

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

**Efeito de concentração sub-inibitória de piperacilina-tazobactam na
morfologia e fisiologia de *Escherichia coli***

João Paulo Lopes de Andrade

Belo Horizonte
2010

João Paulo Lopes de Andrade

5

Efeito de concentração sub-inibitória de piperacilina-tazobactam na morfologia e fisiologia de *Escherichia coli*

10

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

15

Orientadora:

Prof^a. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

20

Universidade Federal de Minas Gerais
Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG

Co-orientadores:

Prof. Luiz de Macêdo Farias

25

Universidade Federal de Minas Gerais
Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG

Prof^a. Kênia Valéria dos Santos

Universidade Vale do Rio Doce
Faculdade e Ciências da Saúde

30

Prof. Oscar Bruña-Romero

Universidade Federal de Minas Gerais
Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG

35

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2010

Colaboradores

Prof^a. Danielle da Glória de Souza

Universidade Federal de Minas Gerais

5 Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG

Prof^a. Elizabeth Ribeiro da Silva

Universidade Federal de Minas Gerais

10 Departamento de Morfologia – ICB/UFMG

15

20

25

30

35

5

10

15

20

25

30

A todos aqueles que, com seu exemplo, fizeram-me crescer como pessoa: meus amigos e colegas, meus familiares e professores. Em especial à minha querida mãe, exemplo de ser humano, que mesmo não estando mais presente fisicamente, estará eternamente presente em minha mente e em meu coração.

AGRADECIMENTOS

- À minha família, mesmo em muitos momentos eu estando ausente, vocês sempre foram a base em minha vida e uma fonte inesgotável de incentivo. Obrigada pai, por te possibilitado a realização de mais essa etapa.
5
- À Dodora e ao Luiz, por terem me acolhido em seu laboratório e terem me dado a oportunidade de conhecer um pouquinho mais do ‘mundo microbiológico’. Obrigada por terem possibilitado a realização do presente trabalho.
10
- À Kênia, sempre calma, prestativa e ‘de bem’ com tudo e com todos, por ter me apresentado o fascinante ‘mundo dos antibióticos’ e sua relação com as bactérias.
15
- À Carol Valeff e Morgana, que além colegas de sala, amigas e companheiras de quarto e de Congresso, terem sido minhas ‘guias’ até o MOA.
- Ao Sérgio e a Luzia, sempre sorridentes, bem humorados e com uma enorme disposição em ajudar. O que seria de nossos experimentos sem vocês. Este trabalho também é muito de vocês. Muito obrigado!
20
- Ao professor Oscar, por ter sido fundamental no início e delineamento do presente trabalho.
25
- À professora Danielle, pelo carinho, pela presteza e pelas palavras sempre sábias. Apesar do pouco tempo de convivência aprendi muito com você e com sua equipe.
- Aos professores Antônio César e Tarcisio Campos pelos ensinamentos que ainda carrego comigo desde a Iniciação Científica, em outras áreas que não da Microbiologia.
30

- À Simone Cristina, amiga, colega de mestrado, minha 'tutora' na época da Iniciação Científica e também conselheira nas horas vagas, principalmente nos cálculos matemáticos. Sim Simone, vencemos essa batalha!

- 5 • Ao Luciano, amigo e companheiro de laboratório. Meu braço direito nos experimentos com animais e nos géis bidimensionais. Sem sua ajuda, certamente não teria conseguido vencer essas etapas.

- 10 • Ao João Fernando, pela ajuda durante o mestrado, pela paciência comigo e com os experimentos, mesmo nos momentos de maior desgaste físico, mental e emocional.

- 15 • À Renata (Ingris) pela amizade, pelas conversas, pelos ensinamentos e, é claro, pelos materiais preparados e autoclavados, pelos meios de cultura, pelos Grams e pelos diversos momentos de gargalhada. É Renata, só não vale enlouquecer antes do término do seu mestrado heim!

- 20 • Ao Augusto pelos conselhos e pelas palavras intermináveis e incansáveis de incentivo e apoio, mesmo quando a vontade era de desistir.

- 25 • Ao pessoal do MOA: Simone Gonçalves (hoje professora Simone), Cris Dutra, Érika, Jaqueline, Patrícia, Mireille, Janir, Jamil, Diego, Rafa Mangerotti, pelo companheirismo e amizade, pelas palavras de apoio, pela torcida e ajuda. Mesmo que tenha sido sem a percepção de vocês, vocês de alguma forma ajudaram muito.

- 30 • Ao pessoal do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (laboratório irmão), sempre ajudando a todos nos do MOA com muita presteza e bom humor.

- Ao pessoal 'das antigas' do MOA: Paty Rangel, Luana, Renato, Carol Vieira, Carol Apolônio, Renata Barreto, Rodrigo, Gaby, Simone Queiroz, Jane, Natália e Rafa Castro. Obrigado pelo carinho, pela amizade e pela torcida.

- Aos amigos-irmãos Wally e Soró. Obrigado pela nossa amizade verdadeira durante todos esses anos.

- 5 • Aos amigos do curso de Biologia da PUC e da UFMG: Minhoca, Chico, Kajuru, Cá, Perillo, Bárbs, Ji, Gigante, Manjuba, Toshiba, Bruninha, Fêfs, Laurinha, Bruno, Giaco, Didi, Marina Beirão, Santana, Capita, Lelê, Russo, Fernandinha e Pimentinha. Obrigado pelo companheirismo, tanto nos bons momentos quanto nos ruins. Obrigado pelas festas, pelos butecos, obrigado pela oportunidade de fazê-los parte da minha vida e permitir que eu fizesse da de vocês.

- 10 • À Tati, pela amizade, companheirismo, persistência e, principalmente, pelo carinho e compreensão mesmo nos momentos mais difíceis.

- 15 • À galerinha mais bacana de todos os mestrados de todos os tempos, especialmente à Naty, com seu jeito de ‘minininha’, sempre frágil e doce; à Fê Piló com sua meiguice e sua espontaneidade que nós ‘mata’ de rir; à Raquel sempre cominucativa, animada e festeira; à Renata, muita alegre, engraçada e companheira de ‘golo’ (espero que nossa amizade aumente cada vez mais); ao Adriano, com suas aparições inesperadas, mas sempre salvadoras; ao Milan, 20 Rafa Pezzutti e Sérgio, pessoas muito bacanas, de fácil diálogo e cuja amizade quero manter para sempre.

- 25 • Aos amigos doutorandos: Lú, pelos conselhos, ajuda e momentos de muita risada; Estefânia pela alegria, companheira de festinhas do departamento; e a Tássia, por toda ajuda, solicitude e presença constante em momentos de confraternização (você deve ter cansado de ver minha cara nesses dois anos, principalmente nos últimos meses de tanto eu ter ido atrás de você pedir coisas emprestadas).

- 30 • Ao pessoal da equipe da professora Danielle, sempre prestativos e bem humorados, especialmente a Andréia e a Irla, e mais especialmente ainda a Vivian. Sempre sorridente, educada, prestativa e bem humorada, mesmo contando células comigo beirando madrugada adentro.

- À Suzy por ter sido a salvação dos meus experimentos de biofilme.
- Ao professor Ary, pelo auxílio na obtenção das fotos de microscopia óptica.
- 5 • Ao pessoal da secretária de Pós-graduação, sempre tentando ajudar com muita educação mesmo em momentos tensos.
- À CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFMG pelos auxílios financeiros concedidos para a realização deste trabalho.

10

15

20

25

30

5

10

15

20

25

30

*A verdadeira viagem do descobrimento
não consiste em buscar novas paisagens,
mas em ter novos olhos.*

Marcel Proust

RESUMO

E. coli é um dos habitantes mais comuns do trato intestinal e, embora não seja necessariamente patogênica, é a bactéria anaeróbia facultativa mais frequentemente isolada de infecções intra-abdominais. A combinação piperacilina-tazobactam (PTZ) está entre as drogas antimicrobianas que podem ser usadas para o tratamento de infecções polimicrobianas, na qual *E. coli* está frequentemente envolvida. Durante a terapia antimicrobiana, concentrações inibitórias das drogas utilizadas são, sempre, seguidas por concentrações sub-inibitórias. Já foi demonstrado que drogas em sub-CIM (concentrações abaixo da concentração inibitória mínima) influenciam nas características fenotípicas de bactérias, com destaque para a indução de células filamentosas, cujo grau de agressividade não é consensual. Neste trabalho, avaliou-se o efeito de metade da concentração inibitória mínima de PTZ (0,5 x CIM de PTZ) na morfologia e na fisiologia de *E. coli*. Para tal, a bactéria utilizada nos testes foi crescida em tempo determinado em meio de cultura com 0,5 x CIM de PTZ (células filamentosas) e, também, em meio sem antimicrobiano. As células tratadas com PTZ apresentaram uma CIM maior que as não tratadas; porém, a concentração bactericida mínima (CBM) encontrada foi menor. O crescimento de *E. coli* em meio contendo antibiótico, evidenciou alterações na morfologia bacteriana. As células alteradas não apresentaram diferenças em características bioquímicas em relação às não alteradas, mesmo quando estas foram testadas em meio teste contendo 0,5 x CIM de PTZ. O crescimento da bactéria em presença de 0,5 x CIM de PTZ alterou o padrão de crescimento de *E. coli*, diminuindo sua densidade populacional final, ou atrasando o início e/ou final da fase exponencial de crescimento. Em comparação com as células cultivadas na ausência de drogas, a bactéria na forma filamentosa expressou menor capacidade de formação de biofilme, motilidade e hidrofobicidade celular, e maior sensibilidade ao estresse oxidativo. Finalmente, o perfil de expressão de proteínas totais mostrou menor expressão protéica nas células tratadas. Quando as bactérias de morfologia normal e filamentosa foram testadas na presença de 0,5 x CIM de PTZ em alguns desses testes, as alterações foram ainda mais significativas. O desafio de animais experimentais com as células tratadas com

0,5 x CIM de PTZ mostrou que estas são, aparentemente, menos agressivas que as não tratadas, o que é coerente com os demais dados deste trabalho.

Palavras-chave: *E. coli*, piperacilina-tazobactam, alteração morfológica e virulência.

5

10

15

20

25

30

ABSTRACT

E. coli is one of the most common inhabitants of the intestinal tract and, although it is not necessarily pathogenic, it is a facultative anaerobic bacterium that is most frequently isolated from intra-abdominal infections. The combination of piperacillin-tazobactam (PTZ) is among the antimicrobial drugs that can be used for the treatment of polymicrobial infections in which *E. coli* is often involved. During antimicrobial therapy, inhibitory concentrations of drugs used are always followed by sub-inhibitory concentrations. It has been shown that drugs in sub-MIC (concentrations below the minimum inhibitory concentration) influence the phenotypic properties of bacteria, especially the induction of filamentous cells, whose degree of aggressiveness is not consensual. In this work, we evaluated the effect of half minimum inhibitory concentration of PTZ (0.5 x MIC of PTZ) on the morphology and physiology of *E. coli*. For this purpose, the bacteria used in the tests were grown for determined time in medium with 0.5 x MIC of PTZ (filamentous cells) and also in medium without antibiotic. The cells that were treated with PTZ showed a greater MIC compared to the ones that were not treated; however, the minimum bactericidal concentration (MBC) found was lower. The growth of *E. coli* in medium containing antibiotic showed changes in bacterial morphology. The altered cells did not show differences in biochemical characteristics in relation to untreated ones, even when they were tested in the test medium containing 0.5 x MIC of PTZ. The presence of 0.5 x MIC of PTZ changed the growth pattern of *E. coli*, decreasing its final population density, or delaying the beginning and/or the end of the exponential growth phase. Compared with cells grown in the absence of drugs, the bacteria in filamentous form expressed lower ability to form biofilm, motility and cell surface hydrophobicity, and increased sensitivity to oxidative stress. Finally, the expression profile of total proteins showed lower protein expression in treated cells. When normal and filamentous bacteria were tested in the presence of 0.5 x MIC of PTZ in some of these tests, the changes were even more significant. Challenging experimental animals with cells treated with 0.5 x CIM PTZ showed that they are apparently less aggressive than those not treated, which is consistent with the other data in this study.

Keywords: *E. coli*, piperacillin-tazobactam, morphological changes and virulence.

5

10

15

20

25