacionais

O processamento de dados e as análises foram realizadas nos *clusters* computacionais Gloriosos (ICB-UFMG) e Chapolin (UFSB).

4. RESULTADOS

4.1 Genômica

4.1.1 Controle de qualidade, montagem, completude e anotação do genoma de *Acinetobacter baumannii* AC37

O sequenciamento do tipo *Whole Genome Sequencing* (WGS) foi realizado na plataforma Illumina NextSeq 1000 e gerou 2x 5.117.651 leituras de 301 nucleotídeos *paired-end*.

As amostras do sequenciamento de DNA do isolado AC37 foram analisadas quanto à qualidade com o programa FastQC que gerou gráficos de distribuição do *score* de qualidade Phred para cada base nas leituras. As bases apresentaram *scores* de qualidade superiores a 30, que corresponde a uma probabilidade de erro inferior a 0.1%. Isso indica uma alta precisão nas sequências geradas (Figura 8).



Figura 8. Qualidade dos sequenciamentos. Visualização realizada com o MultiQC. A linha verde representa a média de qualidade por base sequenciada nas amostras *forward* e *reverse*.

A visualização das métricas e comparação entre as montagens do genoma realizadas pelo SPAdes e Unicycler foram obtidas com o script `scaffold_stats.py` e estão sumarizadas na Tabela 2. A montagem pelo Unicycler foi selecionada por possuir um dos melhores parâmetros de montagem além de ter a possibilidade de visualização do genoma utilizando o programa Bandage.

O programa BUSCO foi utilizado para avaliar a completude do genoma de *A. baumannii* AC37, comparando-o com um conjunto de proteínas ortólogas presentes na classe Gammaproteobacteria. De 366 proteínas, AC37 apresentou 360, sendo 356 em cópia única e 4 proteínas duplicadas, totalizando 98.4% de completude (Figura 9). A alta taxa de completude, associada aos baixos valores de duplicação, fragmentação e proteínas ausentes, indicam, novamente, a alta qualidade na montagem do genoma sequenciado.

```

***** Results: *****

C:98.4%[S:97.3%,D:1.1%],F:0.8%,M:0.8%,n:366
360      Complete BUSCOs (C)
356      Complete and single-copy BUSCOs (S)
4        Complete and duplicated BUSCOs (D)
3        Fragmented BUSCOs (F)
3        Missing BUSCOs (M)
366      Total BUSCO groups searched

```

Figura 9. Completude do genoma via BUSCO. Valores obtidos a partir da análise de proteínas ortólogas presentes na classe Gammaproteobacteria.

A visualização do genoma montado pelo Unicycler, foi realizada utilizando o programa Bandage com instalação local (Figura 10). O Bandage utiliza como *input* o resultado da tentativa de circularização do genoma realizada pelo Unicycler e auxilia na visualização da estrutura genômica, assim como na identificação de possíveis plasmídeos.



Figura 10. Visualização do genoma montado pelo Unicycler através do Bandage. O Unicycler realiza a tentativa de formação de pontes para interligar os contigs e realizar a circularização do genoma bacteriano. O Bandage auxilia na visualização do genoma montado, além de identificar estruturas extra-cromossomais, como plasmídeos.

Por meio do Bandage foi possível identificar um fragmento de DNA que estava aparentemente fora do DNA genômico circular. Foi realizada uma busca com a ferramenta BLASTn na interface *web* do PLSDB (*Plasmid Database*) para a identificação deste possível plasmídeo presente no contig 31 com 8.731 pb. Foram obtidos 71 *hits*, sendo 2 com 100% de identidade e 1 *hit* apresentando exatamente 8.731 pb do contig 31. O plasmídeo tem o identificador NZ_CP131945.1, isolado da linhagem de *A. baumannii* 2023CK-0089 e codifica 11 genes sendo eles: repM (*replication initiation protein*), Q8W07_RS18795 (*plasmid replication DNA-binding protein*), znuD2 (*TonB-dependent receptor*), Q8W07_RS18810 (*BrnT family toxin*), Q8W07_RS18815 (*BrnA antitoxin family protein*), Q8W07_RS18805 (*tetratricopeptide repeat protein*), Q8W07_RS18825 (*DIP1984 family protein*) e 4 proteínas hipotéticas (Figura 11).

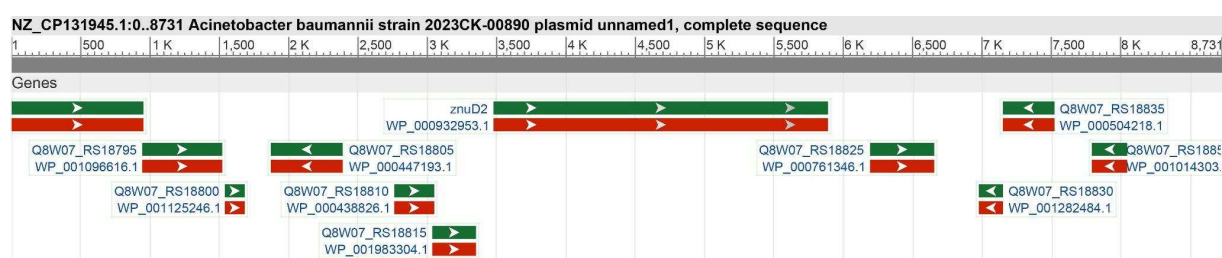


Figura 11. Plasmídeo NZ_CP131945.1 identificado no PLSDB. Esse plasmídeo foi inicialmente isolado da linhagem 2023CK-00890 e codifica 11 genes.

A anotação do genoma montado foi realizada pela ferramenta do NCBI chamada pgap, assim como pelo programa Prokka. A comparação das métricas entre os dois *softwares* se encontra na Tabela 3. O programa Prokka é geralmente utilizado para anotações rápidas que requerem pouco processamento computacional. Já o pgap utiliza-se de um número maior de bancos de dados para a identificação de proteínas ortólogas e maior processamento computacional para realizar as anotações genômicas.

As próximas análises foram realizadas utilizando a anotação gerada pelo pgap por ser mais completa e fornecer maiores informações quando comparada com a anotação realizada pelo Prokka.

Tabela 3 - Comparação das anotações do genoma do isolado AC37 pelos programas pgap e Prokka.

	Número total de genes	Número total de CDS	Número total de RNAs	Proteínas hipotéticas
pgap	3.716	3.646	70	453
Prokka	3.706	3.609	97	1379

4.1.2 Identificação de genes de resistência

O próximo passo foi identificar genes relacionados à resistência a antibióticos com o programa RGI utilizando o banco de dados CARD. Ao todo, 31 genes foram identificados e agrupados, de acordo com seu mecanismo de ação contra fármacos, em cinco categorias principais: permeabilidade reduzida a antibióticos, substituição do alvo do antibiótico, alteração do alvo do antibiótico, inativação do antibiótico e efluxo do antibiótico (Figura 12).

O mecanismo de efluxo do antibiótico foi mais predominante dentre os genes identificados, com 20 genes relacionados a esse mecanismo, seguido pela inativação do antibiótico com 7 genes, alteração do alvo do antibiótico com 2 genes, e a redução da permeabilidade a antibióticos e substituição do alvo do antibiótico com 1 gene cada.

Os 31 genes também foram classificados de acordo com a identidade com a sequência correspondente no banco de dados. Desta forma, 11 genes identificados foram idênticos e 20 genes apresentaram variação com os genes correspondentes no CARD.

O Apêndice 1 mostra a associação dos genes de resistência e os fármacos associados à resistência por esses genes. Curiosamente, a maioria dos genes estão associados à resistência a pelo menos 2 antibióticos.

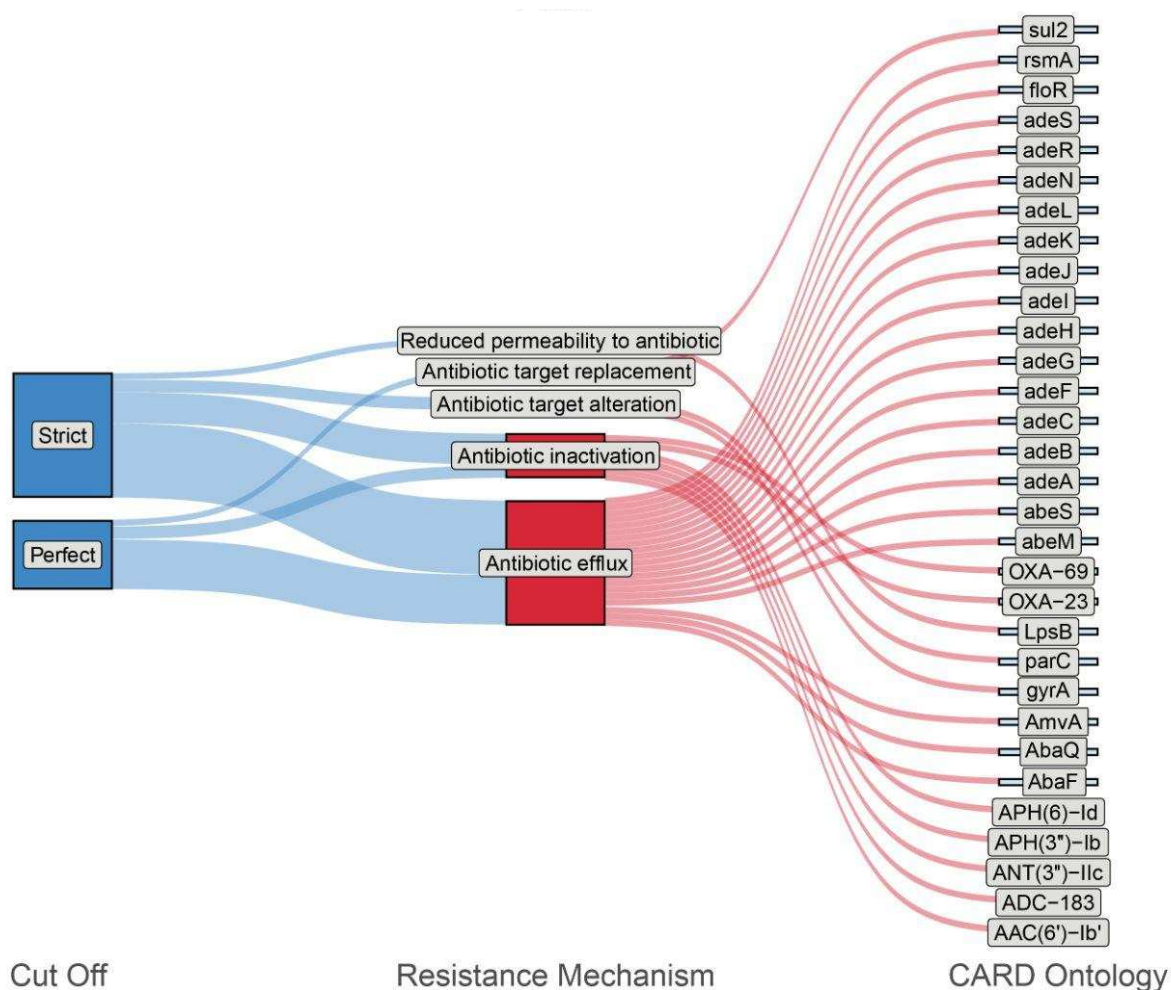


Figura 12. Genes de resistência à antibióticos. Identificação de 31 genes realizada com o RGI utilizando o banco de dados CARD em modo estrito. O parâmetro Cut Off é dividido em *Strict*, para genes com 95% de identidade a sequência correspondente no CARD; e *Perfect* para o gene curado no banco de dados. O parâmetro *Resistance Mechanism* mostra a associação dos genes (CARD *Ontology*) com os mecanismos de ação contra o antibiótico.

4.1.3 Identificação de genes de virulência

A identificação de genes de virulência foi realizada utilizando o programa BLASTx com o banco de dados de proteínas do VFDB. Foram identificados 114 *hits*, os quais foram categorizados de acordo com o mecanismo de virulência disponível no VFDB. Na Figura 13, encontram-se todos os genes categorizados de acordo com o mecanismo efetor. Observa-se que os *clusters* Fatores de Nutrição/Metabolismo (*Nutritional/Metabolic factor*) e Aderência (*Adherence*) são os maiores, representado por um total de 27 genes cada, seguidos pelo Sistema efetor de entrega (*Effector delivery system*) com 25 genes.

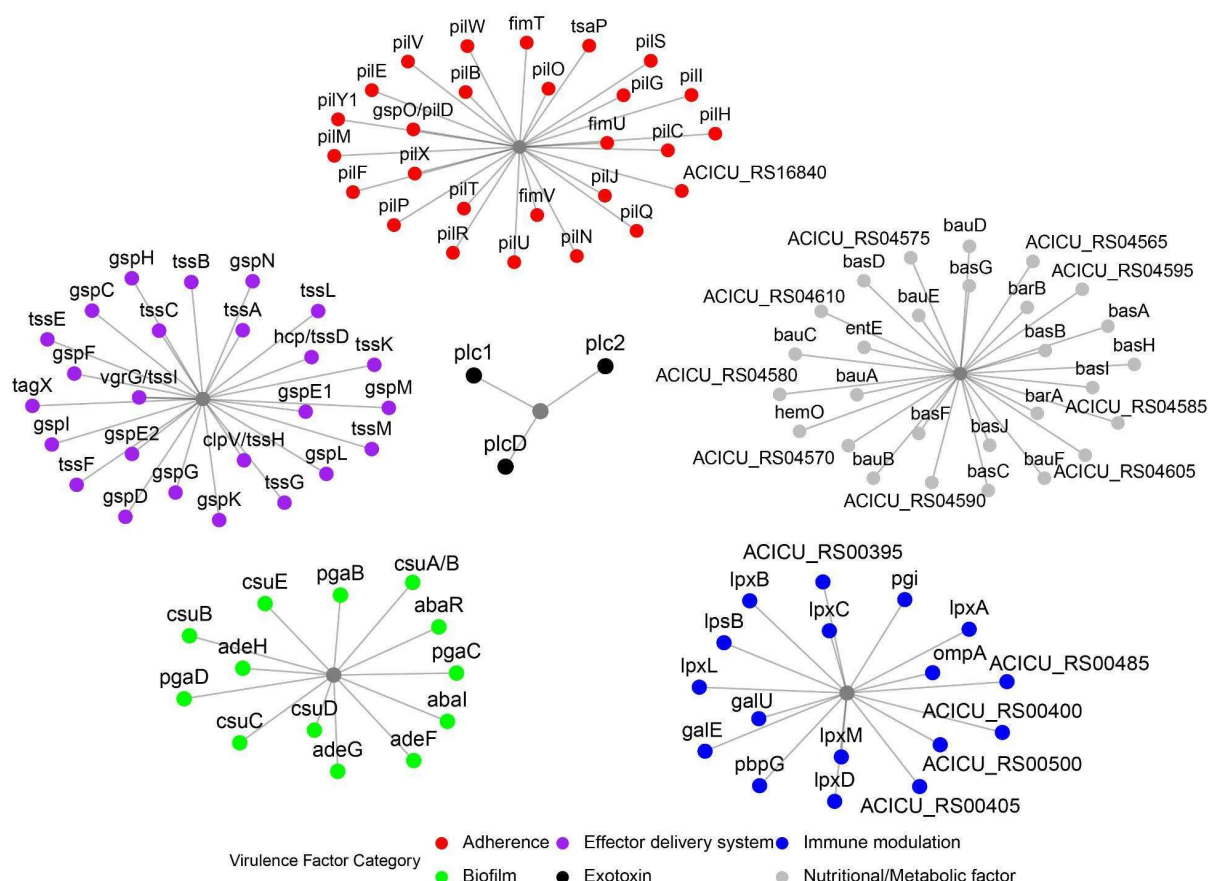


Figura 13. Genes de virulência. Identificação de 114 fatores de virulência realizado com BLASTx em conjunto com o *core database* do VFDB. As cores representam as categorias de acordo com o mecanismo efector do gene em *A. baumannii*.

4.1.4 Identificação de elementos genéticos móveis

A identificação dos elementos genéticos móveis presentes no genoma do isolado AC37 foi realizada utilizando o programa BLASTn com o banco de dados de nucleotídeos do TNCentral. O output do BLASTn resultou em 88 hits, que foram manualmente curados nas páginas *web* do TNCentral e ISFinder para reduzir a redundância dos dados.

Foram identificados 7 genes associados a regiões de elementos transponíveis, 4 genes localizados em regiões de elementos de inserção e 2 genes em integrons (Figura 14). Entre esses 13 genes passageiros, 7 estão relacionados à resistência a antibióticos e 2 à resistência a metais pesados. Os genes *floR* e *AAC(6')-Ib*, que são exclusivos do isolado AC37 (seção 4.1.6) são encontrados nas regiões de transposons e integrons, respectivamente. Em particular o gene *AAC(6')-Ib*, de acordo com o banco de dados do TNCentral, foi inicialmente encontrado em um isolado de *Pseudomonas aeruginosa*, indicando uma possível

transferência horizontal entre as espécies. Não foi possível identificar a origem do gene *floR* por se tratar de um isolado não cultivável em laboratórios, segundo o TNCentral.

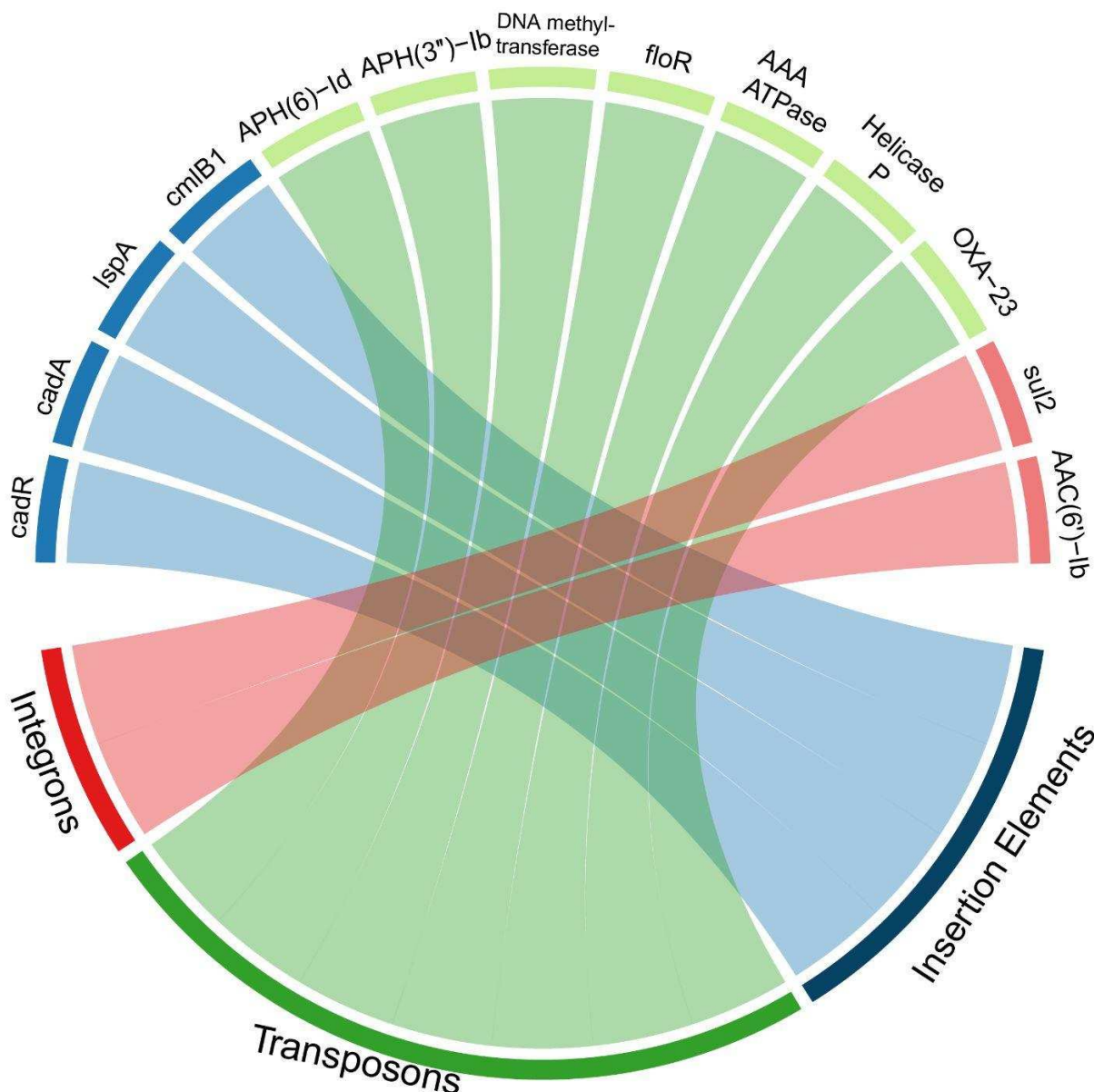


Figura 14. Identificação e classificação dos elementos genéticos móveis do isolado AC37. Diagrama de corda construído através dos resultados curados do BLASTn com o banco de dados do TNCentral. Em verde os genes associados a regiões de elementos transponíveis, em azul genes localizados em regiões de elementos de inserção, e em vermelho genes relacionados a regiões de integrons.

4.1.5 Árvore filogenética

A seleção das linhagens de *A. baumannii* para a construção de uma árvore filogenética foi realizada de acordo com a seção 3.1.2 de forma que seria inviável a

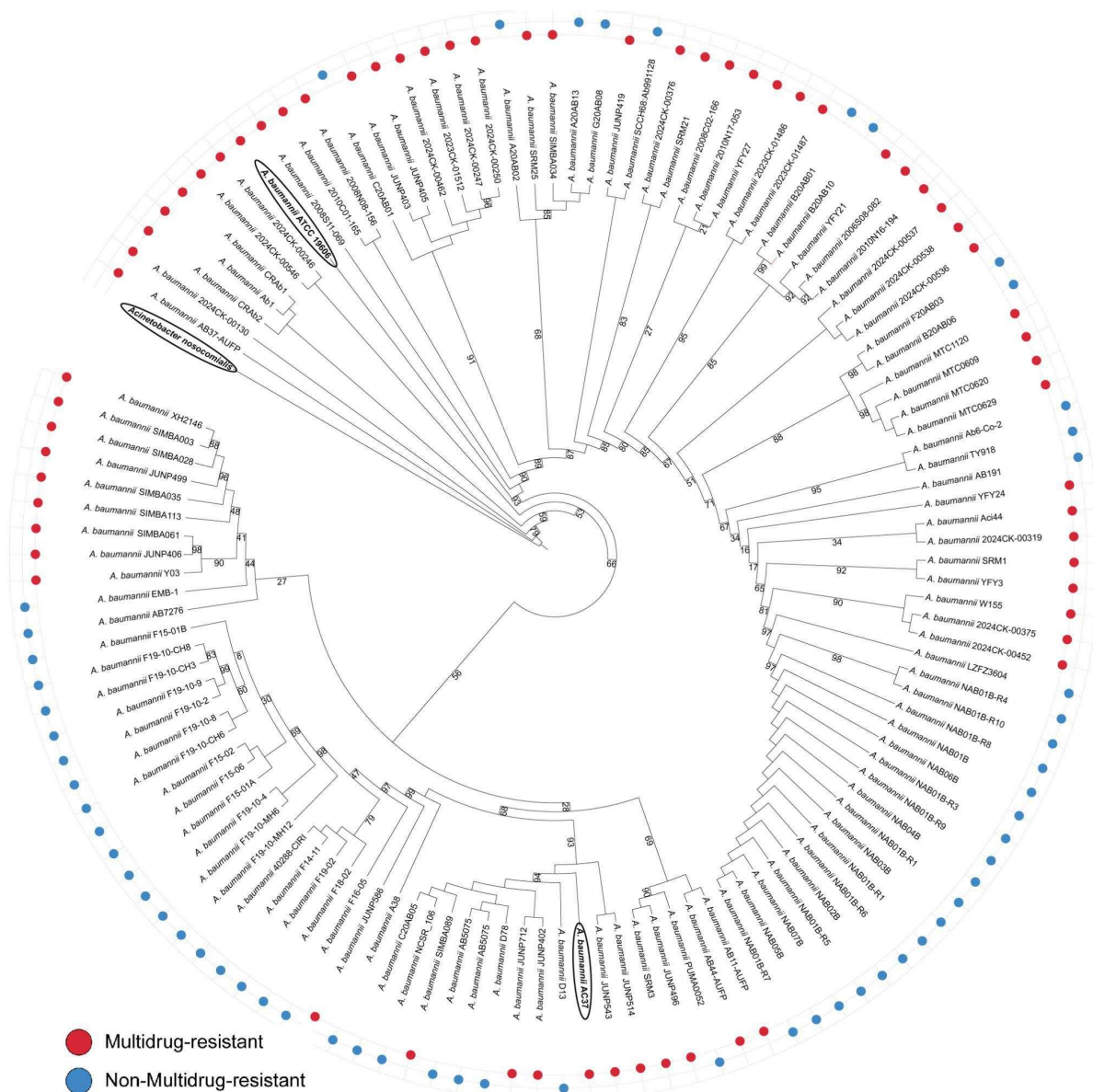


Figura 15. Árvore filogenética de 124 linhagens *Acinetobacter baumannii*. Cladograma construído utilizando proteínas ortólogas de cópia única identificadas pelo BUSCO nos 124 genomas utilizados neste trabalho. Filogenia construída com o programa IQ-TREE2, utilizando o design automático de seleção do melhor modelo de empacotamento dos dados. Apenas os valores de *bootstrap* diferentes de 100 estão representados. Em negrito encontram-se destacados o isolado AC37, o genoma de referência (*A. baumannii* ATCC 19606) e o outgroup (*A. nosocomialis*). Os círculos em azul representam as linhagens não resistentes enquanto os círculos em vermelho representam as linhagens multirresistentes a antibióticos.

4.1.6 Comparação dos genes de resistência entre as linhagens de *Acinetobacter baumannii*

A identificação dos genes de resistência utilizando o RGI com o banco de dados CARD também foi realizada para todas as 123 linhagens de *A. baumannii* apresentadas na árvore filogenética. O isolado AC37 apresenta três genes que são exclusivos desta linhagem: *floR*, *AAC(6')-Ib* e *ADC-183* (Figura 16).

O gene *floR* pertence à categoria de mecanismos de resistência relacionados ao efluxo de fármacos, e sua expressão está associada a fenótipos de resistência ao Cloranfenicol e ao Florfenicol, sendo encontrado, de acordo com o CARD, em 2.83% dos isolados de *A. baumannii*.

Já os genes *AAC(6')-Ib* e *ADC-183* são categorizados como inativadores de fármacos, apresentando fenótipos associados à resistência à Amicacina e Tobramicina; e às Cefalosporinas, respectivamente. Segundo o CARD, esses genes também são considerados raros em *A. baumannii*, com uma estimativa de presença em 0.71% dos isolados para *AAC(6')-Ib* e 0.35% para *ADC-183*.

Os genes relacionados ao efluxo de antibióticos *rsmA*, *adeF*, *AmvA*, *adeK*, *adel*, *adeH*, *adeG*, *abeS*, *adeL*, *adeM*, *adeJ*, *AbaQ*, *Abaf*, *adeB*, *adeA*, *adeS* e *adeR*; estão presentes na maioria dos genomas analisados. Além disso, OXA-23, uma β -lactamase comumente encontrada em isolados clínicos, está presente na maioria dos genomas.

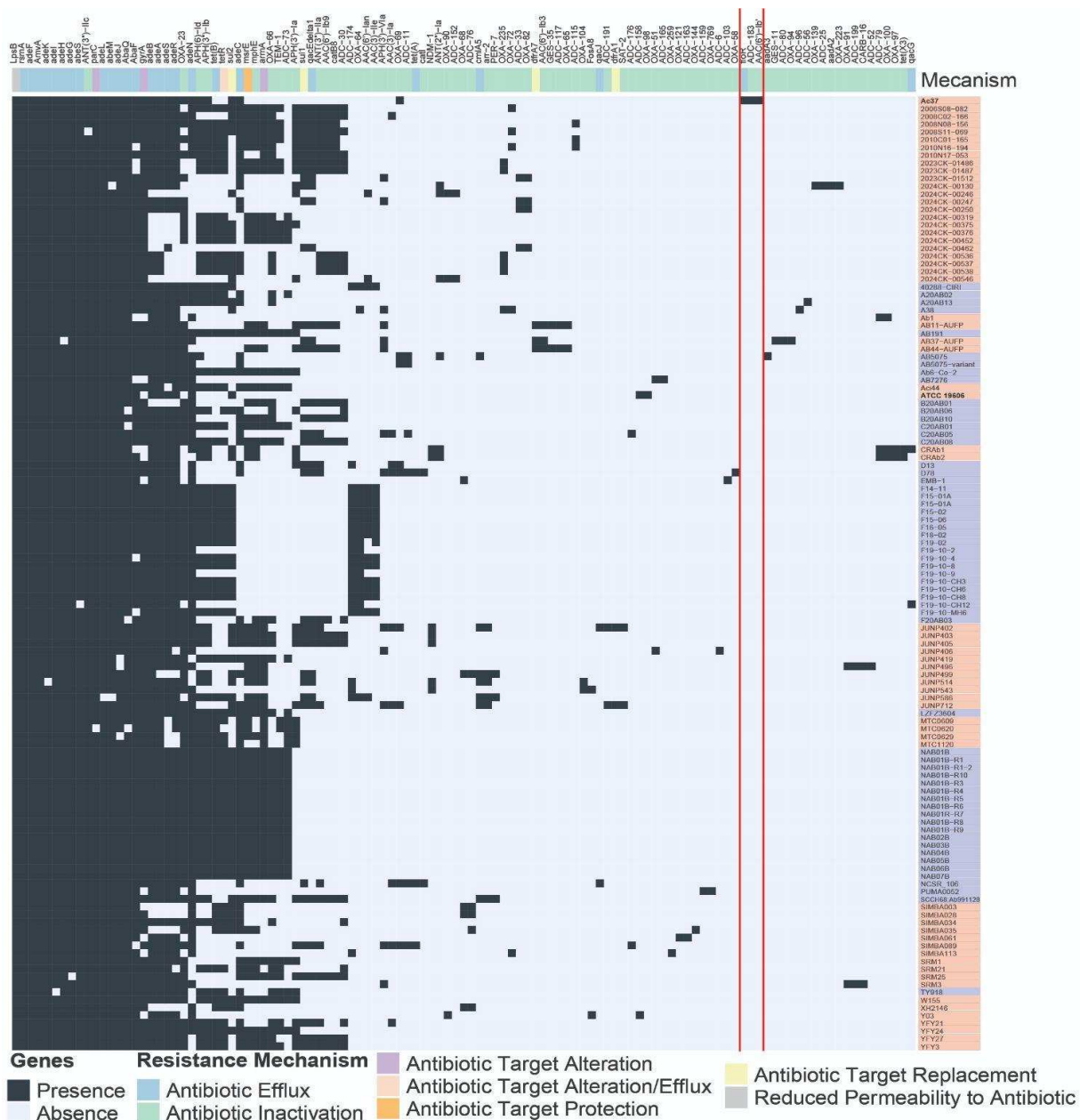


Figura 16. Comparação dos genes de resistência à antibióticos em 123 linhagens de *Acinetobacter baumannii*. Heatmap de presença e ausência onde quadrados em pretos representam a presença dos genes de resistência e quadrados em cinza representam a ausência desses genes. Análise realizada utilizando o programa RGI em conjunto com o banco de dados CARD em sua versão estrita. Os genes de resistência estão presentes em colunas e classificados de acordo com seu mecanismo de resistência. As linhagens estão representadas em linhas classificadas em resistentes (em vermelho) e não resistentes (em azul).

4.1.7 Comparação dos genes de virulência entre as linhagens de *Acinetobacter baumannii*

A comparação dos fatores de virulência entre os 123 genomas de *A. baumannii* foi realizada utilizando BLASTp em conjunto ao banco de dados VFDB está representada na Figura 17. Foram identificados 39 genes compartilhados entre todas as linhagens analisadas, os quais foram categorizados em diferentes classes

funcionais de acordo com seu mecanismo de ação celular. Na categoria aderência foram entrados 14 genes: *pilF*, *pilG*, *pilH*, *pilI*, *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilP*, *pilQ*, *pilT*, *pilU*, *tsaP* e *fimT*. Para o sistema efetor de entrega, 8 genes: *gspE1*, *gspE2*, *gspH*, *gspI*, *gspK*, *gspL*, *gspM* e *vgrG/tssI*. Em relação à formação de biofilme, foram identificados 6 genes: *adeF*, *adeG*, *adeH*, *pgaB*, *pgaC* e *pgaD*. Na categoria de modulação imunológica, 6 genes: *LpsB*, *lpxA*, *lpxB*, *lpxD*, *lpxL*, *lpxM* e *ompA*. Fatores de nutrição e metabolismo foram representados por 2 genes: *basI* e *basJ*. Por fim, a categoria de exotoxinas inclui 2 genes: *plc1* e *plc2*.

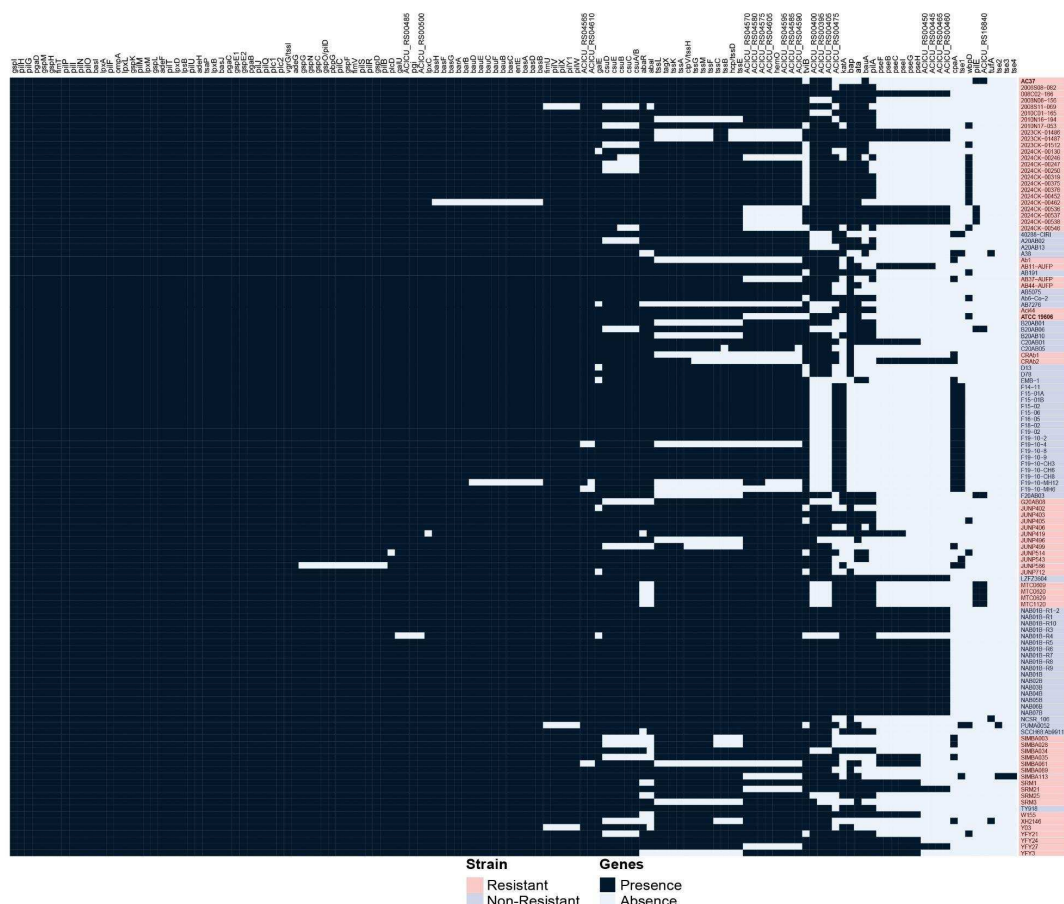


Figura 17. Comparação dos genes de virulência em 123 linhagens de *Acinetobacter baumannii*. Heatmap de presença e ausência onde quadrados em preto representam a presença dos genes de virulência e quadrados em cinza representam a ausência desses genes. Identificação realizada com BLASTp em conjunto com o *core dataset* do VFDB. Os fatores de virulência estão representados em colunas. As linhagens estão representadas em linhas e classificadas de acordo com resistência à antibióticos (em vermelho) e não resistentes (em azul).

4.2 Transcriptômica

4.2.1 Controle de qualidade, mapeamento e contagem de genes

O sequenciamento do RNA do isolado AC37 foi realizado na plataforma Illumina NextSeq 550 em diferentes condições experimentais: controle (sem

tratamento), tratamento com o peptídeo LyeTx I Δ mnK, tratamento com Meropenem e na condição de sinergismo entre LyeTx I Δ mnK e Meropenem. As informações detalhadas sobre as bibliotecas sequenciadas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Descrição dos dados de sequenciamento de RNA

Biblioteca	Comprimento das leituras	Profundidade do sequenciamento
Controle 1	74 pb	2x 6.187.767 bases
Controle 2	74 pb	2x 6.030.493 bases
Controle 3	74 pb	2x 5.222.480 bases
LyeTx I Δ mnK 1	74 pb	2x 9.285.450 bases
LyeTx I Δ mnK 2	74 pb	2x 8.867.544 bases
LyeTx I Δ mnK 3	74 pb	2x 7.020.297 bases
Meropenem 1	74 pb	2x 5.921.924 bases
Meropenem 2	74 pb	2x 6.950.387 bases
Meropenem 3	74 pb	2x 6.421.162 bases
LyeTx I Δ mnK + Meropenem 1	74 pb	2x 6.561.879 bases
LyeTx I Δ mnK + Meropenem 2	74 pb	2x 6.030.493 bases
LyeTx I Δ mnK + Meropenem 3	74 pb	2x 5.222.480 bases

Todas as amostras foram analisadas quanto à qualidade com o programa FastQC apresentando alta precisão no sequenciamento de acordo com os scores de *phred* acima de 30 (Figura 18).

FastQC: Mean Quality Scores

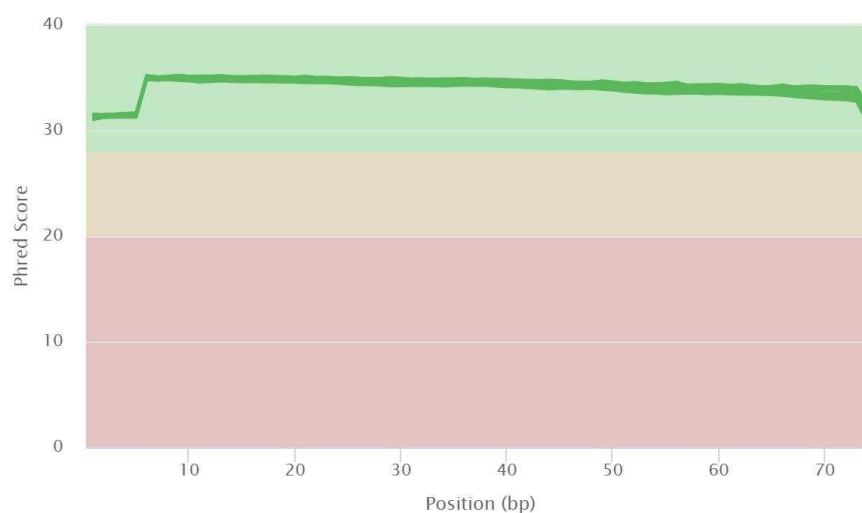


Figura 18. Qualidade dos sequenciamentos. Sumarização dos *scores* de *phred* utilizando o programa MultiQC. A linha verde representa a média de qualidade por base sequenciada nas amostras *forward* e *reverse*.

Todas as bibliotecas foram submetidas ao mapeamento das *reads* utilizando os programas STAR e Bowtie2. Os percentuais de mapeamento utilizando o Bowtie2 são maiores em comparação ao STAR (Tabela 5). Desta forma, foram selecionados os *outputs* do Bowtie2 para as análises a jusante. A contagem do número de leituras mapeadas em cada gene foi realizada com o *software* FeatureCounts como visto no Apêndice 2.

Tabela 5 - Percentual de mapeamento das *reads* nos programas STAR e Bowtie2

Biblioteca	Reads mapeadas		Mapeamento	
	STAR	Bowtie2	STAR	Bowtie2
Controle 1	5.840.210	6.033.072	94.38%	97.50%
Controle 2	5.721.293	5.912.295	94.87%	98.04%
Controle 3	4.926.124	5.104.451	94.33%	97.74%
LyeTx I mnΔK 1	8.932.319	9.070.956	96.20%	97.69%
LyeTx I mnΔK 2	8.545.784	8.691.079	96.37%	98.01%
LyeTx I mnΔK 3	6.673.746	6.877.784	95.06%	97.97%
Meropenem 1	5.499.533	5.808.223	92.87%	98.08%
Meropenem 2	6.605.458	6.812.769	95.04%	98.02%
Meropenem 3	6.127.054	6.298.517	95.42%	98.09%
LyeTx I mnΔK + Meropenem 1	6.283.142	6.429.985	95.75%	97.99%
LyeTx I mnΔK + Meropenem 2	5.872.298	6.037.738	95.35%	98.04%
LyeTx I mnΔK + Meropenem 3	6.569.686	6.696.866	95.89%	97.75%

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para visualizar a distribuição das amostras e verificar possíveis agrupamentos entre as condições experimentais. Esse método permite reduzir a dimensionalidade dos dados enquanto preserva a maior parte da variabilidade, facilitando a interpretação das diferenças entre os grupos (JOLLIFFE; CADIMA, 2016).

Na Figura 19, observa-se a separação de cada uma das condições de tratamento em um quadrante diferente, indicando as diferenças entre as condições experimentais. As amostras das condições “Controle” e “Meropenem” apesar de representadas em quadrantes diferentes, estão agrupadas próximas, podendo indicar similaridade entre as bibliotecas. A variável componente principal 1 (PC1), explica 40% da variância, enquanto PC2 explica 27.7% da variância entre as amostras. No Apêndice 3 é apresentada a representação das variações entre as dimensões do PCA.

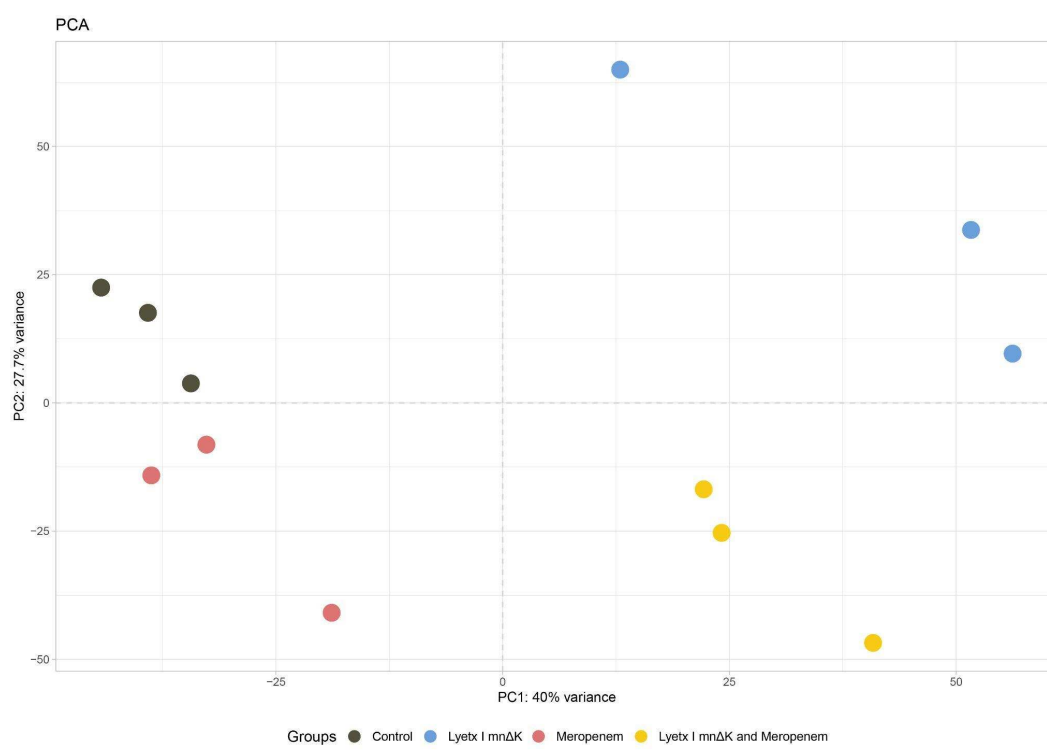


Figura 19. Perfil de variação das amostras. *Biplot* representando os resultados da análise de componente principal realizada com a função `prcomp` no programa R. Cada círculo representa uma amostra de cada condição experimental. Os controles estão representados na cor preta, LyeTx I mnΔK em azul, Meropenem em vermelho e o sinergismo em amarelo.

4.2.2. Expressão diferencial de genes

A análise da expressão diferencial de genes foi realizada através do pacote DESeq2 no programa R. Para considerar um gene como diferencialmente expresso, foram aplicados critérios de valor absoluto de $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$ e p-valor absoluto < 0.05 .

Todas as condições experimentais apresentaram mais genes subexpressos em relação aos superexpressos (Figura 20). O tratamento com o peptídeo LyeTx I mnΔK teve o maior impacto na regulação da expressão gênica, resultando em 626

genes diferencialmente expressos (DEGs) de um total de 3712. Desses, 269 genes estavam superexpressos e 357 subexpressos.

O tratamento combinado com os dois antimicrobianos (LyeTx I mnΔK e Meropenem) resultou em 339 DEGs, dos quais 157 foram superexpressos e 182 subexpressos.

Por fim, o tratamento com Meropenem isoladamente apresentou o menor impacto, com 17 DEGs identificados, sendo 4 genes superexpressos e 13 subexpressos. Devido ao baixo número de genes diferencialmente expressos e a proximidade das amostras ao grupo controle do PCA, foi realizada uma busca por estudos de RNA-Seq de *A. baumannii* tratadas com Meropenem no SRA como descrito nas Seções 3.2.2 e 3.2.4, a fim de compreender a resposta bacteriana a esse antibiótico. Os resultados podem ser encontrados na Seção 4.2.4.

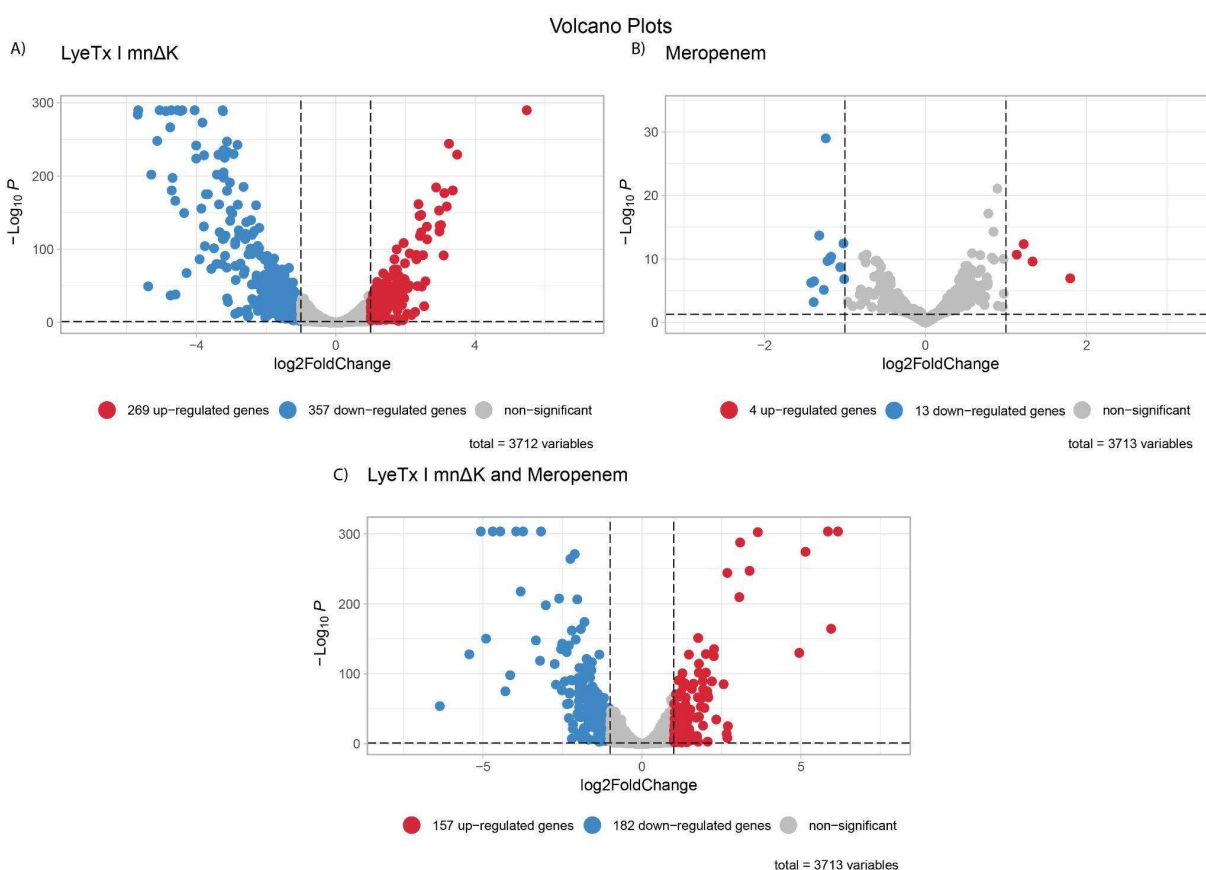


Figura 20. Comparação do número de genes diferencialmente expressos entre as condições experimentais. Círculos em azul, vermelho e cinza representam genes subexpressos, superexpressos e não diferencialmente expressos, respectivamente, de acordo com valor absoluto de $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$ e p-valor ajustado < 0.05 . Painéis: (A) LyeTx I mnΔK. (B) Meropenem. (C) LyeTx I mnΔK e Meropenem.

A expressão dos 31 genes de resistência identificados no genoma (Seção 4.1.2) estão representados na Figura 21. Apenas no tratamento com LyeTx I Δ mn Δ K podemos observar genes diferencialmente expressos, sendo eles: *adeA*, *adeB*, *adeI*, *adeJ* e *adeK*.

Na condição de tratamento com o peptídeo e o Meropenem, 2 genes ficaram próximos do filtro de DEG, sendo eles *adeI* e *adeJ*, apresentando log2FoldChange de 0.96 e 0.73, respectivamente.

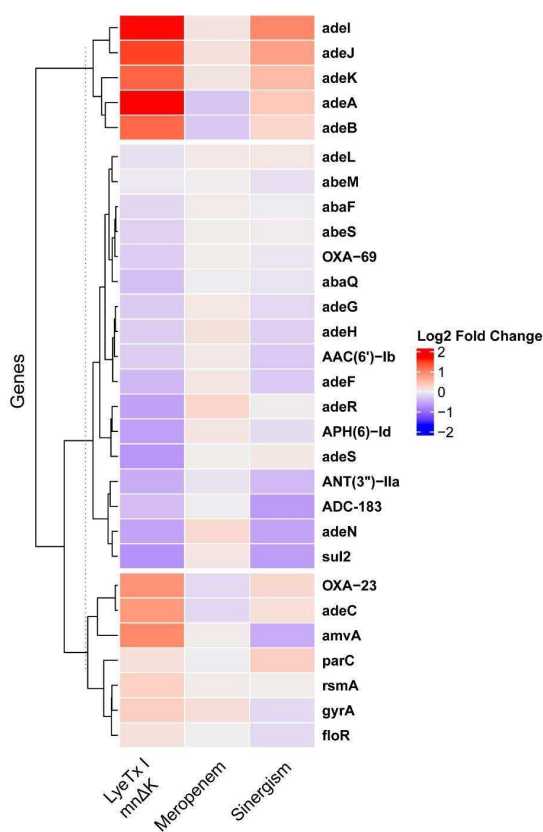


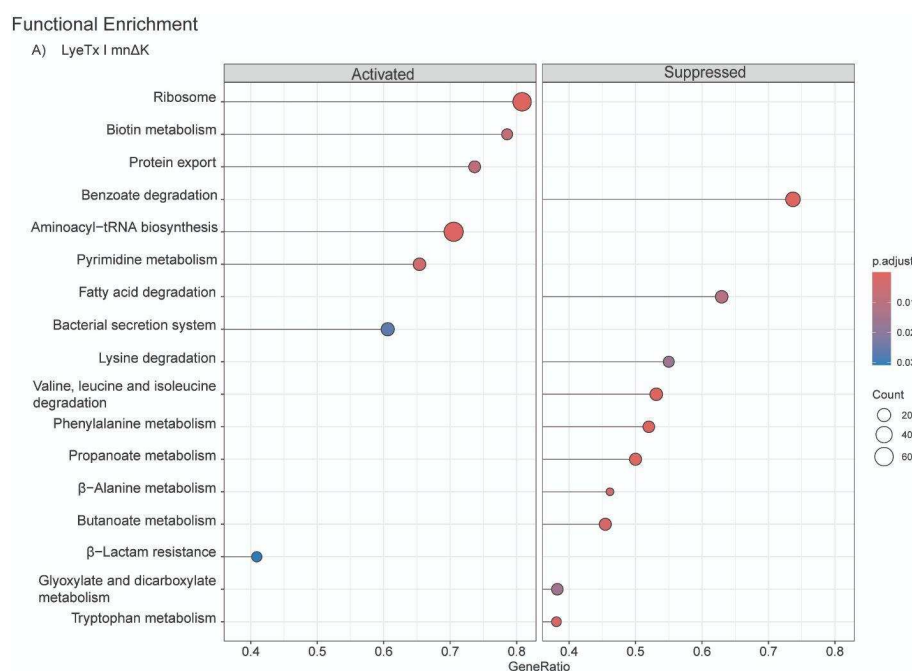
Figura 21. Expressão dos genes de resistência. *Heatmap* representando a expressão, em log2FoldChange, dos 31 genes de resistência identificados no genoma do isolado AC37. Quanto mais em vermelho, maior o valor de log2FoldChange, enquanto quanto mais em azul, menor o valor de log2FoldChange. As colunas representam as condições de tratamento com o peptídeo LyeTx I Δ mn Δ K, Meropenem e o sinergismo de ambos, respectivamente.

4.2.3 Enriquecimento funcional

A análise funcional foi realizada através do enriquecimento de vias biológicas anotadas pelo KEGG utilizando a função gseKEGG do pacote clusterProfiler. Foram considerados significativos as vias com p-valor ajustado menor que 0.05. O cultivo com Meropenem não está representado visto que apenas a via de biossíntese de Aminoacil-tRNAs estava suprimida.

A condição de tratamento com o peptídeo LyeTx I Δ mn apresentou o maior número de vias enriquecidas (Figura 22, Painel A). Das 17 vias metabólicas, 7 estão associadas à ativação de genes dessas vias, enquanto 10 vias foram suprimidas. Os processos ativados convergem, em especial, em processos relacionados à produção, exportação e secreção de proteínas. Adicionalmente, as vias de metabolismo de pirimidinas e resistência à β -lactâmicos também encontram-se ativadas. As vias suprimidas estão associadas, principalmente, à degradação de aminoácidos e ácidos graxos.

O tratamento combinado dos antimicrobianos resultou exclusivamente na supressão de vias metabólicas (Figura 22, Painel B), com destaque para a via de fosforilação oxidativa. Isso sugere um possível impacto na produção de ATP e homeostase energética da célula. Assim como observado no tratamento com o LyeTx I Δ mn isolado, há uma tendência à supressão das vias associadas à degradação de aminoácidos, indicando uma possível reprogramação metabólica para adaptação ao estresse antimicrobiano.



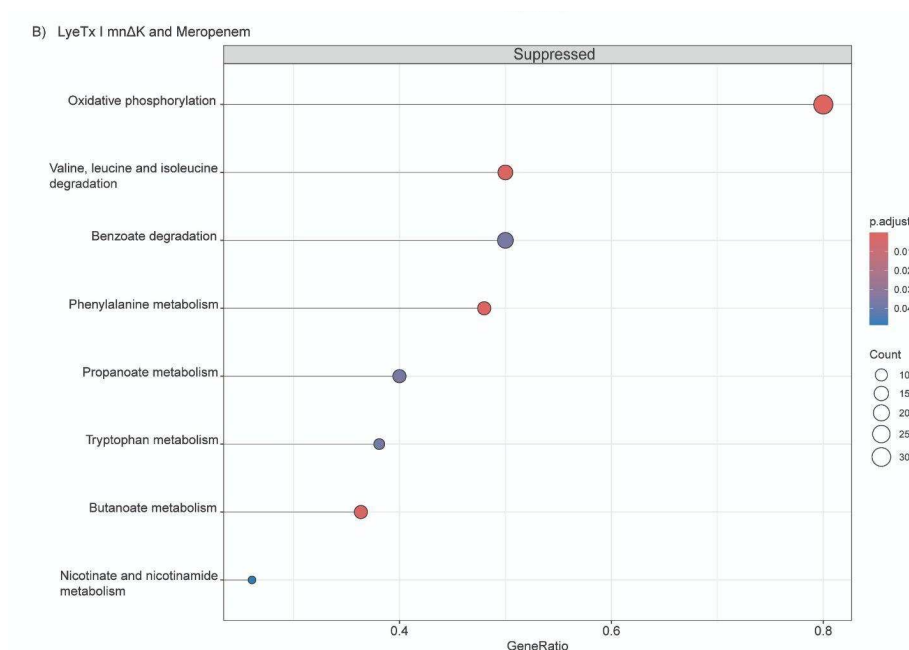


Figura 22. Processos biológicos enriquecidos nos tratamento com o peptídeo LyeTx I mnΔK e Sinergismo. Gráfico lollipop das vias ativadas e suprimidas na condição de tratamento utilizando a função gseKEGG. Espectro de cor representando o valor de significância (p-valor ajustado) das vias biológicas. O tamanho de cada círculo representa a contagem do número de genes enriquecidos em cada via. Painéis (A): LyeTx I mnΔK. (B): LyeTx I mnΔK e Meropenem.

4.2.4. Dados públicos de RNA-Seq

Devido ao baixo número de genes diferencialmente expressos e à pequena distância e variância observadas no PCA entre as bibliotecas tratadas com Meropenem e os controles, optamos por analisar dados públicos de RNA-Seq a fim de comparar com os resultados obtidos neste estudo.

A seleção de estudos depositados no SRA de *A. baumannii* tratada com Meropenem foi realizada de acordo com a seção 3.2.2. Dessa forma, os projetos com os identificadores PRJNA548006 e PRJNA787205 foram selecionadas seguindo esses critérios. As características dos projetos podem ser encontradas na Tabela 6.

O projeto PRJNA548006 realizou o cultivo de *A. baumannii* na presença de Meropenem por um período de 35 dias com o objetivo de obter mutantes resistentes a este antibiótico. Após cultivo, observou-se a presença de 2 mutantes, RM1 e RM2, resistentes a este antimicrobiano. Foi realizado então o sequenciamento dos RNAs dos mutantes e a comparação com controle quando tratados com Meropenem.

A Figura 23 representa o número de genes diferencialmente expressos nesses tratamentos. Observa-se um baixo número de DEGs em ambos os tratamentos, sendo a maioria desses genes superexpressos.

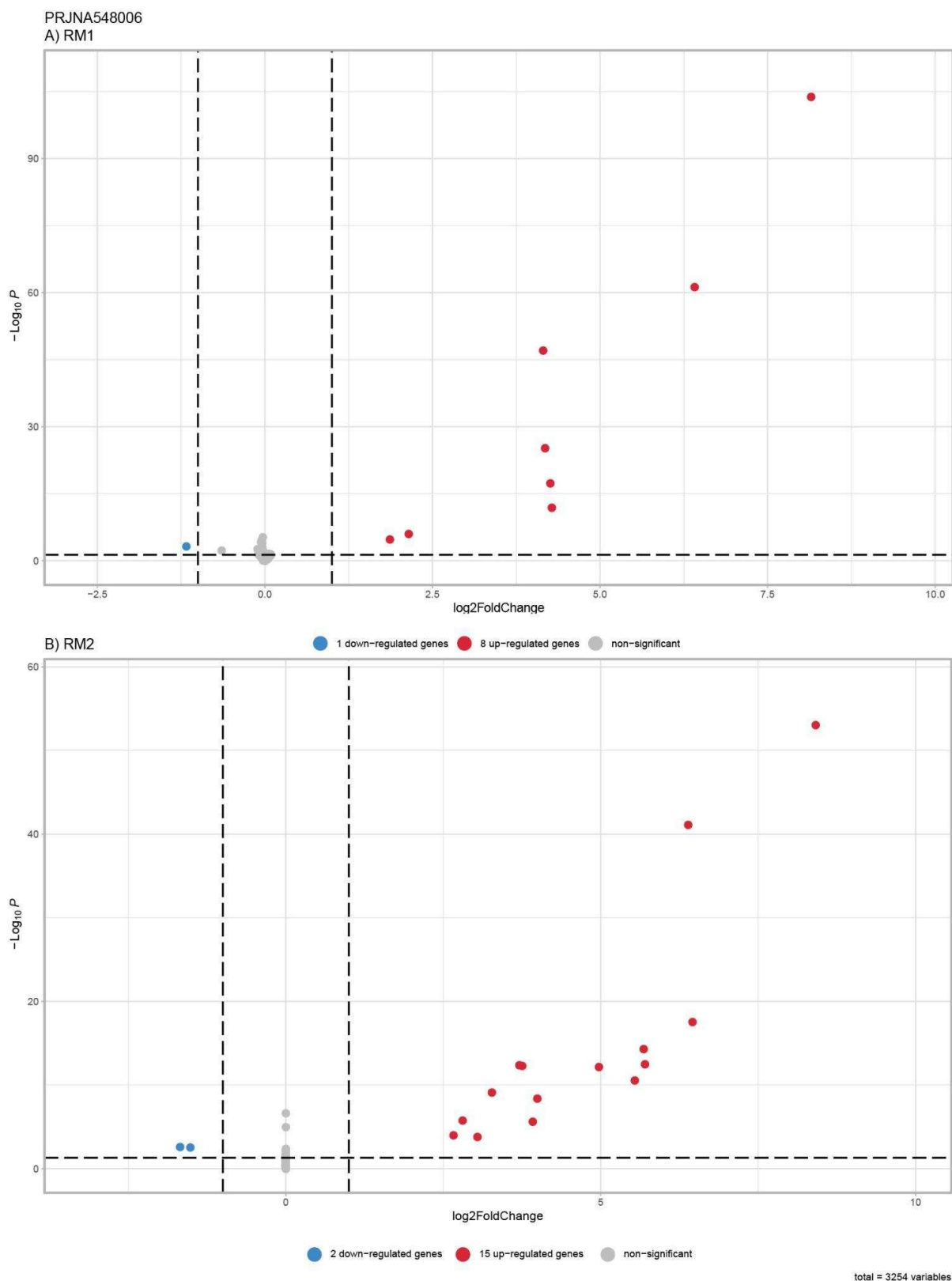


Figura 23. Gráficos Volcanos do estudo PRJNA548006. Representação do número de genes diferencialmente expressos encontrados. Círculos em azul, vermelho e cinza representam genes subexpressos, superexpressos e não diferencialmente expressos, respectivamente, de acordo com valor absoluto de $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$ e p-valor ajustado < 0.05 . Painéis (A): Mutante *A. baumannii* 37662 RM1 e (B) Mutante de *A. baumannii* 37662 RM2.

Tabela 6 - Características dos estudos de *Acinetobacter baumannii* tratada com Meropenem depositadas no SRA. Em negrito o identificador dos estudos selecionados

Bioproject	Linhagem	Tamanho das leituras	Concentração de Meropenem	Tempo de cultivo após tratamento	Profundidade das bibliotecas	Plataforma de sequenciamento	Tipo de leitura	Número de replicatas
PRJNA321935	R1 a R9 (resistentes), S1 a S3 (sensível)	101 pb	sub-MIC (1/8 a 1/64 x MIC)	-	17-26M pb	Illumina HiSeq 2000	<i>Paired-end</i>	Duplicata
PRJNA518730	ATCC 17978 (resistente)	68 pb	MIC	10, 30 e 60 min	8-21M pb	Illumina HiSeq2500	<i>Paired-end</i>	Duplicata
PRJNA548006	37662 (resistente)	150 pb	sub-MIC (0.5 x MIC)	30 dias	10-12M pb	Illumina HiSeq2500	<i>Paired-end</i>	Triplicata
PRJNA686448	ATCC 17978 (resistente)	58 pb	-	30 e 90 min	3-9M pb	Illumina NextSeq 500	<i>Single-end</i>	Triplicata
PRJNA787205	ATCC 17978 (resistente)	50 pb	MIC	30 min, 3h e 9h	10-16M pb	Illumina NextSeq 550	<i>Paired-end</i>	Triplicata
PRJNA797559	AB5116 (sensível)	150 pb	sub-MIC (0.5 x MIC, 0.0625 µg/mL)	30 min	10-14M pb	Illumina HiSeq X Ten	<i>Paired-end</i>	Triplicata
PRJNA876061	AB075 (resistente)	102 pb	25, 100 e 200 µg/mL	15 min	1-3M pb	Illumina HiSeq 4000	<i>Paired-end</i>	Duplicata

O estudo PRJNA787205 teve objetivo de avaliar a expressão gênica ao longo do intervalo de tempo entre 30 minutos, 3 horas e 9 horas de cultivo na presença de Meropenem. Observa-se que, ao longo do tempo, há um aumento no número de DEGs, existindo uma similaridade no número de genes superexpressos e subexpressos (Figura 24).

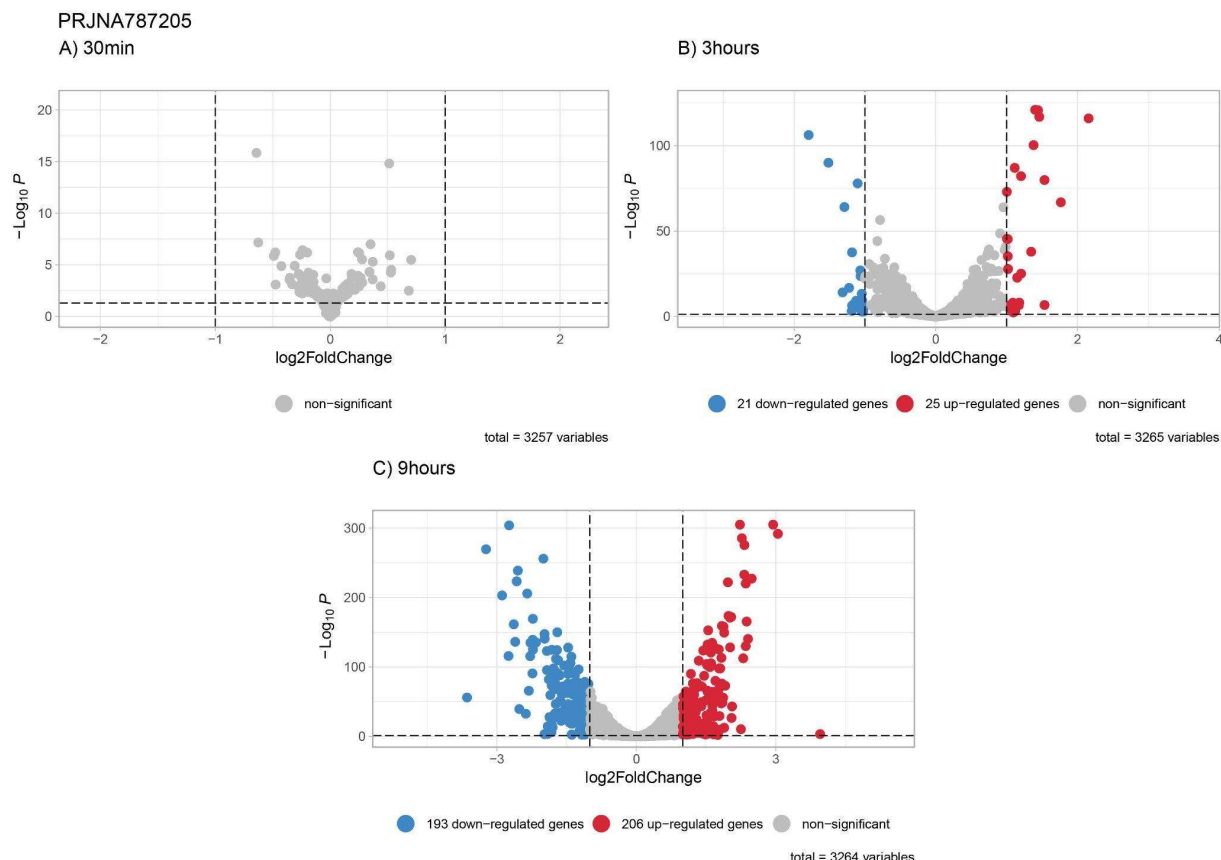


Figura 24. Gráficos Volcanos do estudo PRJNA787205. Representação do número de genes diferencialmente expressos encontrados. Círculos em azul, vermelho e cinza representam genes subexpressos, superexpressos e não diferencialmente expressos, respectivamente, de acordo com valor absoluto de $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$ e p-valor ajustado < 0.05 . Painéis (A): Tratamento com Meropenem durante 30 minutos, (B) Tratamento com Meropenem durante 3 horas e (C) Tratamento com Meropenem durante 9 horas.

A expressão dos genes de resistência identificados na seção 4.1.2 para os estudos do SRA estão representados na Figura 25. O projeto PRJNA548006 apresenta, em seus 2 mutantes, a alta expressão do gene OXA-69. Já o estudo PRJNA787205, apenas o gene *sul2* foi diferencialmente expresso na condição de 9 horas de tratamento.

Após a análise de enriquecimento, para o projeto PRJNA548006, observou-se que não houve termos enriquecidos para ambas as bibliotecas RM1 e RM2. Já o estudo PRJNA787205, os termos enriquecidos associados ao KEGG podem ser visualizados na Figura 26.

O tratamento com Meropenem durante 30 minutos resultou em 2 termos enriquecidos, “Metabolismo de fenilalanina” e “Metabolismo de D-aminoácidos”. As bibliotecas do cultivo por 3 horas na presença de Meropenem apresentaram o maior número de vias enriquecidas, sendo a maior parte relacionadas a vias suprimidas. Destacam-se algumas vias de metabolismo energético como a supressão das vias “biossíntese e metabolismo de ácidos graxos” e “metabolismo de piruvato”. Já a condição de 9 horas de tratamento com Meropenem resultou em vias enriquecidas semelhantes ao tratamento com 3 horas, com exceção da ativação de vias de “Exportação de proteínas” neste intervalo de cultivo.

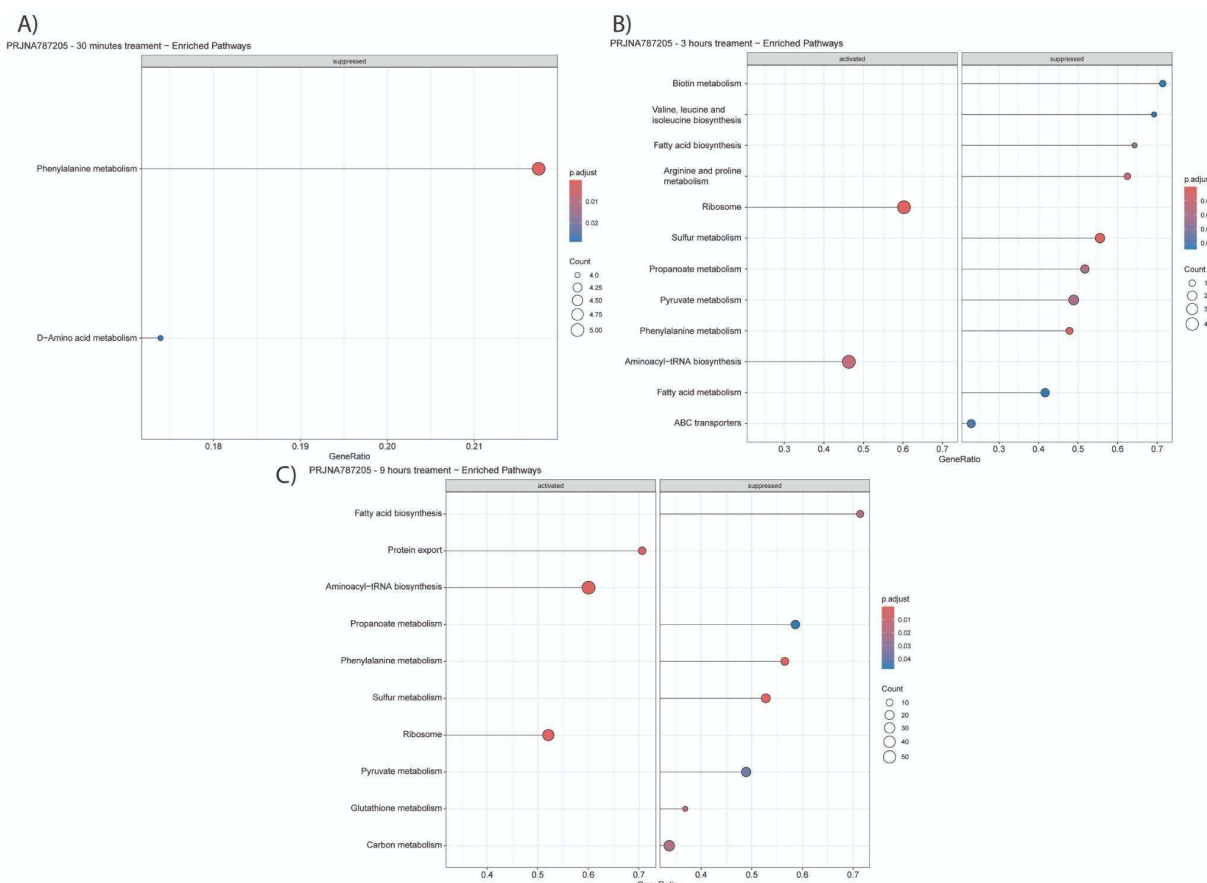


Figura 26. Processos biológicos enriquecidos nos tratamentos com Meropenem no projeto PRJNA787205. Gráfico lollipop das vias ativadas e suprimidas nas condições de tratamento utilizando a função gseKEGG. Espectro de cor representando o valor de significância (p-valor ajustado) das vias biológicas. O tamanho de cada círculo representa a contagem do número de genes enriquecidos em cada via. Painéis (A), (B) e (C) representam os tempos de incubação com Meropenem de 30 minutos, 3 horas e 9 horas, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

A fim de caracterizar e comparar um novo genoma de *A. baumannii* com outros genomas da espécie, foram realizados, neste trabalho, a montagem, anotação e identificação de genes de resistência, virulência e elementos genéticos móveis no genoma do isolado de AC37. Além disso, foi realizada a análise da resposta desta bactéria ao tratamento com o peptídeo LyeTx I Δ mnΔK, Meropenem e ao sinergismo de ambos antimicrobianos, por meio da análise do transcriptoma das bactérias tratadas, com o objetivo de compreender a regulação gênica dessa bactéria frente a novas alternativas de tratamento a infecções por *A. baumannii*.

Este isolado apresenta um plasmídeo identificado pelo PLSDB, contendo 11 genes. Embora plasmídeos que codificam genes de resistência sejam comuns em bactérias, o plasmídeo NZ_CP131945.1 não apresenta tais genes, contudo, ele codifica duas proteínas associadas ao sistema toxina-antitoxina. Descoberto na década de 1980, esse sistema representa uma estratégia de segregação bacteriana, na qual bactérias produzem uma toxina que inibe processos celulares essenciais, enquanto apenas os microrganismos que produzem a antitoxina correspondente conseguem sobreviver (GERDES; RASMUSSEN; MOLIN, 1986).

A maioria das toxinas descritas são proteínas, enquanto as antitoxinas podem ser tanto proteínas quanto RNAs. (JURÉNAS et al., 2022). Os genes do sistema toxina-antitoxina *BrnT/BrnA*, inicialmente elucidados em *Brucella abortus* em 2012, estão organizados em um operon que codifica uma proteína tóxica citoplasmática e sua antitoxina correspondente. BrnTp atua como uma ribonuclease, que forma um heterotetrâmero 2:2 associado a BrnAp. Esse complexo tetramérico pode se ligar ao próprio promotor via BrnAp e suprimindo sua expressão (HEATON et al., 2012).

Devido a abundância de genomas de *A. baumannii* disponíveis no NCBI, nos interessou descobrir a posição filogenética do isolado AC37. A construção da árvore filogenética inclui o isolado AC37 e outros 122 genomas de *A. baumannii* obtidos no NCBI.

Observa-se que o isolado AC37 se agrupou em um *cluster* contendo genomas de *A. baumannii* tanto multirresistentes quanto sensíveis. É importante destacar que a classificação de cada linhagem como multirresistente ou sensível foi

baseada nas informações disponíveis na página *web* da montagem correspondente no NCBI.

Curiosamente, o isolado AC37 está posicionado distante da linhagem ATCC 19606, o genoma de referência da espécie. Essa característica revelou-se relevante nas análises de transcriptoma, visto que os dados de RNA-Seq apresentaram maior porcentagem de mapeamento ao genoma de AC37. Isso reforça a importância de utilizar o genoma específico do isolado para obter resultados mais precisos, considerando a alta variação genética característica entre diferentes populações clonais da espécie (GRANA-MIRAGLIA et al., 2017).

Após a construção da árvore filogenética, realizamos a análise comparativa do resistoma de todas as linhagens utilizando o RGI. Os 123 genomas analisados apresentaram, em média, 31.78 genes de resistência, um número próximo ao observado por Hernández-González et al., (2022), em seu estudo comparativo com 1472 genomas de *A. baumannii*, no qual identificaram uma média de 29.38 genes de resistência. Observou-se que a maioria dos genes compartilhados entre os genomas analisados está associada à classe efluxo de antibióticos, sendo predominantemente pertencentes à família de bombas de efluxo RND.

Nossa análise revelou que o isolado AC37 apresentava 3 genes de resistência exclusivos: *AAC(6')-Ib'*, *floR* e *ADC-183*. Esses genes também foram considerados raros no estudo de Hernández-González (HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ; MATEO-ESTRADA; CASTILLO-RAMIREZ, 2022), sendo *AAC(6')-Ib'* encontrado em apenas 27 genomas, *floR* em 22 genomas, e *ADC-183* ausente em todos os genomas analisados por eles.

O gene *AAC(6')-Ib'* sintetiza uma enzima modificadora de aminoglicosídeos, que inativa esses fármacos por meio de acetilação, utilizando o acetil-CoA como doador (Figura 27). A classe de enzima AAC (do inglês, *Aminoglycoside acetyltransferase*) é um dos principais fatores associados ao aumento de resistência em bactérias. As enzimas variantes de *AAC(6')-I* são abundantes e encontradas principalmente nas famílias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Vibrionaceae*. Suas variações são principalmente na região N-terminal, podendo existir substituições de aminoácidos para uma maior abrangência dos substratos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2017). Por sua vez, os aminoglicosídeos são utilizados no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Atuam ligando-se à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, promovendo alterações

conformacionais no sítio A, similares à provocadas quando há chegada de t-RNAs. Como consequência, esses antibióticos induzem a síntese de proteínas aberrantes, impactando o proteoma celular (GREEN et al., 2010; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

Em nosso estudo, o gene *AAC(6')-Ib'* foi identificado dentro de um integron de classe I, descrito no TNCentral como pertencente a *Pseudomonas aeruginosa*. Esse gene é comumente encontrado associado a essa classe de integrons, mas também em outros elementos genéticos móveis como em sequências de inserção, plasmídeos e elementos transponíveis, ou até mesmo integrado no cromossomo bacteriano. Essa ampla distribuição destaca sua relevância na disseminação da resistência a aminoglicosídeos (RAMIREZ; NIKOLAIDIS; TOLMASKY, 2013).

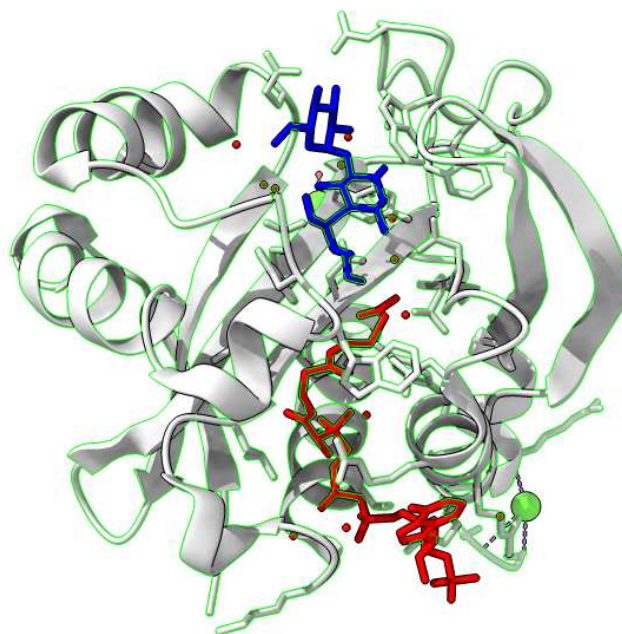


Figura 27. Representação da estrutura terciária de AAC(6')-Ib'. Estrutura resolvida por difração raio-x do completo AAC(6')-Ib' (cinza), em associação a Acetil-CoA (vermelho) e Kanamicina C (azul). PDB:1V0C.

O segundo gene exclusivo identificado no genoma do isolado AC37 é *ADC-183*. Este gene codifica uma β -lactamase da classe C (AmpC), pertencente ao grupo das Cefalosporinases derivadas de *Acinetobacter* (do inglês ADC - *Acinetobacter*-derived cephalosporinases) (KARAH et al., 2017). O mecanismo antibacteriano dos β -lactâmicos baseia-se na acilação de uma serina localizada no sítio ativo de proteínas de ligação à penicilina. Dessa forma, durante os estágios finais da formação da parede celular bacteriana, esses antibióticos bloqueiam as reações de transpeptidação e transglicosilação, impedindo a formação de ligações entre os peptideoglicanos, o que resulta na morte celular (Figura 28) (BUSH, 2018).

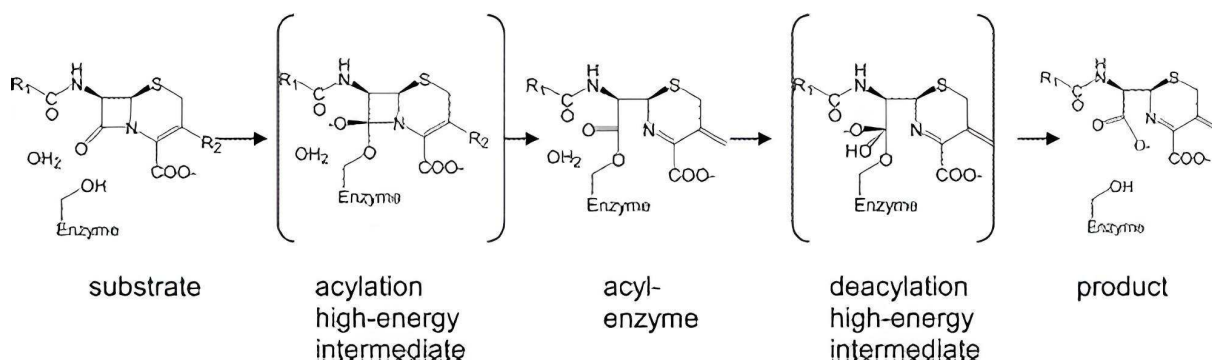


Figura 28. Mecanismo de hidrólise enzimática por β -lactamases da classe C (AmpC). A reação ocorre através de um complexo inicial de primeiro encontro pré-covalente (à esquerda), um intermediário tetraédrico de alta energia de acilação, um complexo enzima-acil de baixa energia, um intermediário tetraédrico de alta energia de desacilação após o ataque da água catalítica e, por fim, o produto hidrolisado, que é subsequentemente liberado do complexo enzimático. Retirado de: The Deacylation Mechanism of AmpC β -Lactamase at Ultrahigh Resolution (CHEN et al., 2006).

Os genes pertencentes a esse grupo são cromossomais exclusivos do gênero *Acinetobacter* (PÉRICHON et al., 2014). Variantes desse grupo apresentam cerca de 380 aminoácidos, com variações de 1 a 25 aminoácidos. Normalmente os ADCs são expressos em níveis baixos, sendo que o fenótipo de resistência à cefalosporinas resulta de uma combinação entre a expressão do gene e propriedades de permeabilidade da membrana externa bacteriana (ZHAO; HU, 2012).

O gene *ADC-183* foi identificado em apenas um isolado hospitalar, conforme descrito por Nodari et al. (2020), em seu estudo com linhagens provenientes de hospitais brasileiros. Segundo ROCHA, 2024, em sua análise de variações alélicas do gene ADC, *ADC-183* apresenta estreita relação filogenética com outras variantes, como *ADC-181*, *ADC-234* e *ADC-235*. Curiosamente, todos esses genes foram encontrados exclusivamente em isolados endêmicos do Brasil, reforçando sua relevância no contexto epidemiológico nacional.

O terceiro gene exclusivo do isolado AC37 é *floR*. Esse gene codifica um exportador de fenicol, inicialmente caracterizado em 1999 em um linhagem de *Salmonella typhimurium* (ARCANGIOLI et al., 1999). Similar a outros genes de resistência, *floR* já foi identificado tanto em cromossomos quanto em regiões de elementos genéticos móveis (LU et al., 2018). Esse gene foi encontrado no genoma de AC37, associado a uma região de elemento transponível. A transferência de material genético entre bactérias é um fenômeno comum e especialmente perigoso em ambientes hospitalares, visto que o ganho de genes de resistência pode tornar o prognóstico da infecção ainda pior (BOITEN et al., 2023).

Após a caracterização genômica do isolado AC37 e comparação com outros genomas, nosso estudo direcionou-se para investigar a resposta desse isolado ao tratamento com o peptídeo LyeTx I Δ mnK, o antibiótico Meropenem, e combinação sinérgica de ambos os antimicrobianos.

O peptídeo LyeTx I Δ mnK apresenta-se como uma promissora alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, devido a sua elevada capacidade bactericida aliada a uma baixa taxa hemolítica. Um estudo prévio também demonstrou que esse peptídeo possui efeito sinérgico quando combinado ao Meropenem, um antibiótico amplamente utilizado no combate às infecções causadas por *A. baumannii*. Essa combinação potencializa a eficácia antimicrobiana, representando uma estratégia promissora frente a isolados multirresistentes (LIMA et al., 2021).

Após as análises de qualidade iniciais, mapeamento dos transcriptomas no genoma do isolado AC37 e contagem dos genes, fizemos uma análise de componentes principais (PCA). Observamos que todas as condições experimentais de tratamento se separaram em quadrantes distintos, evidenciando as diferenças entre elas. No entanto, as bibliotecas dos grupos “Controle” e “Meropenem”, embora posicionadas em quadrantes diferentes, mostraram-se agrupadas de forma próxima.

Essa proximidade, alinhado ao baixo número de genes diferencialmente expressos nessa condição, levou-nos a hipotetizar que a concentração sub inibitória mínima (sub-MIC) utilizada para os experimentos não foi suficiente para desencadear uma resposta bacteriana. Diante disso, decidimos investigar outros estudos de RNA-Seq públicos disponíveis no SRA, com o objetivo de realizar comparações e enriquecer nossas análises, como será discutido posteriormente.

Observamos que o tratamento somente com o peptídeo resultou no maior número de DEGs, seguido pelo sinergismo e, por último, o tratamento somente com o Meropenem. Tivemos o interesse de investigar a expressão dos genes de resistência identificados no genoma de AC37 para tentarmos ampliar nosso conhecimento sobre a resposta bacteriana a esses tratamentos.

Notamos que somente o tratamento com o peptídeo havia gerado DEGs ao analisarmos exclusivamente os genes de resistência. Foram identificados 5 genes diferencialmente expressos nessa condição experimental, *adeA*, *adeB*, *adeI*, *adeJ* e *adeK*. Esses genes codificam bombas de efluxo pertencentes à classe RND, as

quais desempenham um papel fundamental na tentativa da célula bacteriana de expulsar o peptídeo da célula.

O sistema de efluxo ativo de membrana é geralmente composto por 3 partes: uma proteína de membrana externa, um transportador de múltiplas drogas e uma proteína de fusão de membrana. Com base na homologia das estruturas primárias dessas proteínas, as bombas de efluxo de membrana são classificadas em 5 famílias: ATP-binding cassette (ABC), small multidrug resistance (SMR), multi-antimicrobial extrusion (MATE), major facilitator (MFS) e resistance/nodulation/division (RND). A classe ABC está presente essencialmente em bactérias gram-positivas, utilizando ATP como fonte de energia. Enquanto as superfamílias SMR, MATE, MFS e RND dependem da força motriz de prótons como fonte de energia (COYNE; COURVALIN; PÉRICHON, 2011; XU; BILYA; XU, 2019).

A superfamília de bombas de efluxo RND é amplamente encontrada em *A. baumannii* e compreende os operons adeABC, adeDE, adeFGH, adeIJK e adeXYZ. Uma característica marcante dessas bombas de efluxo em bactérias Gram-negativas é que suas proteínas estão estruturadas de maneira a atravessar a membrana interna, o periplasma e a membrana externa da célula bacteriana (ATHAR et al., 2023).

O operon adeABC (do inglês, *Acinetobacter drug efflux*), é exclusivamente associado a linhagens multirresistentes de *A. baumannii*. A superexpressão desse operon tem sido associada a fenótipos de resistência a uma ampla gama de antibióticos incluindo os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e cloranfenicol (RUMBO et al., 2013; RUZIN; KEENEY; BRADFORD, 2007; YUHAN et al., 2016). A Figura 29 representa a hipótese proposta do sobre mecanismo de ação de adeB, onde a força motriz da troca de prótons do periplasma celular para o interior da célula é responsável pela extrusão do antimicrobiano (SU et al., 2019)

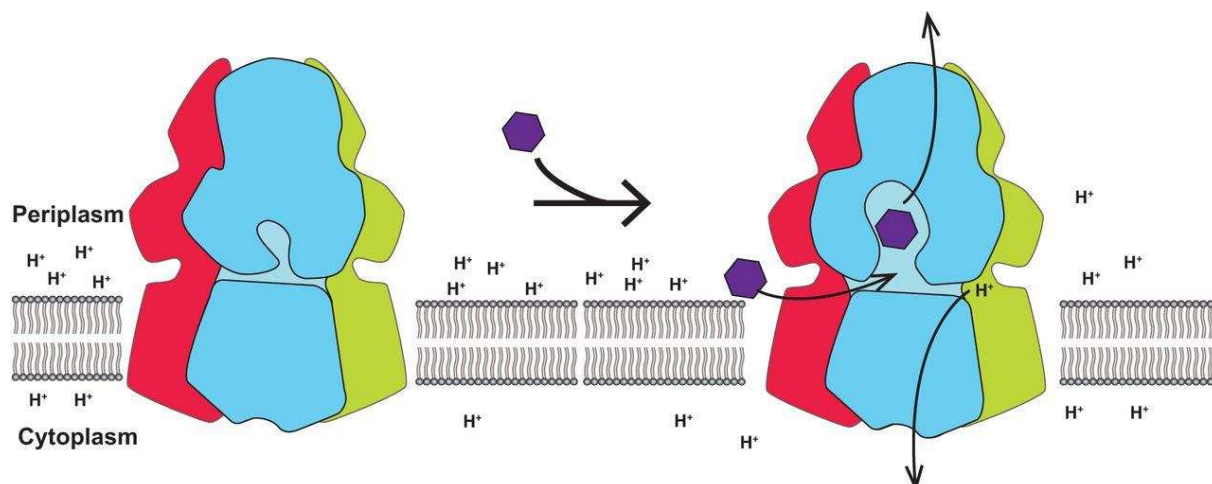


Figura 29. Mecanismo de ação de adeB. O influxo de prótons e a expulsão do fármaco são processos sincronizados e acoplados. Retirado de: Cryo-Electron Microscopy Structure of an *Acinetobacter baumannii* Multidrug Efflux Pump.

Interessantemente, o gene *adeC* não foi identificado como diferencialmente expresso em nossas análises. Como esse gene codifica uma proteína de membrana externa, o complexo *adeAB* parece ser capaz de utilizar outras proteínas de membrana externa para completar a etapa final da expulsão do antimicrobiano, garantindo a sobrevivência bacteriana (MARCHAND et al., 2004).

O operon *adeIJK*, ao contrário de *adeABC*, se encontra em isolados sensíveis quanto multirresistentes. A superexpressão de *adeIJK* também é associada a fenótipos de resistência, e a principal diferença entre os dois operon se dá na especificidade a alguns substratos (TAMBAT et al., 2024).

Além dos genes da superfamília RND, observamos também a alta expressão de *AmvA* e *OXA-23* que estão próximos ao limiar dos critérios de expressão diferencial, apresentando valores de $\log_2\text{FoldChange}$ de 0.923 e 0.854, respectivamente. O gene *AmvA* participa da classe das bombas de efluxo MFS, enquanto *OXA-23* é uma das principais β -lactamases associadas aos fenótipos de resistência a antibióticos em *A. baumannii* (COYNE; COURVALIN; PÉRICHON, 2011; LEE et al., 2010).

Após as análises da expressão diferencial dos genes de resistência, tivemos a curiosidade de entender, em um contexto geral, as alterações geradas pelos tratamentos através de uma análise de enriquecimento funcional utilizando as vias anotadas pelo KEGG. De acordo com a ferramenta do BlastKOALA (KANEHISA; SATO; MORISHIMA, 2016), apenas 52% do genoma de *A. baumannii* apresenta anotação de vias do KEGG, o que limita o escopo de nossas análises.

Os processos ativados no tratamento com o peptídeo LyeTx I Δ mn mostraram-se relacionados à produção, exportação e secreção de proteínas. Além disso, as vias de metabolismo de pirimidinas e resistência à β -lactâmicos também encontram-se ativadas. Entre esses processos, a exportação e secreção de proteínas foram particularmente interessantes, tendo a via dependente de Sec diversos genes superexpressos (dados não mostrados).

Essa via desempenha um papel essencial, visto que mais de um terço do proteoma bacteriano precisa ser exportado para localizações extracitoplasmáticas, como a membrana plasmática ou o periplasma celular. A via dependente de Sec faz parte do mecanismo de translocação de proteínas e é caracterizado pelo reconhecimento de um peptídeo sinal em todas as proteínas transportadas. Esse sinal é reconhecido por componentes do sistema Sec, garantindo que as proteínas sejam translocadas enquanto ainda estão em estado não enovelado (GREEN; MECSAS, 2016; TSIRIGOTAKI et al., 2017). Dessa forma, a superexpressão dos genes da via dependente de Sec pode indicar uma tentativa na manutenção e composição das membranas celulares.

Os fatores de virulência desempenham um papel crucial na sobrevivência bacteriana e podem ser transportados pela via dependente de Sec. Essa via pode contribuir com o transporte desses fatores que, posteriormente, podem ser secretados no ambiente extracelular, facilitando processos importantes como a captação de nutrientes no meio externo e a formação de biofilmes, auxiliando na proteção contra agentes químicos, físicos e biológicos (GREEN; MECSAS, 2016). No tratamento com o LyeTx I Δ mn, observou-se a superexpressão de genes relacionados à aderência e formação de biofilme (dados não mostrados), sugerindo também a ocorrência desses eventos para a sobrevivência bacteriana.

Na análise de enriquecimento funcional para o tratamento com o sinergismo entre o LyeTx I Δ mn e o Meropenem, observou-se somente vias que foram suprimidas por essa condição experimental. Entre os processos, destaca-se a da fosforilação oxidativa, em especial, os genes relacionados ao complexo I NADH desidrogenase estão em sua maioria subexpressos, podendo indicar um desbalanço eletroquímico visto que esse complexo é um dos responsáveis pelo bombeamento de prótons H^+ para o periplasma celular.

O complexo citocromo bd oxidase (*CydA*, *CydB* e *CydX*) também participa do processo de respiração de procariotos, sendo responsável pela redução do oxigênio

molecular (O_2) para H_2O , com auxílio de quinonas (GIUFFRÈ et al., 2014). Os genes relacionados a este complexo estão, em sua maioria, subexpressos no tratamento com o sinergismo de ambos antimicrobianos (dados não mostrados). A regulação negativa de genes da fosforilação oxidativa também foi observado por KASHYAP; SHARMA; CAPALASH, 2022, que concluíram que a diminuição da diferença de potencial elétrico entre o periplasma e o citoplasma celular, além de diminuir a produção de ATP, pode contribuir para a diminuição da virulência e viabilidade celular.

Como mencionado, os resultados inesperados das bibliotecas tratadas com Meropenem motivaram a busca por estudos similares na literatura envolvendo linhagens de *A. baumannii* cultivadas na presença de Meropenem. Essa pesquisa resultou em 2 estudos relevantes depositados sob os *BioProjects*: PRJNA548006 e PRJNA787205.

Resumidamente, o estudo depositado com o *BioProject* PRJNA548006 utilizou uma linhagem sensível à carbapênicos (*A. baumannii* 37662) que foi cultivada durante 35 dias na concentração de 0.5 x MIC de Meropenem. Como resultado, foram isolados 2 mutantes, denominados RM1 e RM2, que foram submetidos a experimentos fenotípicos além da análise e comparação do transcriptoma desses mutantes. No entanto, os mutantes RM1 e RM2 apresentaram um baixo número de genes diferencialmente expressos. Essa observação pode ser explicada pelo fato de os autores não especificarem, em sua metodologia, se o crescimento bacteriano para a extração do RNA foi realizado na presença de Meropenem, levando à hipótese de que a ausência do antibiótico durante o crescimento celular possa ter influenciado na baixa quantidade de DEGs.

Já o estudo depositado como PRJNA787205, foi realizado em uma linhagem resistente (*A. baumannii* ATCC 17978), comparou a expressão gênica em diferentes tempos de cultivo na presença de Meropenem. Os resultados indicaram que há uma diferença temporal na expressão gênica, com um aumento no número de DEGs ao longo do tempo. Essa observação sugere uma resposta tardia de *A. baumannii* quando cultivada na presença de Meropenem.

As análises de enriquecimento para as bibliotecas do *BioProject* PRJNA787205 revelaram vias enriquecidas similares às observadas no tratamento com o peptídeo LyeTx I Δ mn Δ K, porém com algumas diferenças notáveis, como a supressão do metabolismo do piruvato e a supressão da biossíntese de ácidos

graxos, processos ausentes na resposta ao peptídeo. Esses resultados podem indicar um estado metabólico reduzido das bactérias frente a esse tipo de estresse como possível tentativa de manutenção da viabilidade celular.

Interessante notar que no tratamento com LyeTx mnΔK houve supressão da via de degradação de ácidos graxos enquanto no tratamento com Meropenem, durante 3 e 9 horas, encontramos a supressão da biossíntese de ácidos graxos. Essas respostas refletem no tratamento sinérgico onde a tentativa de manutenção da composição das membranas celulares, associada a supressão na síntese de ATP, indicam uma desregulação aguda da resposta celular ao tratamento combinado.

Esses achados destacam a relevância da caracterização genômica de *A. baumannii*, além da compreensão da regulação gênica bacteriana em resposta a uma possível nova terapia. Também se mostra essencial, especialmente no contexto de análises transcriptômicas, a necessidade da obtenção de anotações do genoma mais precisas para melhorar compreensão e interpretação dos resultados em análises de enriquecimento funcional, permitindo identificar vias metabólicas mais restritas e precisas para melhor compreensão da resposta bacteriana a diferentes estresses.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, realizamos a montagem e anotação genômica de um novo isolado de *A. baumannii*, incluindo a identificação de plasmídeos, genes de resistência, fatores de virulência e elementos genéticos móveis. Além disso, analisamos os transcriptomas dessa bactéria sob tratamento com concentrações sub-inibitórias do novo peptídeo antimicrobiano LyeTx I mnΔK, do antibiótico clínico Meropenem e da combinação sinérgica entre ambos. Podemos concluir que:

- Na árvore filogenética com 123 genomas de *A. baumannii*, o isolado AC37 encontra-se em um *cluster* diverso, que inclui linhagens sensíveis e multirresistentes;
- Este isolado está distante do genoma de referência da espécie, ressaltando a relevância da sua caracterização;
- O genoma de AC37 contém 31 genes de resistência, dos quais três genes são raros e exclusivos em comparação aos outros genomas da árvore filogenética;
- Dois dos três genes de resistência exclusivos, *floR* e *AAC(6')-Ib'*, estão localizados em regiões de elementos genéticos móveis, evidenciando a importância da transferência gênica horizontal entre diferentes espécies;
- O peptídeo LyeTx I mnΔK foi o principal agente a induzir alterações na expressão gênica de *A. baumannii*, em especial nas vias de exportação e secreção de proteínas;
- O tratamento sinérgico com LyeTx I mnΔK e Meropenem também influenciou a expressão gênica, com destaque para alterações na via da fosforilação oxidativa.

7. REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. *Avaliação nacional dos indicadores de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2023. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviço de Saúde*, n. 31, 2023.
- AHMED, W. RNA-seq resolving host-pathogen interactions: Advances and applications. **Ecological Genetics and Genomics**, v. 15, p. 100057, 1 maio 2020.
- ALCOCK, B. P. et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D690–D699, 6 jan. 2023.
- ALMASAUDI, S. B. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 3, p. 586–596, mar. 2018.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.
- ANTUNES, L. C. S.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and Disease**, v. 71, n. 3, p. 292–301, ago. 2014.
- ARCANGIOLI, M.-A. et al. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in Salmonella typhimurium DT104. **FEMS Microbiology Letters**, v. 174, n. 2, p. 327–332, 1 maio 1999.
- ARNOLD, B. J.; HUANG, I.-T.; HANAGE, W. P. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 206–218, abr. 2022.
- ARTUSO, I. et al. Genome diversity of domesticated Acinetobacter baumannii ATCC 19606T strains. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 1, p. 000749, 27 jan. 2022.
- ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49–59, 3 mar. 2017.
- ATHAR, M. et al. Tripartite efflux pumps of the RND superfamily: what did we learn from computational studies? **Microbiology (Reading, England)**, v. 169, n. 3, p. 001307, mar. 2023.
- Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.** Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 15 fev. 2025.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.
- BIN HAFEEZ, A. et al. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11691, 28 out. 2021.
- BOITEN, K. E. et al. Characterization of mobile genetic elements in multidrug-resistant Bacteroides fragilis isolates from different hospitals in the Netherlands. **Anaerobe**, v. 81, p. 102722, jun. 2023.
- BRISOU, J.; PREVOT, A. R. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group. **Annales De l'Institut Pasteur**, v. 86, n. 6, p. 722–728, jun. 1954.
- BUSH, K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. e01076-18, 24 set. 2018.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. **Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Complex Surveillance**, 2021.

CERCEO, E. et al. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 5, p. 412–431, jul. 2016.

CHEN, Y. et al. The Deacylation Mechanism of AmpC β -Lactamase at Ultrahigh Resolution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 9, p. 2970–2976, 1 mar. 2006.

COLGAN, A. M.; CAMERON, A. D.; KRÖGER, C. If it transcribes, we can sequence it: mining the complexities of host–pathogen–environment interactions using RNA-seq. **Current Opinion in Microbiology**, v. 36, p. 37–46, abr. 2017.

COYNE, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 947–953, mar. 2011.

DANECEK, P. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. **GigaScience**, v. 10, n. 2, p. giab008, 1 fev. 2021.

DARBY, E. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 280–295, maio 2023.

DE PASCALE, G.; WRIGHT, G. D. Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation: From Mechanisms to Solutions. **ChemBioChem**, v. 11, n. 10, p. 1325–1334, 2010.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 939–951, dez. 2007.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, jan. 2013.

DOI, Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 69, n. Suppl 7, p. S565–S575, 1 dez. 2019.

DOUGHARI, H. J. et al. The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 2, p. 101–112, 2011.

EWELS, P. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047–3048, 1 out. 2016.

FUSCALDI, L. L. et al. Shortened derivatives from native antimicrobial peptide LyeTx I: *In vitro* and *in vivo* biological activity assessment. **Experimental Biology and Medicine**, v. 246, n. 4, p. 414–425, fev. 2021.

GERDES, K.; RASMUSSEN, P. B.; MOLIN, S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 10, p. 3116–3120, maio 1986.

GIAMMANCO, A. et al. Global Assessment of the Activity of Tigecycline against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens between 2004 and 2014 as Part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. e00310-16, 18 jan. 2017.

GIUFFRÈ, A. et al. Cytochrome bd oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1837, n. 7, p. 1178–1187, jul. 2014.

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

GRAÑA-MIRAGLIA, L. et al. Rapid Gene Turnover as a Significant Source of Genetic Variation in a Recently Seeded Population of a Healthcare-Associated Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 8,

p. 1817, 20 set. 2017.

GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, p. 4.1.13, 29 jan. 2016.

GREEN, K. D. et al. Exploring the Substrate Promiscuity of Drug-Modifying Enzymes for the Chemoenzymatic Generation of N-Acylated Aminoglycosides. **ChemBioChem**, v. 11, n. 1, p. 119–126, 2010.

HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91–102, fev. 2018.

HEATON, B. E. et al. Molecular Structure and Function of the Novel BrnT/BrnA Toxin-Antitoxin System of *Brucella abortus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 15, p. 12098–12110, abr. 2012.

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, I. L.; MATEO-ESTRADA, V.; CASTILLO-RAMIREZ, S. The promiscuous and highly mobile resistome of *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 1, p. 000762, 25 jan. 2022.

HILL, J. A.; COWEN, L. E. Using Combination Therapy to Thwart Drug Resistance. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1719–1726, nov. 2015.

HU, F.-P. et al. Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005–2014. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. S9–S14, mar. 2016.

IBRAHIM, S. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 10, p. 6987–6998, 2021.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2065, p. 20150202, 13 abr. 2016.

JURÉNAS, D. et al. Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 335–350, jun. 2022.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 1 jan. 2000.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 4, p. 726–731, 22 fev. 2016.

KARAH, N. et al. Database for the *ampC* alleles in *Acinetobacter baumannii*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0176695, 1 maio 2017.

KASHYAP, S.; SHARMA, P.; CAPALASH, N. Tobramycin Stress Induced Differential Gene Expression in *Acinetobacter baumannii*. **Current Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 88, 7 fev. 2022.

KOOHI, M. V. et al. A research on existence and special activities of *Acinetobacter* in different cheese. [s.d.].

KYRIAKIDIS, I. et al. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 3, p. 373, 19 mar. 2021.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, abr. 2012.

LEE, C.-R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**,

v. 7, 13 mar. 2017.

LEE, Y. et al. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the blaOXA-66 gene. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 40, n. 1, p. 43–48, 2010.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W78–W82, 5 jul. 2024.

LI, X. et al. Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2675, 21 abr. 2022.

LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, v. 30, n. 7, p. 923–930, 1 abr. 2014.

LIMA, W. G. et al. A short synthetic peptide, based on LyeTx I from *Lycosa erythrognatha* venom, shows potential to treat pneumonia caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* without detectable resistance. **The Journal of Antibiotics**, v. 74, n. 7, p. 425–434, jul. 2021.

LIU, B. et al. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D912–D917, 30 nov. 2021.

LIU, Y. et al. Phenol biodegradation by *Acinetobacter radioresistens* APH1 and its application in soil bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 427–437, jan. 2020.

LIU, Z. et al. Biodegradation of Phenol by Bacteria Strain *Acinetobacter Calcoaceticus* PA Isolated from Phenolic Wastewater. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 3, p. 300, mar. 2016.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LU, J. et al. Spread of the florfenicol resistance floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, p. 127, 1 nov. 2018.

MALLAPRAGADA, S.; WADHWA, A.; AGRAWAL, P. Antimicrobial peptides: The miraculous biological molecules. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 21, n. 6, p. 434, dez. 2017.

MARCHAND, I. et al. Expression of the RND-Type Efflux Pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* Is Regulated by the AdeRS Two-Component System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3298–3304, set. 2004.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defence? **Biochemical Society Transactions**, v. 29, n. 4, p. 598–601, 1 ago. 2001.

MHLONGO, J. T. et al. Antimicrobial Peptide Synergies for Fighting Infectious Diseases. **Advanced Science**, v. 10, n. 26, p. 2300472, 2023.

MICHALOPOULOS, A.; FALAGAS, M. E. Treatment of *Acinetobacter* infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 11, n. 5, p. 779–788, abr. 2010.

MIGLIACCIO, A. et al. Phylogenomics of *Acinetobacter* species and analysis of antimicrobial resistance genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1264030, 19 out. 2023.

MINH, B. Q. et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 1 maio 2020.

MULESHKOVA, T. et al. **Exploring the Multifaceted Genus *Acinetobacter*: The Facts, the Concerns and the Opportunities**. Biology and Life Sciences, , 9 jul. 2024. Disponível em: <<https://www.preprints.org/manuscript/202407.0683/v1>>. Acesso em: 10 jan. 2025

NODARI, C. S. et al. Genomic Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Belonging to Major Endemic Clones in South America. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 584603, 30 nov. 2020.

NOEL, H. R.; PETREY, J. R.; PALMER, L. D. Mobile genetic elements in *Acinetobacter* antibiotic-resistance acquisition and dissemination. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1518, n. 1, p. 166–182, dez. 2022.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. Supplement_7, p. S521–S528, 13 nov. 2019.

OLIVEIRA, P. H. et al. The chromosomal organization of horizontal gene transfer in bacteria. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 841, 10 out. 2017.

PARTE, A. C. et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607–5612, 1 nov. 2020.

PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. e00088-17, out. 2018.

PÉRICHON, B. et al. Identification of 50 Class D β -Lactamases and 65 *Acinetobacter*-Derived Cephalosporinases in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 936–949, 27 jan. 2014.

RAMIREZ, M. S.; BONOMO, R. A.; TOLMASKY, M. E. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 720, 6 maio 2020.

RAMIREZ, M. S.; NIKOLAIDIS, N.; TOLMASKY, M. E. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the *aac(6')*-Ib paradigm. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 121, 17 maio 2013.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside Modifying Enzymes. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 13, n. 6, p. 151–171, dez. 2010.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 2267, 19 dez. 2017.

ROCHA, Igor Vasconcelos. Estudo de Variantes de Betalactamases ADC de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* na resistência aos betalactâmicos. 2021. 141. Tese (Doutorado em Ciências e Biotecnologia em saúde - Universidade de Recife).

ROSS, K. et al. TnCentral: a Prokaryotic Transposable Element Database and Web Portal for Transposon Analysis. **mBio**, v. 12, n. 5, p. 10.1128/mbio.02060-21, 14 set. 2021.

RUMBO, C. et al. Contribution of Efflux Pumps, Porins, and β -Lactamases to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5247–5257, nov. 2013.

RUMBO-FEAL, S. et al. Whole Transcriptome Analysis of *Acinetobacter baumannii* Assessed by RNA-Sequencing Reveals Different mRNA Expression Profiles in Biofilm Compared to Planktonic Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72968, 30 ago. 2013.

RUZIN, A.; KEENEY, D.; BRADFORD, P. A. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 1001–1004, 1 maio 2007.

SANTOS, D. M. et al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa*

erythrognatha. **Amino Acids**, v. 39, n. 1, p. 135–144, jun. 2010.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.

SIGUIER, P. et al. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Database issue, p. D32–36, 1 jan. 2006.

SIMÃO, F. A. et al. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, n. 19, p. 3210–3212, 1 out. 2015.

STEFFENS, N. A. et al. Meropenem use and therapeutic drug monitoring in clinical practice: a literature review. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 610–621, 2021.

SU, C.-C. et al. Cryo-Electron Microscopy Structure of an *Acinetobacter baumannii* Multidrug Efflux Pump. **mBio**, v. 10, n. 4, p. 10.1128/mbio.01295-19, 2 jul. 2019.

TAMBAT, R. et al. AdelJK Pump-Specific Inhibitors Effective against Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*. **ACS Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 2239–2249, 14 jun. 2024.

TATUSOVA, T. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 14, p. 6614–6624, 19 ago. 2016.

TOKUDA, M.; SHINTANI, M. Microbial evolution through horizontal gene transfer by mobile genetic elements. **Microbial Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. e14408, 2024.

TSIRIGOTAKI, A. et al. Protein export through the bacterial Sec pathway. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 21–36, jan. 2017.

UZEH, R. E.; OHENHEN, R. E.; ROJUGBOKAN, A. K. Microbiological and Nutritional Qualities of Dairy Products: Nono and Wara. 2006.

WHITTLE, E. E. et al. Efflux Impacts Intracellular Accumulation Only in Actively Growing Bacterial Cells. **mBio**, v. 12, n. 5, p. e02608-21, [s.d.].

WICK, R. R. et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. e1005595, 8 jun. 2017.

WIJERS, C. D. M. et al. Identification of Two Variants of *Acinetobacter baumannii* Strain ATCC 17978 with Distinct Genotypes and Phenotypes. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 12, p. e00454-21, [s.d.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 19 fev. 2025.

XU, C. F.; BILYA, S. R.; XU, W. adeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbes and New Infections**, v. 30, p. 100549, jul. 2019.

XUAN, J. et al. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. **Drug Resistance Updates**, v. 68, p. 100954, maio 2023.

YANG, W. et al. Current status and trends of antimicrobial resistance among clinical isolates in China: a retrospective study of CHINET from 2018 to 2022. **One Health Advances**, v. 1, n. 1, p. 8, 30 mar. 2023.

YUHAN, Y. et al. Over expression of AdeABC and AcrAB-TolC efflux systems confers tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 165–171, abr. 2016.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, jan. 2002.

ZHANEL, G. G. et al. Comparative Review of the Carbapenems: **Drugs**, v. 67, n. 7, p. 1027–1052, 2007.

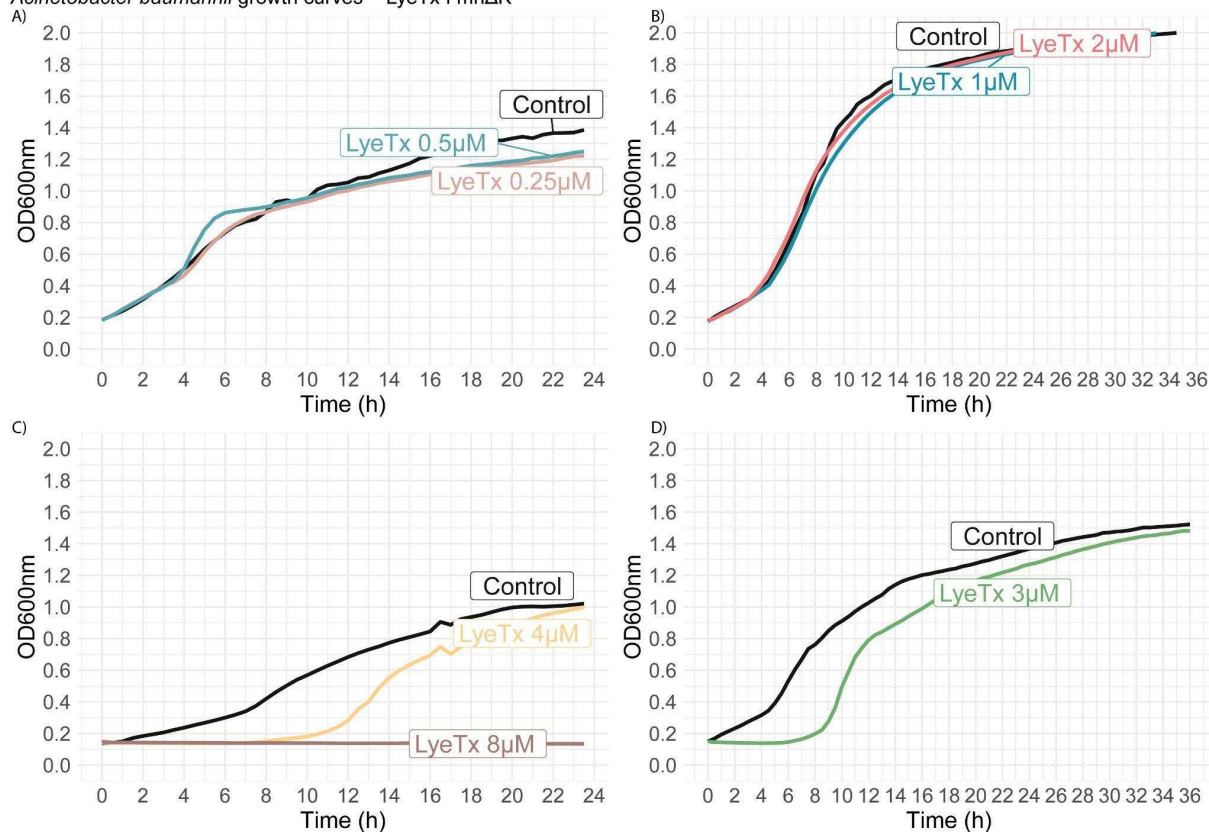
ZHANG, J. et al. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 5, p. 614–620, 1 mar. 2014.

ZHAO, W.-H.; HU, Z.-Q. *Acinetobacter*: A potential reservoir and dispenser for β -lactamases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 30–51, fev. 2012.

8. APÊNDICES

Anexo 1 - Curvas de crescimento de *Acinetobacter baumannii* AC37 tratadas em condições sub-MIC com o peptídeo LyeTx I mnΔK

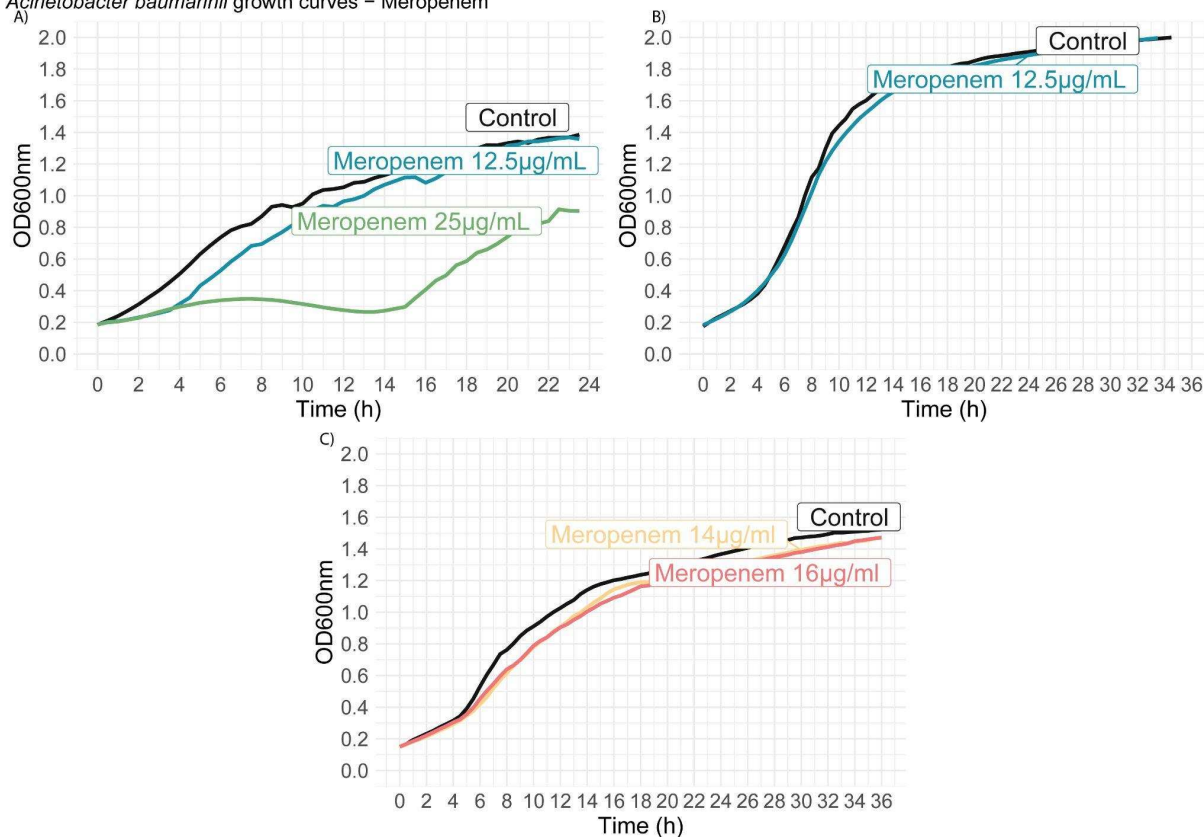
Acinetobacter baumannii growth curves – LyeTx I mnΔK



Anexo 1. Curvas de crescimento do isolado AC37 em condições sub-MIC na presença do peptídeo LyeTx I mnΔK. Experimentos realizados por colaboradores. A concentração selecionada para o cultivo e construção das bibliotecas para o sequenciamento de RNA foi de 3 μM. MIC do LyeTx I mnΔK = 4 μM.

Anexo 2 - Curvas de crescimento de *A. baumannii* AC37 tratadas em condições sub-MIC com o antibiótico Meropenem

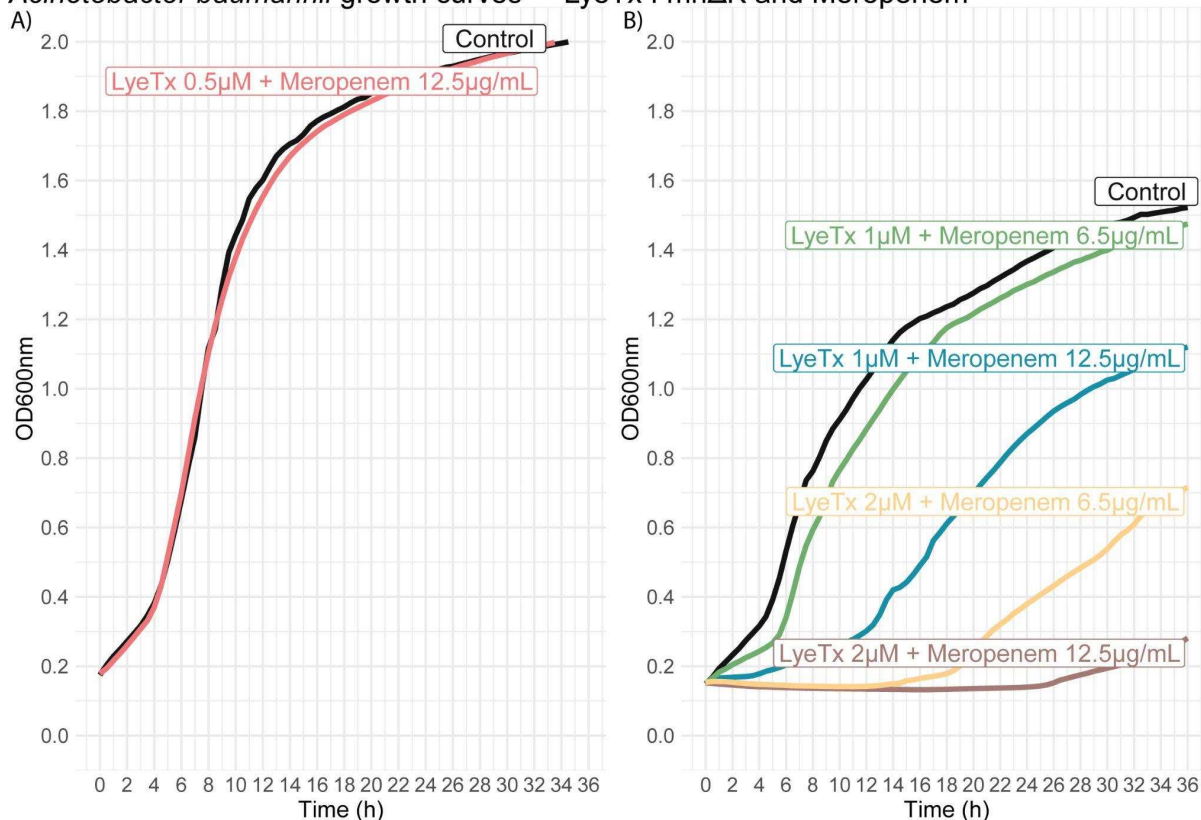
Acinetobacter baumannii growth curves – Meropenem



Anexo 2. Curvas de crescimento do isolado AC37 em condições sub-MIC na presença do antibiótico Meropenem. Experimentos realizados por colaboradores. A concentração selecionada para o cultivo e construção das bibliotecas para o sequenciamento de RNA foi de 14 µg/mL. MIC do Meropenem $\geq$ 16 µg/mL.

Anexo 3 - Curvas de crescimento de *A. baumannii* AC37 tratadas em condições sub-MIC com o peptídeo LyeTx I mnΔK em sinergismo com o antibiótico Meropenem

Acinetobacter baumannii growth curves – LyeTx I mnΔK and Meropenem



Anexo 3. Curvas de crescimento do isolado AC37 em condições sub-MIC na presença do peptídeo LyeTx i mnΔK e do antibiótico Meropenem. Experimentos realizados por colaboradores. A concentração selecionada para o cultivo e construção das bibliotecas para o sequenciamento de RNA foi de 1 μM do peptídeo e 6.5 μg/mL do Meropenem. MIC do LyeTx I mnΔK = 4 μM e MIC do Meropenem ≥ 16 μg/mL.

Anexo 4 - Principais classes de antibióticos, seus alvos e os mecanismos de resistência associados

Anexo 4 - Classes de antibióticos, com exemplos, seus alvos nas células de microrganismos e os mecanismos de resistência para o combate desses efeitos. Adaptado de: Molecular mechanism of antibiotic resistance revisited. Darby. et al., 2023

Classificação do antibiótico (com exemplos)	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
Aminoglicosídeos (Gentamicina, Estreptomicina, Canamicina)	Interação com a subunidade 30S do rRNA 16S, provocando erros na leitura e/ou formação de proteínas truncadas, levando a morte celular. Além disso, devido à sua carga positiva, esses compostos se ligam à membrana externa,	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases; metilases do rRNA 16S; mutações no gene do rRNA 16S; alterações nos

	aumentando a formação de poros e promovendo maior acúmulo intracelular	mecanismos de influxo e/ou efluxo
β -lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Cefamicinas, Carbapenêmicos, Monobactâmicos)	Tem como alvo o entrecruzamento do peptidoglicano ao inibir as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que realizam a ligação cruzada das cadeias peptídicas na parede celular, levando à lise celular	Produção de β -lactamases; modificação das proteínas ligadoras de penicilina; permeabilidade reduzida e aumento do efluxo
Estreptograminas (Dalfopristina)	Alvo na tradução de proteínas ao se ligar ao rRNA 23S da subunidade 50S no domínio peptidiltransferase, causando peptídeos truncados	Mutações no rRNA 23S; modificação das estreptograminas por acetiltransferases; efluxo para fora da célula
Fenicóis (Cloranfenicol)	Inibem a tradução ao se ligar ao sítio A da subunidade ribossomal 50S, bloqueando a síntese proteica	Mutações no rRNA 23S da subunidade ribossomal 50S; inativação enzimática por acetiltransferases e efluxo
Glicopeptídeos (Vancomicina)	Inibem o entrecruzamento e, conseqüentemente, a síntese de peptidoglicano ao se ligarem ao D-alanil-D-alanina na cadeia peptídica	Resistência intrínseca em bactérias Gram-negativas devido à membrana externa impermeável; em células Gram-positivas, enzimas podem modificar e hidrolisar precursores do peptidoglicano; fenótipo de suscetibilidade intermediária conferido por mutações que levam ao espessamento da membrana e baixa permeabilidade
Lincosamidas (Clindamicina)	Alvo na tradução de proteínas, especificamente no rRNA 23S da subunidade 50S, causando cadeias peptídicas truncadas	Metiltransferases que modificam o rRNA; expressão de proteínas que inativam lincosamidas e efluxo
Lipopeptídeos (Daptomicina)	Inserem-se na membrana celular, causando despolarização, o que reduz a capacidade de geração de ATP e leva à morte celular	Espessamento e aumento da carga positiva na parede celular; redução da despolarização das membranas induzida por lipopeptídeos
Macrolídeos (Azitromicina, Eritromicina)	Inibem a tradução de proteínas ao atingir o rRNA 23S da subunidade ribossomal 50S, causando cadeias peptídicas truncadas	Metiltransferases de rRNA, que metilam o rRNA 23S; mutações no ribossomo; efluxo; fosfotransferases e esterases de macrolídeos; proteção ribossomal mediada por proteínas da família ABC-F
Oxazolidinonas (linezolida)	Limitam a tradução ao se ligar ao rRNA 23S da subunidade 50S, impedindo a formação de	Modificações do rRNA 23S, por exemplo, por metiltransferases; proteção do ribossomo

	uma subunidade funcional 70S	mediada por proteínas da família ABC-F
Peptídeos catiônicos (Colistina)	Ligam-se ao lipídeo A no lipopolissacarídeo, permeabilizando a membrana externa e causando morte celular	Modificação ou remoção do lipídeo A
Pirimidinas (Trimetoprima)	Afetam o metabolismo do C1 e síntese de folato ao inibir a diidrofolato redutase, bloqueando a produção de tetraidrofolato	Modificação ou aquisição de novos genes de diidrofolato redutase e efluxo de trimetoprima
Quinolonas e Fluoroquinolonas (Ciprofloxacino)	Inibem a replicação do DNA pela DNA girase e topoisomerase IV, que estão envolvidas no superenrolamento do DNA, corte das fitas e religação	Mutações na DNA girase ou na topoisomerase IV; efluxo de quinolonas ou proteínas que protegem a DNA girase e topoisomerase IV
Rifamicinas (Rifampicina)	Inibem a transcrição, especificamente a síntese de DNA dependente de DNA, ao se ligarem à RNA polimerase	Mutações no alvo do medicamento, rpoB; ribosilação enzimática ou inativação da rifampicina
Sulfonamidas (Sulfametizol)	Impedem a síntese do ácido diidrofolato ao inibir a diidropteroato sintase, interrompendo o crescimento celular	Mutações no gene da diidropteroato sintase e nos genes sul1 e sul2, que codificam diidropteroato sintases distintas, menos suscetíveis às sulfonamidas
Tetraciclinas (Tigeciclina, Tetraciclina)	Inibem a tradução ao se ligarem ao rRNA 16S da subunidade 30S, impedindo a ligação do tRNA ao sítio A da subunidade 30S	Efluxo; proteção do ribossomo mediada por proteínas; mutações ribossômicas; inativação enzimática do medicamento

Apêndice 1 - Características dos genes de resistência identificados no isolado AC37

Genes de resistência e suas associações à classes e fármacos

Gene	Classe do fármaco	Antibiótico	Mecanismo de resistência
AAC(6')-Ib'	Aminoglicosídeos	Amicacina e Tobramicina	Enzima de modificação de aminoglicosídeos
AbaF	Ácido fosfônico	Fosfomicina	Bomba de efluxo
AbaQ	Fluoroquinolonas	-	Bomba de efluxo

abeM	Fluoroquinolonas, Agentes desinfetantes e Antissépticos	Espectinomicina e Estreptomicina	Bomba de efluxo
abeS	Macrolídeos e Aminocumarinos	Eritromicina e Novobiocina	Bomba de efluxo
ADC-183	Cefalosporinas	-	β -lactamase
adeA	Glicilciclinas e Tetraciclinas	Tigeciclina e Tetraciclina	Bomba de efluxo
adeB	Glicilciclinas e Tetraciclinas	Tigeciclina e Tetraciclina	Bomba de efluxo
adeC	Glicilciclinas e Tetraciclinas	Tigeciclina e Tetraciclina	Bomba de efluxo
adeF	Fluoroquinolonas e Tetraciclinas	Tetraciclina	Bomba de efluxo
adeG	Fluoroquinolonas e Tetraciclinas	Tetraciclina	Bomba de efluxo
adeH	Fluoroquinolonas e Tetraciclinas	Tetraciclina	Bomba de efluxo
adel	Macrolídeos, Fluoroquinolonas, Lincosamida, Carbapenêmicos, Cefalosporinas, Tetraciclinas, Rifamicina, Diaminopirimidinas e Fenicóis	Tetraciclina, Rifampicina, Imipenem, Trimetoprima, Cloranfenicol e Ticarcilina	Bomba de efluxo
adeJ	Macrolídeos, Fluoroquinolonas, Lincosamida, Carbapenêmicos, Cefalosporinas, Tetraciclinas, Rifamicina, Diaminopirimidinas e Fenicóis	Tetraciclina, Rifampicina, Imipenem, Trimetoprima, Cloranfenicol e Ticarcilina	Bomba de efluxo
adeK	Macrolídeos, Fluoroquinolonas, Lincosamida, Carbapenêmicos, Cefalosporinas, Tetraciclinas, Rifamicina, Diaminopirimidinas e Fenicóis	Tetraciclina, Rifampicina, Imipenem, Trimetoprima, Cloranfenicol e Ticarcilina	Bomba de efluxo

adeL	Fluoroquinolonas e Tetraciclina	Tetraciclina	Regulador de adeFGH
adeN	Macrolídeos, Fluoroquinolonas, Lincosamida, Carbapenêmicos, Cefalosporinas, Tetraciclina, Rifamicina, Diaminopirimidinas e Fenicóis	Tetraciclina, Rifampicina, Imipenem, Trimetoprima, Cloranfenicol e Ticarcilina	Regulador de adeJK
adeR	Glicilciclina e Tetraciclina	Tigeciclina e Tetraciclina	Regulador de adeABC
adeS	Glicilciclina e Tetraciclina	Tigeciclina e Tetraciclina	Regulador de adeABC
AmvA	Macrolídeos, Agentes desinfetantes e Antissépticos	Eritromicina e Acriflavina	Bomba de efluxo
ANT(3'')-Ilc	Aminoglicosídeos	Espectinomicina e Estreptomicina	Enzima de modificação de aminoglicosídeos
APH(3'')-Ib	Aminoglicosídeos	Estreptomicina	Enzima de modificação de aminoglicosídeos
APH(6)-id	Aminoglicosídeos	Estreptomicina	Enzima de modificação de aminoglicosídeos
floR	Fenicóis	Cloranfenicol e Florfenicol	Bomba de efluxo
gyrA	Fluoroquinolonas	Enoxacina, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Moxifloxacino, Gatifloxacino, Lomefloxacino, Ácido Nalidíxico, Norfloxacino, Ofloxacino, Trovafloxacina, Grepafloxacina, Esparfloxacina e Pefloxacina	Mudança estrutural na DNA girase
LpsB	Peptídeos	Colistina A, Colistina B e Defensinas	Mutação em proteínas constituintes da membrana externa
OXA-23	Carbapenêmicos, Cefalosporinas	Cloxacilina, Oxacilina e Cefalotina	β -lactamase
OXA-63	Carbapenêmicos, Cefalosporinas	Cloxacilina, Oxacilina e Cefalotina	β -lactamase
parC	Fluoroquinolonas	Enoxacina, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Moxifloxacino, Gatifloxacino, Lomefloxacino, Ácido Nalidíxico, Norfloxacino, Ofloxacino,	Mudança estrutural na Topoisomerase IV

		Trovafloxacin, Grepafloxacin, Esparfloxacin e Pefloxacin	
rsmA	Fluoroquinolonas, Diaminopirimidinas e Fenicóis	Trimetoprima e Cloranfenicol	Bomba de efluxo
sul2	Sulfonamidas	Sulfadiazina, Sulfadimidina, Sulfametoxazol, Sulfisoxazol, Sulfacetamida, Mafenida, Sulfasalazina e Sulfametizol	

Apêndice 2 - Porcentagem da contagem de genes utilizando o FeatureCounts

Proporção de leituras anotadas a genes utilizando o FeatureCounts.

Biblioteca	Número de <i>reads</i> (por biblioteca)	Número de <i>reads</i> anotadas com FeatureCounts	Porcentagem de <i>reads</i> anotadas com FeatureCounts
Controle 1	12.375.534	11.682.235	94.4%
Controle 2	12.060.986	11.438.249	94.8%
Controle 3	10.444.960	9.867.758	94.5%
LyeTx I Δ mnK 1	18.570.900	17.417.170	93.8%
LyeTx I Δ mnK 2	17.735.088	16.733.839	94.4%
LyeTx I Δ mnK 3	14.040.594	12.240.785	94.3%
Meropenem 1	11.843.848	11.216.200	94.7%
Meropenem 2	13.900.774	13.193.696	94.9%
Meropenem 3	12.842.324	12.167.094	94.7%
LyeTx I Δ mnK + Meropenem 1	12.123.758	12.443.310	94.8%
LyeTx I Δ mnK + Meropenem 2	12.316.888	11.652.932	94.6%
LyeTx I Δ mnK + Meropenem 3	13.702.028	12.912.690	94.2%

Apêndice 3 - Proporção da variância explicada por cada componente principal no PCA

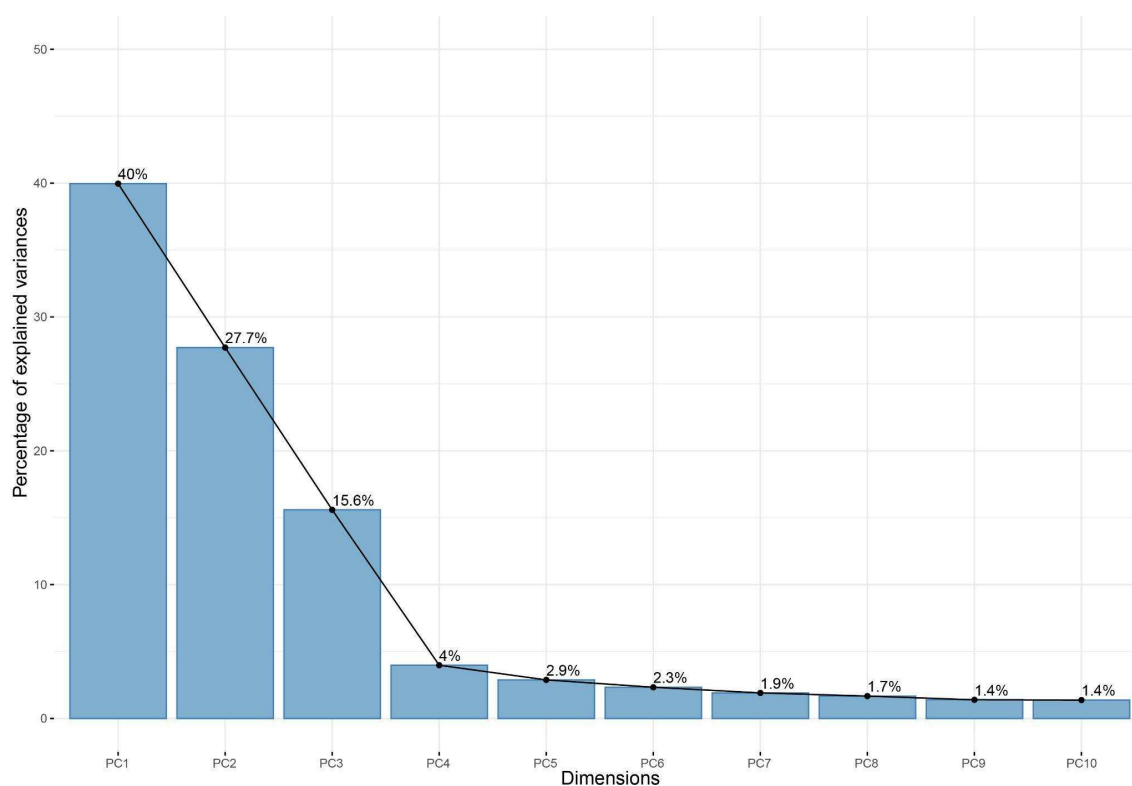


Gráfico Scree representando a porcentagem variância explicada por cada componente principal (PC). PC1, PC2 e PC3 explicam 83.3% da variância.

Apêndice 4 - Mapeamento dos genomas de *A. baumannii* disponíveis no KEGG

Média das porcentagens de mapeamento nos genomas de *A. baumannii* disponíveis na interface web do KEGG. Bibliotecas de RNA-Seq Controle e tratadas com o peptídeo LyeTx I mnΔK, Meropenem e o sinergismo. Em negrito o genoma de referência selecionado.

Linhagem	Média da % mapeamento Controle	Média da % mapeamento LyeTx I mnΔK	Média da % mapeamento Meropenem	Média da % mapeamento Sinergismo
1656-2	93.38%	94.06%	93.11%	92.26%
AB0057	96.91%	97.13%	96.77%	96.06%
AB030	93.59%	94.49%	93.32%	92.76%
AB031	92.49%	93.62%	92.3%	91.48%
AB307-0294	96.28%	96.69%	96.15%	95.64%
AbH12O-A2	93.02%	93.96%	92.73%	92.06%
AC29	93.4%	94.21%	93.06%	92.47%
ACICU (v2008)	93.44%	94.09%	93.2%	92.25%

ACICU (v2021)	93.54%	94.23%	93.3%	92.37%
ATCC 17978 (v2014)	92.34%	93.3%	91.84%	91.5%
ATCC 17978 (v2022)	92.63%	93.51%	92.37%	91.6%
AYE	96.6%	97.1%	96.8%	96.25%
BJAB07104	94.44%	94.81%	93.51%	92.92%
BJAB0715	92.88%	93.83%	92.59%	91.69%
BJA0868	93.85%	94.8%	93.44%	93.04%
D1279779	92.04%	92.87%	91.77%	90.93%
LAC-4	91.96%	92.85%	91.66%	90.83%
MDR-TJ	93.8%	94.77%	93.55%	92.91%
MDR-ZJ06	93.81%	94.57%	92.88%	92.82%
SDF	86.74%	90.1%	82.26%	86.94%
TCDC-AB0715	93.84%	94.59%	93.54%	92.94%
TYTH-1	92.53%	93.46%	92.24%	91.47%
ZW85-1	93.49%	93.31%	92.25%	91.15%

Apêndice 5 - Porcentagem de mapeamento das bibliotecas de *A. baumannii* tratadas com Meropenem obtidas no SRA no genoma do isolado AC37

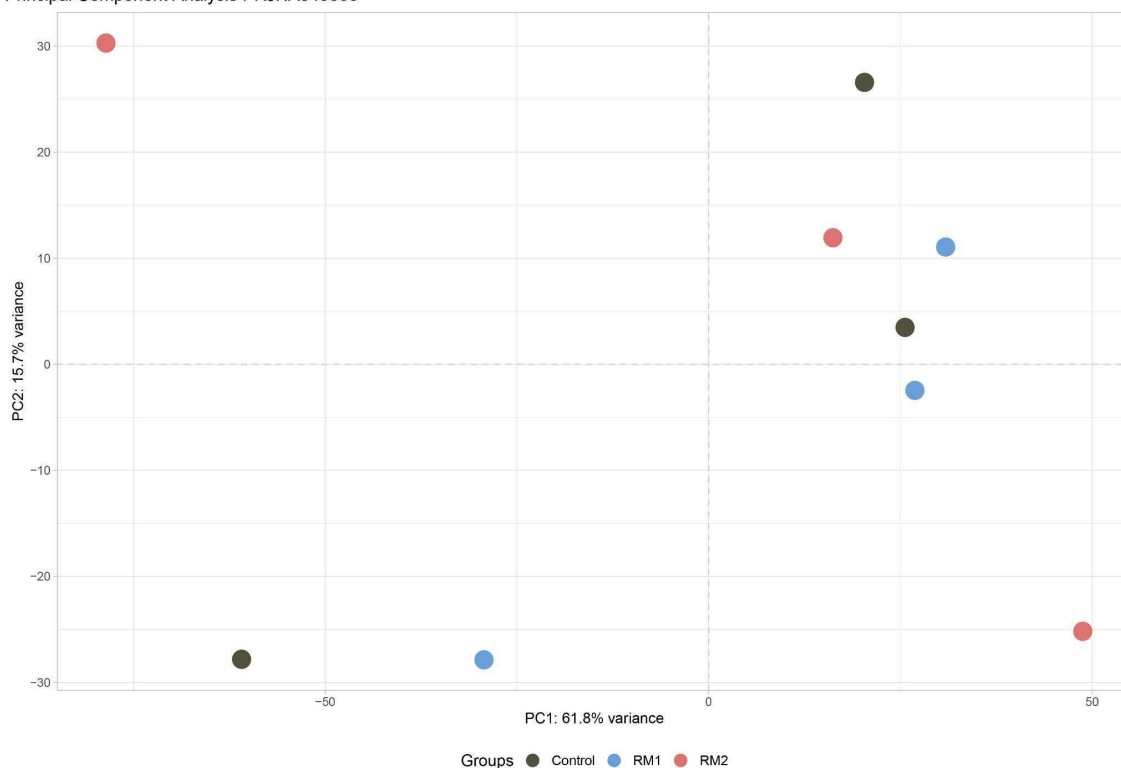
Porcentagem de mapeamento (Bowtie2) e contagem de genes (FeatureCounts) das bibliotecas dos estudos PRJNA548006 e PRJNA787205 no genoma de AC37.

	Biblioteca	Número de reads (por biblioteca)	Porcentagem de mapeamento com Bowtie2	Porcentagem de reads anotadas com FeatureCounts
PRJNA548006	Controle 1	11.422.798	91.37%	90.3%
	Controle 2	10.363.437	93.12%	92.9%
	Controle 3	10.646.498	92.28%	92.1%
	RM1 1	9.937.126	92.14%	91.3%
	RM1 2	12.164.897	94.33%	94.0%
	RM2 3	10.243.176	93.35%	93.2%
	RM2 1	11.616.357	89.63%	88.6%
	RM2 2	10.139.713	95.81%	95.4%

	RM2 3	11.164.327	93.99%	93.7%
PRJNA787205	Controle 30min 1	14.786.683	94.38%	90.6%
	Controle 30min 2	14.133.564	94.02%	90.2%
	Controle 30min 3	13.189.954	94.43%	90.5%
	30 minutos 1	12.036.742	94.12%	90.2%
	30 minutos 2	11.494.806	94.35%	90.4%
	30 minutos 3	15.410.606	94.11%	90.4%
	Controle 3 horas 1	13.782.073	92.56%	88.5%
	Controle 3 horas 2	14.608.683	92.36%	88.4%
	Controle 3 horas 3	13.525.567	92.83%	88.8%
	3 horas 1	13.141.836	93.10%	89.0%
	3 horas 2	13.670.564	93.14%	89.1%
	3 horas 3	15.852.629	92.96%	88.7%
	Controle 9 horas 1	11.547.198	92.41%	89.1%
	Controle 9 horas 2	11.594.663	91.63%	88.3%
	Controle 9 horas 3	14.931.303	92.09%	88.6%
	9 horas 1	12.334.733	94.07%	90.8%
	9 horas 2	10.637.435	94.35%	91.0%
	9 horas 3	10.462.001	93.71%	90.3%

Apêndice 6 - PCAs bibliotecas públicas de *A. baumannii* tratadas com Meropenem baixadas no SRA

Principal Component Analysis PRJNA548006



Análise de componente principal do estudo PRJNA548006. PC1 e PC2 explicam 77.5% da variância. Círculos pretos, azuis e vermelhos representam as replicatas Controle, mutante RM1 e mutante RM2, respectivamente.

Scree plot PRJNA548006

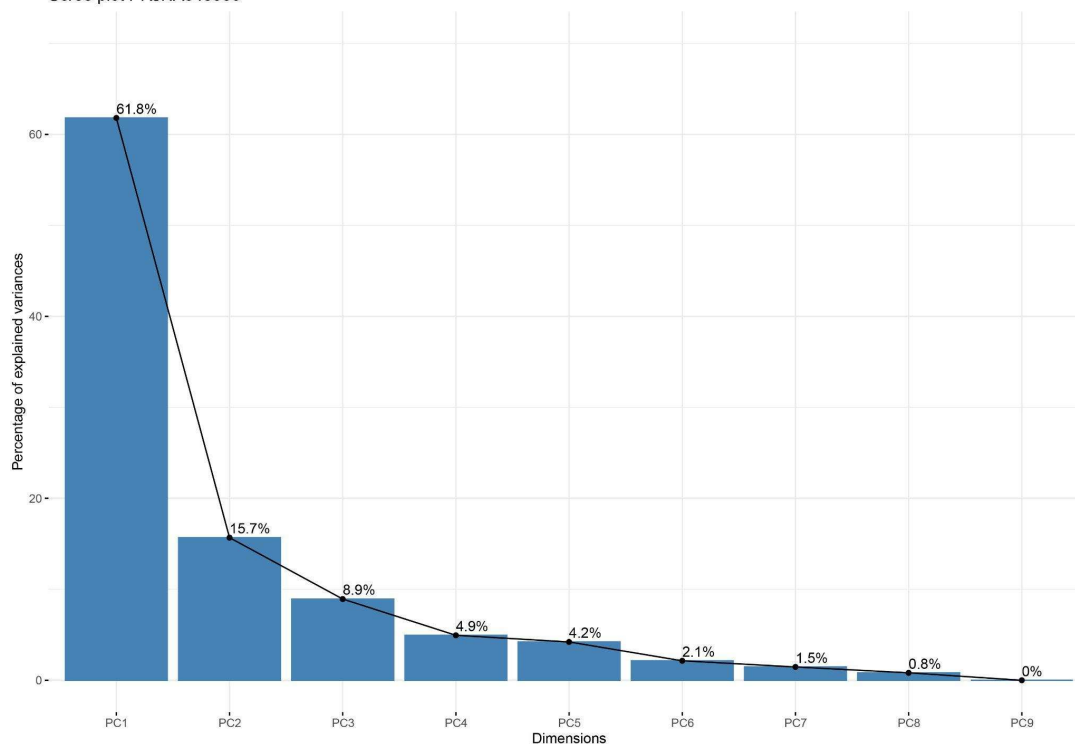
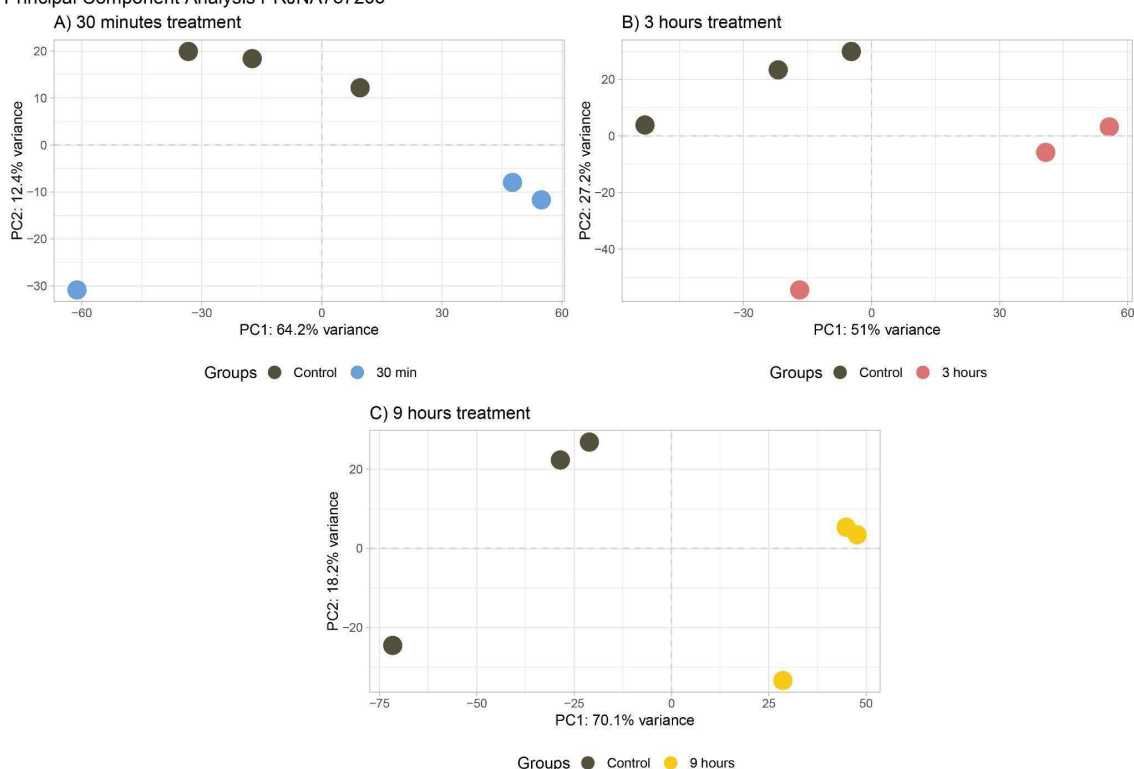


Gráfico Scree representando a porcentagem variância explicada por cada componente principal (PC) no projeto PRJNA548006 . PC1, PC2 e PC3 explicam 86.4% da variância.

Principal Component Analysis PRJNA787205



Análise de componente principal do estudo PRJNA787205. Painei (A), tratamento com Meropenem durante 30min; Painei (B), tratamento por 3 horas e Painei (C) tratamento durante 9 horas. Círculos pretos, azuis, vermelhos e amarelos representam os tratamentos durante 30 minutos, 3 horas e 9 horas, respectivamente.

Scree Plot PRJNA787205

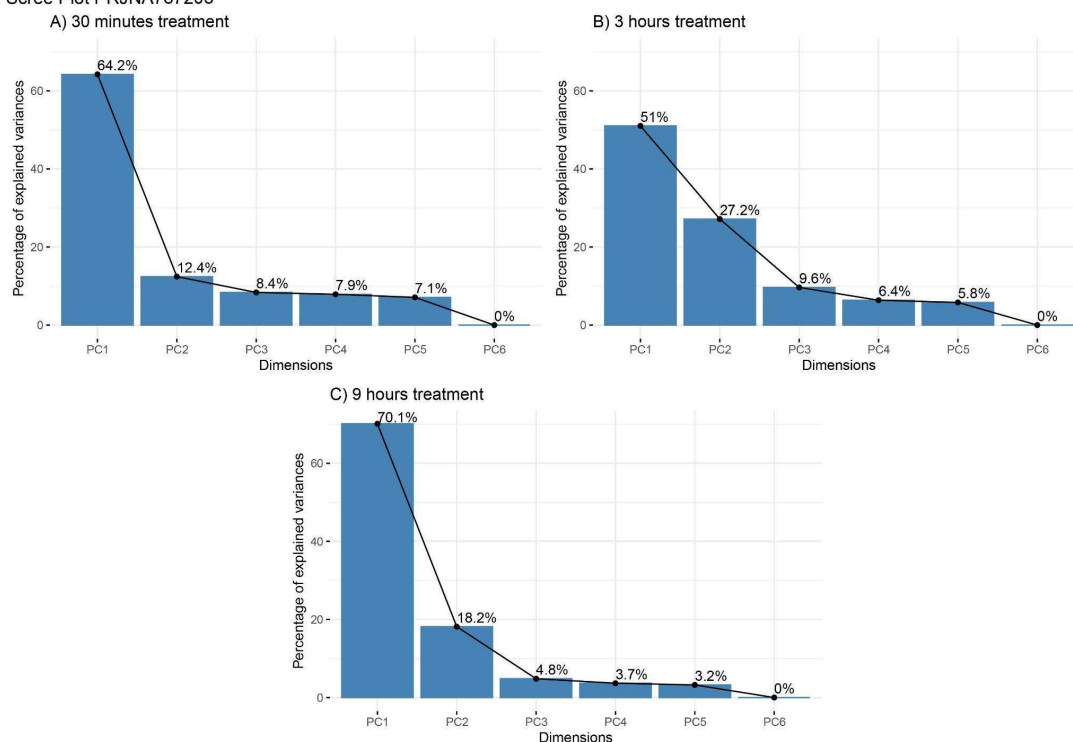


Gráfico Scree representando as porcentagens variância explicada por cada componente principal (PC) em cada tratamento no estudo PRJNA787205.

Apêndice 7 - Porcentagem de mapeamento das bibliotecas *A. baumannii* tratadas com Meropenem obtidas no SRA no genoma AB0057 para as análises de enriquecimento funcional

Tabela X - Porcentagem de mapeamento (Bowtie2) e contagem de genes (FeatureCounts) das bibliotecas do estudo PRJNA548006 no genoma de AC37.

	Biblioteca	Porcentagem de mapeamento com Bowtie2	Porcentagem de reads anotadas com FeatureCounts
PRJNA548006	Controle 1	92.58%	91.0%
	Controle 2	93.53%	93.2%
	Controle 3	92.71%	92.5%
	RM1 1	92.33%	92.0%
	RM1 2	94.65%	94.3%
	RM2 3	93.65%	93.4%
	RM2 1	90.98%	89.6%
	RM2 2	96.04%	95.6%
	RM2 3	94.32%	93.9%
PRJNA787205	Controle 30min 1	93.97%	90.8%
	Controle 30min 2	94.63%	90.4%
	Controle 30min 3	95.06%	90.8%
	30 minutos 1	94.78%	90.4%
	30 minutos 2	94.97%	90.6%
	30 minutos 3	94.71%	90.7%
	Controle 3 horas 1	93.29%	88.9%
	Controle 3 horas 2	93.08%	88.7%
	Controle 3 horas 3	93.59%	89.1%
	3 horas 1	93.83%	89.3%
	3 horas 2	93.79%	89.4%
	3 horas 3	93.69%	89.1%

	Controle 9 horas 1	93.12%	89.5%
	Controle 9 horas 2	92.37%	88.7%
	Controle 9 horas 3	92.86%	89.1%
	9 horas 1	94.69%	91.2%
	9 horas 2	94.96%	91.4%
	9 horas 3	94.32%	90.7%