

**Keyla Caroline de Almeida**

**Análise proteômica e transcriptômica  
comparativa de *E. coli* resistente e susceptível ao  
peptídeo antimicrobiano magainina I**

**Brasília-DF, 2013**



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Keyla Caroline de Almeida**

**Análise proteômica e transcriptômica  
comparativa de *E. coli* resistente e susceptível ao  
peptídeo antimicrobiano magainina I**

**Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Simoni Campos Dias**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

**Brasília-DF, 2013**

Trabalho desenvolvido no Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília, sob a orientação do Prof. Dr. Octávio Luiz Franco e co-orientação da Profa. Dra. Simoni Campos Dias. Este trabalho teve o apoio financeiro do CNPq.

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Deus, fonte de força e sabedoria; À minha mamãe, sempre exemplo de dedicação, doação e companheirismo; Ao meu amor, sinônimo de muito, muito amor e carinho e à minha amada família, suporte em todos os momentos, ombros para chorar e braços para abraçar. Vocês sabem como foram importantes nessa caminhada e por isso o meu trabalho tem um pedacinho de cada um de vocês.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela superação de todos os momentos difíceis.

Ao meu amor, muito obrigada pelo seu companheirismo, por sua dedicação, paciência e carinho. Por acreditar quando tive dúvidas, por me encorajar quando estava cansada, por ser tão prestativo e principalmente pela sua cumplicidade sempre. NEOQEAV!

À minha querida mamãe, obrigada por todas as horas de preocupação e orações, por ser tão dedicada e pelo amor incondicional. Obrigada por sempre encurtar as distâncias e ser tão presente em minha vida. A senhora é muito importante para mim. Eu te amo muito!

Ao meu papai, apesar de não ter sua presença física, sei que espiritualmente sempre está comigo.

Às minhas irmãs queridas, por toda a dedicação, pelos momentos super divertidos e ainda por todo o apoio. Amo muito vocês!

Aos meus filhos do coração, Layslly, Ysabella, Pedro Henrique, Laura, Maria Fernanda e Maria Antônia. Obrigada por tornarem os meus dias muito mais divertidos e pela amizade e respeito de vocês.

Aos meus avós, como foi divertido escutar cada estória contada por vocês... Vocês têm meu eterno amor.

À Consola, ao Fernando e ao Elber por todo carinho, amor e consideração e por nos tornarmos uma única família.

Aos meus amigos e parceiros, que “fecham comigo e nunca deixam a peteca cair!”

À todos os meus amigos do laboratório por terem me acolhido tão bem e por todas as amizades que cultivei ao longo desse período.

Ao meu orientador, prof. Dr. Octávio Luiz Franco, primeiramente pela generosidade e carta branca para me receber. E depois pela orientação, amizade, amparo e confiança. Obrigada por acreditar

em mim e no meu trabalho e por abrir as portas do nosso laboratório, sempre me dizendo que iria dar tudo certo.

À minha co-orientadora, profa. Dra. Simoni Campos Dias, obrigada pela amizade sincera, apoio, confiança, por ter me recebido tão bem e ainda, por todas as idéias inspiradoras sempre. Muito obrigada!

Aos professores da banca examinadora por aceitarem nosso convite.

Enfim, obrigada a todos aqueles que acompanharam meu doutorado e que contribuíram e participaram durante esse período. Com certeza, a caminhada seria muito mais difícil sem vocês.

**“Quem sabe pode muito. Quem ama pode mais”**

Francisco Cândido Xavier.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs – Peptídeos antimicrobianos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC -*American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina trifosfato

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CAMPs – Peptídeos antimicrobianos catiônicos

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI -*Clinical and Laboratory Standards Institute*

2-DE - Eletroforese bidimensional em gel

DPS - Proteína de proteção do DNA durante privação de nutrientes

DTT – Ditioneitol

ESBLs -  $\beta$ -lactamases de espectro estendido

IRaS – Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

Glp - Glicerol-3-fosfato desidrogenase

HAIs – *Healthcare Associated Infections*

HldD – ADP-L-glicero-D-mano-heptose-6-epimerase

ITU – Infecções do trato urinário

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KOs – *KEGG Orthology codes*

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LB - Meio Luria Bertani



LPS– Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF MS - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry*.

MalM – Proteína periplasmática operon maltose

ME – Membrana externa

MI – Membrana interna

MRSA - *Staphylococcus aureus* multi-droga resistente

MSP - *Main spectrum projection dendrogram*

OD – Densidade óptica

OMP- Proteína de membrana externa

OppA – Proteína periplasmática de ligação a oligopeptídeo

PBP - *Penicillin Binding Proteins*

PBS – Tampão fosfato salina

pH - Potencial hidrogeniônico

pI - Ponto isoelétrico

PIC – Coquetel de inibidor de proteases

PS – Polissacarídeos

PSA – Persulfato de amônio

RNA-Seq – Sequenciamento de RNA de nova geração

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPM - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

UFC - Unidade formadora de colônia

UTI - Unidades de Terapia Intensiva

WHO – *World Health Organization*

XdhB - Xantina desidrogenase subunidade B

ZraP - Proteína associada à resistência ao zinco

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas e principais alvos de ação dos antibióticos que atuam na membrana bacteriana. . . . .	15
Figura 2. Modelos de mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos catiônicos baseados na interação com a membrana citoplasmática de bactérias. . . . .	27
Figura 3. Estrutura tridimensional de magainina II em solução aquosa. . . . .	30
Figura 4. Processo de seleção das colônias de <i>Escherichia coli</i> resistentes à magainina I (R1, R2 e R3). . . . .	44
Figura 5. Protocolo padronizado para obtenção das proteínas do secretoma e do lisado total bacteriano. . . . .	51
Figura 6. Espectros de massas das linhagens de <i>E. coli</i> obtidos à partir da análise por MALDI-TOF MS. . . . .	73
Figura 7. Dendrograma do tipo MSP de <i>E. coli</i> obtido a partir da análise do perfil principal dos espectros obtidos à partir da análise por MALDI-TOF MS. . . . .	75
Figura 8. Perfil de massa molecular do lisado bacteriano total das linhagens de <i>E. coli</i> resistente e susceptível à magainina I por SDS-PAGE 12%, corado por azul de Coomassie. . . . .	89
Figura 9. Distribuição das proteínas identificadas por nanoUPLC-MS <sup>E</sup> e PLGS em classes biológicas. . . . .	90
Figura 10. Distribuição das proteínas envolvidas no metabolismo bacteriano identificadas por nanoUPLC-MSE e classificadas conforme o KEGG. . . . .	91
Figura 11. Diagrama de Venn mostrando as proteínas identificadas por nanoUPLC-MS <sup>E</sup> , correlacionando-as com seu respectivo grupo controle ATCC 8739, controle susceptível à magainina I e resistente à magainina I. . . . .	92
Figura 12. Diagrama de Venn mostrando as proteínas exclusivas, compartilhadas e diferenciais identificadas por comparação entre o grupo controle susceptível à magainina I e o grupo resistente à magainina I. . . . .	93
Figura 13. Distribuição das proteínas exclusivas identificadas na linhagem resistente à magainina I por nanoUPLC-MS <sup>E</sup> . . . . .	110
Figura 14. Análise da integridade do RNA total extraído das linhagens susceptível e resistente à magainina I. . . . .	114
Figura 15. Análise de qualidade do mRNA utilizado para a construção das bibliotecas de cDNA. ....	116

Figura 16. Análise de qualidade das bibliotecas de cDNA. ....	117
Figura 17. Média da quantidade de fragmentos ( <i>reads</i> ) sequenciados e mapeados das linhagens susceptível e resistente na presença ou ausência de magainina I. ....	119
Figura 18. Distribuição em classes biológicas dos genes diferencialmente expressos nos grupos experimentais identificados por análise transcriptômica. ....	126
Figura 19. Comparação dos genes diferencialmente expressos identificados entre os grupos analisados. ....	127
Figura 20. Modelo de ação do sistema de resposta Psp em <i>E. coli</i> e <i>Y. enterocolitica</i> . . ....	132
Figura 21. Controle traducional de <i>secA</i> em resposta a atividade celular de secreção de proteínas. ...	135
Figura 22. Via metabólica de síntese de fosfolipídeos em <i>E. coli</i> . ....	140
Figura 23. Biosíntese do açúcar ADP-L,D-Hep do domínio principal do lipopolissacarídeo (LPS)....	142
Figura 24. Descrição das vias metabólicas das proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos identificados na linhagem de <i>E. coli</i> resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível na presença desse peptídeo. ....	146
Figura 25. Perfil de massa molecular do secretoma dos isolados de <i>E. coli</i> resistente e susceptível à magainina I por SDS-PAGE 12%. ....	149
Figura 26. Análise comparativa dos géis 2-DE do secretoma das linhagens de <i>E. coli</i> susceptíveis e resistentes a magainina I . ....	151

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos mais frequentes nas IRaS. ....	13
Tabela 2. Principais mecanismos de resistência antimicrobiana estudados em <i>E. coli</i> . ....	23
Tabela 3. Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) determinadas pelos sistemas VITEK 2 e MicroScan. ....	78
Tabela 4. Comparação da interpretação dos resultados obtidos para <i>Escherichia coli</i> no teste de susceptibilidade antimicrobiana aos antibióticos convencionais entre os sistemas Vitek e MicroScan. ....	80
Tabela 5. Propriedades dos peptídeos antimicrobianos catiônicos testados em <i>Escherichia coli</i> por teste de microdiluição. ....	82
Tabela 6. Concentrações inibitórias mínimas de diferentes peptídeos antimicrobianos catiônicos testados nas linhagens de <i>Escherichia coli</i> . ....	83
Tabela 7. Análise dos rendimentos protéicos das amostras biológicas de <i>Escherichia coli</i> obtidos após extração. ....	87
Tabela 8. Análise das proteínas superexpressas na linhagem de <i>Escherichia coli</i> resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível à magainina I identificadas por nanoUPLC-MS <sup>E</sup> e sua participação nos processos biológicos. ....	95
Tabela 9. Análise das proteínas subexpressas na linhagem de <i>Escherichia coli</i> resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível à magainina I identificadas por nanoUPLC-MS <sup>E</sup> e sua participação nos processos biológicos. ....	101
Tabela 10. Análise das proteínas exclusivas identificadas na linhagem de <i>Escherichia coli</i> resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível à magainina I e com a cepa ATCC 8739 por nanoUPLC-MS <sup>E</sup> e sua participação nos processos biológicos. ....	106
Tabela 11. Análise da qualidade do RNA extraído das linhagens de <i>Escherichia coli</i> susceptível e resistente à magainina I para RNA-seq. ....	113
Tabela 12. Quantidade de fragmentos obtidos no sequenciamento das linhagens de <i>Escherichia coli</i> susceptível e resistente à magainina I. ....	118
Tabela 13. Genes com expressão diferencial entre as linhagens de <i>Escherichia coli</i> susceptível e resistente à magainina I identificados por RNA-seq e participação nos processos biológicos. ....	121

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1. Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRaS) .....	11
1.2. Antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções.....	18
1.3. Resistência bacteriana aos antibióticos convencionais .....	20
1.4. Peptídeos antimicrobianos (AMPs).....	26
1.4.1. Magaininas .....	28
1.5. Resistência aos AMPs .....	33
1.6. Ômicas como estratégia de estudo da resistência bacteriana .....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. HIPÓTESE.....	41
4. OBJETIVOS .....	42
Objetivo Geral.....	42
Objetivos Específicos.....	42
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	43
5.1. Obtenção de <i>E. coli</i> resistente e susceptível à magainina I.....	43
5.2. Identificação das linhagens de <i>E. coli</i> através dos sistemas microbiológicos automatizados..	45
5.3. Identificação das linhagens de <i>E. coli</i> por MALDI-TOF MS .....	46
5.4. Análise espectrométrica através do Bruker MALDI BioTyper.....	46
5.5. Dendrograma do tipo MSP.....	47
5.6. Teste de susceptibilidade antimicrobiana através dos sistemas MicroScan e VITEK.....	47
5.7. Avaliação da susceptibilidade aos peptídeos antimicrobianos.....	48
5.8. Análises proteômicas das linhagens susceptíveis e resistentes à magainina I .....	49
5.8.1. Obtenção das amostras protéicas do lisado e do secretoma bacteriano .....	49
5.8.2. Lisado bacteriano .....	52
5.8.3. Secretoma bacteriano .....	56
5.9. Análise transcriptômica das linhagens susceptível e resistente à magainina I.....	58
5.9.1. Extração de RNA total .....	58
5.9.2. Remoção de RNA ribossomal.....	60
5.9.3. Análise de integridade do mRNA extraído .....	62

5.9.4.	Construção das bibliotecas de cDNA.....	63
5.9.5.	Sequenciamento das amostras.....	67
5.9.6.	Análises de bioinformática.....	67
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
6.1.	CAPÍTULO I - Caracterização bioquímica das linhagens de <i>E. coli</i> susceptíveis e resistentes à magainina I.....	70
6.1.1.	Identificação das linhagens resistentes e susceptíveis à magainina I.....	70
6.1.2.	Diferenciação entre as linhagens resistentes e susceptíveis à magainina I.....	74
6.1.3.	Análise da susceptibilidade antimicrobiana aos antibióticos convencionais .....	76
6.1.4.	Avaliação das linhagens de <i>E. coli</i> resistentes à magainina I em relação à susceptibilidade/resistência aos AMPs .....	81
6.2.	CAPÍTULO II - Análise proteômica comparativa do lisado bacteriano das linhagens de <i>E. coli</i> susceptível e resistente à magainina I por metodologia <i>gel-free</i> .....	87
6.2.1.	Proteínas superexpressas na linhagem de <i>E. coli</i> resistente à magainina I.....	94
6.2.2.	Proteínas subexpressas na linhagem de <i>E. coli</i> resistente à magainina I.....	100
6.2.3.	Proteínas exclusivas identificadas na linhagem de <i>E. coli</i> resistente à magainina .....	105
6.3.	CAPÍTULO III - RNA-Seq e análise do transcriptoma de <i>E. coli</i> resistente e susceptível à magainina I.....	112
6.3.1.	Sequenciamento de RNA de nova geração (RNA-seq) .....	112
6.3.2.	Análise comparativa da expressão gênica diferencial entre as linhagens resistente e susceptível à magainina I .....	120
6.4.	CAPÍTULO IV – Análises proteômicas preliminares do secretoma das linhagens de <i>E. coli</i> susceptíveis e resistentes à magainina I por metodologia <i>in-gel</i> . .....	148
7.	CONCLUSÕES .....	153
8.	PERSPECTIVAS .....	155
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	156
10.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....	170

## RESUMO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRaS) e o aparecimento de cepas multirresistentes representam um grave problema de saúde pública, sendo notória a necessidade de melhor compreender os mecanismos de resistência bacteriana e assim, elaborar antibióticos mais eficazes. Portanto, o objetivo deste trabalho consistiu em identificar, através de técnicas proteômicas e transcriptômicas, genes e proteínas diferencialmente expressos em linhagens de *E. coli* ATCC 8739 resistentes à magainina I. Para isso foi realizada a caracterização bioquímica através de microdiluição, VITEK<sup>®</sup>, MicroScan<sup>®</sup> e MALDI-TOF MS. Em seguida, foram analisadas a transcrição gênica e a expressão protéica por RNA-seq, nanoUPLC-MS<sup>E</sup> e 2-DE, respectivamente. Os resultados demonstram que as linhagens resistentes podem ser discriminadas por análises no MALDI-TOF MS e que a resistência à magainina I parece ser bastante específica. Utilizando técnicas proteômicas, foram identificadas 10 proteínas superexpressas dentre as quais, as porinas OmpW, OmpF, OmpC e OmpC fragmento 1b e as proteínas OppA, ZraP e MalM, que participam do transporte pela membrana e transdução de sinal. Por outro lado as proteínas GlpB, GlpA, GdpD, que participam do metabolismo de fosfolipídeos, e o regulador transcricional kdgR, DPS, DnaK, relacionado ao processamento de informação genética, estavam subexpressas. Observou-se também 60 proteínas exclusivas na linhagem resistente, que participam principalmente do metabolismo e processamento de informação genética e ambiental. A fim de aumentar a amplitude da análise, técnicas transcriptômicas também foram aplicadas ao mesmo modelo de estudo observando-se 80 genes com expressões diferenciais, principalmente correlacionados com o metabolismo. Dentre esses, a linhagem resistente *versus* susceptível com magainina I apresentou 5 genes diferenciais, estando 3 deles superexpressos (*pspA*, *secM*, *xdhB*) e 2 subexpressos (*cdp*, *hldD*). Os resultados sugerem que a bactéria foi capaz de desenvolver mecanismos de adaptação em resposta à presença de magainina, provavelmente regulando uma complexa rede de múltiplos genes.

Palavras-chave: IRaS, resistência bacteriana, magainina I, *E. coli.*, transcriptômica e proteômica



## ABSTRACT

Healthcare Associated Infections (HAIs) and emergence of multidrug-resistant bacteria represent a serious public health problem, requesting a better understanding of bacterial resistance's mechanisms in order to develop more effective antibiotics. Therefore, work aims to identify, through proteomics and transcriptomics tools, genes and proteins differentially expressed in *E. coli* ATCC 8739 magainin I resistant strains. Biochemical characterization was performed by broth microdilution, VITEK<sup>®</sup>, MicroScan<sup>®</sup> and MALDI - TOF MS. Then, gene and protein expression were analyzed by RNA -seq, nanoUPLC - MS<sup>E</sup> and 2-DE. Results demonstrated that the resistant strains could be discriminated by MALDI- TOF MS analysis and resistance to magainin I seems to be quite specific. By using proteomic tools, ten proteins were upregulated, such OmpW, OmpF, OmpC e OmpC 1b fragment and fifteen proteins, such GlpB, GlpA, GdpD, transcriptional factor regulator kdgR, DPS and DnaK, were downregulated in resistant strains. The upregulated proteins have been associated to membrane transport and signal transduction and downregulated proteins seem to participate in phospholipid metabolism and genetic information processing. It were also observed the presence of 60 unique proteins in the resistant strains that participate in bacterial metabolism, genetic and environmental information processing. In order to increase the knowledge of bacterial resistance, transcriptomic analysis was realized by using the same magainin I-resistant *E. coli* model being 80 genes identified, with differential expression in resistant strain being mainly related to metabolism. Among these, the comparison between resistant versus susceptible group cultured with magainin I showed five differential expressed genes, being three of them overexpressed (*pspA*, *secM*, *xdhB*) and the others subexpressed (*cdp*, *hldD*). These data suggest that the bacterium was able to develop a adaptation mechanism in response to magainin, probably regulating a complex net formed by multiple genes.

Keywords: HAIs, bacterial resistance, magainin I, *E. coli*, transcriptomics and proteomics tools

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRaS)

As doenças infecciosas afetam a humanidade desde o início das civilizações que, por sua vez, desconheciam a existência e patogenicidade da maioria dos microrganismos. Posteriormente, com um maior conhecimento destes organismos e a descoberta de que alguns microrganismos poderiam secretar substâncias que por sua vez, interferiam no crescimento de outros microrganismos tornou-se possível uma melhora no diagnóstico e tratamento das enfermidades (Alanis, 2005). A descoberta de Alexander Fleming (1929) ao estudar o fungo *Penicillium chrysogenum*, marcou o início de uma era moderna dos antibióticos. Desde então, muitas outras moléculas têm sido desenvolvidas a partir do molde da penicilina, originando vários fármacos, de diferentes classes, com maior eficiência e menos efeitos colaterais (Kong *et al.*, 2010). Porém, juntamente com a descoberta de agentes quimioterápicos inéditos, a sociedade também pôde acompanhar o surgimento concomitante de resistência bacteriana às múltiplas classes de antibióticos por diferentes espécies de bactérias (Fischbach e Walsh, 2009). Tal fato tem sido motivo de grande preocupação, devido ao número de pacientes imunodeprimidos que frequentam constantemente os ambientes hospitalares, que por sua vez tornam-se susceptíveis às infecções relacionadas aos serviços de saúde (IRaS), causadas por bactérias multi-resistentes (Nascimento *et al.*, 2000).

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRaS), também conhecidas como infecções hospitalares ou nosocomiais, podem ser adquiridas por pacientes enquanto estão recebendo tratamento médico hospitalar ou cirúrgico, sendo considerado o principal evento adverso durante a internação. O risco de adquirir as IRaS tem sido considerado universal e difunde-se por todas as instituições de saúde pelo mundo, representando uma das maiores causas de morte e de aumento da morbidade em pacientes hospitalizados (WHO, 2011).

Estudos demonstram que as IRaS acontecem aproximadamente de 5 a 10% nos países desenvolvidos e que o risco pode aumentar em até 20 vezes nos países em desenvolvimento e geralmente a proporção de pacientes infectados excede 25%, o que evidencia a necessidade de tornar a prevenção desse agravo uma prioridade, principalmente nos países em desenvolvimento, no intuito de aprimorar os cuidados em saúde para a população. (Pittet *et al.*, 2008; Matlow e Morris, 2009). Estas infecções são consideradas ainda mais graves em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), onde é possível observar elevados índices de pneumonia associada à ventilação mecânica, bem como infecções na corrente sanguínea e do trato urinário (Olaechea *et al.*, 2010). Dentre as IRaS, a infecção pulmonar, causada principalmente por *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli* e *Enterobacter sp.* podem levar a morte com maior frequência, variando entre 13 a 55% de fatalidade entre os casos de pneumonia em crianças, idosos e adultos imunodeprimidos (Levy, 2004; Levy e Marshall, 2004). O impacto das IRaS geralmente está relacionado com maior debilitação do paciente, prolongamento do tempo de internação hospitalar, aumento nos custos para o paciente, seus familiares e instituições públicas e privadas de saúde, aumento de resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos, podendo culminar em maior incidência de morte, demonstrando que essas infecções apresentam-se como um grave problema de saúde pública (WHO, 2009; 2011). Cabe ressaltar que, as infecções em âmbito hospitalar podem ser adquiridas não apenas por pacientes, apesar da maior susceptibilidade, mas também, embora menos frequentemente, por visitantes e funcionários do próprio hospital (Lipsitch *et al.*, 2000).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* dos Estados Unidos da América, estima-se que as IRaS representam cerca de 1,7 milhões dentre as infecções e 99.000 mortes estão associadas a cada ano no país (Klevens *et al.*, 2007; Scott, 2009). Destas infecções, 32% referem-se às infecções do trato urinário, 22% são infecções de sítio cirúrgico, 15% são relativas à pneumonia (infecção pulmonar) e 14% são infecções na corrente

sanguínea (Klevens *et al.*, 2007; Scott, 2009). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a taxa média de infecção hospitalar é de 15%, onde 3-15% dos pacientes infectam-se após procedimentos invasivos ou terapia imunossupressora (ANVISA, 2004; Apecih, 2005).

De forma geral, bactérias, fungos e vírus podem causar IRaS. Os fungos estão geralmente associados com aproximadamente 9%, os vírus 22% e as bactérias, os patógenos em destaque no ranking dessas infecções, com 69% dos casos de IRaS diagnosticadas (Aujard, 2000; Levy, 2004; Levy e Marshall, 2004). Os microrganismos que aparecem mais comumente associados às IRaS estão demonstrados na Tabela 1 (Levy, 2004).

**Tabela 1.** Microrganismos mais frequentes nas IRaS.

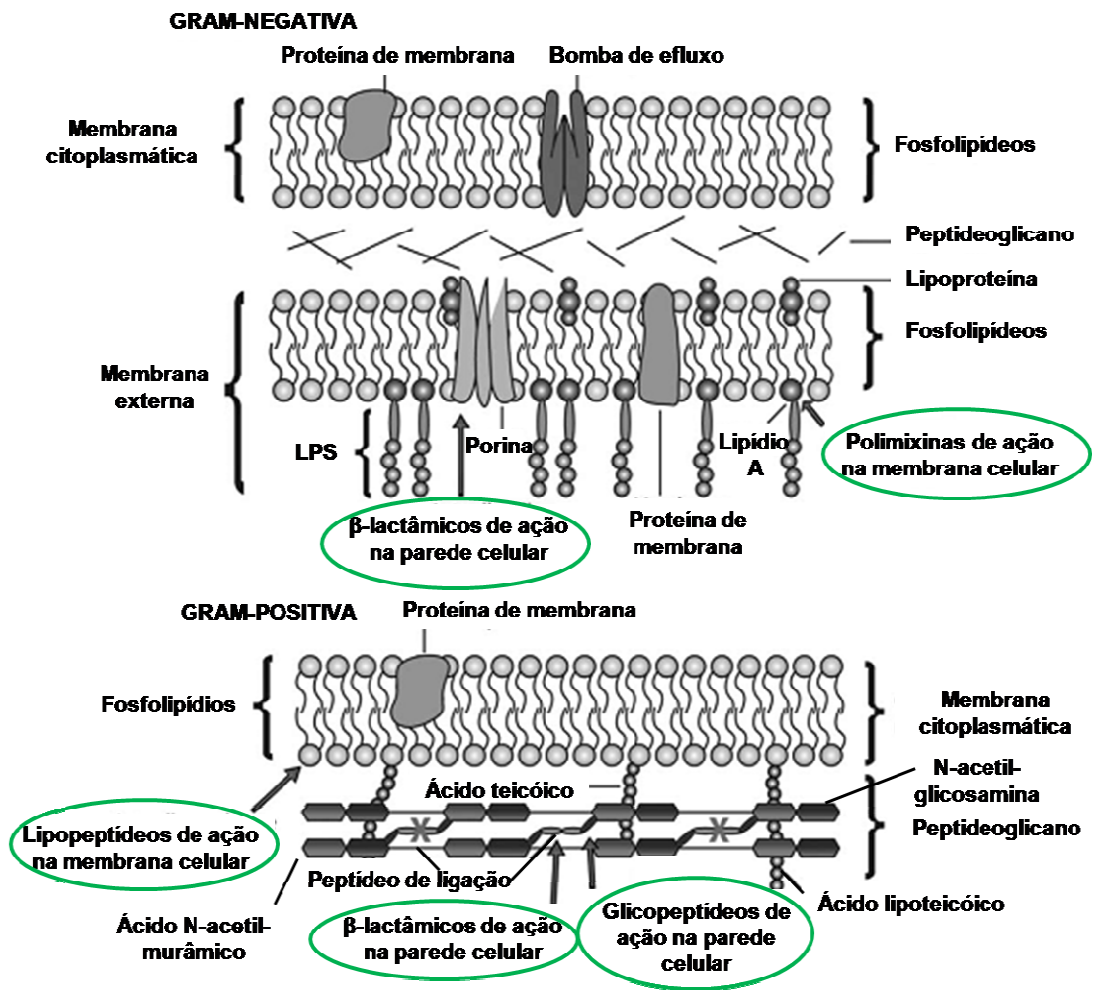
<b>Microrganismos</b>	<b>Sítios comuns de isolamento</b>
<b>Bactérias Gram negativas</b>	
<i>Escherichia coli</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas,
<i>Pseudomonas sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório
<i>Klebsiella sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório,
<i>Proteus sp.</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas
<i>Enterobacter sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório,
<i>Serratia sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório,
<b>Bactérias Gram positivas</b>	
<i>Streptococcus sp.</i>	Trato urinário, trato respiratório,
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<b>Fungos</b>	
<i>Candida albicans</i>	Trato urinário, sangue
Outros	Trato urinário, trato respiratório,

Fonte: Adaptado de Levy (2004).

Os microrganismos comuns nas IRaS podem ser isolados com mais frequência no trato urinário, trato respiratório, pele, feridas cirúrgicas e sangue (Levy, 2004). As infecções sanguíneas associadas a serviços de saúde são a principal causa de morbimortalidade nas unidades de terapia intensiva mundialmente (Vincent *et al.*, 2009). Em estudo multicêntrico

realizado de 2008 a 2012 no Japão com vinte um hospitais, observou-se um aumento na média de culturas positivas por leito de 4,06 para 5,36 resultados nesse período. Paralelamente, houve incremento de 29% para 50% no número de culturas positivas múltiplas detectadas (Nagao, 2012).

Como observado na Tabela 1 tanto as bactérias Gram positivas quanto as Gram negativas estão associadas ao desenvolvimento das IRaS. As bactérias Gram positivas apresentam composição singular em sua parede celular, baseada em mureína e peptideoglicanos, formando um arcabouço composto por uma alternância de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico (Cordwell, 2006; Lodish *et al.*, 2000), no qual se encontra ligado o ácido teicóico. Já as bactérias Gram negativas são formadas por uma dupla camada membranácea, a qual consiste em uma membrana interna (MI) rica em fosfolipídios e uma externa (ME) rica em fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS). O espaço periplasmático que separa essas membranas contém peptideoglicanos (Figura 1). Vários grupos de proteínas estão associados a essas membranas e envolvidas em diferentes atividades como ligação a ATP, transporte de íons e pequenas moléculas. Dentre essas proteínas observam-se as porinas e lipoproteínas, associadas a ME; as proteínas integrais, que atravessam a ME em várias regiões; as periplasmáticas e as associadas à MI (Cordwell, 2006).



**Figura 1.** Parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas e principais alvos de ação dos antibióticos que atuam na membrana bacteriana. Em verde, os alvos de ação dos antibióticos. Fonte: Adaptada de Lima *et al.* (2013).

As bactérias Gram negativas produzem uma variedade de polissacarídeos, como o lipopolissacarídeo (LPS) e os polissacarídeos exo e capsular (PSs), que são particularmente importantes para sua interação com o sistema imunitário do hospedeiro. O LPS atua como uma molécula padrão associada ao patógeno, estimulando a resposta do hospedeiro, e os PSs podem formar barreiras físicas (biofilmes e estruturas capsulares), as quais favorecem a evasão da resposta imune do hospedeiro (Herasimenka *et al.*, 2005).

A família Enterobacteriaceae consiste atualmente na maior e mais heterogênea família de bactérias Gram negativas de grande importância associada à ocorrência de IRaS, sendo

isoladas em 95% dos casos clínicos (Levy e Marshall, 2004). Os membros da família Enterobacteriaceae apresentam as seguintes características: bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, não esporulantes, catalase positivos, oxidase negativa, redutores de nitrato a nitrito, fermentadores de glicose, com motilidade variável e de fácil crescimento em meios básicos (caldo peptona), meios ricos (ágar sangue, ágar chocolate e CLED) e em meios seletivos (MacConkey, EMB) (Jones, 1998). Dentre esses membros, os predominantes causadores de IRaS são *E. coli* e *Proteus* sp., que causam frequentemente infecções do trato urinário (ITU), e *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp., importantes na ocorrência de pneumonias e infecções intestinais. Entretanto, todos os membros dessa família têm sido implicados em infecções sanguíneas, peritonites, colites e outras infecções intra-abdominais (Hujer *et al.*, 2006).

Em estudo de escala nacional nos Estados Unidos da América, foram identificadas as espécies de bactérias associadas a infecções relacionadas aos serviços de saúde entre os anos de 2009 e 2010 (Sievert *et al.*, 2013). Com base em 2.039 hospitais incluídos na pesquisa, foram observadas mais de 69.000 infecções no período, sendo a *E. coli*, o segundo microrganismo mais associado a essas infecções, responsável por 11,5% das mesmas e relacionadas mais frequentemente ao trato urinário (Sievert *et al.*, 2013).

No Japão, dentre as principais espécies associadas às infecções sanguíneas adquiridas em serviços de saúde, nas UTIs analisadas, a *E. coli* foi responsável por 13-17% das infecções no período, colocando-se dentre as três espécies bacterianas mais frequentes, juntamente com *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* ssp. As fontes mais frequentes de isolados de *E. coli* foram infecção intra-abdominal, neutropenia febril, infecção no sítio cirúrgico e no trato urinário (Nagao, 2012). Analisando os dados de nove hospitais públicos na Austrália, Barnett e colaboradores (2013) observaram que 9% do total de infecções sanguíneas foram causadas

por *E. coli*, e representaram 22% das infecções por bactérias Gram negativas. De 2005 a 2010 foi registrada uma mortalidade de 12% dentre as infecções decorrentes de *E. coli*.

No cenário brasileiro, a prevalência de infecções por *E. coli* seguem valores semelhantes, conforme demonstrado por Abreu *et al.* (2011), em análise de 659 cepas de enterobactérias obtidas em três hospitais. Dentre 125 cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido, 16% foram dessa espécie. Frequentemente, as cepas isoladas de culturas sanguíneas demonstram a existência de resistência antimicrobiana relevante para *E. coli* (Albuquerque *et al.*, 2013).

Considerando o impacto econômico que as infecções associadas a serviços de saúde acarretam, Scott (2009) apresenta uma análise de custos diretos de pacientes nesse quadro clínico nos Estados Unidos. O custo considerado para cada paciente foi de US\$ 25.903 dólares no ano de 2007, enquanto o custo total das infecções no país foi de US\$ 45 bilhões de dólares no período. Portanto, levando-se em consideração os índices alarmantes de IRaS pelo mundo e o impacto econômico e social desse agravo, torna-se fundamental a busca por medidas capazes de aprimorar os cuidados em saúde para a população e de se evitar o seu aparecimento e disseminação. Vários fatores podem contribuir para o aparecimento de infecções em pacientes hospitalizados, como a idade e imunodepressão dos pacientes, o aumento na variedade de procedimentos médicos, as técnicas invasivas que propiciam uma potencial rota para a infecção, a transmissão hospitalar de microrganismos droga-resistentes, principalmente bactérias multi-resistentes e a própria terapia antimicrobiana utilizada que associada às práticas ineficazes ou insuficientes de prevenção e controle da infecção, podem facilitar a sua disseminação e permitir a propagação das IRaS (WHO, 2009).



## 1.2. Antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções

Após a descoberta e disseminação do uso das sulfonamidas e da penicilina na metade do século XX, os anos entre 1950 e 1970 foram considerados a “era do ouro” da descoberta de novos antimicrobianos. Muitas infecções que eram sérias e potencialmente fatais até o momento tornaram-se passíveis de tratamento e até mesmo cura. Entretanto, esse sucesso estimulou o uso excessivo e inadequado de antibióticos o que resultou ao longo dos anos, no aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos disponíveis (WHO, 2002). Os antimicrobianos são divididos em diferentes classes e apresentam diversos mecanismos de ação capazes de modificar o metabolismo microbiano e processos fisiológicos como a tradução, replicação de DNA e biossíntese da parede celular (Lima *et al.*, 2013).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos possuem caracteristicamente a presença de um anel nitrogenado em sua estrutura. Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e monobactâmicos são classes terapêuticas representativas, que diferem entre si na configuração do heterociclo conjugado ao primeiro anel e também na estrutura da cadeia lateral. O alvo desses fármacos são proteínas de ligação a penicilinas (PBP), responsáveis pela biossíntese e rearranjo de peptidoglicanos que constituem a parede celular. Os  $\beta$ -lactâmicos se ligam a essas proteínas, tornando-as enzimaticamente inativas e comprometendo a formações peptídicas que permitem a ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano (Kohanski *et al.*, 2010). A vancomicina, um glicopeptídeo isolado inicialmente da espécie *Streptomyces orientalis*, sinônimo *Amycolatopsis orientalis*, pode ser utilizado no tratamento de infecções causadas pelos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* multirresistentes. Outro membro dessa classe é a teicoplanina, isolada do microrganismo *Actinoplanes teichomyceticus* (Levine, 2006; Lima *et al.*, 2013). O mecanismo de ação desses medicamentos envolve a inibição competitiva dos sítios de ligação peptídica D-Ala-D-Ala que formam a ponte cruzada entre

peptideoglicanos. Assim, a atividade de PBPs é bloqueada, causando distúrbios osmóticos e na integridade física da parede celular (Lima *et al.*, 2013).

Dentre os antibióticos que atuam na inibição da síntese protéica está a classe dos macrolídeos, representada principalmente por eritromicina, claritromicina e azitromicina. São moléculas capazes de se ligar à subunidade ribossomal 50S, impedindo os processos de transpeptidação, translocação e alongamento da cadeia polipeptídica produzida pela bactéria (Leclerq, 2002). O uso clínico frequente dos macrolídeos abrange infecções do trato respiratório superior, causadas por cocos Gram positivos, como *Streptococcus pneumoniae*, e as bactérias Gram negativas *Haemophilus spp*, *Moraxella catarrhalis*, e *Legionella pneumophila* (Zuckerman *et al.*, 2004).

Outras classes de antibióticos que também agem inibindo a subunidade 50S na síntese protéica são as licosamidas, como a clindamicina, os fenicóis, representados pelo cloranfenicol, as estreptogaminas, quinupristina e dalfopristina, e as oxazolidinonas, como a linezolida. Mais especificamente, esses fármacos podem bloquear a tradução de proteínas impedindo a ligação de t-RNA no sítio A do ribossomo, além de prejudicar a translocação do t-RNA durante a leitura da fita de mRNA e conseqüentemente comprometendo o prolongamento da cadeia peptídica em formação (Kohanski *et al.*, 2010). A ação de agentes antibacterianos na subunidade 30S também pode ser observada para aminoglicosídeos e tetraciclina, que são capazes de conduzir a uma tradução errônea do peptídeo, promovendo uma ligação mal codificada do complexo peptidil-t-RNA ao ribossomo (Kohanski *et al.*, 2010).

Nesse cenário, apesar da ampla disponibilidade de agentes antimicrobianos para tratamento das mais diversas infecções, o seu uso indiscriminado e inapropriado contribui bastante para o agravamento das IRaS, uma vez que essa atitude propicia o aparecimento recorrente de bactérias que são resistentes aos mais diferentes antibióticos, resultando em

aumento da susceptibilidade dos pacientes hospitalizados e imunodeprimidos a essas infecções (WHO, 2002).

### **1.3. Resistência bacteriana aos antibióticos convencionais**

Ao longo dos anos, juntamente com a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento das infecções, os microrganismos também desenvolveram mecanismos de adaptação e sobrevivência ao ambiente em que vivem. As bactérias, por sua vez, mostraram uma excelente habilidade em resistir e se adaptar ao ambiente, incluindo o desenvolvimento de diversos mecanismos de resistência aos diferentes agentes antimicrobianos utilizados até o momento, culminando na ineficácia desses fármacos como tratamento de escolha para infecções graves (Alanis, 2005).

O desenvolvimento de mecanismos de resistência foi observado inicialmente com *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina e sulfonamidas nos anos 1930s e, em 1940, *Neisseria gonorrhoeae* resistente à penicilina. Segue, em 1970, com *Haemophilus influenzae* mutante produtor de  $\beta$ -lactamases, *S. aureus* resistentes a meticilina. No final dos anos 1970s e 1980s, ocorreu o ressurgimento de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogas resistente, assim como resistência de diversas cepas de bactérias Gram negativas comuns entéricas e não entéricas, tais como *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, entre outras (Allen *et al.*, 2010; Davies, 2010; Sykes, 2010). Atualmente, muitos microrganismos tornaram-se multi-resistentes aos antibióticos convencionais. Essas bactérias resistentes estão comumente relacionadas com o aumento da morbidade e mortalidade, particularmente entre pacientes imunocomprometidos, sendo ainda mais preocupante em pacientes hospitalizados por estarem debilitados e mais vulneráveis (WHO, 2002).

No Brasil diferentes estudos relatam o surgimento de cepas resistentes a diversos antibióticos em ambiente hospitalar. De acordo com Rossi (2011), as cepas que apresentam uma maior prevalência de resistência são *S. aureus* resistentes a meticilina (60%), *K. pneumoniae* e *E. coli*  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs) com prevalências de 50 e 18%, respectivamente. Santos e colaboradores (2010) demonstraram que 13% dos pacientes internados em UTIs, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, apresentam infecções por cepas de MRSA (*S. aureus* multi-droga resistentes), 46% apresentam colonização de MRSA em diversos tecidos e 51% dos não-pacientes são colonizados ou portadores de cepas de MRSA, demonstrando que as medidas gerais de controle de infecção ainda estão ineficientes.

Wollheim *et al.* (2011), observaram uma alta prevalência (43,7%) de *K. pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido presentes em ambientes hospitalares e, especialmente, em pacientes pediátricos da UTI neonatal do Hospital Geral de Caxias do Sul, no Rio Grande do Sul. De acordo com o autor, a alta prevalência de *K. pneumoniae* ESBL em hospitais ocorre em virtude de mutações nos genes blaCTX-M (82,8%), blaSHV (42,2%) e blaTEM (11,1%).

Os mecanismos de resistência das bactérias Gram positivas estão correlacionados com a atividade de  $\beta$ -lactamases, que rompem o anel lactâmico, e mutações selecionadas em PBPs (proteínas de ligação a penicilinas). Em bactérias Gram negativas, observam-se ainda a ação seletiva de porinas que barram a entrada do fármaco e bombas de efluxo (Larrull *et al.*, 2010). O desenvolvimento de resistência em bactérias Gram positivas aos macrolídeos deve-se principalmente a alterações evolutivas no sítio de ligação desses fármacos e bombas de efluxo (Cetin *et al.*, 2010, Aktas *et al.*, 2007).

A multi-resistência bacteriana consiste em um problema crescente e segundo Partridge (2011), as bactérias Gram negativas, em particular as pertencentes a família Enterobacteriaceae, apresentam regiões de multirresistência (MRR), constituída de elementos

móveis tais como, cassete de genes/integrans e transposons que ao se recombinarem resultam nos mecanismos diferenciais de resistência.

O fenótipo de resistência pode ser perceptível em função da presença de um ou mais mecanismos moleculares de resistência antibiótica na bactéria. Dentre os tipos de mecanismos moleculares de resistência destacam-se, por sua relevância, a inativação enzimática, as alterações no sítio ativo e alterações na permeabilidade, exemplos que podem ser observados mais detalhadamente na Tabela 2, conforme estudo que demonstra os principais mecanismos de resistência antimicrobiano estudados em *E. coli* (Mosquito *et al.*, 2011).

**Tabela 2.** Principais mecanismos de resistência antimicrobiana estudados em *E. coli*.

FAMÍLIA DE ANTIBIÓTICOS	MECANISMO DE AÇÃO	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	GENES RELACIONADOS
<b>β- Lactâmicos</b>	Interfere na síntese de peptidoglicano, componente necessário para formação da parede bacteriana.	β- lactamases: enzimas que se caracterizam por hidrolisar a ligação amida do núcleo β- lactâmico, inativando dessa maneira o antibiótico.	Genes que codificam β- lactamases: <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> CARB, <i>bla</i> OXA, <i>bla</i> CTX-M e <i>bla</i> GES.
<b>Quinolonas</b>	Inibe a ação das Topoisomerases e da DNA girase bacterianas	Mutações pontuais que resultam na troca de aminoácidos na região alvo do antibiótico.  Sistemas de expulsão do antibiótico.  Presença de genes plasmidiais de resistência antibiótica.	Mutações em <i>gyrA</i> (gene que codifica uma subunidade da DNA girase) e <i>parC</i> (gene que codifica uma subunidade da topoisomerase IV).  AcrAB-like (sistemas presentes em diferentes enterobacterias)  Família de genes <i>qnr</i> (A, B, C, D S) que codificam proteínas Qnr que impedem estericamente a união do antibiótico ao sítio ativo.  Gene que codifica a variante cr da acetiltransferase 6' (AAC (6')-Ib-cr), capaz de acetilar fluoroquinolonas.
<b>Tetraciclínas</b>	Unem-se ao ribossomo bacteriano, inibindo a síntese de proteínas.	Presença de bombas de efluxo específicas para tetraciclínas.	Genes <i>tetA</i> y <i>tetB</i> que codificam sistemas de efluxo.
<b>Cloranfenicol</b>	Inibidor da biossíntese de proteínas.	Inativação enzimática por acetilação.  Exportadores específicos de Cloranfenicol.	Gene <i>cat</i> que codifica a enzima cloranfenicol acetiltransferase. Genes <i>foR</i> e <i>cmlA</i> .
<b>Trimetoprima/ Sulfametoxazol</b>	Inibe a síntese da enzima diidropteroato sintase (sulfametoxazol) e da enzima diidrofolato redutase (trimetoprima), as quais são enzimas necessárias na rota do ácido fólico.	Presença de genes que codificam formas mutantes da enzima.	Genes <i>sul1</i> <i>esu2</i> (sulfametoxazol) e genes <i>dfr</i> (trimetoprima).

Fonte: Adaptada de Mosquito *et al.*(2011).

O processo de aquisição de resistência pode ser ativo, como por exemplo, o resultado de uma pressão específica para adaptar-se a um mecanismo de ataque de um antibiótico ou de uma classe de antibióticos; ou passivo, quando a resistência consiste em uma consequência de processos de adaptação em geral não necessariamente relacionada a um antibiótico e que são transmitidos para outras bactérias, como, por exemplo, a barreira não específica propiciada pela membrana externa de bactérias Gram negativas (Wright, 2005).

As bactérias podem desenvolver resistência ativa principalmente através do efluxo de antibióticos da via celular utilizando uma coleção de proteínas associadas à membrana que funcionam como bombas de efluxo; da modificação dos alvos de ligação dos antibióticos, observada, por exemplo, na mutação desses alvos, como o RNA ribossomal ou então na reprogramação da via de biossíntese, como na resistência aos antibióticos glicopeptídicos; e através da síntese de enzimas modificadoras que atuam seletivamente no antibiótico, eliminando sua atividade (Wright, 2005; Mosquito *et al.*, 2011).

É importante salientar que todos esses mecanismos requerem uma reprogramação genética pela célula em resposta à presença dos agentes antimicrobianos, regulando positivamente, em muitos casos, a expressão de genes de resistência e exigindo um elevado gasto energético e metabólico pela célula bacteriana (Wright, 2005). Além disso, a resistência bacteriana pode ser inata ou adquirida em relação a um ou mais antibióticos. A resistência adquirida pode ocorrer por mutações em genes celulares (mutações cromossômicas) levando a uma resistência cruzada ou por transferência de genes de um microrganismo para outro através de plasmídeos (conjugação ou transformação), transposons (conjugação), integrons e bacteriófagos (transdução). Porém, independente do processo, geralmente a resistência resulta em falha terapêutica e agravamento do estado de saúde do paciente (Giedraitiene, 2011).

Estudos demonstram que várias bactérias como as *Pneumococcus* spp. *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., desenvolveram resistência e que mais de 70% delas causam infecção. Porém a maior alerta de saúde pública está em relação aos membros da família Enterobacteriaceae, como a *Klebsiella* sp e a *E. coli*, que são frequentes causas de IRaS, chegando a índices de 30 a 50% das infecções nosocomiais do trato urinário por *E. coli* (Ejernaes, 2011; Pelegrini *et al.*, 2008; WHO, 2002).

As linhagens de enterobactérias resistentes apresentam elevada resistência a ampicilina ( $\beta$ -lactâmicos), trimetoprina, sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol, vancomicina e ácido nalidíxico, frequentemente relacionada com a prevalência molecular dos mais diferentes genes. Essa característica de resistência a diferentes antibióticos dificulta o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos, elevando os custos do tratamento e o agravamento do quadro clínico dos pacientes hospitalizados (Mosquito *et al.*, 2011; Wright, 2005).

Nos Estados Unidos foram identificadas resistências em 66,8% das infecções sanguíneas por *E.coli* associadas ao acesso venoso central, 58,3% de pneumonias decorrentes de ventilação mecânica e 39,8% das infecções originadas no sítio cirúrgico (Sievert *et al.*, 2013). Também foi observada no Japão, uma taxa de 12% de cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido para essa espécie e a mortalidade observada devido a infecções por *E. coli* multirresistentes foi de 21% (Nagao, 2012). Portanto é possível destacar um problema emergente de saúde pública mundial: enquanto a bactéria amplia continuamente o desenvolvimento dos mecanismos de adaptação e resistência ao amplo espectro de agentes antimicrobianos convencionais existentes na prática clínica, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos para tratar as IRaS causadas por bactérias Gram negativas multi-droga resistentes, como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli*, encontra-se claramente em declínio (Arias e Murray, 2009).



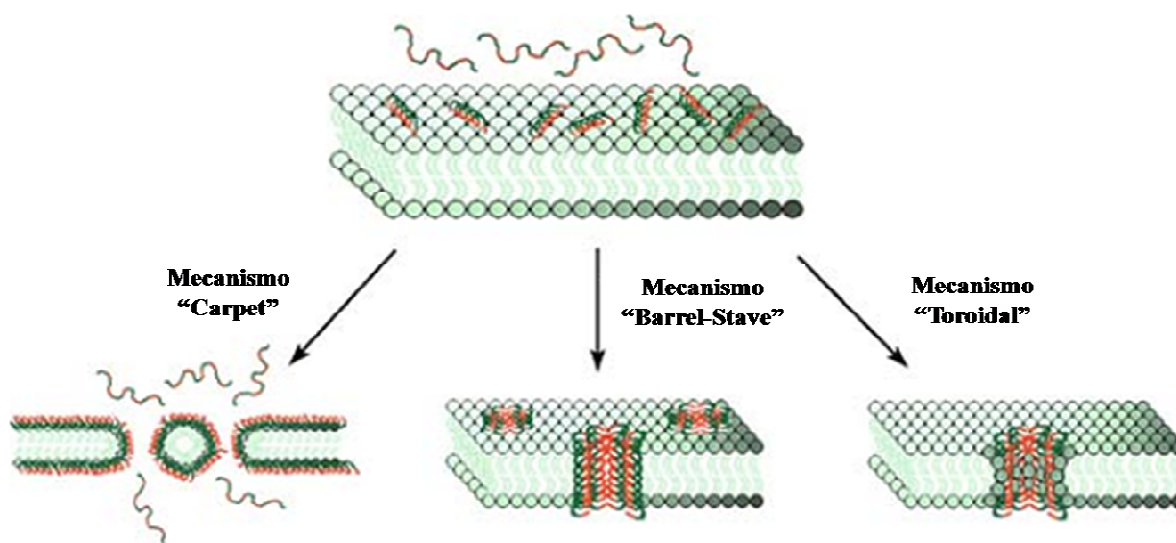
Nesse sentido, torna-se evidente a necessidade da busca por antimicrobianos inovadores, com mecanismos de ação inéditos, capazes de driblar os mecanismos existentes de resistência bacteriana e assim oferecer uma alternativa terapêutica para o tratamento e controle das infecções. Dentre as estratégias alternativas à resistência bacteriana contra os antibióticos usuais, podem-se destacar os peptídeos antimicrobianos.

#### **1.4. Peptídeos antimicrobianos (AMPs)**

Todos os seres vivos, incluindo microrganismos, plantas e mamíferos, desenvolveram ao longo da sua evolução, mecanismos de proteção e defesa contra o ataque de patógenos, como pode ser observado na resposta imune adaptativa humana. Este sistema defensivo pode ser considerado bastante sofisticado incluindo a produção de anticorpos e de células especializadas para reconhecer e eliminar invasores específicos. A produção de peptídeos antimicrobianos, os AMPs, dentre outros mecanismos da imunidade natural, é uma estratégia mais comum e bastante utilizada pelos organismos vivos (Thomma *et al.*, 2002).

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas efetoras da imunidade inata do hospedeiro constituídas por pequenos polipeptídeos de 30 a 100 aminoácidos e em sua maioria catiônicos e com estrutura  $\alpha$ -hélice, sendo encontrados em diferentes organismos multicelulares, como plantas, insetos, peixes, mamíferos e anfíbios (Fulmer *et al.*, 2010). Esses AMPs podem apresentar diferentes mecanismos de ação, inclusive a combinação de mais de uma estratégia na destruição dos patógenos. De forma geral, a atividade dos AMPs pode ser mais comumente associada com sua interação à membrana plasmática (Figura 2), promovendo sua permeabilização e desestabilização (Huang *et al.*, 2010). Porém outros estudos têm demonstrado a ação de AMPs em diferentes mecanismos na inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas,

ligação específica ao DNA, inibição de atividade enzimática, ativação de autolisinas e interferência na formação da parede celular (Brogden, 2005; Nguyen *et al.*, 2011; Roelantes *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Modelos de mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos catiônicos baseados na interação com a membrana citoplasmática de bactérias. No modelo "carpet", os peptídeos inicialmente associam-se com a membrana e alinham-se paralelamente à bicamada, recobrendo toda a superfície, desestabilizando-a geralmente sem o envolvimento da formação de poros. Já no modelo "barrel-stave", os peptídeos orientam-se perpendicularmente à superfície da membrana, com a parte hidrofóbica dos peptídeos associada com a parte hidrofóbica da membrana e apenas a parte hidrofílica dos peptídeos forma um canal ou poro aquoso. No modelo "toroidal", similar ao "barrel-stave", os peptídeos se inserem perpendicularmente à membrana lipídica para formar os poros, porém, nesse modelo, a estrutura bem definida dos poros toroidais é formada pela interação das regiões hidrofílicas de peptídeos e fosfolipídeos em conjunto, no centro dos poros aquosos. Fonte: Adaptada de Huang *et al.*(2010).

Os peptídeos antimicrobianos que atuam na membrana celular e que apresentam uso clínico incluem principalmente a polimixina B e a polimixina E, conhecida como colistina. Foram isolados inicialmente de *Bacillus polymyxa* e são capazes de se ligar a lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídios presentes na membrana externa de bactérias Gram negativas (Zucca *et al.*, 2011), resultando no deslocamento competitivo de cátions bivalentes na membrana fosfolipídica e no rompimento da integridade bacteriana (Beceiro *et al.*, 2011).

Em geral, os AMPs pertencem a um amplo grupo de peptídeos que apresentam variações em relação à sua sequência de aminoácidos, a estrutura e tamanho (Epanand e Epanand, 2011; Kosciuzuk *et al.*, 2012), assim como observado para os membros da família das catelicidinas. Essa família, juntamente com as defensinas, pertence ao grande grupo de peptídeos catiônicos funcionais capazes de interagir com a membrana bacteriana através de propriedades anfipáticas (Steinstraesser *et al.*, 2011; Kosciuzuk *et al.*, 2012). As catelicidinas compreendem um grupo variável de peptídeos catiônicos pequenos isolados de diferentes organismos (Sang e Blecha, 2009; Steinstraesser *et al.*, 2011), como por exemplo, cecropinas de insetos (Steiner *et al.*, 1981), PR-39, do intestino delgado de porcos (Agerberth *et al.*, 1991), cecropina P1 do nematóide de porco (Lee *et al.*, 1989) e as magaininas da pele de sapo (Zasloff, 1987).

#### **1.4.1. Magaininas**

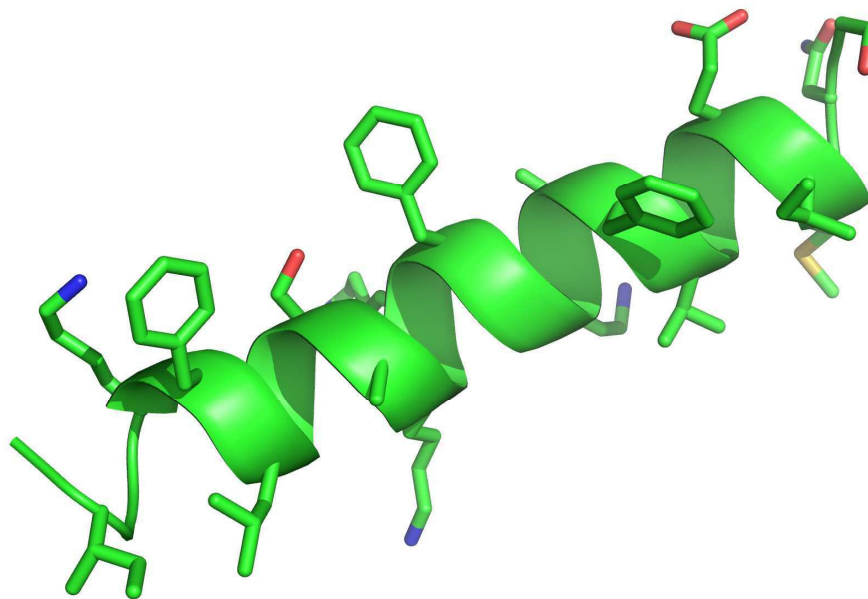
Dentre as inúmeras fontes, a pele de anfíbios consiste em uma fonte rica de compostos bioativos que podem ter diversas funções biológicas e de defesa incluindo os AMPs. Vários AMPs obtidos da pele de anfíbios podem adotar uma estrutura de  $\alpha$ -hélice anfipática em ambientes hidrofóbicos, sugerindo que os oligômeros podem formar poros na bicamada lipídica da membrana dos microrganismos ou então desestabilizá-la, perturbando sua integridade, mas podendo também agir em vários outros alvos na célula (Barra e Simmaco, 1995; Rinaldi, 2002).

Diferentes AMPs da pele de anfíbios já foram isolados e caracterizados, como bombinina (*Bombina variegata* e *B. orientalis*), dermaseptina e adenoregulina (*Phyllomedusa sauvagei*), caerina-1 e caeridina-1 (*Litoria* sp), brevinina, gaegurina e ranalexina (*Rana* sp) e PGLa, XPF e magaininas (*Xenopus laevis*) (Barra e Simmaco, 1995).

Zasloff e colaboradores (1987), durante experimentos para estudar a expressão de RNA em eucariotos, utilizando como modelo biológico os oócitos de fêmeas de *Xenopus laevis* (Xenopodinae, Pipidae), observaram que apesar de todo o procedimento cirúrgico não-estéril realizado para retirar os ovários, e o retorno imediato após a cirurgia para o tanque contendo água não-estéril, o desenvolvimento de infecção nesses animais durante a cicatrização de feridas relacionadas ao modelo experimental era extremamente raro. Dessa forma, Zasloff sugeriu que esse animal apresentava uma atividade “esterelizante” na pele. Portanto, essas observações propiciaram posteriormente, a purificação e caracterização das magaininas (Zasloff, 1987).

Essas moléculas protéicas pertencem a uma família de peptídeos antimicrobianos potentes, isolados da pele de sapos da África do Sul, da espécie *Xenopus laevis*. No trabalho original de isolamento destas moléculas, foram obtidos dois peptídeos denominados de magainina I e magainina II (do hebraico “magain” que significa escudo, proteção) (Zasloff, 1987; Soravia *et al.*, 1988; Duclouhier, 1994). Essa classe de peptídeos mostrou atividade antimicrobiana inédita e participação crucial no sistema de defesa desse anfíbio (Berkowitz *et al.*, 1990).

Estruturalmente, as magaininas I e II apresentam formas potencialmente helicoidais, similares e anfipáticas (Figura 3), formadas por 23 resíduos de aminoácidos e, diferindo apenas nas substituições nas posições 10 de glicina (Gly) por lisina (Lys) e 22 de lisina (Lys) por asparagina (Asn) (Zasloff, 1987). São moléculas catiônicas, e sua carga positiva em pH neutro, além dos resíduos hidrofóbicos que lhe conferem caráter anfipático, são determinantes para a atividade antimicrobiana (Hicks *et al.*, 2003; Haney *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Estrutura tridimensional de magainina II em solução aquosa. Estrutura determinada por RMN, depositada no PDB sob o código 2mag (Gesell *et al.*, 1997) e visualizada pelo software UCSF Chimera.

As magaininas apresentam um amplo espectro de ação, sendo capazes de inibir, em concentrações reduzidas, o crescimento de fungos, bactérias Gram positivas e Gram negativas. Inicialmente, a magainina sofre atração das forças eletrostáticas exercidas pelos grupos fosfato dos lipopolissacarídeos (LPS) presentes nas bactérias Gram negativas e do ácido lipotecóico nas Gram positivas (Huang *et al.*, 2010). O peptídeo desloca os cátions  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , estabilizadores da membrana externa, contribuindo para entrada de mais moléculas. Em seguida, ao entrar em contato com a membrana citoplasmática dos microrganismos, a estrutura secundária helicoidal anfipática da magainina é capaz de interagir paralelamente com a bicamada de fosfolípidos. Consequentemente ocorre a interferência na integridade da membrana, desestabilização e ruptura associadas à formação de poros toroidais (Figura 2) (Duclouhier, 1994; Zasloff, 2002; Huang *et al.*, 2010; Bechinger, 2011).

As magaininas I e II foram um dos primeiros peptídeos antimicrobianos identificados, e por isso são amplamente estudados para elucidação dos mecanismos de ação. Por muito tempo, os pesquisadores demonstraram que a atividade antimicrobiana desses AMPs e diversos análogos sintéticos têm estreita ligação com a interação  $\alpha$ -hélice-membrana, como descrito anteriormente. No entanto, estudos recentes vão além e apresentam indícios de que o mecanismo de ação pode estar relacionado a outras etapas distintas e que podem existir outras moléculas-alvo na célula bacteriana, ainda em estudo (Haney *et al.*, 2009). De fato, a internalização de magainina pela *E. coli*, representa mais um indício de que exista um possível alvo intracelular e um modo de ação diferente e mais complexo do que apenas a formação de poros na membrana (Splith e Neundorf, 2011).

Laughlin e Ahmad (2010) estudaram a atividade inibitória de diversos AMPs, inclusive magainina II e magainina II-amida, sobre a ATP-sintase de *Escherichia coli*. O grupo  $-NH_2$  foi associado a uma inibição enzimática de 60%, enquanto a magainina II apresentou potencial inibitório de 20%. Foi observado que o processo de ligação do peptídeo com a enzima é totalmente reversível, pois não possui caráter covalente, portanto influencia a atividade antimicrobiana de cada peptídeo. A magainina II-amida ainda reduziu moderadamente o crescimento de *E. coli* em condições de estresse de redução de glicose, demonstrando interferência na via glicolítica, e também houve diminuição do crescimento celular em presença de succinato (uma fonte de carbono não fermentável), devido à menor síntese de ATP por fosforilação oxidativa.

Atualmente, a magainina I, semelhante ao que vem acontecendo com outros peptídeos antimicrobianos, vem sendo sintetizada em nível industrial e comercializada mundialmente,

devido seu grande potencial biotecnológico na área farmacológica, bem como para elucidação dos mecanismos de ação e de resistência bacteriana.

Em dois ensaios clínicos fase III multicêntricos, denominados estudo 303 e estudo 304, Lipsky *et al.* (2008) estudaram a eficácia de uma formulação tópica de pexiganana 1-2%, um peptídeo sintético de 22 aminoácidos análogo da magainina II, no tratamento de infecções em úlceras de pé diabético. O tratamento comparador consistiu no uso de dois comprimidos de ofloxacino 200 mg duas vezes ao dia. Visando o ensaio duplo cego dos pacientes e dos investigadores, o grupo tratado com pexiganana tópica foi orientado a ingerir comprimido placebo; e para o grupo referente ao ofloxacino utilizou-se uma formulação tópica placebo. Foram acompanhados 835 pacientes no total e o tempo de duração da terapia antibiótica variou entre 14 a 28 dias para os dois tratamentos em cada estudo, com mediana de 27 dias no estudo 303 e 25 dias no estudo 304. Na análise combinada desses ensaios clínicos, as taxas de cura ou melhora clínica da úlcera de pé diabético foram de 87% para o grupo pexiganana tópica e 90% para o grupo ofloxacino oral, com diferença igual a - 3,57% (IC 95% -7,87 a 0,74), mostrando que a diferença estatística de benefício clínico entre os grupos tratados não foi significativa.

Para análise do desfecho clínico de eficácia antimicrobiana, foi medida inicialmente o número de pacientes com isolados bacterianos encontrados na úlcera no início do estudo. Em seguida, foi avaliada a quantidade de pacientes com microrganismos erradicados após o tratamento. Dentre a família Enterobacteriaceae, para os grupos pexiganana tópica e ofloxacino, foi observada a redução, respectivamente, de 79% vs 75% na presença de *Escherichia coli* nos indivíduos; 83% vs 60% para *Enterobacter* sp.; 75% vs 87% para *Enterobacter cloacae* e 60% vs 71% para *Proteus mirabilis*, indicando que o uso clínico desse AMP pode representar uma alternativa terapêutica para tratamento dessa patologia.

O potencial dos AMPs como ferramenta para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos ativos já foi substancialmente observado. Comparando-os aos antibióticos convencionais, a ação da maioria dos AMPs pode ser extremamente rápida com efeitos bactericidas eficazes observados em concentrações reduzidas, bem próxima da concentração inibitória mínima (CIM). Além disso, somando-se a essas características, muitos AMPs apresentam um espectro amplo e próprio de atividade, conseguindo destruir patógenos multi-droga resistentes (Wiesner e Vilcinskas, 2010).

### **1.5. Resistência aos AMPs**

Devido ao seu complexo modo de ação, a resistência contra os AMPs pode ser bastante dificultada, já que seria o resultado de alterações profundas na estrutura da membrana bacteriana. Entretanto, não se pode ignorar o fato de que os patógenos adquirem a habilidade de perceber e responder aos AMPs, frequentemente resultando em redução da carga negativa do seu envelope celular devido a modificações específicas na sua superfície ou então promovendo a inativação proteolítica dos AMPs (Wiesner e Vilcinskas, 2010).

Já foi demonstrado que, na presença de concentrações crescentes de pexiganana, cepas de *E. coli* e *Pseudomonas fluorescens*, de uma forma geral, apresentaram uma evolução dos mecanismos de resistência aos AMPs, demonstrando que esse fenômeno pode acontecer em populações bacterianas através de seleção continuada (Perron *et al.*, 2006). Além disso, em *Salmonella enterica* foi observado o desenvolvimento de resistência bacteriana ao AMP PR-39, após adaptação bacteriana em concentrações subinibitórias do peptídeo (Pranting *et al.*, 2008).

Os mecanismos de resistência bacteriana em resposta a presença dos AMPs parecem ser, até o momento, bastante complexos e sem um padrão único (Pranting *et al.*, 2008; Maria-Neto *et*



*al.*, 2012). Para o desenvolvimento da resistência, aparentemente são necessário que dois elementos chaves combinem-se: a presença de um antimicrobiano capaz de inibir a maioria das bactérias presentes em uma colônia e em uma colônia heterogênea de bactérias, onde pelo menos uma destas bactérias carregue o determinante genético capaz de expressar resistência ao antimicrobiano (Paterson, 2006).

Portanto, acredita-se que a resistência aos AMPs ocorrerá ao longo do tempo, o que faz alusão à necessidade da busca pelo entendimento dos prováveis mecanismos moleculares bacterianos que podem estar envolvidos nessa resistência aos AMPs, no intuito de possibilitar a identificação de alvos terapêuticos promissores para a concepção racional de fármacos antimicrobianos pioneiros e eficazes (Bechinger, 2011). Nesse contexto, as ferramentas disponibilizadas pela transcriptômica e proteômica podem ser bastante importantes na busca pelo entendimento da resistência bacteriana e na validação de novos alvos.

## **1.6. Ômicas como estratégia de estudo da resistência bacteriana**

Atualmente, as análises do transcriptoma (perfil de expressão gênica) e proteoma (perfil de abundância protéica) de bactérias como a *E. coli*, têm sido amplamente realizadas através de diferentes ferramentas experimentais e analíticas com o objetivo de ilustrar uma pintura completa dos eventos bioquímicos que acontecem no interior das células (Taniguchi *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2011; Berthoumieux *et al.*, 2012; Ying *et al.*, 2013). Essas análises quando utilizadas em conjunto podem permitir um maior entendimento da fisiologia e do metabolismo celular global, possibilitando a identificação de conexões entre diferentes vias metabólicas e regulatórias ainda não esclarecidas (Yoon *et al.*, 2002; Berthoumieux *et al.*, 2012).

A proteômica, entendida como a análise em larga escala da expressão protéica, possibilita a identificação de centenas ou milhares de proteínas a partir de extratos protéicos complexos. Ela envolve a separação eletroforética ou cromatográfica, aliada à espectrometria de massa, possibilitando assim, a identificação de proteínas envolvidas diretamente em diferentes situações metabólicas e fisiológicas de um dado organismo, e ainda detectar modificações pós-traducionais (Anderson e Seilhamer, 1997).

De um modo geral, através da análise proteômica tem sido possível caracterizar determinado organismo, tecido, organela ou estrutura celular com a identificação do maior número possível de proteínas, ou ainda comparar apenas proteínas diferencialmente expressas fornecendo assim, informações complementares às obtidas através das técnicas genômicas (Fey e Larsen, 2001). A utilização desta tecnologia foi alavancada com o surgimento de novas estratégias para o sequenciamento de peptídeos, que incluem técnicas de ionização tais como, *electro-spray ionization* (ESI) e *Matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) bem como, a miniaturização das cromatografias líquidas, nano e alta pressão, que ao serem empregadas permitem a mensuração e identificação de peptídeos com melhor sensibilidade em amostras biológicas complexas (Mallick e Kuster, 2010). Cabe ainda ressaltar que, o uso em conjunto de 2D-LC ou a combinação de 1D PAGE e LC-MS tem contribuído para o crescimento da proteômica (Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2013).

Nos últimos anos as ferramentas da proteômica e transcriptômica têm sido empregadas em diversas áreas incluindo, a caracterização de genes e proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência a antibióticos (Lima *et al.*, 2013). A resistência bacteriana tem fundamentação em nível genético, indicando que mudanças na composição genética das bactérias previamente susceptíveis poderão acarretar em níveis diferenciados de expressão protéica, evidenciando possíveis proteínas envolvidas no mecanismo de resistência. Deste modo, as técnicas de

transcriptômica e proteômica têm sido empregadas com o intuito de tentar elucidar as modificações ocorridas em cepas resistentes quanto ao nível diferencial de transcrição de genes específicos e de determinadas proteínas, sejam eles envolvidos diretamente com a resistência a determinada droga ou simplesmente a uma alteração fisiológica que confere a cepa esta resistência (Peng *et al.*, 2005; Wright, 2005; Paterson, 2006; Kamensek e Zgur-Bertok, 2013).

Em *P. aeruginosa* resistentes a ampicilina, kanamicina, e tetraciclina foram encontrados 11 proteínas de membrana com expressão diferenciada observada por análises proteômicas, presentes na fração insolúvel a sarcosina, como as porinas OprD, OprF, OprG, OprL, e OmpH e a proteína MexA que compõe o maior sistema de bomba de efluxo presente em *P. aeruginosa* (Peng *et al.*, 2005; Nikaido, 2003). Através desta análise pôde-se averiguar que, todas as proteínas, com exceção a OprF, apresentaram níveis diferenciais de expressão de acordo com a presença de cada um dos antibióticos, indicando que o desenvolvimento de resistência provavelmente acontece por mecanismos distintos (Peng *et al.*, 2005; Dotsch, 2009).

No estudo proteômico de *Vibrio parahaemolyticus* resistente a AMPs, ao avaliar o subproteoma oriundo da membrana externa e interna revelou que esta resistência pode ser resultante de múltiplos mecanismos que incluem, a bomba de efluxo mediada pela super expressão do canal de exportação trans-membrânico denominado TolC e F1-ATPA bem como, a superexpressão de DLD que confere um aumento da biossíntese de fosfolipídeos e consequentemente uma reparação na membrana (Shen *et al.*, 2010).

Estudos de proteômica comparativa entre cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes a meticilina revelaram a superexpressão da enzima intracelular fosfoglicerato quinase nas variantes resistentes à meticilina, além disso, foram encontradas diversas enzimas relacionadas com a via biossintética das purinas bem como, LytM peptideoglicano hidrolase juntamente com SceD, uma provável transglicosilase, tiveram alta expressão e em contrapartida a redução de D-ALA-D-ALA

ligase que catalisa reações da via biossintética para a obtenção da parede celular do peptidoglicano resultando assim, em possíveis alterações da estrutura do peptidoglicano e consequentemente desencadeando a resistência de *S. aureus* frente a vancomicina (Pieper *et al.*, 2006).

Análises de 2-DE das proteínas diferencialmente expressas em *Mycobacterium tuberculosis* resistente a estreptomicina, um aminoglicosídeo, evidenciou a presença de chaperona 70 kDa, que apresenta 2 domínios sendo o domínio de ligação ao peptídeo e o domínio ATPase, indicando assim, a sua função relacionada ao enovelamento da proteína e também a superexpressão de chaperonina 60 kDa que pode neutralizar o efeito do antibiótico (Sharma *et al.*, 2009).

Nosso grupo identificou diferenças significativas entre o subproteoma citosólico das cepas de *E. coli* resistente e susceptível à magainina I, utilizando as análises proteômicas, sendo possível destacar a expressão diferencial de 41 proteínas nas linhagens de *E. coli* resistentes à magainina I, relacionadas com o metabolismo energético, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de aminoácidos, resposta a estresse e outras funções, como espessamento da parede celular, indicando uma intensa resposta metabólica (Maria-Neto *et al.*, 2012).

Os recentes progressos realizados no desenvolvimento combinado de métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ultra eficiência (UPLC), espectrometria de massas e bioinformática, têm possibilitado o acesso a uma infinidade de dados protéicos, que em conjunto com os géis de eletroforese bidimensional, permitem um grande progresso na expansão de tecnologias para análises proteômicas (Gevaert *et al.*, 2002; Zürbig, 2008). A análise proteômica combinada com a transcriptômica complementar pode auxiliar na interpretação dos perfis de expressão gênica relativa e validar a expressão de genes essenciais para os microrganismos.

As ferramentas transcriptômicas têm sido bastante utilizadas para a análise do conjunto de transcritos de uma determinada célula, ou uma população celular, que inclui mRNAs codificantes de proteínas e pequenos RNAs não-codificantes (por exemplo ribossomais, tRNAs, miRNAs), em diferentes organismos patogênicos, como norovírus (Batty *et al.*, 2013), *M. tuberculosis* (Cossu *et al.*, 2013), *E. coli* (Shivastava *et al.*, 2012), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Jorth *et al.*, 2013), *Campylobacter jejuni* (Taveirne *et al.*, 2013) e *Staphylococcus aureus* (Osmundson *et al.*, 2013).

Kamensek e Zgur-Bertok (2013) avaliaram a resposta de *E. coli* frente à colicina M, uma bactericina que inibe a síntese de peptidoglicano e demonstraram, por análises transcriptômicas, que concentrações subinibitórias de colicina M alteram a expressão de genes bacterianos envolvidos no envelope, estresse osmótico, motilidade celular e ainda relacionados com a produção de exopolissacarídeos e com o sistema CreBC, já conhecido por promover aumento na resistência contra colicina M e E2.

Metodologicamente, tecnologias que sejam eficazes para as análises transcriptômicas estão disponíveis e são largamente utilizadas, desde o desenvolvimento da técnica de microarranjo e o sequenciamento do genoma humano. Anteriormente, a análise da expressão de RNA mensageiro (mRNA) era avaliada apenas por microarranjo e técnicas de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Porém o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (NGS), como uma técnica sensível e rápida, possibilitou a obtenção de uma grande quantidade de sequências de alta qualidade para análise de perfil transcricional, a anotação de genomas inéditos e a descoberta de RNA não codificantes (Mutz *et al.*, 2013). O sequenciamento de nova geração, baseado em plataformas de sequenciamento capazes de gerar informações sobre milhões de pares de bases em uma única corrida, como observado nas plataformas Illumina®, oferece um meio robusto para a análise da expressão gênica global utilizando relativamente,

pequena quantidade de RNA e auxílio computacional para análise dos dados gerados (Jorth *et al.*, 2013; Osmundson *et al.*, 2013).

Dessa forma, a tecnologia do sequenciamento de nova geração revolucionou o sequenciamento dos genomas completos e as análises de transcriptomas (VanderNoot *et al.*, 2012; Taveirne *et al.*, 2013). Em particular, o sequenciamento de cDNA sintetizados à partir do RNA intracelular (RNA-seq), possibilita a análise do perfil de expressão gênica num dado momento celular, com grande alcance dinâmico e cobertura genômica, expandido o nosso conhecimento sobre os transcritos de RNA codificantes e servindo como importante ferramenta, no caso desse trabalho, para o estudo molecular da resistência de *E. coli* à magainina I. Nesse sentido, a proteômica e transcriptômica comparativa em associação, podem representar um avanço expressivo em direção à identificação de possíveis genes e/ou proteínas alvos diferencialmente expressos nas cepas resistentes quando comparadas às susceptíveis (Peng *et al.*, 2005; Paterson, 2006; Kamensek e Zgur-Bertok, 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

A resistência antimicrobiana de cepas bacterianas, geralmente associadas com maior permanência hospitalar, maior custo de tratamento, maior debilitação do paciente e aumento na mortalidade, tornaram-se um grave problema mundial de saúde pública e apesar de intervenções substanciais com o objetivo de prevenir a emergência ou a disseminação de bactérias fármaco-resistentes, os índices continuam aumentando, o que implica na necessidade crescente de fármacos mais efetivos e um maior conhecimento sobre os mecanismos de resistência desenvolvidos por esses patógenos. Atualmente são descritos casos de resistência bacteriana em praticamente todas as espécies, em decorrência da enorme capacidade adaptativa das mesmas, como no caso das enterobactérias, em destaque a *E. coli*, que estão frequentemente associadas às infecções nosocomiais. Nesse contexto as análises transcriptômica e proteômica poderão propiciar maior conhecimento dos genes e das proteínas expressas, respectivamente, por cepas resistentes e a sua caracterização molecular e funcional como alvos terapêuticos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos e conseqüentemente um maior conhecimento dos mecanismos de resistência desenvolvidos frente aos AMPs, tendo em vista a necessidade emergente da busca de quimioterápicos alternativos para o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos resistentes.

### **3. HIPÓTESE**

Existem genes transcritos e proteínas expressas diferencialmente correlacionadas com a resistência de *Escherichia coli* ao peptídeo antimicrobiano magainina I, que podem representar alvos moleculares promissores para a busca e o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos inéditos para tratamento de infecções associadas a bactérias resistentes.



## **4. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Identificar transcritos e proteínas diferencialmente expressas em cepas de *E. coli* ATCC 8739 resistentes ao peptídeo antimicrobiano magainina I como subsídeo para a elucidação dos prováveis mecanismos moleculares envolvidos na resistência da cepa através de análises transcriptômica e proteômica comparativas.

### **Objetivos Específicos**

**4.2.1.** Realizar a caracterização bioquímica das linhagens de *E. coli* utilizadas no estudo e validar a utilização do MALDI-TOF MS para discriminação entre as linhagens susceptíveis e resistentes à magainina I;

**4.2.2.** Verificar a especificidade de resistência das linhagens de *E. coli* em relação aos antibióticos convencionais e AMPs da mesma família da magainina I;

**4.2.3.** Identificar os genes diferencialmente transcritos na linhagem resistente à magainina I, na presença ou ausência deste AMP, por comparação com a linhagem susceptível controle, utilizando sequenciamento de nova geração;

**4.2.4.** Determinar as proteínas diferencialmente expressas no lisado bacteriano total através de análise por LC-MS e identificar proteínas exclusivas nas linhagens resistentes à magainina I.

**4.2.5.** Identificar as proteínas diferenciais presentes no secretoma bacteriano por eletroforese bidimensional.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Obtenção de *E. coli* resistente e susceptível à magainina I.

As linhagens resistentes (R1, R2 e R3) e susceptíveis (C1, C2 e C3) à magainina I foram obtidas a partir da cepa *E. coli* ATCC 8739 (*American Type Culture Collection*, iniciais do inglês). Para a obtenção destas linhagens, foi utilizado o protocolo previamente estabelecido por Maria-Neto *et al.* (2012) (Figura 4), no qual um pré-inóculo foi preparado utilizando uma colônia de *E. coli* desta cepa ATCC 8739 cultivada em meio Luria Bertani (LB) a 37 °C por 16 h sob agitação de 240 rpm. A indução ou não da resistência bacteriana foi realizada utilizando 100 µL desse pré-inóculo cultivado em 2,5 mL de meio LB por 37 °C sob agitação de 240 rpm até atingir a metade da fase exponencial, a qual foi monitorada pela medição da densidade óptica (D.O.) a 595 nm. Em seguida  $5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> do inóculo foi transferido para 100 mL de meio LB na ausência ou presença da metade da CIM (concentração inibitória mínima) de magainina I (Sigma-Aldrich), permanecendo incubado por 2 h, a 37 °C e agitação de 240 rpm. Este procedimento foi repetido por 10 propagações sucessivas e após a última propagação, as suspensões bacterianas foram semeadas em meio LB-ágar e incubadas em estufa a 37 °C por 16 h. Em seguida, uma colônia de cada réplica biológica resistente ou susceptível foi selecionada, sendo denominadas de C1, C2 e C3 e R1, R2 e R3, para as linhagens susceptíveis e resistentes à magainina I, respectivamente. Para a manutenção deste material, foram preparados pré-inóculos contendo  $5 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de cada colônia isolada, que permaneceram armazenados a - 80 °C em glicerol 10% até utilização nos experimentos subsequentes (Figura 4).

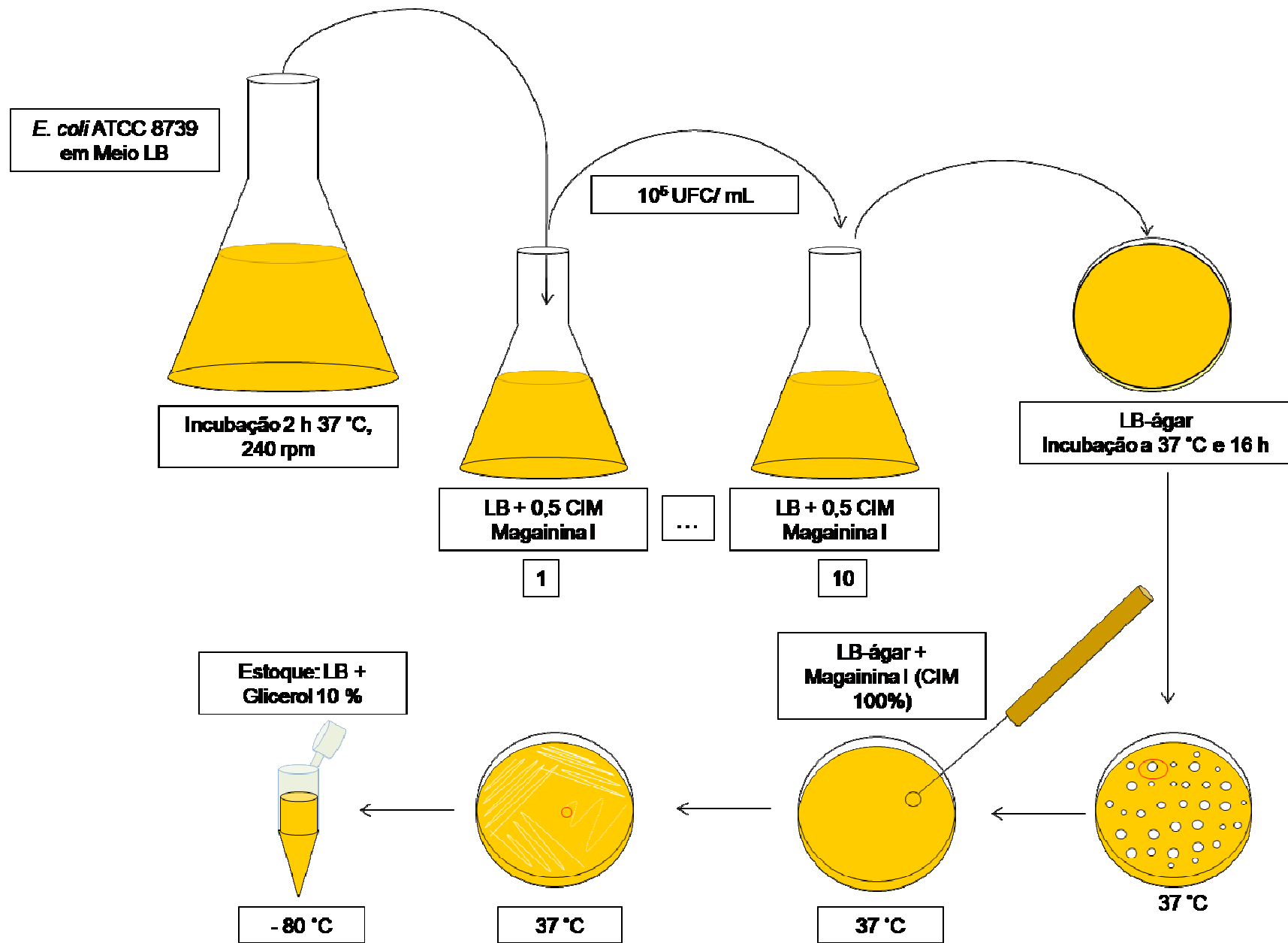


Figura 4. Processo de seleção das colônias de Escherichia coli resistentes à magainina I (R1, R2 e R3).

## **5.2. Identificação das linhagens de *E. coli* através dos sistemas microbiológicos automatizados**

Os pré-inóculos das linhagens de *E. coli* controle (C1, C2, C3) e resistentes à magainina I (R1, R2, R3) foram plaqueados em meio LB-ágar e sub-cultivados em placas contendo meio MacConkey-ágar a 37 °C por 16 h. Após o período de incubação, a suspensão bacteriana para o sistema automatizado MicroScan® WalkAway® (Siemens), foi preparada utilizando o sistema *Prompt™ Inoculation* para seleção da quantidade de colônias adequadas, que foram diluídas em uma solução padronizada do fabricante para todas as linhagens testadas e o painel de teste MC50 foi carregado com o auxílio do inoculador *Renok rehydrating*. Já a suspensão bacteriana para o sistema automatizado VITEK® 2 (bioMérieux), foi preparada utilizando 1-3 colônias de cada linhagem diluídas em salina 0.9%. A turbidez foi medida com o equipamento DensiChek® (bioMérieux), ajustada para o padrão 0.5 McFarland de acordo com as instruções do fabricante e esse inóculo foi imediatamente utilizado para carregar o cartão ID-GNBcard. Para a identificação bacteriana através desses sistemas automatizados, os resultados bioquímicos obtidos após o período de incubação da amostra são comparados com um banco de dados taxonômicos do software de cada equipamento e um cálculo de probabilidade numérica foi realizado para determinar um valor de proximidade entre o resultado obtido e o descrito no banco de dados. Baseado nesse cálculo numérico de probabilidade, diferentes níveis de confiabilidade de identificação são obtidos, sendo 96-99% de probabilidade, considerado excelente; 93-95%, muito bom; 89-92%, bom; 85-88%, aceitável e outros valores diferentes são classificados como baixa discriminação ou organismo não identificado.

### **5.3. Identificação das linhagens de *E. coli* por MALDI-TOF MS**

No intuito de identificar as linhagens utilizadas e diferenciar entre as resistentes e as susceptíveis à magainina I, as análises de MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) e BioTyper foram utilizadas. As linhagens de *E. coli* susceptíveis à magainina I (C1, C2 e C3) e resistentes à magainina I (R1, R2 e R3) foram cultivadas a 37 °C por 12 h em LB-ágar e posteriormente, 6 colônias de cada linhagem foram separadamente homogeneizadas em 1 mL de etanol 70%. As suspensões foram centrifugadas a 13.000 g por 2 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 10 µL de solução de extração contendo acetonitrila (100%) e ácido fórmico (70%) na proporção 1:1 (v/v). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13.000 g por 2 min a 4 °C e uma alíquota de 1 µL do sobrenadante foi aplicada sobre a placa do MALDI (Bruker Daltonics). Em seguida, uma alíquota de 1 µL de solução matriz CHCA (*α*-cyano-4-hydroxycinnamic acid, do inglês) em 50% acetonitrila e 0.3% ácido trifluoroacético foi adicionada sobre o poço contendo a amostra. As amostras foram analisadas no espectrômetro de massas MicroFlex LRF (Bruker Daltonics), em modo linear positivo, usando o método MBT. Foram obtidos 24 espectros de cada linhagem com uma faixa de detecção de massas entre 2.000 a 20.000 Da.

### **5.4. Análise espectrométrica através do Bruker MALDI BioTyper**

Os espectros adquiridos para cada linhagem foram normalizados e comparados com o banco de dados do MALDI Biotyper versão 3.0, o qual contém 3995 microrganismos de referência até o momento da comparação. A análise dos perfis protéicos foi conduzida de acordo com os parâmetros do algoritmo de reconhecimento padrão e a identificação do microrganismo foi interpretada de acordo com o valor de log

obtido após análise, definido entre um intervalo de 0-3.0, comparando-se a lista de massas da linhagem desconhecida com a lista de massas do banco de dados de referência. Um valor (log) próximo de 2.0 é considerado uma boa correlação em nível de espécie (Mellmann *et al.*, 2009).

### **5.5. Dendrograma do tipo MSP**

Com o objetivo de diferenciar as linhagens bacterianas resistentes das susceptíveis à magainina I, os 24 espectros adquiridos pelo MALDI-TOF MS para cada linhagem, foram utilizados para a construção de um espectro médio principal (MSP, do inglês). A partir dos MSPs de cada amostra foi construído um dendrograma do tipo MSP utilizando o programa flexAnalysis (Bruker Daltonics), que por sua vez, analisa os 100 íons mais frequentes e intensos entre uma faixa de detecção de massas entre 3.000 a 15.000 Da, com uma resolução definida de 1.0, fator de compressão de 10, tolerância de distância de 300, tolerância de íons de 25, função de correção de intensidade de 0.25, linha de base subtraída e intensidade refinada de acordo com o algoritmo Savitzky Golay. Para a diferenciação bacteriana, as linhagens de *E. coli* resistentes e susceptíveis à magainina I foram comparadas entre si e agrupadas no dendrograma do tipo MSP.

### **5.6. Teste de susceptibilidade antimicrobiana através dos sistemas MicroScan e VITEK**

As suspensões bacterianas de todas as linhagens susceptíveis e resistentes à magainina I (C1, C2 e C3 e R1, R2 e R3), foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante como descrito no item (.5.2) acima para a identificação das linhagens através dos sistemas microbiológicos automatizados. Os testes de susceptibilidade antimicrobiana (AST, do inglês) foram realizados utilizando o painel

de teste MC50 para o sistema MicroScan® WalkAway® (Siemens) e o cartão de teste AST-N105 para o sistema VITEK® 2 system (bioMérieux). A avaliação do fenótipo de resistência bacteriana foi realizada para um amplo espectro de antibióticos convencionais utilizados na clínica médica, como amicacina, ampicilina, amoxicilina/clavulanato, aztreonam, cefepima, cefotaxima, cefoxitina, cefazolina, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacino, gentamicina, levofloxacino, meropenem, imipenem, ertapenem, piperacilina, piperacilina/tazobactam, tetraciclina, ticarcilina/clavulanato, tobramicina e trimetoprima/sulfametoxazol através do sistema MicroScan e amicacina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, aztreonam, cefalotina, cefepima, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ciprofloxacino, colistina, gentamicina, meropenem, imipenem, ertapenem e tigeciclina através do sistema VITEK 2. Após a incubação, os sistemas automatizados calcularam a CIM para cada antimicrobiano testado e as linhagens foram classificadas como susceptível (S), intermediária (I) e resistente (R) de acordo com os critérios de interpretação de susceptibilidade/resistência para a CIM descritos no documento M100-S22 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, iniciais do inglês) (CLSI, 2012 a).

### **5.7. Avaliação da susceptibilidade aos peptídeos antimicrobianos**

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês) magainina I (Peptide 2.0 Inc, USA), cecropina P1, PMAP-23 (*porcine myeloid antimicrobial 23-amino-acid peptide*, do inglês) e PR-39 (*proline-arginine-rich 39-amino-acid peptide*, do inglês) (Hanhong Chemical, China) foram sintetizados pelo método Fmoc. Esses peptídeos foram selecionados para avaliação da susceptibilidade devido a duas características principais: pertencem à mesma família da magainina, a família catelicidina e, além disso, a cecropina P1 e o PMAP-23 têm mecanismo de ação similar ao da magainina I. Em

contraposição, o PR-39 apresenta um modo de ação completamente diferente, permitindo posteriormente a comparação entre esses outros peptídeos e a magainina I. O pó liofilizado desses peptídeos foi reconstituído em água ultrapura estéril (Milli-Q) e acondicionado no  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso. A concentração e pureza ( $> 95\%$  de pureza) foram verificadas por análise de espectrometria de massas utilizando o espectrômetro de massas Autoflex Speed (Bruker Daltonics) pelo método MBT, em modo positivo linear, com faixa de detecção de massas de 500 a 5.000 Da. Para determinar as CIMs dos peptídeos, todas as linhagens de *E. coli* foram testadas em uma microplaca de polipropileno de 96 poços através do método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo descrito no documento M07-A9 do CLSI (CLSI, 2012 b). As suspensões bacterianas foram inoculadas separadamente na concentração final de  $5 \times 10^5$  CFU. mL<sup>-1</sup> em meio LB contendo os peptídeos nas concentrações crescentes de 1,2  $\mu\text{M}$  até 124  $\mu\text{M}$ . Água Milli-Q e meio LB sem peptídeos foram utilizados como controles negativos e cloranfenicol 99  $\mu\text{M}$  foi utilizado como controle positivo de inibição do crescimento. As microplacas foram incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 h com agitação de 40 rpm e após o período de incubação foi medido o crescimento bacteriano através de leitura da D.O. da suspensão a 595 nm no leitor de microplacas (Biotek). O experimento foi realizado em triplicata.

## **5.8. Análises proteômicas das linhagens susceptíveis e resistentes à magainina I**

### **5.8.1. Obtenção das amostras protéicas do lisado e do secretoma bacteriano**

Foram utilizados pré-inóculos das linhagens de *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* resistentes à magainina I (R1, R2 e R3) e *E. coli* susceptíveis à magainina I (C1, C2 e C3) obtidos conforme protocolo previamente estabelecido por MARIA-NETO *et al.*, 2012. Os pré-inóculos dessas linhagens de *E. coli* foram cultivados em 50 mL de meio



Luria Bertani (LB) a 37 °C por 16 h sob agitação de 240 rpm e ao final desse processo foi realizada a medição da D.O. a 595 nm. Essas suspensões bacterianas foram inoculadas individualmente na concentração de  $5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, que corresponde a D.O. de 0.05 UA, em 2 L de meio LB e permaneceram incubadas a 37 °C, sob agitação de 200 rpm por 3 h. Após o período de incubação todo o volume foi coletado e imediatamente centrifugado a 4000 rpm, 4 °C por 10 min separando-se o sobrenadante e o sedimento que foram utilizados nos experimentos subsequentes (Figura 5).

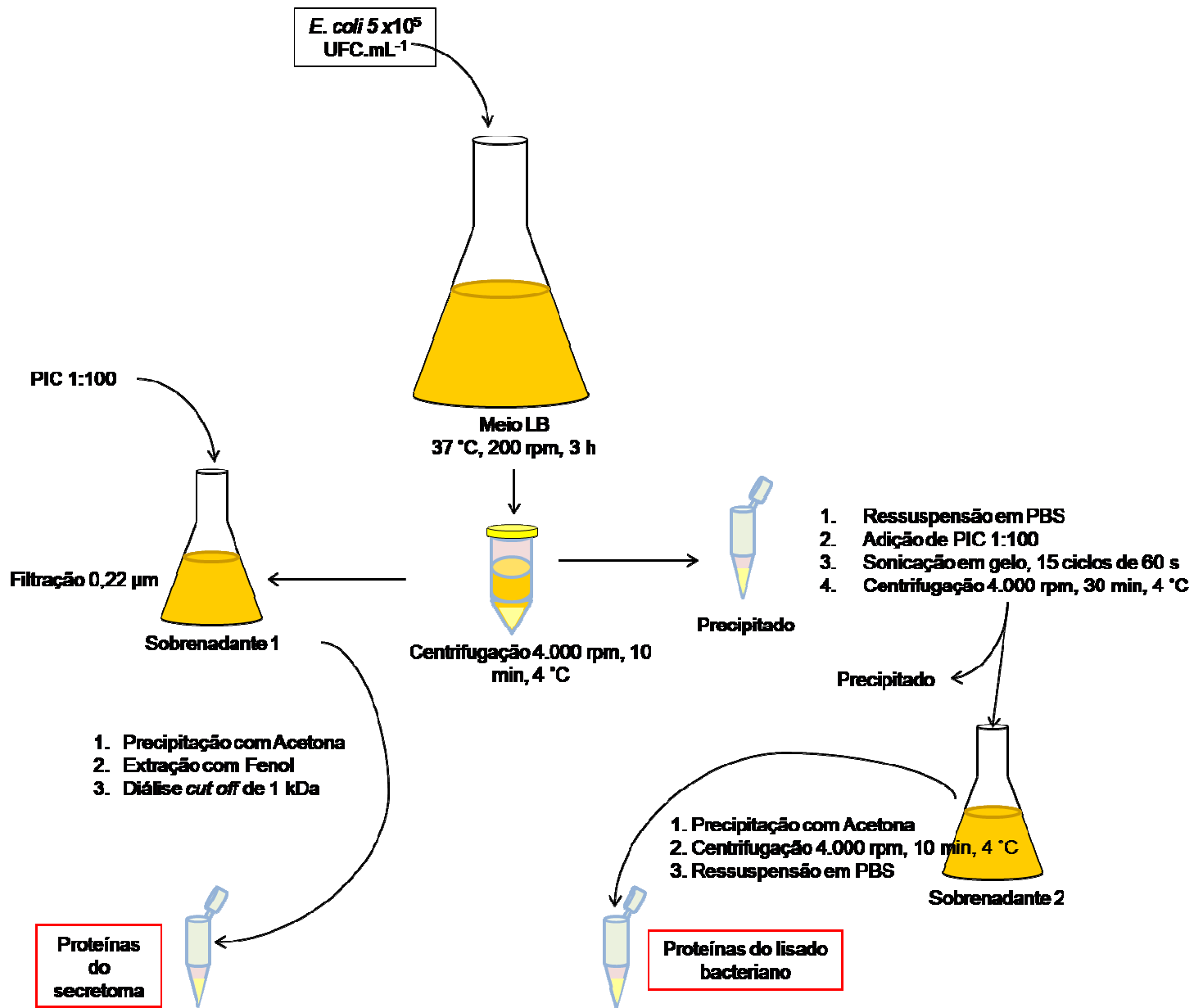


Figura 5. Protocolo padronizado para obtenção das proteínas do secretoma e do lisado total bacteriano.

## **5.8.2. Lisado bacteriano**

### **5.8.2.1. Precipitação e extração das proteínas do lisado bacteriano total**

O sedimento celular obtido conforme descrito anteriormente (item 5.8.1.) foi ressuspensionado em tampão fosfato-salina (PBS, do inglês), estabilizado com PIC 1:100 (v/v) e submetido a lise celular por sonicação em banho de gelo (Figura 2). O período de sonicação utilizado foi de 60 segundos com 60 segundos de intervalo por 15 ciclos. Em seguida o lisado bacteriano contendo as proteínas totais foi centrifugado a 4000 rpm, 4 °C por 30 min para remoção de fragmentos celulares e células não rompidas. O sobrenadante obtido foi utilizado para extração protéica com acetona PA (Vetec) a - 20 °C na proporção de 3:1 (v/v) por 16 h a 4 °C. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4000 rpm e 4 °C e os sedimentos ressuspensionados em PBS. As amostras protéicas do lisado foram quantificadas a 750 nm utilizando o kit *RCDC protein assay* (BioRad) e utilizadas para análise no LC-MS.

### **5.8.2.2. Preparação da amostra protéica do lisado para aquisição no LC-MS**

As amostras protéicas do lisado bacteriano de *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* susceptíveis C1-3 e *E. coli* resistentes R1-3, obtidas conforme descrito previamente (item 5.8.1.) foram digeridas com tripsina em triplicata para leitura em nanoUPLC-MS<sup>E</sup>. Foram transferidos 100 µL de cada amostra, contendo 100 µg de proteína total (estoque a 1µg. µL<sup>-1</sup>) para tubos de microcentrífuga. Adicionou-se 20 µL de 50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> (Vetec) e 50 µL de solução RapiGest SF (Waters). O material foi levado ao agitador vórtex (Diagger<sup>®</sup>), incubado a 80 °C por 15 min e submetido à pequena centrifugação por 15 segundos. Foram adicionados 5 µL de 100 mM dithiothreitol (GE Healthcare) e em seguida, a amostra foi agitada e incubada a 60 °C por 30 min. Após o período de incubação as amostras foram deixadas a T. A., até esfriamento e

centrifugadas rapidamente por 15 segundos. Adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de 300 mM iodoacetamida (GE Healthcare), agitou-se e permaneceram incubando por 30 min a T. A. e protegido da luz. Após, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de solução tripsina (Promega) em 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (Vetec) na concentração de 1:100 enzima:proteína, as amostras foram agitadas novamente e incubadas a 37 °C por 16 h para digestão. Seguida a digestão, para hidrólise e precipitação do surfactante, 20  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético 5% (Mallinckrodt) foram adicionados, novamente as amostras foram levadas ao agitador e foram incubadas a 37 °C por 90 min. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 14000 rpm, 6 °C por 30 min, o sobrenadante transferido para tubo de microcentrífuga novo e evaporado em concentrador a vácuo (Labconco). As amostras foram ressuspendidas em 195  $\mu\text{L}$  de formato de amônio (Sigma-Aldrich) e foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de Fosforilase B (*MassPREP<sup>TM</sup> Digestion Standard Phosphorylase b*, Waters) como padrão de digestão protéica (concentração final de 50 fmol.mL<sup>-1</sup>). As amostras digeridas foram então transferidas para o frasco tipo *vial* de 12x32 mm (Waters), etiquetadas e encaminhadas para aquisição.

### **5.8.2.3. Aquisição de espectros no LC-MS**

Foram utilizados métodos modificados conforme descrito por Murad *et al.* (2011). A separação em nano escala dos fragmentos trípticos foi executada usando um sistema cromatográfico nanoACQUITY<sup>TM</sup> system (Waters Corp.) com tecnologia 2D por diluição. A primeira dimensão (1D) foi feita usando uma coluna XBridge<sup>TM</sup> 300 mm x 50 mm nanoEase<sup>TM</sup> BEH130 C18 com 5  $\mu\text{m}$  de partícula. A segunda dimensão (2D) foi feita usando uma pré-coluna Symmetry C18 5  $\mu\text{m}$ , 5-mm x 300- $\mu\text{m}$  e uma coluna analítica HSST3 C18 1.8 $\mu\text{m}$  particle, 75  $\mu\text{m}$  x 150 mm ambas de fase reversa (Waters). Na 1D, a fase móvel A foi uma solução de 20 mM de

formato de amônio, e a fase móvel B foi acetonitrila. Na corrida 2D a fase móvel A foi uma solução de 0.1% de ácido fórmico em água, e a fase móvel B foi 0.1% de ácido fórmico em acetonitrila. Inicialmente foram transferidos 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra para a coluna da 1D em 0.5 min à 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 0.1% B. Os peptídeos da primeira fração foram eluídos na 1D à 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 10.8% da fase móvel B por 2 min e diluída na pré-coluna da 2D usando solução aquosa de ácido fórmico 0.1% em um fluxo de 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  por 8.5 min. Os peptídeos foram separados usando um gradiente de 7-35% B por 37 min num fluxo de 500  $\eta\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  seguido de uma lavagem de 5 min com 85% da fase móvel B. A coluna foi reequilibrada às condições iniciais por 10 min. A temperatura da coluna foi mantida à 35°C. A injeção foi configurada de modo a aplicar o conteúdo exato do *loop* de injeção. Os peptídeos da segunda, terceira, quarta e quinta frações foram eluídos utilizando 14%, 16,7%, 20,4% e 50% de fase móvel B, respectivamente. As condições da diluição, fluxo e separação na 2D foram as mesmas da primeira fração. A massa de correção *lock mass* Glu-fibrino peptide (GFP) foi injetada no spray de referência *NanoLockSpray* do espectrômetro de massas utilizando o sistema fluídico do SynaptG2 usando um fluxo constante de 200  $\eta\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  em uma concentração de 320 fmol da GFP. Os peptídeos trípticos foram analisados usando um espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS™ (Waters, Manchester, UK). Para todas as análises o espectrômetro foi operado em modo positivo utilizando um *nanoSpray* e com resolução de no mínimo 20000 *full-width half-maximum* (FWHM). O analisador foi calibrado externamente utilizando as massas dos íons b<sup>+</sup> e y<sup>+</sup> da GFP com m/z 50 até 2000 e com correção pós aquisição usando o valor de m/z da dupla carga do precursor de GFP  $[M + 2H]^{2+} = 785.8426$ . A massa do *spray* de referência foi amostrada com intervalos de 30 s. As massas exatas por tempo de retenção (*Exact mass retention time* - EMRT, iniciais do inglês) foram adquiridas em aquisição independente alternando de baixa para alta energia. O espectro contínuo foi coletado, em cada modo, em 1.5 s com um atraso de *scan* de 0.1 s. Em modo de

baixa energia (*MS mode*) foi usado 3 eV de energia de colisão constante. Em modo de energia elevado (*fragmentation*) foi usado uma rampa de 12 à 45 eV durante os 1.5 *scans*. A radio frequência do quadrupolo foi ajustada para que íons entre m/z 50 à 2000 fosse transmitida eficientemente garantindo que íons menores que 50 m/z sejam provenientes da separação dentro da célula de *T-WAVE*.

#### **5.8.2.4. Processamento de dados e identificação protéica por LC-MS**

Os espectros de massa obtidos do nanoUPLC-MS<sup>E</sup> foram processados utilizando-se o *software ProteinLynx Global Server (PLGS)* versão 3.0. A identificação de proteínas foi mediada pelo algoritmo de contabilização de íons do *software* incorporado ao programa (Li *et al.*, 2009; Geromanos *et al.*, 2009) e realizando-se a comparação com o banco de dados de *Escherichia coli*, incluindo-se as sequências dos padrões de digestão Mass PREP (MPDS) Phosphorilase-B. Para análise de quantificação protéica, a medida de intensidade observada de três peptídeos protótipos de cada proteína foi quantificada à partir da intensidade medida dos peptídeos protótipos identificados do padrão externo utilizando-se algoritmos dedicados (Silva *et al.*, 2005). A identificação de proteínas foi executada atendendo os seguintes critérios: no mínimo um fragmento por peptídeo, no mínimo 3 fragmentos por proteína, no mínimo um peptídeo por proteína, modificações variáveis de acetilação no N-terminal, N desaminação, Q desaminação e oxidação M, modificação fixa de C-carbamidometil, taxa de 4% de falsos positivos, proteína de calibração P00489, concentração de proteína de calibração de 250 fmol, digestão executada por tripsina e permitido o erro de clivagem em 1. Foram separadas as proteínas comuns, exclusivas e diferenciais (aumentadas e/ou diminuídas) entre cada um dos grupos experimentais usando-se o PLGS, onde para análise de proteínas aumentadas e/ou diminuídas foi utilizada a razão

logarítmica das concentrações de proteínas em fmol com autonormalização dos dados. O valor de p utilizado afirma se a expressão de proteína encontra-se aumentada ( $p > 0,95$ ) ou diminuída ( $p < 0,05$ ). Qualquer valor entre esses extremos indicou ausência de alteração na expressão das mesmas. Proteínas que repetem sua expressão tanto nas réplicas biológicas, quanto nas técnicas foram consideradas proteínas comuns aos diferentes grupos, proteínas exclusivas foram consideradas as proteínas presentes em um grupo específico com base nas réplicas. Em adição, dentro de cada grupo, as proteínas foram separadas de acordo com a sua função celular utilizando a base de dados do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) para busca de possíveis marcadores de resistência bacteriana.

### **5.8.3. Secretoma bacteriano**

#### **5.8.3.1. Precipitação e extração das proteínas do secretoma bacteriano**

Após o processo descrito no ítem 5.8.1., o sobrenadante obtido contendo as proteínas secretadas durante o crescimento bacteriano foi denominado de secretoma. Esse material foi estabilizado com coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:100 (v/v) e filtrado em membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Figura 5). As amostras correspondentes ao secretoma das linhagens resistentes (R1, R2 e R3) e susceptíveis à magainina I (C1, C2 e C3) foram utilizadas para obtenção dos extratos protéicos conforme protocolo adaptado de Wang *et al.*(2003) e Wang *et al.*(2006). O protocolo de extração foi padronizado utilizando-se acetona PA (Vetec) a - 20 °C na proporção de 3:1 (v/v). Esse material foi incubado por 16 h a 4 °C e posteriormente centrifugado por 10 min a 4000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 10 mL de tampão de solubilização, contendo sacarose 30% (m/v), SDS 2% (m/v), Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 e  $\beta$ -mercaptoetanol 0.5% (v/v). Adicionou-se o mesmo

volume de fenol tamponado com Tris-HCl pH 10.5 (Promega), essa mistura foi agitada no vórtex e centrifugada a 4000 rpm, 4 °C por 5 min para separação das fases fenólica e aquosa. A fase fenólica foi coletada e 3.7 volumes de solução de acetato de amônio 0.1 M em metanol PA foi adicionada. As amostras foram incubadas a - 20 °C por 16 h. Após esse período de incubação as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, 4 °C por 15 min e o precipitado foi lavado duas vezes com 10 mL de solução de acetato de amônio 0.1 M em metanol PA e 2 vezes com acetona PA, ambas soluções previamente refrigeradas a - 20 °C. Em seguida as amostras foram submetidas a 10 min de secagem a T. A. para remoção da acetona residual e então ressuspensas em tampão de ressuspensão contendo SDS 2% (m/v), glicerol 5% (v/v) e Tris-HCl 0.1 M pH 8.0. As amostras protéicas obtidas foram dialisadas (*cut off* de 1 kDa) contra água destilada, quantificadas a 750 nm utilizando o kit *RCDC protein assay* (BioRad) e estocadas a - 20 °C até sua utilização.

### **5.8.3.2. SDS-PAGE**

As frações protéicas quantificadas do lisado e do secretoma das linhagens susceptíveis e resistentes à magainina I foram analisadas inicialmente por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (gel empilhador a 3,9% e o separador a 12%) sob condições desnaturantes e redutoras para verificação do perfil protéico (Laemmli, 1970). Foram utilizados 50 µg de cada fração protéica acrescida de 5 µL de tampão de amostra contendo Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 10% (m/v), Glicerol 30% (v/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,04% (m/v). Essas frações foram fervidas por 5 min e aplicadas no gel. Como padrão molecular foi utilizado o marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados com azul de Coomassie e/ou coloração de prata para visualização das bandas protéicas.



### **5.8.3.3. Eletroforese bidimensional (2-DE)**

As amostras do secretoma bacteriano das linhagens susceptíveis (C1-3) e resistentes (R1-3) à magainina I foram analisadas por 2-DE. A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada no sistema eletroforético Ettan™ IPGphor 3 (GE Healthcare). As proteínas do secretoma em concentrações variando de 1mg à 3 mg, foram ressuspensas em solução de reidratação (CHAPS 2%, uréia 8 M, DTT 20 mM e tampão IPG 0,5% (GE Healthcare) e aplicadas em uma *immobiline DryStrip* de 13 cm, pH não linear de 3-11 (GE Healthcare), a qual permaneceu incubada nessa solução por 18 h, a 18 °C para reidratação. A IEF foi realizada sequencialmente a 250 V por 4 h, gradiente até 1.000 V em 30 min, gradiente até 5.000 V em 1,5 h e 5.000 V por 1 h. Quatro réplicas técnicas de IEF foram realizadas a 50  $\mu$ A/*strip* e temperatura constante de 20 °C. Após a primeira dimensão, as *strips* foram incubadas por 15 min em tampão 1 contendo uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), Tris-HCl 50 mM pH 8,8 e DTT 0,1% (p/v) e em tampão 2 contendo uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), Tris-HCl 50 mM pH 8,8 e iodoacetamida 4% (p/v), respectivamente. A segunda dimensão foi realizada em gel 12% e 1,0 mm de espessura, no equipamento Dalt-6 (GE Healthcare) a 600 V, 90 mA e 100 W por 30 min e 700 V, 240 mA e 100 W durante o tempo necessário para o término da corrida. Como padrão molecular foi utilizado o marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados com azul de Coomassie.

## **5.9. Análise transcriptômica das linhagens susceptível e resistente à magainina I**

### **5.9.1. Extração de RNA total**

Para a análise transcriptômica foram selecionadas as linhagens C1, susceptível à magainina I e R3, resistente à magainina I, as quais foram cultivadas separadamente na presença

ou na ausência de magainina I, em cada uma das linhagens. Cada tratamento experimental foi realizado em triplicatas independentes, totalizando no final 12 amostras biológicas cultivadas. Inicialmente, 500  $\mu\text{L}$  das suspensões bacterianas estoques de C1 e R3 foram inoculadas em 5 mL de meio LB e permaneceram incubadas a 37 °C por 16 h sob agitação de 240 rpm. Após o período de incubação, 1 mL de cada pré-inóculo foi transferido para 4 mL de LB livre de magainina e para 4 mL de LB contendo 0.5 x CIM de magainina I. As amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação de 240 rpm por 7 h e em seguida, foram transferidos  $1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de cada inóculo para 10 mL de meio LB e para 10 mL de meio LB contendo 0.5 x CIM de magainina I. Essas suspensões bacterianas ficaram incubadas a 37 °C, sob agitação de 240 rpm por 16 h. Posteriormente, o volume total das quatro suspensões bacterianas (C1 sem magainina; C1 com magainina; R3 sem magainina e R3 com magainina) foram centrifugadas separadamente a 3200 g, 4 °C por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular utilizado para a extração de RNA total. A extração de RNA total foi realizada utilizando o kit RNeasy® Protect Bacteria (Qiagen). Brevemente, o sedimento de cada amostra foi ressuspensionado em 500  $\mu\text{L}$  do reagente RNAprotect Bacteria®, transferido para tubo de 2,0 mL, homogeneizado em vórtex por 5 s, incubado por 5 min à temperatura ambiente (T. A.) e centrifugado por 10 min a 5000 g. O sobrenadante foi completamente descartado e o sedimento ressuspensionado em 200  $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris-HCl 30 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) contendo lisozima 15 mg.mL<sup>-1</sup> (Qiagen). As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 s e incubadas a T. A. por 10 min. Durante a incubação as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 s a cada 2 min. Após incubação foi adicionado 700  $\mu\text{L}$  de tampão de lise RLT (Qiagen), contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 10  $\mu\text{L}$ .mL<sup>-1</sup> e as amostras foram homogeneizadas vigorosamente em vórtex por 10 s e transferidas para tubo contendo 25 mg de pérolas de vidro (150-600  $\mu\text{m}$  de diâmetro). As suspensões foram submetidas à lise celular no TissueLyser® por 5 min em velocidade máxima, centrifugadas por 1 min a

11000 g e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Ao sobrenadante foram adicionados 470  $\mu\text{L}$  de etanol 100%, homogeneizado e o volume total foi transferido para a coluna de purificação (Qiagen). Essa coluna foi centrifugada a 8000 g por 1 min. O eluído foi descartado e adicionaram-se 350  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem RW1 (Qiagen) sendo a coluna centrifugada por 1 min a 8000 g e o eluído descartado. Esse procedimento foi realizado por 2 vezes. Em seguida, foi preparada uma mistura contendo 10  $\mu\text{L}$  de DNase I 2,7  $\text{u.}\mu\text{L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich) e 70  $\mu\text{L}$  de tampão RDD (Qiagen). Essa mistura foi homogeneizada por inversão e transferida diretamente para a membrana da coluna de purificação. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 min e posteriormente adicionou-se 350  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem RW1, incubou-se por 5 min à T. A. e centrifugou-se a 8000 g por 1 min. O eluído foi descartado e a coluna transferida para novo tubo de 2,0 mL. Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de tampão RPE à coluna e centrifugou-se a 8000 g por 30 s. e o procedimento foi repetido. A coluna foi centrifugada por 2 min a 8000 g e posteriormente transferida para um tubo novo de 1,5 mL. Adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase diretamente à membrana da coluna, incubou-se por 1 min à T. A. e centrifugou-se a 8000 g por 1 min para eluição do RNA. Esse último passo foi repetido mais uma vez. O RNA total extraído foi quantificado utilizando o kit Qubit® RNA BR (Invitrogen) e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0.7% corado com brometo de etídeo 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de remoção de RNA ribossomal (rRNA).

### **5.9.2. Remoção de RNA ribossomal**

A remoção de rRNA foi realizada utilizando o kit Ribo-Zero™ Magnetic Gram Negative Bacteria (Epicentre). Inicialmente 1350  $\mu\text{L}$  de pérolas magnéticas foram pipetadas (255  $\mu\text{L}$  por reação) em um tubo de 1,5 mL livre de RNase. Para lavagem das pérolas magnéticas, o tubo foi

incubado por 2 min no suporte magnético e o sobrenadante foi removido e descartado. Em seguida, o tubo foi removido da estante magnética, adicionou-se 1350  $\mu$ L de água livre de RNase e o mesmo foi homogeneizado em vórtex à velocidade média. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Ao final desse processo de lavagem, o tubo foi removido da estante magnética e adicionou-se 360  $\mu$ L de tampão *Magnetic Bead Resuspension Solution* (Epicentre) e as pérolas foram homogeneizadas em vórtex à velocidade média. Em seguida, foram aliquoteados 65  $\mu$ L dessa mistura em 6 tubos novos de 1,5 mL livres de RNase e adicionou-se 1  $\mu$ L do inibidor RiboGuard RNase Inhibitor (Epicentre) a cada tubo. Os tubos permaneceram à T. A., após serem homogeneizados, até o preparo das amostras. Em 6 tubos de 500  $\mu$ L livres de RNase, foram adicionados 4  $\mu$ L de tampão Ribo-Zero Reaction Buffer (Epicentre), 10  $\mu$ L de solução Ribo-Zero rRNA Removal Solution (Epicentre) e 5  $\mu$ g de RNA total de cada amostra. Essa reação foi homogeneizada cuidadosamente e incubada a 68 °C por 10 min. Após esse período, as amostras foram incubadas à T. A. por 5 min. O RNA total tratado foi então adicionado aos tubos contendo as pérolas magnéticas lavadas e imediatamente homogeneizado por pipetagem e posteriormente por 10 s no vórtex à velocidade média. As amostras foram incubadas à T. A. por 5 min, posteriormente homogeneizadas por 10 s no vórtex à velocidade média e novamente incubadas a 50 °C por 5 min. Após o período de incubação, os tubos foram imediatamente transferidos para o suporte magnético e permaneceram por 2 min. O sobrenadante contendo o RNA sem rRNA foi removido com cuidado, transferido para um novo tubo de 1,5 mL livre de RNase e submetido ao processo de purificação. A purificação do RNA sem rRNA foi realizada utilizando o kit RNeasy® (Qiagen). Adicionou-se à solução contendo o RNA de cada amostra, 350  $\mu$ L de tampão RLT. A mistura foi homogeneizada, adicionou-se 250  $\mu$ L de etanol 100% e após homogeneização, a amostra foi imediatamente transferida para a coluna de purificação da Qiagen e centrifugada por 30 s à 8000 g. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 500  $\mu$ L de

tampão RPE à coluna e centrifugou-se à 8000 g por 30 s. Essa etapa foi repetida por mais uma vez e ao final, a coluna foi transferida para novo tubo de 1,5 mL livre de RNase. Para eluição do RNA final utilizou-se 30  $\mu$ L de água livre de RNase aplicados diretamente sobre a membrana da coluna. A coluna ficou incubada a T. A. por 1 min e posteriormente foi centrifugada por 1 min a 8000 g. O eluído contendo o RNA livre de rRNA foi recuperado, quantificado utilizando o kit Qubit® RNA BR (Invitrogen), avaliado quanto a integridade e acondicionado no - 80 °C até sua utilização.

### **5.9.3. Análise de integridade do mRNA extraído**

A integridade do RNA livre de rRNA, denominado nesse trabalho de mRNA, por se tratar do tipo de RNA mais presente nas amostras após a realização da remoção do RNA ribossomal, foi avaliada antes da construção da biblioteca de cDNA, através do Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). O gel para análise do mRNA foi preparado, conforme descrito no kit Agilent RNA Pico, pipetando 2  $\mu$ L do corante e 40  $\mu$ L da matriz do gel em um frasco de 0,5 mL livre de RNase. Em seguida a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 1300 g por 10 min a T. A. Foram pipetados 9  $\mu$ L da mistura preparada no poço correspondente do chip Agilent RNA-1000 e posteriormente com auxílio do aplicador, o restante dos poços do chip foram preenchidos. Foram pipetados 9  $\mu$ L de solução RNA Pico *conditioning* nos poços marcados e 5  $\mu$ L do marcador RNA Pico nos poços do marcador e das amostras. Foram pipetados 1  $\mu$ L de marcador de RNA no poço correspondente e 1  $\mu$ L do mRNA de cada amostra. O chip foi homogeneizado por vórtex durante 60 s a 2400 rpm e utilizado para carregar o equipamento.

## **5.9.4. Construção das bibliotecas de cDNA**

### **5.9.4.1. Síntese da primeira fita de cDNA**

A construção das bibliotecas de DNA complementar (cDNA) foi realizada conforme descrito no kit *TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation* (Illumina). Foram utilizados 5 µL de RNA livre de rRNA de cada amostra, contendo de 6 a 40 ng do RNA pré-isolado. Esse material foi homogeneizado nos poços da placa RBP (*RNA Bead Plate*, iniciais do inglês) com 13 µL do tampão FPF (*Fragment Prime Finish Mix*, iniciais do inglês). A placa RBP foi selada com plástico adesivo e incubada a 94 °C por 1 min no termociclador. Após esse período a placa foi centrifugada rapidamente e incubada no suporte magnético a T. A. por 5 min. O selo da placa foi retirado e transferiu-se 17 µL do sobrenadante de cada poço para os poços da placa CDP (cDNA plate, do inglês). Foi preparada uma mistura contendo os tampões *SuperScript II* e *First Strand Synthesis Act D* (1:9) e adicionou-se 8 µL dessa mistura de tampões a cada poço da placa CDP contendo os mRNA fragmentados. As amostras foram homogeneizadas, a placa CDP foi selada com plástico adesivo, centrifugada rapidamente e incubada no termociclador a 25 °C por 10 min, a 42 °C por 15 min e por último a 70 °C por 15 min.

### **5.9.4.2. Síntese da segunda fita de cDNA**

Após o período de incubação, a placa foi retirada, o plástico adesivo descartado e foram adicionados 5 µL de tampão de ressuspensão a cada poço da placa CDP e 20 µL do tampão *Second Strand Marking Master Mix*. As amostras foram homogeneizadas, a placa novamente selada e incubada no termociclador a 16 °C por 1 h. Após incubação, o selo adesivo foi retirado e a placa permaneceu em repouso até atingir a T.A. Posteriormente foram adicionados 90 µL de AMPure XP beads a cada poço da placa CDP que contém os 50 µL de cDNA dupla fita (ds

cDNA). Após homogeneização, a placa CDP foi incubada a T. A. por 15 min. Em seguida, a placa foi transferida para o suporte magnético e permaneceu incubada a T. A. por 5 min. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 200  $\mu$ L de etanol 80% para lavagem das micropérolas magnéticas e a placa CDP foi incubada por 30 s a T. A. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, essa etapa de lavagem foi repetida e a placa CDP permaneceu incubada a T. A. por 15 min para secar. A placa CDP foi retirada do suporte magnético, adicionou-se 17,5  $\mu$ L do tampão de ressuspensão a cada poço da placa e após homogeneização a placa foi incubada a T. A. por 2 min. Em seguida, a placa foi incubada no suporte magnético por 5 min a T. A. e foram transferidos 15  $\mu$ L do sobrenadante (ds cDNA) para os poços da placa ALP (*Adapter Ligation Plate*, iniciais do inglês).

#### **5.9.4.3. Adenilação da extremidade 3' dos fragmentos e ligação de adaptadores**

Foram adicionados 2,5  $\mu$ L de tampão de ressuspensão e 12,5  $\mu$ L de *A-Tailing Mix* a cada poço da placa ALP. A placa foi homogeneizada, selada e incubada a 37 °C por 30 min e em seguida a 70 °C por 5 min. Após a adenilação, cada amostra foi ligada a um adaptador contendo uma sequência diferente (*index*) para a identificação após a corrida. O plástico adesivo foi removido, foram adicionados 2,5  $\mu$ L de tampão de ressuspensão, 2,5  $\mu$ L de tampão de ligação e 2,5  $\mu$ L de RNA *Adapter Index* a cada poço da placa ALP, a placa foi homogeneizada, selada, centrifugada a 280 g por 1 min e incubada a 30 °C por 10 min. Após a incubação, o adesivo plástico foi removido, foram adicionados 5  $\mu$ L de tampão *Stop Ligation* em cada poço da placa para inativar a ligação. Adicionou-se 42  $\mu$ L de AMPure XP *beads* a cada poço, a placa ALP foi homogeneizada, incubada por 15 min a T. A. e em seguida, incubada no suporte magnético a T. A. por 5 min. Foram descartados 79,5  $\mu$ L de sobrenadante de cada poço, adicionados 200  $\mu$ L de

etanol 80% e a placa foi incubada por 30 s a T. A. O sobrenadante foi descartado, essa etapa foi repetida mais uma vez e o sedimento permaneceu incubado a T. A. por 15 min para secagem. O sedimento foi então ressuspensionado com 52,5  $\mu$ L de tampão de ressuspensão, homogeneizado, incubado por 2 min a T. A. e também por 5 min a T. A. no suporte magnético. Foram transferidos 50  $\mu$ L do sobrenadante para a placa CAP (*Clean Up ALP Plate*) e adicionados 50  $\mu$ L do *AMPure XP beads*. A placa CAP foi homogeneizada, incubada a T. A. por 15 min e posteriormente incubada no suporte magnético por 5 min a T. A. Foram descartados 95  $\mu$ L do sobrenadante de cada poço, adicionados 200  $\mu$ L de etanol 80% e a placa foi incubada por 30 s a T. A. Todo o sobrenadante foi removido, a lavagem com etanol repetida por mais uma vez e o sedimento de cada poço foi ressuspensionado em 22,5  $\mu$ L de tampão de ressuspensão. Após homogeneização, a placa CAP foi incubada primeiramente a T. A. por 2 min e depois por 5 min no suporte magnético para a recuperação do sobrenadante.

#### **5.9.4.4. Enriquecimento dos fragmentos de cDNA**

Foram transferidos 20  $\mu$ L do sobrenadante de cada poço para a placa PCR (Polymerase Chain Reaction, iniciais do inglês), 5  $\mu$ L de PCR Primer Cocktail e 25  $\mu$ L de PCR Master Mix para cada poço. Os poços foram homogeneizados, a placa selada e incubada no termociclador para a reação de amplificação. O ciclo consistiu na desnaturação a 98 °C por 40 s, seguida de anelamento dos oligos por 30 s a 60 °C e a polimerização e extensão foram executadas a 72 °C por 30 s. Foram realizados no total 15 ciclos por reação e uma etapa final de extensão a 72 °C por 5 min. Após a PCR, o selo da placa foi removido, 50  $\mu$ L de *AMPure XP beads* foram adicionados, homogeneizados e a placa foi incubada a T.A. por 15 min. Em seguida a placa foi incubada no suporte magnético por 5 min, foram descartados 95  $\mu$ L de sobrenadante de cada



poço e adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol 80%. A placa foi incubada por 30 s a T. A., todo o sobrenadante foi removido e essa etapa de lavagem novamente repetida por mais uma vez. O sedimento foi então ressuspensionado em 32,5  $\mu\text{L}$  de tampão de ressuspensão, a placa foi incubada por 2 min a T. A., posteriormente incubada no suporte magnético por 5 min e foram transferidos 30  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada poço para a placa TSP (Target Sample Plate, iniciais do inglês), que correspondem à biblioteca de cDNA. Esse material foi utilizado para validação, conforme descrito abaixo e armazenado no - 20 °C até sua utilização.

#### **5.9.4.5. Validação e mistura das bibliotecas de cDNA**

A biblioteca de cDNA foi validada utilizando o Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). O gel foi preparado, conforme descrito no kit Agilent High Sensitivity DNA, adicionando-se 15  $\mu\text{L}$  do corante de DNA concentrado de alta sensibilidade ao frasco contendo a matriz do gel de DNA de alta sensibilidade. Em seguida a amostra foi homogeneizada em vórtex, centrifugada rapidamente, transferida para o filtro e centrifugada a 2240 g por 10 min. Foram pipetados 9  $\mu\text{L}$  da mistura preparada no poço correspondente do chip Agilent DNA-1000 e posteriormente com auxílio do aplicador, o restante dos poços do chip foram preenchidos, conforme as orientações do fabricante. Foram pipetados 5  $\mu\text{L}$  de marcador em todos os poços do chip. Foram pipetados 1  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular no poço correspondente e 1  $\mu\text{L}$  da biblioteca de cada amostra da placa TSP. O *chip* foi homogeneizado por vórtex durante 1 min a 2400 rpm, incubado por 5 min a T. A. e carregado no equipamento. A pureza e o tamanho dos fragmentos de cDNA foram analisados e após a validação da biblioteca, foram transferidos 10  $\mu\text{L}$  da biblioteca de cada amostra para os poços da placa DCT (*Diluted Cluster Template*) e a concentração das amostras foi normalizada para 10 nM com uma solução contendo Tris-HCl 10

nM, pH 8,5 e Tween 20 0,1%. Em seguida, 10 ul de cada amostra a 10 nM foram misturadas em um único *pool* para a corrida de sequenciamento.

### 5.9.5. Sequenciamento das amostras

Após a validação e mistura das bibliotecas de cDNA das triplicatas de cada amostra (linhagem controle C1 com e sem magainina e linhagem resistente R3 com e sem magainina), foi realizado o sequenciamento de segunda geração e obtenção das sequências para análise. Foram realizadas 2 corridas na plataforma MiSeq<sup>®</sup> (Illumina) em leituras *paired-end* de 2x150 pb Para a aplicação no sequenciador, o *pool* de amostras foi desnaturado com uma solução de NaOH a 0,2 N e diluída a fim de se alcançar a quantidade ideal de moléculas de DNA para serem ligadas na *flowcell* e amplificadas na PCR em ponte. A primeira corrida foi feita com 12 pM da mistura de bibliotecas e a segunda corrida foi feita com 10 pM. Após o sequenciamento, as amostras foram individualizadas de acordo com os index e convertidas para o formato fastq utilizando o programa MiSeq Reportes (Illumina).

### 5.9.6. Análises de bioinformática

Os *reads* foram mapeados em relação ao genoma de referência para *E. coli* (RefSeq|NC\_010468.1) utilizando o programa Bowtie2, tendo como critérios o limite de no máximo 3 *mismatches* e alinhamento em único local no genoma para cada sequência. As sequências alinhadas em regiões codificantes foram contadas e a partir daí obteve-se o valor absoluto de expressão gênica em cada região. Esses valores foram normalizados e analisados estatisticamente utilizando o teste de variância ANOVA para identificar os genes diferencialmente expressos entre as diferentes condições avaliadas e foram considerados

estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0,05$ . Os assinalamentos de vias biológicas foram mapeados de acordo com a base de dados do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>).

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e a discussão estão apresentados em capítulos dispostos da seguinte forma:

- 6.1. CAPÍTULO I** - Caracterização bioquímica das linhagens de *E. coli* susceptíveis e resistentes à magainina I.
- 6.2. CAPÍTULO II** - Análise proteômica comparativa do lisado bacteriano das linhagens de *E. coli* susceptível e resistente à magainina I por metodologia *gel-free*
- 6.3. CAPÍTULO III** - RNA-Seq e análise do transcriptoma de *E. coli* resistente e susceptível à magainina I.
- 6.4. CAPÍTULO IV** – Análises proteômicas preliminares do secretoma das linhagens de *E. coli* susceptíveis e resistentes à magainina I.

## **6.1. CAPÍTULO I - Caracterização bioquímica das linhagens de *E. coli* susceptíveis e resistentes à magainina I**

### **6.1.1. Identificação das linhagens resistentes e susceptíveis à magainina I**

As cepas de *E. coli* susceptíveis (C1, C2 e C3) e resistentes à magainina I (R1, R2 e R3) foram obtidas conforme descrito por Maria-Neto *et al.* (2012), após dez propagações sucessivas de *E. coli* da linhagem ATCC 8739 em meio LB contendo ou não magainina I na concentração subinibitória de 37,3 µg.mL<sup>-1</sup> (metade da CIM). Em seguida, foram selecionadas três colônias controles susceptíveis à magainina I e denominadas de C1, C2 e C3 e três colônias resistentes à magainina I, nomeadas de R1, R2 e R3 para dar continuidade à pesquisa. Foram preparados pré - inóculos de cada linhagem que permaneceram mantidos à - 80 °C em glicerol até sua utilização nos experimentos realizados nesse trabalho.

As linhagens utilizadas nos experimentos, foram identificadas através dos sistemas automatizados VITEK® 2 (bioMerieux) e MicroScan® WalkAway® (Siemens) e ainda por MALDI-TOF MS. Os métodos microbiológicos automatizados, conhecidos como sistemas inteligentes (*expert systems*, do inglês), como o VITEK® 2, BD Phoenix® e MicroScan® WalkAway® (Winstanley e Courvalin, 2011), são frequentemente utilizados nos laboratórios de microbiologia e análises clínicas e permitem a identificação bacteriana através da comparação entre os resultados das reações colorimétricas e quantificação de fluorescência das amostras e o banco de dados fornecido pelos equipamentos (Zbinden *et al.*, 2007).

Nos testes microbiológicos automatizados foram analisados 47 testes bioquímicos, incluindo diferentes atividades metabólicas como acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática, urease, utilização de malonato, padrão de

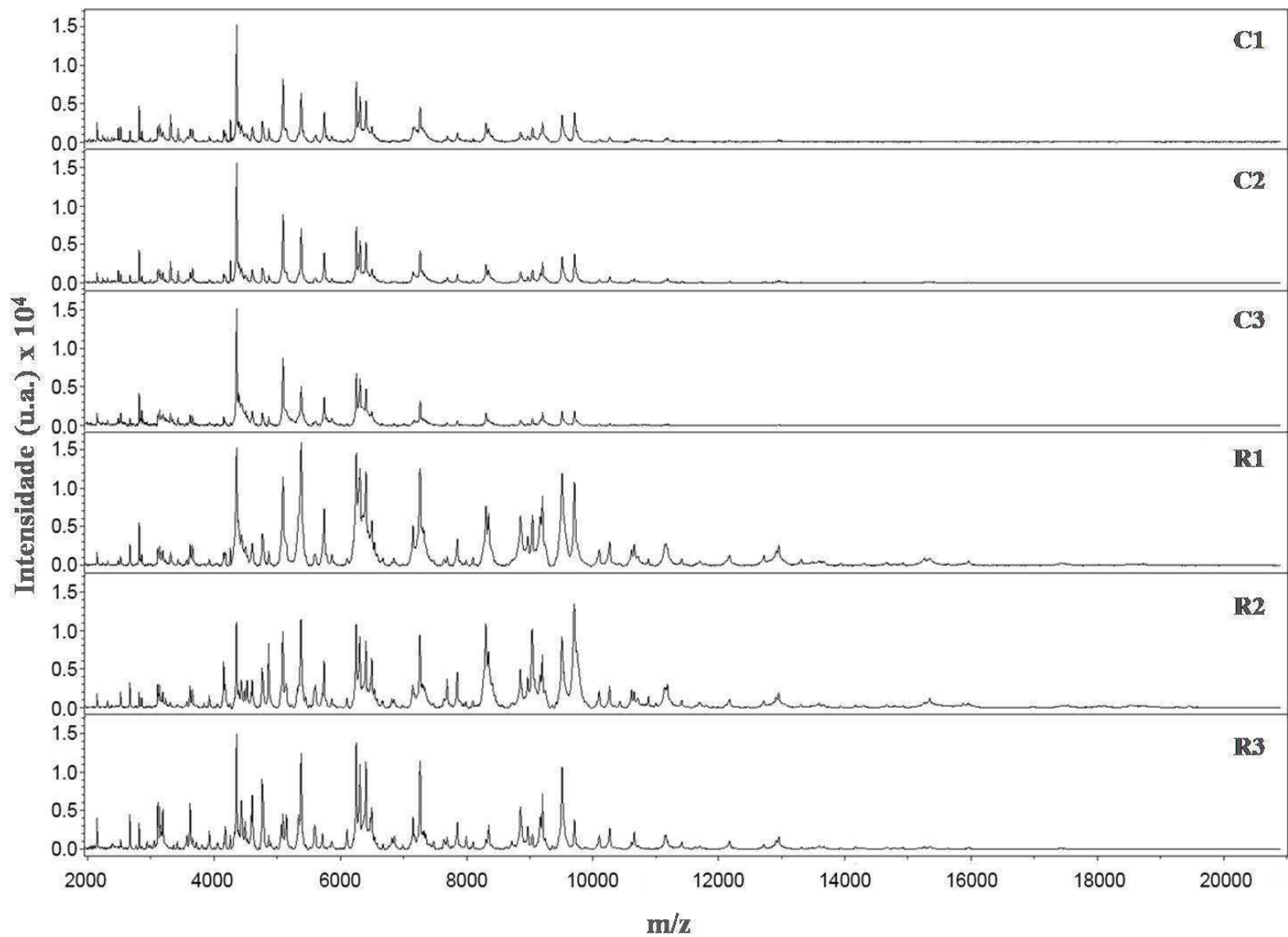
susceptibilidade a drogas e teste de fermentação (Funk, 1998; Zbinden *et al.*, 2007) e todas as linhagens avaliadas (C1, C2 e C3; R1, R2 e R3) foram identificadas como *E. coli*, como esperado, com nível de confiabilidade de identificação de 95%, considerado muito bom pelo Vitek e 99,99%, considerado excelente grau de confiabilidade pelas análises do MicroScan.

Apesar de ambos os sistemas automatizados terem identificados com sucesso todas as linhagens testadas em aproximadamente 24-48 h, nós propusemos a utilização do MALDI-TOF MS para a identificação rápida das linhagens, o qual é capaz de identificar precisamente muitas amostras na mesma análise e em poucos minutos. O uso dessa ferramenta nos laboratórios de análises clínicas pode permitir a identificação rápida e precisa de patógenos infecciosos, reduzindo os custos e o tempo de espera para o início da quimioterapia (Van Veen *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2012). Além disso, a utilização de antibióticos com espectro de ação adequado resulta no aumento da efetividade do tratamento quimioterápico e provavelmente reduz a possibilidade de falha terapêutica, que tem sido considerada um grave problema no que diz respeito ao desenvolvimento de resistência bacteriana (Rosenthal, 2011; Park *et al.*, 2011).

Dessa forma, a identificação bacteriana também foi realizada através das análises utilizando o *Biotyper* MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). Para cada linhagem (C1-3 e R1-3) foram analisadas separadamente 06 colônias submetidas à extração (Calderaro *et al.*, 2012) e obtidos 24 espectros de cada uma dessas colônias. Os espectros adquiridos foram analisados através da ferramenta do *Biotyper* para identificação das cepas por comparação com o respectivo banco de dados que contém 3995 microrganismos de referência (Bruker Daltonics, Germany).

Através da análise do perfil protéico (Figura 6) foi possível confirmar que todas as linhagens são provenientes da espécie *E. coli* com logaritmo de 1,93, apresentando

correlação em nível de espécie (Mellmann *et al.*, 2009) e demonstrando que a utilização dessa metodologia por MALDI-TOF MS pode ser uma alternativa na identificação microbiológica clínica, uma vez que, o processamento de colônias intactas ou lisados celulares é feito de maneira rápida, simples e eficaz (Bellido, 2010), como demonstrado no trabalho.



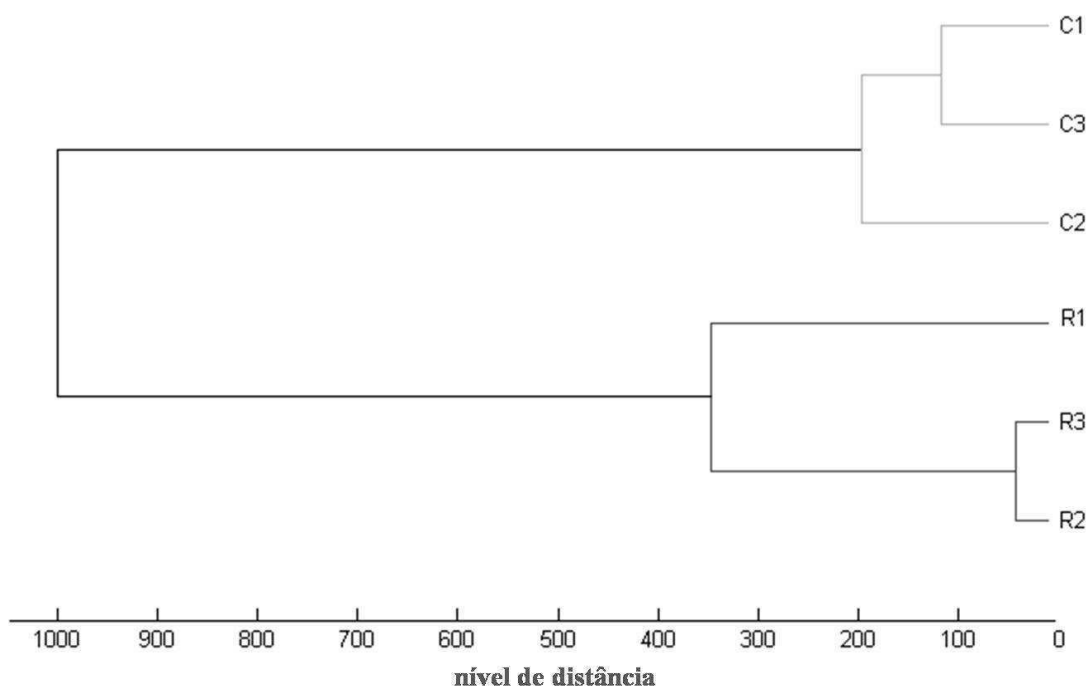
**Figura 6.** Espectros de massas das linhagens de *E. coli* obtidos à partir da análise por MALDI-TOF MS. C1-3, controles susceptíveis à magainina I; R1-3, linhagens resistentes à magainina I. As proteínas foram analisadas em um espectrômetro de massas *MicroFlex LRF* em modo linear positivo utilizando o método MBT. O eixo “Y” mostra a intensidade e o eixo “X” mostra a relação massa/carga.



### **6.1.2. Diferenciação entre as linhagens resistentes e susceptíveis à magainina I**

Após a identificação e considerando que as linhagens de *E. coli* resistentes à magainina I mostram um aumento na tolerância à esse peptídeo, como estabelecido por Maria-Neto *et al.* (2012), foi verificado se as análises do MALDI TOF MS poderiam distinguir as bactérias resistentes daquelas não-resistentes à magainina I.

A análise por MALDI TOF MS em modo positivo linear de 2.000 à 20.000 Da demonstraram que as linhagens de *E. coli* resistentes (R1-R3) e susceptíveis (C1-C3) à magainina I mostraram um perfil protéico similar entre si, como observado nos espectros de cada uma delas (Figura 6). Apesar dessa similaridade, algumas diferenças sutis podem estar presentes e serem capazes de distinguir as linhagens resistentes das susceptíveis. Com esse intuito, um dendrograma do tipo MSP (*main spectra profile*, iniciais do inglês) foi construído utilizando o programa flexAnalysis para analisar todos os 24 espectros adquiridos de cada linhagem e os resultados foram agrupados em uma árvore (Figura 7).



**Figura 7.** Dendrograma do tipo MSP de *E. coli* obtido a partir da análise do perfil principal dos espectros obtidos à partir da análise por MALDI-TOF MS. C1-3, controles susceptíveis à magainina I; R1-3, linhagens resistentes à magainina I.

O dendrograma do tipo MSP mostrou que as linhagens resistentes foram agrupadas em um grupo distinto das linhagens susceptíveis. O resultado indica que todas as linhagens de *E. coli* resistentes à magainina I, R1, R2 e R3, têm um claro grau de distância das linhagens susceptíveis controles, C1, C2 e C3 (Figura 7), sendo agrupadas em braços distintos, quando comparadas. Portanto, as análises pelo MALDI-TOF MS, permitiram a distinção entre as bactérias susceptíveis e resistentes ao peptídeo antimicrobiano magainina I (Figura 7). Esse resultado sugere que as diferenças entre o grau de distância das linhagens resistentes e susceptíveis podem ser correlacionadas com diferenças fisiológicas sutis entre as linhagens, que resultam em modificações na massa molecular e na intensidade dos íons e que podem ser facilmente detectadas pelas análises de MALDI-TOF MS (Arnold e Reilly, 1999; Muroi *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm demonstrado o uso das análises de MALDI-TOF MS para discriminar rapidamente linhagens bacterianas resistentes a um único antibiótico ou múltiplos antibióticos, como observado para *Streptococcus pneumonia* com diferentes níveis de resistência a ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino e moxifloxacino (Malakhova *et al.*, 2007); para *Enterobacter cloacae* resistente à colistina como recentemente demonstrado pelo nosso grupo (Lima *et al.*, 2013, artigo *in press*); para linhagens de *Staphylococcus aureus* multi-droga resistentes (*MRSA*, iniciais do inglês) (Muroi *et al.*, 2012; Charyulu *et al.*, 2012); e para *E. coli* resistente à diferentes antibióticos (Camara e Hays, 2007; Muroi *et al.*, 2012). O resultado obtido reporta, pela primeira vez na literatura, a possibilidade de uso das análises por MALDI-TOF MS para discriminar rapidamente microrganismos susceptíveis e resistentes aos peptídeos antimicrobianos ribossomais.

### **6.1.3. Análise da susceptibilidade antimicrobiana aos antibióticos convencionais**

No intuito de se averiguar, de forma abrangente, a especificidade de resistência à magainina I, as linhagens de *E. coli* resistentes e susceptíveis a esse AMP, foram testadas utilizando os métodos automatizados VITEK® 2 e MicroScan® WalkAway®, em relação a um amplo espectro de 27 antibióticos diferentes utilizados rotineiramente na prática clínica e pertencentes a 11 classes distintas. Essas metodologias permitiram a análise de 23 antibióticos com abrangência no MicroScan, 17 antibióticos no Vitek e desses, 12 antibióticos foram analisados nos dois equipamentos, sendo amicacina e gentamicina, aminoglicosídeos; ampicilina, penicilina; aztreonam, monobactâmicos; cefoxitina, cefotaxima e ceftazidima e cefepima, cefalosporinas de segunda, terceira e quarta geração, respectivamente; ciprofloxacino, fluoroquinolona; meropenem, imipenem e ertapenem, carbapenêmicos. Os antibióticos testados apresentam

mecanismos de ação distintos, correlacionados com metabolismo bacteriano e processos fisiológicos, como replicação do DNA, tradução e biosíntese de parede celular bacteriana (Lima *et al.*, 2013). De acordo com esse teste, o crescimento bacteriano na presença de concentrações variadas do agente antimicrobiano, permitiu o cálculo automático das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para cada antimicrobiano avaliado através do programa de cada equipamento (Tabela 3).

**Tabela 3.** Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) determinadas pelos sistemas VITEK 2 e MicroScan.

Antibiótico	Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )											
	<i>E. coli</i> susceptíveis à magainina I						<i>E. coli</i> resistentes à magainina I					
	C1		C2		C3		R1		R2		R3	
	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS
Amicacina	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$
Amoxicilina/Clavulanato	-	$\leq 8/4$	-	$\leq 8/4$	-	$\leq 8/4$	-	$\leq 8/4$	-	$\leq 8/4$	-	$\leq 8/4$
Ampicilina	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$
Ampicilina/Sulbactam	$\leq 2/1$	-	$\leq 2/1$	-	$\leq 2/1$	-	$\leq 2/1$	-	$\leq 2/1$	-	$\leq 2/1$	-
Aztreonam	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$
Cefalotina	4	-	$\leq 2$	-	4	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	4	-
Cefazolina	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$
Cefepima	$\leq 1$	$\leq 8$	$\leq 1$	$\leq 8$	$\leq 1$	$\leq 8$	$\leq 1$	$\leq 8$	$\leq 1$	$\leq 8$	$\leq 1$	$\leq 8$
Cefotaxima	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
Cefoxitina	$\leq 4$	$\leq 8$	$\leq 4$	$\leq 8$	$\leq 4$	$\leq 8$	$\leq 4$	$\leq 8$	$\leq 4$	$\leq 8$	$\leq 4$	$\leq 8$
Ceftazidima	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
Ceftriaxona	-	$\leq 1$	-	$\leq 1$	-	$\leq 1$	-	$\leq 1$	-	$\leq 1$	-	$\leq 1$
Cefuroxima	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$
Ciprofloxacino	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$
Colistina	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-
Ertapenem	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$
Gentamicina	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$
Imipenem	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
Levofloxacino	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$
Meropenem	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$
Piperacilina	-	$\leq 16$	-	$\leq 16$	-	$\leq 16$	-	$\leq 16$	-	$\leq 16$	-	$\leq 16$
Piperacilina/Tazobactam	-	$\leq 16/4$	-	$\leq 16/4$	-	$\leq 16/4$	-	$\leq 16/4$	-	$\leq 16/4$	-	$\leq 16/4$
Tetraciclina	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$
Ticarcilina/Clavulanato	-	$\leq 16/2$	-	$\leq 16/2$	-	$\leq 16/2$	-	$\leq 16/2$	-	$\leq 16/2$	-	$\leq 16/2$
Tigeciclina	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	-	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-
Tobramicina	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$
Trimetoprima/Sulfametoxazol	-	$\leq 2/38$	-	$\leq 2/38$	-	$\leq 2/38$	-	$\leq 2/38$	-	$\leq 2/38$	-	$\leq 2/38$

V2, VITEK® 2 (bioMérieux); MS, MicroScan® WalkAway® (Siemens); -, não testado; C1, C2 e C3 – linhagens de *E. coli* susceptíveis; R1, R2 e R3 – linhagens de *E. coli* resistentes. Os valores numéricos estão expressos em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Os resultados das CIMs foram interpretados conforme os parâmetros do *CLSI* (CLSI, 2012) e o resultado do teste de susceptibilidade antimicrobiana (*AST*, iniciais do inglês) mostraram que todas as linhagens de *E. coli* susceptíveis e resistentes à magainina I, são susceptíveis a todos os antibióticos testados através dos sistemas automatizados (Tabela 3 e 4), confirmando que a resistência observada parece ser bastante específica aos AMPs.

**Tabela 4.** Comparação da interpretação dos resultados obtidos para *Escherichia coli* no teste de susceptibilidade antimicrobiana aos antibióticos convencionais entre os sistemas Vitek e MicroScan.

Antibiótico	Interpretação de Susceptibilidade											
	C1		C2		C3		R1		R2		R3	
	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Amoxicilina/Clavulanato	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Ampicilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina/Sulbactam	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
Aztreonam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefalotina	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
Cefazolina	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefoxitina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ceftazidima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ceftriaxona	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Cefuroxima	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Ciprofloxacino	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Colistina <sup>a</sup>	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
Ertapenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Levofloxacino	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Piperacilina	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Piperacilina/Tazobactam	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Tetraciclina	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Ticarcilina/Clavulanato	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Tigeciclina <sup>a</sup>	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
Tobramicina	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Trimetoprima/Sulfametoxazol	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S

Resultados obtidos conforme o critério de interpretação do CLSI M100-S23. V2, VITEK® 2 (bioMérieux); MS, MicroScan® WalkAway® (Siemens); C1, C2 e C3 – linhagens de *E. coli* susceptíveis; R1, R2 e R3 – linhagens de *E. coli* resistentes.; S, sensível; <sup>a</sup> o critério de interpretação utilizado nesses casos, foi aquele obtido à partir da análise realizada pelo programa do equipamento, uma vez que não foram encontrados parâmetros de interpretação para esses antibióticos nas tabelas do CLSI 2012 e 2013.

Um estudo recente do nosso grupo com linhagens de *E. coli* resistentes à magainina I foi desenvolvido com objetivo de começar a decifrar o processo de resistência à magainina I através de análise proteômica comparativa. Foi possível observar um padrão de crescimento similar entre as linhagens resistentes e susceptíveis e ausência de resistência cruzada observada para ampicilina, aztreonam, cefalotina, ciprofloxacino, cloranfenicol, gentamicina, imipenem e tetraciclina, avaliada por teste de disco de difusão. Além disso, as principais diferenças protéicas observadas nas linhagens de *E. coli* resistentes à magainina I foram direcionadas para a manutenção da energia celular (aproximadamente 49% das proteínas citosólicas diferenciais identificadas), sugerindo um intenso metabolismo energético nas linhagens resistentes à magainina I (Maria-Neto *et al.*, 2012). Os dados obtidos nesse trabalho acendem novas possibilidades sobre o entendimento da resistência bacteriana específica aos AMPs. Nesse contexto, para tentar entender melhor a resistência específica de *E. coli* ao AMP magainina I foi realizada a análise de susceptibilidade/resistência a outros AMPs.

#### **6.1.4. Avaliação das linhagens de *E. coli* resistentes à magainina I em relação à susceptibilidade/resistência aos AMPs**

No objetivo de avaliar se a resistência à magainina I é específica a esse AMP ou generalizada, três peptídeos antimicrobianos catiônicos (*CAMPs*) foram selecionados para esse experimento: PR-39, PMAP-23 e cecropina P1 (Tabela 5). Esses peptídeos foram selecionados para averiguar a especificidade de resistência à magainina I das linhagens de *E. coli* por serem AMPs que pertencem à família das catelicidinas, a mesma da magainina I e devido o mecanismo de ação, que permitem a comparação entre a magainina I e outros AMPs.



**Tabela 5.** Propriedades dos peptídeos antimicrobianos catiônicos testados em *Escherichia coli* por teste de microdiluição.

Peptídeo	Sequência	Massa molecular (Da)	Fonte natural de obtenção	Mecanismo de ação	Referências
Magainina I	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	2409	Secreção da pele de sapo africano <i>Xenopus laevis</i>	Formação de poros na membrana bacteriana	Zasloff (1987), Lohner (2009), Amiche e Galanth (2011)
Cecropina P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR	3338	Nematóide <i>Ascaris suum</i> presente no intestino delgado de porcos	Formação de poros na membrana bacteriana	Boman <i>et al.</i> (1993), Sang e Blecha (2009), Kosciuczuk <i>et al.</i> (2012)
PMAP-23	RIIDLLWRVRRPQKPKFVTWVWR	2961	Medula óssea de porcos	Formação de poros na membrana bacteriana	Zanetti <i>et al.</i> (1994), Sang e Blecha (2009), Kosciuczuk <i>et al.</i> (2012)
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPR FPPRFP	4719	Tecido do intestino delgado de porcos	Interrupção da síntese de DNA e proteínas e atividade imunomodulatória	Agerberth <i>et al.</i> (1991), Hennig-Pauka <i>et al.</i> (2012); Kosciuczuk <i>et al.</i> (2012)

**Tabela 6.** Concentrações inibitórias mínimas de diferentes peptídeos antimicrobianos catiônicos testados nas linhagens de *Escherichia coli*.

Peptídeo	Concentrações Inibitórias Mínimas ( $\mu\text{M}$ )						
	ATCC 8739	C1	C2	C3	R1	R2	R3
Magainina I	62	62	62	62	104	104	104
Cecropina P1	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
PMAP-23	43	43	43	43	43	43	43
PR-39	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4

As CIMs foram obtidas pelo método de microdiluição de acordo com o documento M07-A9 (CLSI, 2012) com a concentração de peptídeos variando de 1.2 a 124  $\mu\text{M}$ ; Cepa de *E. coli* original ATCC 8739; C1-3 – linhagens de *E. coli* susceptíveis à magainina I; R1-3 – linhagens de *E. coli* resistentes à magainina I; Água Milli-Q e meio LB foram utilizados como controle negativo e cloranfenicol 99  $\mu\text{M}$  como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicatas independentes utilizando  $1 \cdot 10^5$  UFC.  $\text{mL}^{-1}$  de cultura bacteriana por 12 h a 37 °C.

Os peptídeos catiônicos da família das catelicidinas, encontrados nos tecidos mielóides (também denominado de peptídeos antimicrobianos mielóides- *MAP*, iniciais do inglês) e epiteliais de diferentes organismos (Sang e Blecha, 2009; Steinstraesser *et al.*, 2011), têm mecanismos de ação complexos, frequentemente associados com o padrão de carga e hidrofobicidade, que possibilitam a ligação na membrana bacteriana e controle da atividade antimicrobiana (Strauss *et al.*, 2010). No objetivo de verificar a especificidade de resistência à magainina I, todas as linhagens susceptíveis e magainina-resistentes foram testadas por microdiluição com os membros da família de catelicidinas, o PR-39, o PMAP-23, a cecropina P1 e também a magainina I.

O PMAP-23 (peptídeo 23 antimicrobiano mielóide de porco), identificado através da clonagem de cDNA da medula óssea de porco (Zanetti *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2011) e a cecropina P1, primeiramente isolado do nematóide *Ascaris suum* do intestino delgado de porco (Lee *et al.*, 1989; Pillai *et al.*, 2005) são peptídeos alfa-hélice anfipáticos, compostos de 23 e 31 resíduos de aminoácidos, respectivamente. O PR-39 (peptídeo 39 rico em aminoácidos prolina e arginina), originalmente isolado do intestino delgado de porcos (Agerberth *et al.*, 1991), é um peptídeo antimicrobiano linear com 39 resíduos de aminoácidos e uma quantidade incomum de resíduos de prolina (49%) e arginina (26%) (Tabela 5) (Sang e Blecha, 2009).

O PR-39 provoca a morte bacteriana por um mecanismo que não está envolvido na formação de poros na membrana e na lise celular, sendo principalmente através de interação estereoespecífica com a célula bacteriana, que resulta na interrupção da síntese de DNA e proteínas (Pranting *et al.*, 2008; Sang e Blecha, 2009; Hennig-Pauka *et al.*, 2012), enquanto que a atividade antimicrobiana do PMAP-23 e da cecropina P1 está relacionada com a interação e penetração da hélice anfipática na bicamada lipídica da membrana bacteriana, formando poros e causando o seu rompimento, de maneira

similar ao mecanismo proposto para as magaininas (Boman *et al.*, 1993; Sang e Blecha, 2009; Arcidiacono *et al.*, 2009).

Todos os mecanismos de ação descritos acima, similar ao que acontece com a magainina (Lohner, 2009; Kim *et al.*, 2011; Amiche e Galanth, 2011), têm sido associados com a conformação estrutural do peptídeo que permitem a interação com a célula bacteriana com ou sem translocação através das membranas biológicas (Pranting *et al.*, 2008; Sang e Blecha, 2009; Hennig-Pauka *et al.*, 2012). Entretanto, os resultados da microdiluição demonstram que as linhagens resistentes à magainina não desenvolveram resistência cruzada aos outros AMPs testados (Tabela 6). Esses dados sugerem que a resistência parece ser realmente específica à magainina I em todas as linhagens resistentes (R1, R2 e R3), já que foi observada apenas em relação a esse AMP (Tabela 6).

A resistência específica à magainina I, surpreendentemente observada no trabalho, indica que o mecanismo de ação da magainina proposto até o momento e relacionado com a formação de poros toroidais na membrana bacteriana (Amiche e Galanth, 2011), provavelmente não é tão simples como parece, uma vez que as linhagens de *E. coli* resistentes à magainina I não se tornaram resistentes também aos outros AMPs utilizados.

A especificidade de resistência à magainina, avaliada pelos métodos de microdiluição e AST, demonstra que esse peptídeo antimicrobiano parece atuar não apenas no rompimento da membrana, mas provavelmente devem existir outros alvos na bactéria patogênica. Esse comportamento pode indicar um modo de ação dos AMPs bem mais complexo, em anuência com observações de que tanto a atividade dos AMPs, quanto o desenvolvimento de resistência aos AMPs parecem não serem resultado de um

único e simples mecanismo molecular (Maria-Neto *et al.*, 2012), o que ainda precisa ser melhor entendido.

## 6.2. CAPÍTULO II - Análise proteômica comparativa do lisado bacteriano das linhagens de *E. coli* susceptível e resistente à magainina I por metodologia *gel-free*

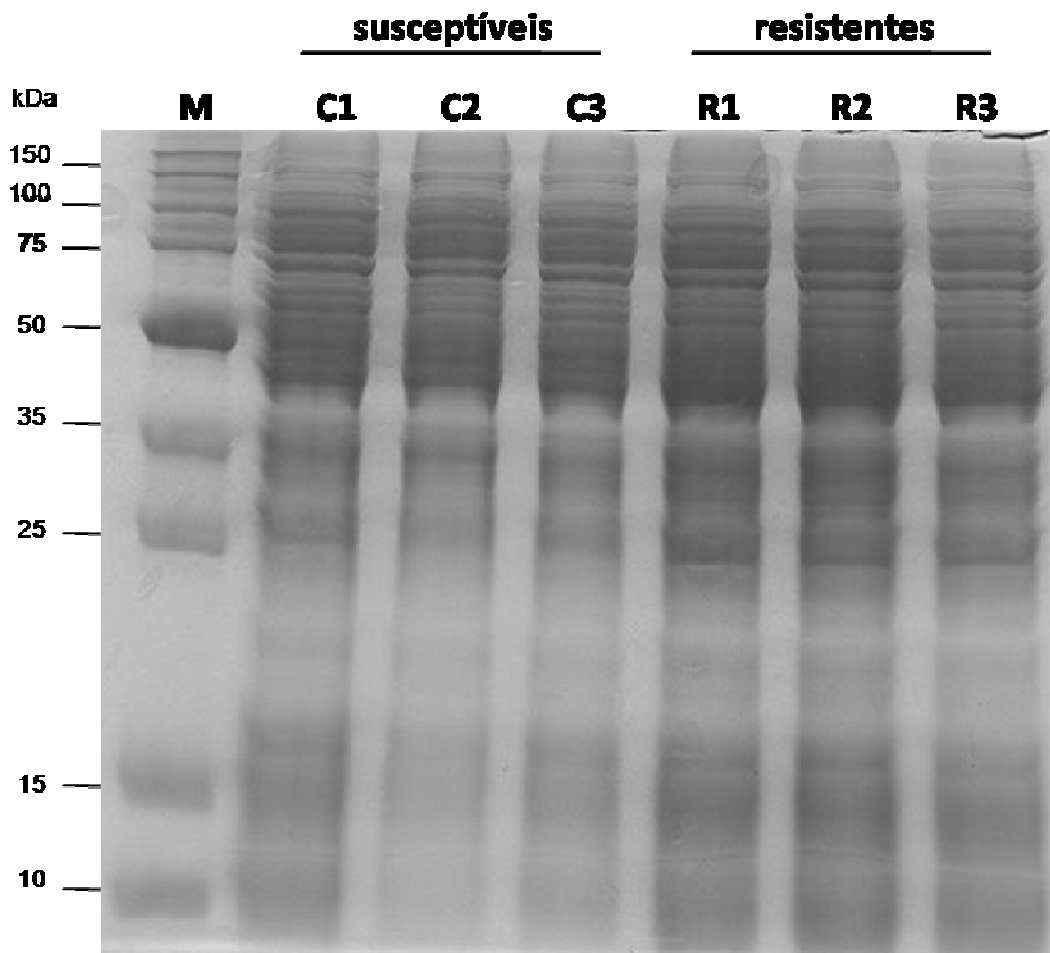
As proteínas do lisado bacteriano da cepa ATCC 8739 e das linhagens susceptíveis à magainina I (C1-3) e resistentes à magainina I (R1-3) foram obtidas conforme descrito em material e métodos e esquematizado na Figura 5. Utilizando essa metodologia foi possível obter um rendimento protéico variando de 24 a 29 mg totais de proteínas do lisado bacteriano para 2 L de meio LB cultivado (Tabela 7), que foram utilizadas para análise proteômica.

**Tabela 7.** Análise dos rendimentos protéicos das amostras biológicas de *Escherichia coli* obtidos após extração.

Amostras protéicas de <i>Escherichia coli</i>					
Amostra biológica	D.O. inicial (U.A)	D.O. final (U.A)	Rendimento em massa celular (g)	Rendimento protéico do lisado (mg)	Rendimento protéico do secretoma (mg)
ATCC 8739	0,048	1,120	12,350	28,580	9,546
C1	0,050	1,136	11,850	25,680	7,916
C2	0,052	1,205	13,450	24,080	9,716
C3	0,051	1,130	12,700	27,620	8,841
R1	0,049	1,202	14,450 g	27,680	9,791
R2	0,057	1,203	13,750	29,220	11,656
R3	0,052	1,135	13,000	25,180	8,656

A cepa de *E. coli* ATCC 8739 e as linhagens de *E. coli* susceptíveis à magainina I (C1, C2 e C3) e resistentes à magainina I (R1, R2 e R3) foram incubadas em 2 L de meio LB a 37 °C, sob agitação de 200 rpm por 180 min. A densidade óptica (D.O.) foi monitorada no tempo zero (D.O. inicial), logo após a adição de  $5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> do inóculo inicial e no tempo 180 (D.O. final), após os 180 min de incubação. A massa celular seca obtida após a centrifugação do volume total foi pesada para obtenção do rendimento em massa celular. e os rendimentos protéicos foram calculados conforme a concentração das proteínas totais obtidas e o volume protéico final de cada amostra.

Primeiramente, o perfil de massa molecular das proteínas do lisado bacteriano de todas as amostras biológicas foi analisado por SDS-PAGE, conforme mostrado na Figura 8, a qual permitiu inferir que o padrão protéico de massa molecular observado para as proteínas do lisado bacteriano foi bastante similar entre as cepas resistentes e susceptíveis, com maior concentração aparente de proteínas de 25 à 150 kDa. Em seguida, com objetivo de permitir a análise comparativa desse subproteoma e posteriormente identificar diferenças significativas entre as linhagens susceptíveis e resistentes à magainina I cultivadas sob condições ideais de crescimento, foi realizada a análise proteômica das amostras por LC-MS, uma metodologia *gel-free* bastante utilizada para o estudo de subproteomas (Schmid *et al.*, 2012; Tanca *et al.*, 2013).



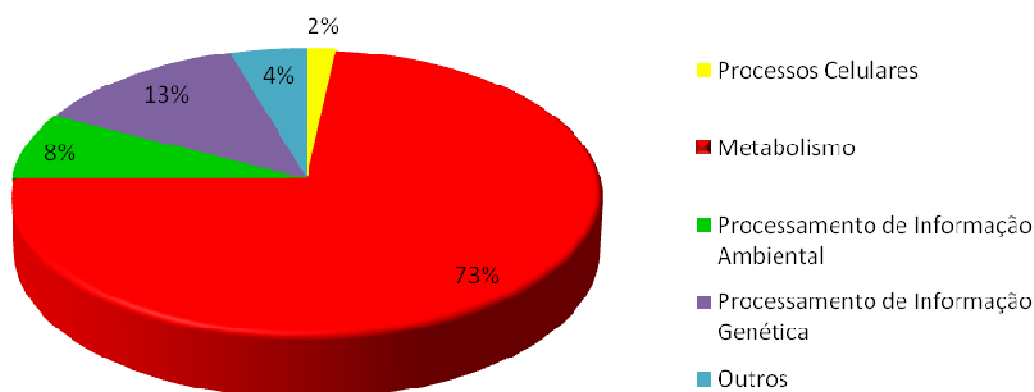
**Figura 8.** Perfil de massa molecular do lisado bacteriano total das linhagens de *E. coli* resistente e susceptível à magainina I por SDS-PAGE 12%, corado por azul de Coomassie. M, marcador de massa molecular *Broad Range Protein Molecular Weight Marker* (Promega); C1 a C3, linhagens susceptíveis à magainina I; R1 a R3, linhagens resistentes à magainina I. Foram utilizados 50  $\mu$ g de amostra protéica em cada poço.

Foram utilizados 100  $\mu$ g de extrato protéico total em cada triplicata de cada amostra para a digestão por tripsina e análise por nanoUPLC-MS<sup>E</sup>. Após aquisição e processamento dos dados, conforme descrito em material e métodos, as proteínas observadas nas amostras foram identificadas e comparadas entre si, com objetivo de verificar as proteínas diferencialmente expressas na linhagem resistente à magainina I. Para maior confiabilidade do resultado foram estabelecidas três réplicas técnicas e três



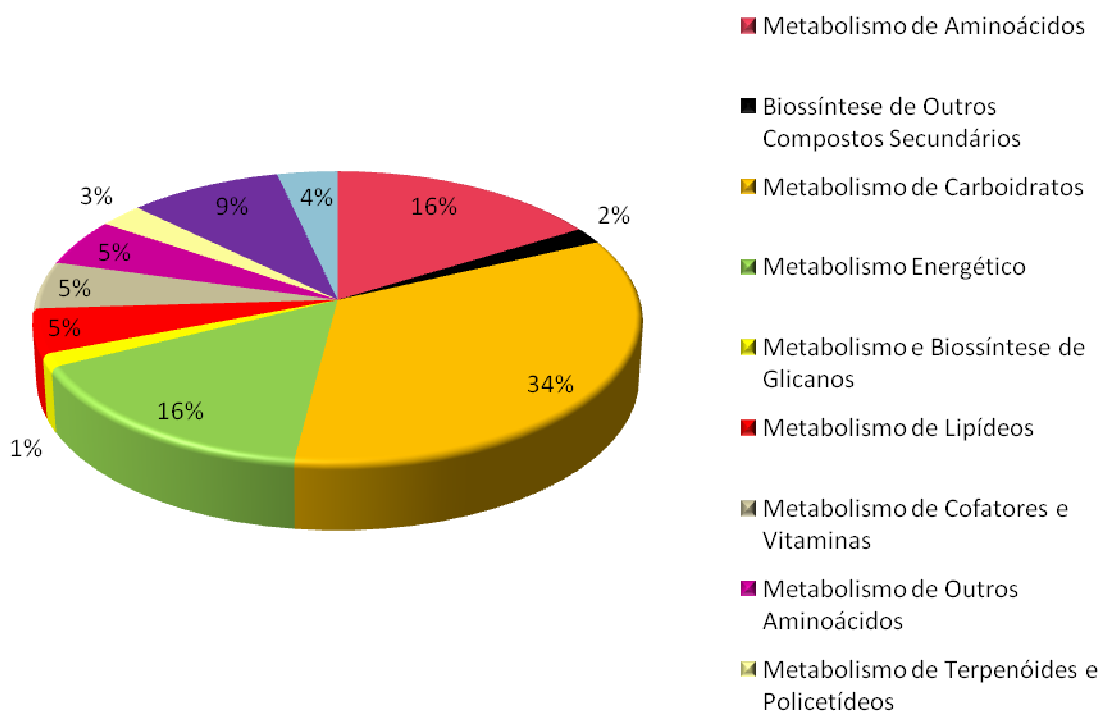
réplicas biológicas independentes para cada grupo susceptível e resistente e para aquisição do perfil protéico foram realizadas corridas separadas de cada réplica biológica, levando-se em consideração a reprodutibilidade das triplicatas. Os dados obtidos ao final das corridas de cada réplica biológica e técnica, foram agrupados para análise em três grupos experimentais, ATCC (réplicas da cepa ATCC 8739 original), susceptível (inclui as réplicas das linhagens C1, C2 e C3) e resistente (inclui as réplicas das linhagens R1, R2 e R3).

Dessa forma, foram identificados 1177 grupos de proteínas no total, distribuídas ao longo dos grupos experimentais e dentre essas 415 proteínas na cepa de *E. coli* ATCC 8739, 855 proteínas foram identificadas na linhagem de *E. coli* controle susceptível à magainina I e 868 proteínas foram identificadas na linhagem de *E. coli* resistente à magainina I. As proteínas identificadas nos grupos foram separadas em categorias e subcategorias utilizando a base de dados do KEGG Orthology (KOs) para a construção do perfil funcional. Foram obtidas 832 atribuições de KOs, distribuídas em cinco classes biológicas que podem ser visualizadas na Figura 9.



**Figura 9.** Distribuição das proteínas identificadas por nanoUPLC-MS<sup>E</sup> e PLGS em classes biológicas. As proteínas totais identificadas nos grupos experimentais foram distribuídas em classes biológicas através da classificação do KEGG.

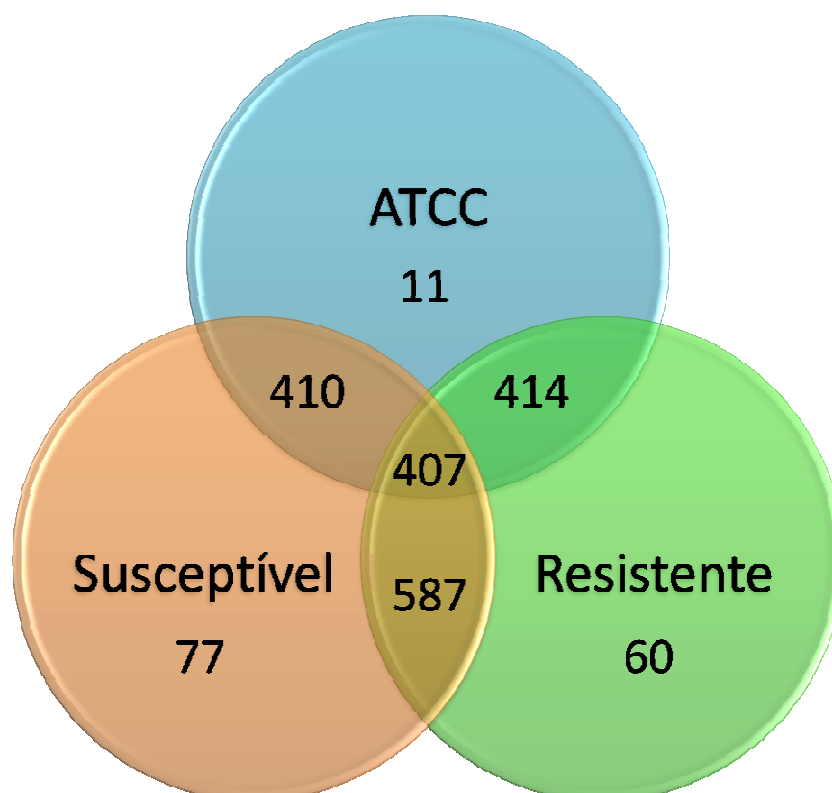
O grupo de KOs com maior representatividade consistiu em proteínas relacionadas ao metabolismo (73% das proteínas identificadas). Isto pode ser explicado pela intensa atividade metabólica das bactérias para se adaptarem ao microambiente e serem capazes de resistir à pressão negativa do peptídeo antimicrobiano como observado em outros estudos (Spoering *et al.*, 2006; Cuneo *et al.*, 2009; Maria-Neto *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013). Como essa classe biológica foi a mais representativa nesse estudo e em função da grande importância do metabolismo para a manutenção da viabilidade bacteriana e capacidade de defesa do microrganismo, essa classe biológica foi detalhadamente analisada e representada na Figura 10.



**Figura 10.** Distribuição das proteínas envolvidas no metabolismo bacteriano identificadas por nanoUPLC-MSE e classificadas conforme o KEGG.

A maioria das proteínas identificadas e relacionadas com o metabolismo participa do metabolismo de carboidratos (34%), seguido por metabolismo energético (16%), metabolismo de aminoácidos (16%) e metabolismo de nucleotídeos (10%)

(Figura 10). As proteínas de cada grupo foram comparadas entre si para a identificação das proteínas compartilhadas, diferenciais e exclusivas entre os grupos. O diagrama de Venn apresenta as interseções entre as proteínas identificadas e seus respectivos grupos experimentais (Figura 11).

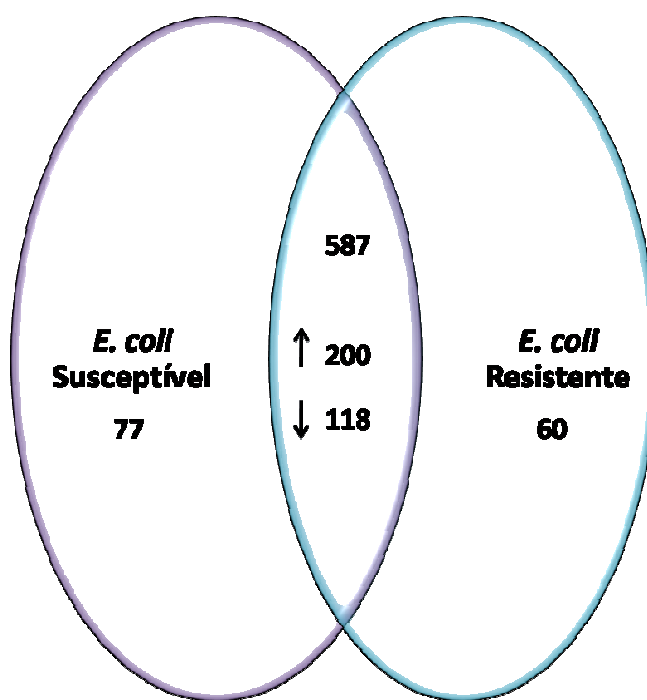


**Figura 11.** Diagrama de Venn mostrando as proteínas identificadas por nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, correlacionando-as com seu respectivo grupo controle ATCC 8739, controle susceptível à magainina I e resistente à magainina I. Também estão representadas as proteínas exclusivas de cada grupo, as proteínas comuns a todos os grupos e as proteínas comuns entre os diferentes grupos.

Nessa figura foi possível observar que 407 proteínas identificadas são comuns aos três grupos analisados, ATCC, susceptível à magainina I e resistente à magainina I. Analisando as interseções em pares, 410 proteínas identificadas foram compartilhadas entre os grupos susceptível e ATCC, 414 proteínas foram compartilhadas entre os

grupos ATCC e resistente e 587 proteínas foram compartilhadas entre os grupos susceptível e resistente. (Figura 11).

Também foi possível analisar que dentre as 587 proteínas identificadas e compartilhadas pelo grupo controle susceptível e pelo grupo resistente, 318 proteínas encontram-se diferencialmente expressas, sendo 200 proteínas reguladas positivamente (*fold* variando de 0,02 a 3,44) e 118 proteínas reguladas negativamente (*fold* variando de 0,02 a 2,88) na linhagem resistente em comparação com a linhagem susceptível à magainina I (Figura 12).



**Figura 12.** Diagrama de Venn mostrando as proteínas exclusivas, compartilhadas e diferenciais identificadas por comparação entre o grupo controle susceptível à magainina I e o grupo resistente à magainina I. A seta para cima ( ↑ ) indica as proteínas que estão superexpressas na linhagem resistente à magainina I e a seta para baixo ( ↓ ) indica as proteínas subexpressas na linhagem resistente à magainina I.

Em relação às proteínas com expressão diferencial, aumentadas ou diminuídas, para fins de significância, utilizou-se o valor do *fold change* para determinar o quão

expressivo é o aumento ou a diminuição da expressão e ainda o valor de variância que indica o quanto a proteína variou entre os grupos experimentais. Dessa forma foram consideradas expressivas apenas as proteínas diferenciais que apresentaram os valores de  $fold \geq 0,5$  e de variância  $\leq 0,51$ . Portanto, de acordo com esses parâmetros determinados, foram identificadas 10 proteínas superexpressas (Tabela 8) e 15 proteínas subexpressas (Tabela 9) no grupo resistente à magainina I em comparação com o controle. As funções e participação das proteínas diferenciais nos processos biológicos da célula bacteriana foram analisadas e descritas em seguida.

#### **6.2.1. Proteínas superexpressas na linhagem de *E. coli* resistente à magainina I**

Analisando a Tabela 8, dentre as 10 proteínas identificadas e superexpressas na linhagem resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível, três foram proteínas não caracterizadas (YKFA\_ECOLI, YCHO\_ECOLI e YGAU\_ECOLI). As outras sete proteínas superexpressas foram a proteína W de membrana externa (OMPW\_ECOLI), proteína C de membrana externa (OMPC\_ECOLI), proteína F de membrana externa (OMPF\_ECOLI), proteína de membrana externa fragmento 1b (Q1PI90\_ECOLI), proteína periplasmática de ligação a oligopeptídeo (OPPA\_ECOLI), proteína associada à resistência ao zinco (ZRAP\_ECOLI) e proteína periplasmática operon maltose (MALM\_ECOLI).

**Tabela 8.** Análise das proteínas superexpressas na linhagem de *Escherichia coli* resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível à magainina I identificadas por nanoUPLC-MS<sup>E</sup> e sua participação nos processos biológicos

Proteínas superexpressas na linhagem de <i>E. coli</i> resistente à magainina I							
Número de acesso	Identificação	Score	Log2	Variância	Descrição protéica	Massa molecular (Da)	Processo Biológico
P0A915	OMPW_ECOLI	236,44	0,50	0,45	Proteína W de membrana externa	22928,00	Transporte de membrana
P06996	OMPC_ECOLI	3576,12	0,65	0,03	Proteína C de membrana externa	40368,00	Transdução de sinal e transporte de membrana
P02931	OMPF_ECOLI	639,19	0,78	0,07	Proteína F de membrana externa	39333,00	Transdução de sinal e transporte de membrana
Q1PI90	Q1PI90_ECOLI	2207,53	0,71	0,04	Proteína de membrana externa fragmento 1b	27594,00	Transdução de sinal e transporte de membrana
P75678	YKFA_ECOLI	283,62	0,52	0,51	Proteína não caracterizada	31892,00	Proteína não caracterizada
P23843	OPPA_ECOLI	558,97	0,67	0,05	Proteína periplasmática de ligação a oligopeptídeo	60899,00	Transporte de membrana
P39165	YCHO_ECOLI	387,49	0,68	0,33	Proteína não caracterizada	52100,00	Proteína não caracterizada
P0AAA9	ZRAP_ECOLI	14392,98	0,70	0,05	Proteína associada à resistência ao zinco	15199,00	Homoestase de zinco e transdução de sinal
P03841	MALM_ECOLI	311,79	0,74	0,22	Proteína periplasmática operon maltose	31943,00	Transporte bacteriano
P0ADE6	YGAU_ECOLI	772,28	0,80	0,13	Proteína não caracterizada	16063,00	Proteína não caracterizada

Essas proteínas superexpressas estão diretamente correlacionadas com a superfície bacteriana e, de uma forma geral, participam principalmente do transporte pela membrana e da transdução de sinais (Tabela 8). A estrutura da superfície celular de bactérias Gram negativas é crucial para a fisiologia bacteriana, assim como para a comunicação das bactérias com o ambiente externo. A superfície de bactérias Gram negativas consiste de três camadas: a citoplasmática ou membrana interna (MI), a membrana externa (ME) e o espaço periplasmático entre a MI e a ME, e as proteínas de membrana e periplasmáticas são fundamentais para a sobrevivência bacteriana (Nandi *et al.*, 2005), o que pode justificar a presença de quatro proteínas de membrana e três proteínas periplasmáticas superexpressas na linhagem resistente à magainina I

#### **6.2.1.1. Proteínas de membrana**

Nesse trabalho as proteínas de membrana superexpressas nas linhagens resistentes à magainina I, OmpW (1,41 vezes mais expressa), OmpF (1,71 vezes mais expressa), OmpC (1,57 vezes mais expressa) e proteína de membrana externa fragmento 1b – fragmento da OmpC- (1,63 vezes mais expressa), são classificadas como porinas que, entre outras funções, auxiliam na permeabilidade da membrana externa, na transdução de sinais e consequentemente no controle da homeostase celular (Wu *et al.*, 2013). Como principal componente da membrana externa de bactérias Gram negativas, as proteínas de membrana externa (PME) como as porinas, são extremamente importantes para a fisiologia bacteriana (Lin *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013).

As porinas participam do transporte de membrana, auxiliando na translocação de proteínas e solutos pela membrana, na transdução de sinal e sabe-se que vários antibióticos utilizam essa estrutura de transporte para atravessar a proteção da membrana externa e alcançar a membrana citoplasmática para sua atuação (Gil *et al.*,

2007). Estudos demonstram que o aumento nas porinas presentes na membrana externa bacteriana, resulta no aumento da permeabilidade da ME aos antibióticos e geralmente está correlacionado com o aumento da susceptibilidade antimicrobiana (Lou *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013). Porém, também já se sabe que a regulação da expressão das proteínas da membrana externa e a resistência antimicrobiana associada, são antibiótico-específicas, dependendo intrinsecamente da substância antimicrobiana analisada (Lin *et al.*, 2010), bem como o intenso envolvimento das porinas de *E. coli* no efluxo e exportação de substâncias e proteínas do periplasma para fora da célula bacteriana (Prehna *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o aumento na expressão das porinas OmpW, OmpF, OmpC e OmpC fragmento 1b, de pelo menos 1,4 vezes, observado na linhagem resistente à magainina I, representa provavelmente o resultado do processo de resistência adaptativa desenvolvida por essa linhagem para conseguir sobreviver frente a uma futura re-exposição a esse peptídeo antimicrobiano. Provavelmente essa superexpressão pode estar relacionada com a intensificação da atividade de efluxo e eliminação da magainina I do espaço periplasmático, dificultando a sua ligação à membrana citoplasmática, seu principal alvo de ação, reduzindo o seu acúmulo nesse local, dificultando sua atividade antimicrobiana e evitando a morte bacteriana.

Alterações no nível de expressão das porinas de *E. coli*, como TolC, LamB, FadL, OmpC, OmpT e OmpW, podem estar frequentemente associadas com resistência bacteriana. Lin e colaboradores (2010) demonstraram que o nível de expressão protéica das porinas difere de acordo com a resistência que a linhagem de *E. coli* apresenta, uma vez que a expressão dessas porinas diferiram nas linhagens de *E. coli* resistente à clortetraciclina ou à cloranfenicol, confirmando que a alteração na expressão protéica parece ser antibiótico-específica. Também Zang e colaboradores. (2008), demonstraram



em *E. coli* a superexpressão das porinas OmpW e OmpC e TolC e subexpressão de LamB em resposta à resistência à tetraciclina, ratificando a importância da expressão diferencial dessas porinas.

Análises conduzidas em *Vibrio cholerae* resistente à tetraciclina, outra bactéria Gram negativa, descreveram a importância do controle de expressão das porinas, geralmente apresentando a OmpU superexpressa e a OmpT sob essas condições (Nandi *et al.*, 2005). Além disso, também foi demonstrado que a expressão de OmpW em *Salmonella typhimurium* pode ser requerida para a resistência ao paraquat, um composto de amônia quaternária que gera espécies reativas de oxigênio (ROS, iniciais do inglês) sob condições aeróbicas, sugerindo-se que a porina OmpW, juntamente com outras PME funcionam como um canal para o efluxo desse composto (Gil *et al.*, 2007). Portanto o controle da expressão dessas proteínas da membrana externa pela bactéria tem sido de fundamental para a sua sobrevivência e podem representar o ponto chave para o entendimento de vários mecanismos de resistência aos peptídeos antimicrobianos

#### **6.2.1.2. Proteínas periplasmáticas de ligação**

O outro grupo de proteínas superexpressas na linhagem resistente à magainina I foi o de proteínas periplasmáticas, representadas pela proteína periplasmática de ligação a oligopeptídeo, OppA (1,60 vezes mais expressa); proteína associada à resistência ao zinco, ZraP (1,62 vezes mais expressa) e proteína periplasmática operon maltose, MalM (1,67 vezes mais expressa) (Tabela 8), todas correlacionadas com o transporte intracelular bacteriano, transdução de sinal e homeostase. As proteínas periplasmáticas de ligação compreendem uma superfamília presente em diferentes organismos e que apresentam grande diversidade molecular permitindo a ligação de diferentes tipos de ligantes (Cuneo *et al.*, 2009).

As proteínas periplasmáticas OppA e MalM parecem estar relacionadas principalmente com a nutrição bacteriana, sendo a MalM associada ao transporte de carboidratos (Cuneo *et al.*, 2009), e a OppA ao transporte de oligopeptídeos (Acosta *et al.*, 2000). A superexpressão dessas proteínas na linhagem de *E. coli* resistente à magainina I (Tabela 8) pode representar um ganho energético para a bactéria e uma adaptação fisiológica, uma vez que a quantidade suficiente de energia parece ser essencial para a defesa celular bacteriana contra a ação dos AMPs (Maria-Neto *et al.*, 2012). Além disso, a OppA parece ter outra função correlacionada com a aquisição de resistência bacteriana, conforme detalhado abaixo.

A OppA é um dos componentes do maior sistema de transporte de oligopeptídeos de bactérias entéricas (Acosta *et al.*, 2000). Esta proteína consiste em uma permease com ampla especificidade de substrato, ligando-se à peptídeos com 2 à 5 resíduos de aminoácidos em bactérias Gram negativas e transportando-os do periplasma para o citoplasma (Ito-Kurashima e Moromisato, 2007). O mecanismo de transporte de oligopeptídeos da OppA parece ser essencial para nutrição e adaptação bacteriana, participando de dois processos principais, a captura de aminoácidos e a reciclagem de muropeptídeos (Monnet 2003). Em algumas bactérias da família Enterobacteriaceae, a reciclagem de muropeptídeos da parede celular está estritamente conectada com a sinalização celular bacteriana para a ativação e regulação da resposta de virulência e resistência bacteriana (Reith e Mayer, 2011; Boudreau *et al.*, 2012). Dessa forma, a superexpressão dessa proteína, conforme observado nesse estudo (Tabela 8), além de auxiliar no aporte nutricional bacteriano, pode sinalizar para a *E. coli*, a necessidade de montagem e estruturação de uma resposta de resistência contra a magainina I, que provavelmente seria intensificada na presença desse AMP. A caracterização dos mecanismos pelos quais a adaptação funcional bacteriana ocorre pode ser considerada

uma estratégia para compreender melhor a participação dessas proteínas na resistência bacteriana aos AMPs .

### **6.2.2. Proteínas subexpressas na linhagem de *E. coli* resistente à magainina I**

De acordo com a Tabela 9, foram identificadas 15 proteínas subexpressas na linhagem resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível. Dentre essas proteínas diferenciais, duas são proteínas não caracterizadas (YCCJ\_ECOLI e YBCJ\_ECOLI) e o restante participa principalmente de diferentes processos no metabolismo bacteriano e na regulação de processos genéticos, como a replicação e transcrição, e que serão detalhadas em função da sua provável correlação com a resistência da *E. coli* à magainina I.

**Tabela 9.** Análise das proteínas subexpressas na linhagem de *Escherichia coli* resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível à magainina I identificadas por nanoUPLC-MS<sup>E</sup> e sua participação nos processos biológicos.

Proteínas subexpressas na linhagem de <i>E. coli</i> resistente à magainina I							
Número de acesso	Identificação	Score	Log2	Variância	Descrição protéica	Massa molecular (Da)	Processo Biológico
P13033	GLPB_ECOLI	483,13	2,03	0,36	Glicerol-3-fosfato desidrogenase subunidade B anaeróbio	45357,00	Metabolismo de fosfolipídeos
P09394	GLPQ_ECOLI	2564,38	1,40	0,18	Glicerofosforil diester fosfodiesterase	40843,00	Metabolismo de fosfolipídeos
P0A9C0	GLPA_ECOLI	2024,03	1,28	0,18	Glicerol-3-fosfato desidrogenase subunidade A anaeróbio	58958,00	Metabolismo de fosfolipídeos
P0AB14	YCCJ_ECOLI	42340,24	0,80	0,07	Proteína não caracterizada	8524,00	Proteína não caracterizada
P76268	KDGR_ECOLI	403,70	0,79	0,30	Regulador transcricional kdgR	30029,00	Regulação de transcrição
P64463	YDFZ_ECOLI	12233,5	0,77	0,05	Provável selenoproteína ydfZ	7276,00	Metabolismo de outros aminoácidos
P77454	GLSA1_ECOLI	485,06	0,74	0,17	Glutaminase 1	32903,00	Metabolismo energético

P0AAS7	YBCJ_ECOLI	854,17	0,60	0,37	Proteína não caracterizada	7390,00	Proteína não caracterizada
P0AGL2	TDCF_ECOLI	826,76	0,57	0,16	Proteína tdcF	14007,00	Metabolismo de aminoácido
Q59385	COPA_ECOLI	205,89	0,53	0,36	ATPase do tipo P exportadora de cobre	87873,00	Efluxo de metais pesados
P0A6K3	DEF_ECOLI	392,11	0,52	0,46	Peptídeo deformilase	19328,00	Metabolismo de proteína
P0A759	NAGB_ECOLI	276,4	0,51	0,37	Glucosamina-6-fosfato deaminase	29774,00	Metabolismo de carboidrato
P0ABT2	DPS_ECOLI	32750,34	0,51	0,03	Proteína de proteção do DNA durante privação de nutrientes	18695,00	Proteção do DNA
P0A6Y8	DNAK_ECOLI	19211,09	0,51	0,02	Proteína chaperona DnaK	69115,00	Replicação do DNA e metabolismo de proteína
P0A8G6	WRBA_ECOLI	11264,48	0,50	0,03	Flavoproteína wrbA	20846,00	Oxidoredução

### 6.2.2.1. Proteínas que participam do metabolismo de fosfolípidos

As proteínas, glicerol-3-fosfato desidrogenase subunidade B, anaeróbio, GlpB (4 vezes menos expressa); a glicerol-3-fosfato desidrogenase subunidade A anaeróbio, GlpA (2,43 vezes menos expressa), e ainda a glicerofosforil diester fosfodiesterase, GdpD (2,63 vezes menos expressa) encontram-se subexpressas na linhagem resistente à magainina I. Essas proteínas participam do metabolismo de fosfolípidos, o principal componente das membranas bacterianas, justificando a sua importância para o controle da homeostase e sobrevivência bacteriana (Nikaido, 2003; Metzner e Raetz, 2010).

As GlpB e GlpA formam um complexo com a GlpC (complexo GlpA/B/C), resultando na enzima sn-glicerol-3-fosfato desidrogenase, que em *E. coli*, está envolvida na conversão de diidroxiacetona fosfato (DHAP) em glicerol-3-fosfato (G3P), um precursor da síntese de fosfolípidos (Spoering *et al.*, 2006; Bizzini *et al.*, 2012). Alterações nessas enzimas e na glicerofosforil diester fosfodiesterase (GdpD) resultam em mudanças na composição e distribuição dos fosfolípidos da membrana bacteriana e estão correlacionadas com resistência aos antibióticos e aos AMPs (Tran *et al.*, 2013; Dowhan, 2013).

Portanto, o fato dessas proteínas estarem subexpressas na linhagem resistente à magainina pode indicar uma adaptação dessas bactérias à pressão seletiva da magainina I, resultando na alteração da superfície bacteriana de uma forma geral, bem como da membrana citoplasmática, dificultando, em um primeiro momento, o acesso desse peptídeo antimicrobiano à membrana interna e o acúmulo desse peptídeo no seu local de atuação e podendo inviabilizar inclusive, a formação dos poros na membrana celular pela magainina I frente a uma exposição a esse peptídeo.

#### 6.2.2.2. Proteínas envolvidas no processamento de informação genética

Outras proteínas subexpressas identificadas na linhagem resistente à magainina I, regulador transcricional *kdgR* (1,73 vezes menos expressa), proteína de proteção do DNA durante privação de nutrientes e proteína chaperona *DnaK* (ambas proteínas, 1,42 vezes menos expressas), estão associadas ao processamento de informação genética, seja na replicação, proteção do DNA ou regulação de transcrição (Tabela 9).

A expressão de chaperonas como *DnaK* e *GroEL*, que auxiliam no direcionamento de polipeptídeos e estão envolvidas em diferentes respostas celulares, como a replicação (Castanié-Cornet *et al.*, 2013; Jonas *et al.*, 2013), tem sido observada na resposta celular bacteriana sob condições de estresse ambiental e em resistência bacteriana (Cardoso *et al.*, 2010). Nesse trabalho também foi identificada alteração na expressão da chaperona *DnaK* sob condições normais, conforme previamente observado por Maria-Neto *et al.* (2012), sugerindo que a regulação dessa proteína, provavelmente devido sua importância nos processos celulares, pode ser crucial não apenas sob condições de estresse, mas também em linhagens resistentes aos AMPs sob condições normais de crescimento.

Os reguladores de transcrição são proteínas importantes para a regulação do nível de proteínas relevantes para a célula, contribuindo para a ativação ou repressão de genes dependendo da necessidade celular e direcionando o gasto energético para as funções celulares indispensáveis. As expressões protéicas do regulador transcricional *kdgR* (*KDGR\_ECOLI*), que controla a transcrição da maioria dos genes envolvidos na degradação de pectina quando a única fonte de carbono for o galacturonato (Pujic *et al.*, 1998; Lin e Shaw, 2007) e da proteína *DPS* (proteína de proteção do DNA durante privação de nutrientes), que protege o DNA de danos oxidativos, estresse térmico e alterações de pH, durante a privação de nutrientes (Martinez e Koulter, 1997; Goulter-

Thorsen *et al.*, 2011; Almiron *et al.*, 2013) encontram-se reduzidas na linhagem de *E. coli* resistente à magainina I (Tabela 9). Esse resultado sugere que sob condições adequadas de crescimento e nutrição, como observado nesse trabalho, a bactéria resistente direciona o seu metabolismo para a ativação de genes e expressão de proteínas que possam ser relevantes para a sobrevivência bacteriana sob essas condições, inibindo a expressão de proteínas que não seriam requisitadas nesse momento pela bactéria.

De uma forma geral a resposta bacteriana observados nesse trabalho ilustra o processo de resistência adaptativa presente em condições ambientais não hostis para o crescimento bacteriano, como condições ideais de temperatura, pH, fonte de nutrição, aeração e sem a pressão negativa do AMP, indicando que a *E. coli* resistente à magainina I desenvolveu um complexo mecanismo molecular de adaptação e defesa bacteriana e que provavelmente o mecanismo de ação desse peptídeo parece ser bem mais complexo do que apenas a interferência na estabilidade da membrana celular bacteriana.

### **6.2.3. Proteínas exclusivas identificadas na linhagem de *E. coli* resistente à magainina**

Além das proteínas diferencialmente expressas, foram encontradas 77 proteínas identificadas apenas no grupo susceptível, 11 proteínas apenas no grupo ATCC e 60 proteínas identificadas exclusivamente no grupo resistente (Figuras 11 e 12). As proteínas identificadas exclusivamente na linhagem resistente à magainina I, bem como a sua participação nos processos biológicos bacterianos foram descritas na Tabela 10.



**Tabela 10.** Análise das proteínas exclusivas identificadas na linhagem de *Escherichia coli* resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível à magainina I e com a cepa ATCC 8739 por nanoUPLC-MS<sup>E</sup> e sua participação nos processos biológicos.

<b>Proteínas exclusivas identificadas na linhagem de <i>E. coli</i> resistente à magainina I</b>			
<b>Identificação</b>	<b>Score</b>	<b>Descrição</b>	<b>Processo biológico</b>
PIFC_ECOLI	353,62	Repressor de transcrição repressor pifC	Transcrição
PPNK_ECOLI	238,3	Provável polifosfato inorgânico/ ATP-NAD quinase	Metabolismo de cofatores e vitaminas
PPIC_ECOLI	720,19	Peptidil-prolil cis-trans isomerase C	Metabolismo de proteína
YJAH_ECOLI	416,62	Proteína não caracterizada	Proteína não caracterizada
FEPC_ECOLI	183,26	Proteína FepC de transporte de enterobactina férrica ligada ao ATP	Transporte de membrana
DGOR_ECOLI	302,04	Repressor transcricional do operon galactonato	Transcrição
MTLD_ECOLI	229,26	Manitol-1-fosfato 5-desidrogenase	Metabolismo de carboidrato
A5PFJ9_ECOLI	286,78	IS10 transposase	Replicação e reparo
YMFN_ECOLI	270,86	Proteína não caracterizada	Proteína não caracterizada
TDCG_ECOLI	251,32	L-serina desidratase tdcG	Metabolismo de aminoácido
RHAS_ECOLI	340,29	Ativador transcricional rhaS do tipo HTH	Transcrição
STFR_ECOLI	195,66	Proteína Rac de filamento de cauda lateral homóloga ao profago lamboide	Interação com hospedeiro
TTCA_ECOLI	345,25	tRNA 2-tiocitidina de biosíntese de TctA	Tradução

---

GUAC_ECOLI	235,03	GMP redutase	Metabolismo de nucleotídeo
TMCA_ECOLI	260,1	tRNA(Met) citidine acetiltransferase TmcA	Tradução
GARD_ECOLI	174,22	D-galactarato desidratase	Metabolismo de carboidrato
EUTK_ECOLI	279,49	Proteína EutK de utilização de etanolamine	Transporte e catabolismo
ENTB_ECOLI	353,76	Isocorismatase	Metabolismo de terpenóides e policetídeos
SECY_ECOLI	189,49	Preproteína translocase subunidade SecY	Transporte de membrana
YAIV_ECOLI	269,7	Proteína não caracterizada	Proteína não caracterizada
MASY_ECOLI	240,63	Malato sintase A	Metabolismo de carboidrato
DPPA_ECOLI	273,55	Proteína periplasmática dipeptídica de transporte	Motilidade celular
FHUA_ECOLI	244,6	Receptor ferro-ferricromo	Transporte de membrana
FLIG_ECOLI	283,19	Proteína FliG flagelar	Motilidade celular
YOAB_ECOLI	376,62	Proteína yoaB da família RutC	Formação de biofilme
AK3_ECOLI	200,63	Lisina- aspartoquinase sensível 3	Metabolismo de aminoácido
MALQ_ECOLI	209,32	4-alfa-glucanotransferase	Metabolismo de carboidrato
RIBD_ECOLI	255,09	Proteína RibD de biosíntese de riboflavina	Metabolismo de cofatores e vitaminas
YHIN_ECOLI	258,38	Proteína não caracterizada	Proteína não caracterizada

---

---

YHCC_ECOLI	420,17	Proteína não caracterizada	Proteína não caracterizada
FRLR_ECOLI	423,25	Ativador transcricional frlR do tipo HTH	Transcrição
YNEI_ECOLI	217,2	Aldeído desidrogenase yneI-símile	Oxidoredução
DHSB_ECOLI	228,58	Succinato desidrogenase subunidade ferro-enzofre	Oxidoredução
YKGC_ECOLI	199,51	Provável piridina nucleotídeo-disulfido oxidoreductase ykgC	Oxidoredução
YACC_ECOLI	467,77	Proteína não caracterizada	Proteína não caracterizada
YADI_ECOLI	475,17	Provável fosfotransferase enzima IIA componente yadI	Transporte de membrana
PLSB_ECOLI	218,31	Glicerol-3-fosfato aciltransferase	Metabolismo de lipídeo
YCCE_ECOLI	351,62	Proteína não caracterizada	Proteína não caracterizada
MODE_ECOLI	551,35	Regulador transcricional modE	Transcrição
DDLB_ECOLI	280,3	D-alanina--D-alanina ligase B	Metabolismo de outros aminoácidos
USPC_ECOLI	424,81	Proteína C de estresse universal	Replicação e reparo
RECJ_ECOLI	241,5	Exonuclease de fita simples de DNA específica recJ	Replicação e reparo
ACRA_ECOLI	273,93	Proteína acriflavina de resistência	Transporte de membrana
YHGF_ECOLI	237,56	Proteína yhgF	Metabolismo celular
TYRR_ECOLI	201,23	Proteína tyrR de regulação transcricional	Transcrição

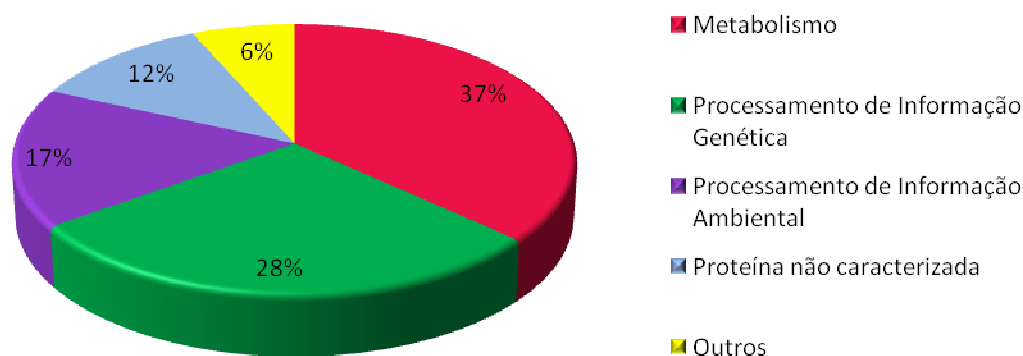
---

---

NIKA_ECOLI	244,58	Proteína periplasmática de ligação ao níquel	Transporte de membrana
FRSA_ECOLI	203,33	Esterase frsA	Metabolismo energético
HSLO_ECOLI	246,89	33 kDa chaperonina	Metabolismo de proteína
KDGK_ECOLI	255,59	2-desidro-3-deoxigluconoquinase	Metabolismo de carboidrato
NSRR_ECOLI	454,9	Repressor transcricional nsrR do tipo HTH	Transcrição
WCAE_ECOLI	388,26	Provável glicosil transferase wcaE de biosíntese de ácido colânico	Metabolismo e biosíntese de glicanos
FDOG_ECOLI	220,31	Formato desidrogenase-O subunidade maior	Transdução de sinal
XNI_ECOLI	417,1	Proteína Xni	Replicação
YAEF_ECOLI	303,74	Lipoproteína yaeF não caracterizada	Metabolismo celular
RSMI_ECOLI	254,85	Ribossomal RNA pequeno subunidade metiltransferase I	Tradução
NRDD_ECOLI	209,98	Anaeróbio ribonucleosídeo-trifosfato reductase	Metabolismo de nucleotídeo
METR_ECOLI	298,54	Regulador transcricional metR do tipo HTH	Transcrição
THIL_ECOLI	255,05	Tiamina-monofosfato quinase	Metabolismo de cofatores e vitaminas
EXOX_ECOLI	448,56	Exodesoxiribonuclease 10	Replicação e reparo
CPTA_ECOLI	254,32	Fosfoetanolamina transferase CptA	Metabolismo celular

---

Foi possível analisar que a maioria das proteínas exclusivas da linhagem resistente participa do metabolismo bacteriano (37%), como esperado, seguida do processamento de informação genética (28%) e o processamento de informação ambiental (17%) (Figura 13). Assim como outras bactérias, a *E. coli* consegue desenvolver mecanismos sofisticados de resposta ao estresse e que propiciam a sua sobrevivência em diferentes condições ecológicas e em ambientes hostis (Asakura *et al.*, 2008), o que pode justificar essa resposta diferenciada na linhagem de *E. coli* resistente à magainina I.



**Figura 13.** Distribuição das proteínas exclusivas identificadas na linhagem resistente à magainina I por nanoUPLC-MS<sup>E</sup>

A presença de proteínas exclusivas em organismos resistentes aos peptídeos antimicrobianos pode ser interessante para a busca por moléculas alvos que participam do desenvolvimento de resistência bacteriana e ainda para compreender melhor esses mecanismos. A resistência bacteriana acontece geralmente por uma combinação na redução da passagem do antimicrobiano para o interior da célula, através da membrana externa, modificações no alvo dos antimicrobianos (proteína ou via metabólica),

degradação do antimicrobiano ou ainda o transporte dessa substância para fora da célula bacteriana (Monnet, 2003; Wright, 2011).

Dessa forma, o estudo de proteínas envolvidas nesses processos, como na redução de permeabilidade da membrana externa e ativação de bombas de efluxo (Lin *et al.*, 2010) e que propiciem adaptações para sobrevivência em condições hostis (Wu *et al.*, 2013), pode ser bastante interessante também para a compreensão dos mecanismos de resistência bacteriana aos peptídeos antimicrobianos, de uma forma geral. Essas proteínas exclusivas serão mais bem estudadas posteriormente para a elucidação da possível participação das mesmas nos mecanismos de resistência bacteriana à magainina I.

### **6.3. CAPÍTULO III - RNA-Seq e análise do transcriptoma de *E. coli* resistente e susceptível à magainina I.**

#### **6.3.1. Sequenciamento de RNA de nova geração (RNA-seq)**

Afim de melhor compreender os prováveis genes envolvidos na resistência bacteriana de *E. coli* ao peptídeo antimicrobiano magainina I, análises transcriptômicas utilizando a tecnologia do sequenciamento de nova geração (RNAseq), foram realizadas. As linhagens C1, susceptível à magainina I e R3, resistente à magainina I, foram selecionadas para a realização desse experimento e cultivadas na presença ou ausência de magainina I. Dessa forma, conforme descrito em material e métodos, foram realizadas as extrações de RNA total das amostras C1 I, II e III, triplicatas da linhagem susceptível à magainina I na ausência de magainina I; C1 Mag I, II e III, triplicatas da linhagem susceptível à magainina I na presença de magainina I; R3 I, II e III, triplicatas da linhagem resistente à magainina I na ausência de magainina I; R3 Mag I, II e III, triplicatas da linhagem resistente à magainina I na presença de magainina I. Após a extração, o RNA total de cada amostra foi quantificado conforme mostrado na Tabela 11, obtendo-se uma concentração de RNA total variando de 37,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  à 160,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

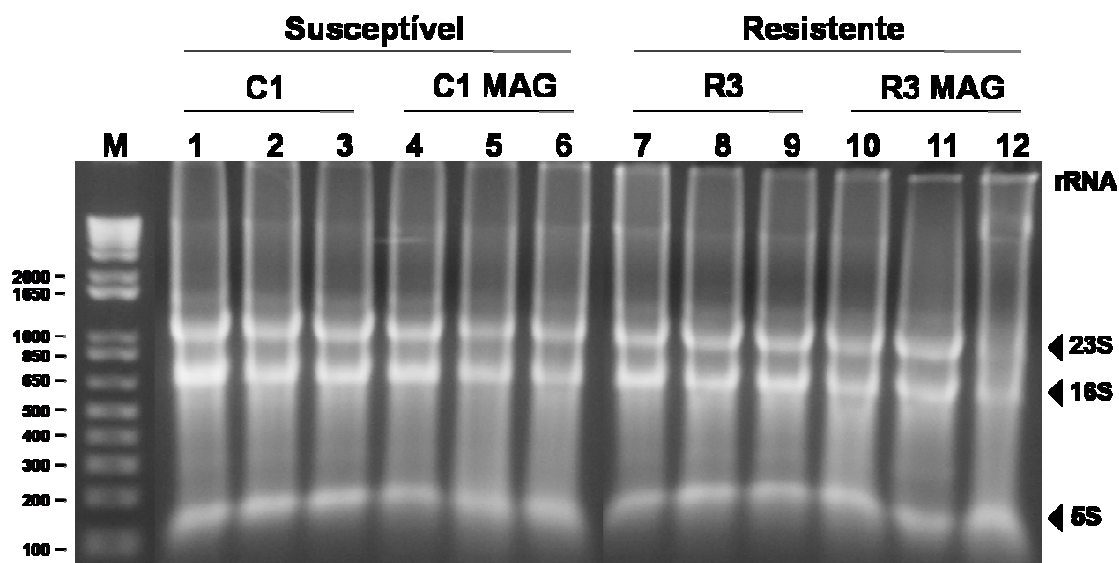
**Tabela 11.** Análise da qualidade do RNA extraído das linhagens de *Escherichia coli* susceptível e resistente à magainina I para RNA-seq.

Análise qualitativa e quantitativa do RNA utilizado para sequenciamento			
Amostra	Concentração de RNA total ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Concentração de mRNA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Quantidade de rRNA (%)
C1 I	39,8	6,0	0,0
C1 II	45,8	6,5	0,0
C1 III	62,3	4,1	0,0
C1 Mag I	48,4	7,4	0,0
C1 Mag II	37,1	5,8	0,0
C1 Mag III	60,4	5,6	0,4
R3 I	74,1	8,3	0,3
R3 II	110,0	3,2	0,0
R3 III	81,8	2,0	1,8
R3 Mag I	100,0	3,8	0,0
R3 Mag II	160,0	2,9	0,0
R3 Mag III	67,4	7,6	0,0

As concentrações de RNA foram obtidas de acordo com o Qubit® e a quantidade de rRNA das amostras pelo Agilent 2100 Bioanalyser após a remoção de rRNA conforme metodologia. I, II e III, triplicatas de cada tratamento; C1, linhagem susceptível à magainina I; R3, linhagem resistente à magainina I; Mag, linhagens incubadas com magainina I.

Adicionalmente, a integridade dos RNAs extraídos foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, sendo possível observar que o RNA total de todas as amostras estava íntegro, podendo então ser utilizado para a próxima etapa de remoção de rRNA (Figura 14).





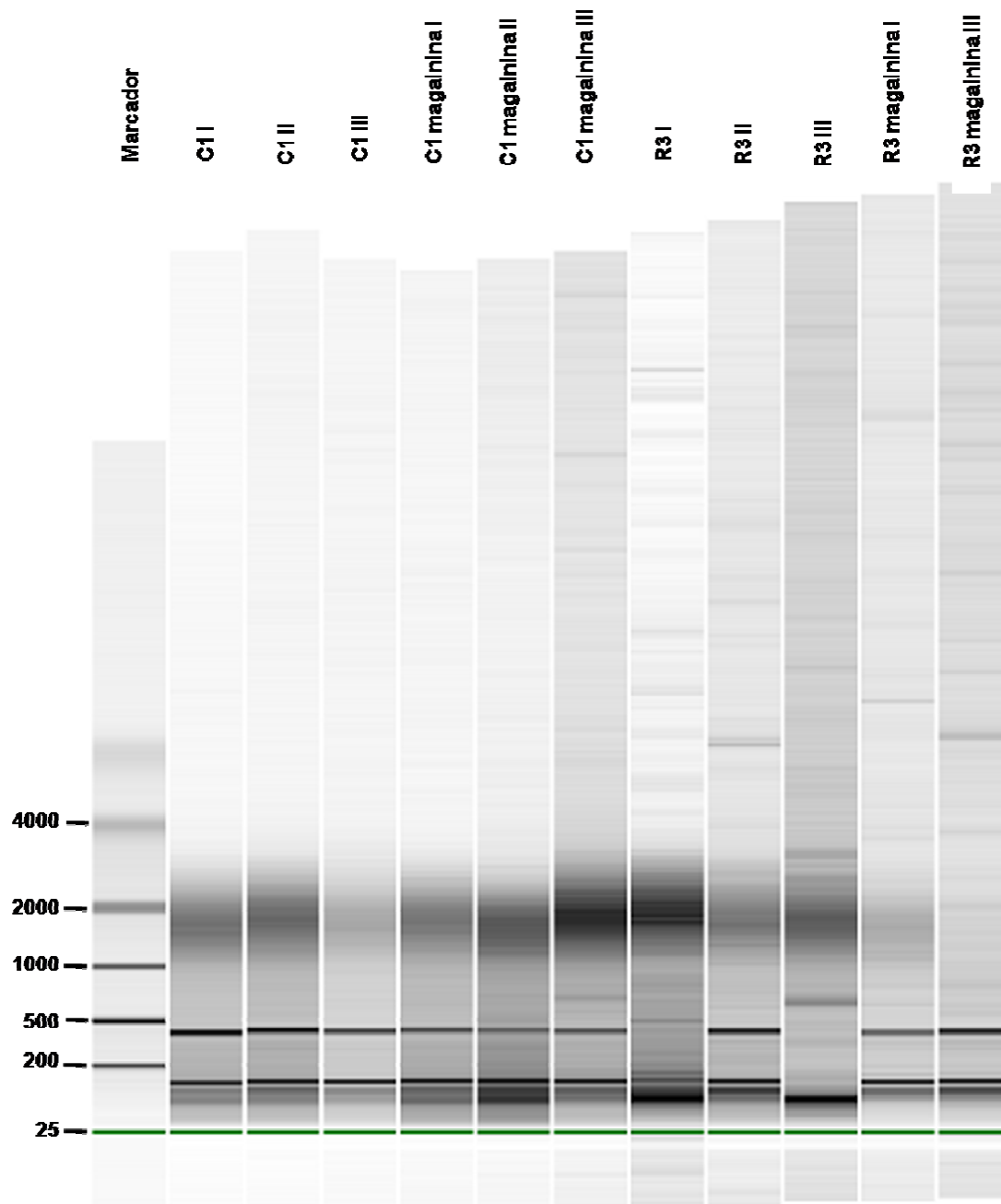
**Figura 14.** Análise da integridade do RNA total extraído das linhagens susceptível e resistente à magainina I. Eletroforese em gel de agarose 0.7% corado com brometo de etídeo  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . As amostras estão apresentadas em triplicata. M, marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) em pares de bases (pb); C1, linhagem susceptível à magainina I; R3, linhagem resistente à magainina I; MAG, linhagens incubadas com magainina I.

Nas bibliotecas de cDNA, a abundância de sequências derivadas de RNA ribossomal (rRNA), o qual geralmente representa 95% do total de RNA intracelular, reduz a eficiência do RNA-seq para estudos de genômica funcional e análises da diversidade transcriptômica, uma vez que apenas uma pequena fração de leituras são sequências de interesse. Nesse contexto, as técnicas de preparação do RNA, que removem eficientemente as populações de sequências derivadas de rRNA, antes do RNA-seq, são altamente necessárias (VanderNoot *et al.*, 2012).

Dessa forma, foram utilizados  $5 \mu\text{g}$  do RNA total de cada amostra (Figura 14) para a depleção de 16S e 23S rRNA (Osmundson *et al.*, 2013) e obtenção das populações purificadas de mRNA. Após as etapas descritas no material e métodos, as amostras livres de rRNA foram quantificadas e as concentrações variaram de  $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  à  $8,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 11).

Antes da construção das bibliotecas de cDNA, a integridade das amostras que passaram pelo processo de depleção de rRNA foi novamente analisada, utilizando o Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). Como parâmetro de qualidade das amostras observou-se a porcentagem de contaminação de rRNA, que foi bastante reduzida, sendo de 0% na maioria das amostras, conforme observado na Tabela 11. Esses dados demonstram que o RNA utilizado para a construção das bibliotecas estava íntegro e de qualidade suficiente para o sequenciamento, o que pôde ser corroborado pela análise do gel obtido no Bioanalyser (Figura 15).

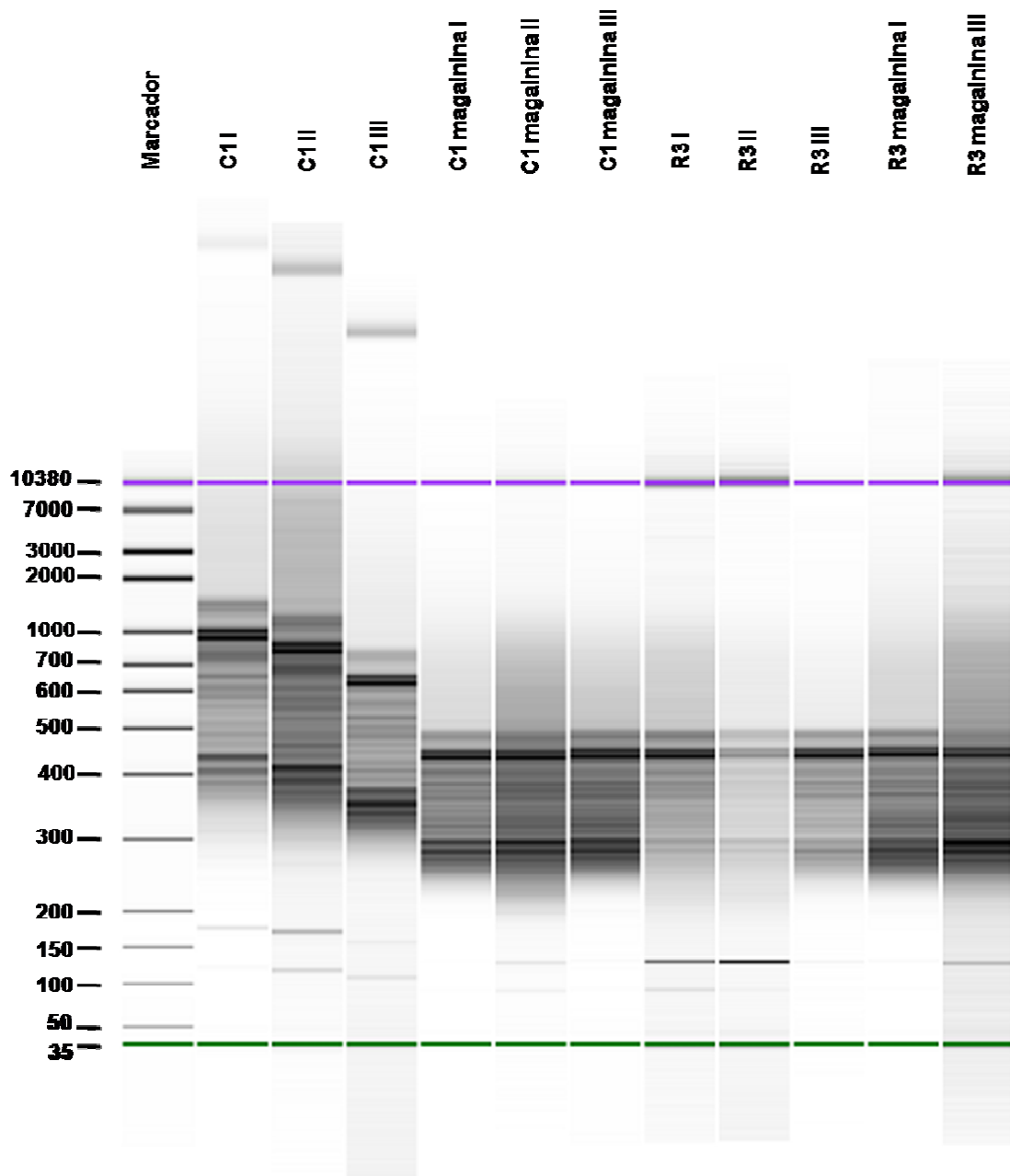
Além disso, foi possível observar que em todas as réplicas, com exceção na réplica R3 magainina II, a maior quantidade de RNA encontrado nas amostras era mRNA (Tabela 11), como esperado, que pode ser observado entre 0,1-4,0 kb (Figura 15). No caso da réplica II da amostra R3 incubada com magainina, (R3 magainina II), a quantidade final obtida de mRNA foi considerada insuficiente e a mesma não foi utilizada para a construção das bibliotecas de cDNA, restando, dessa forma, 11 amostras contendo mRNA de qualidade suficiente para a construção das bibliotecas, que estão demonstradas na Figura 15.



**Figura 15.** Análise de qualidade do mRNA utilizado para a construção das bibliotecas de cDNA. Resultado em pares de bases (pb) obtido conforme análise pelo Agilent 2100 Bioanalyser. I, II e III, triplicatas de cada tratamento; C1, linhagem susceptível à magainina I; R3, linhagem resistente à magainina I; magainina, amostras incubadas com magainina I. Em verde, destaque para a banda do marcador.

As bibliotecas de cDNA foram construídas conforme metodologia previamente descrita e posteriormente validadas através de análise no Agilent 2100 Bioanalyser. Os resultados observados na Figura 16 demonstram a pureza, integridade e tamanho dos

fragmentos de cDNA (principalmente de 300-1000 pb) de cada réplica, validando a biblioteca para sequenciamento.



**Figura 16.** Análise de qualidade das bibliotecas de cDNA. Resultado em pares de bases (pb) obtido conforme análise pelo Agilent 2100 Bioanalyser. I, II e III, triplicatas de cada tratamento; C1, linhagem susceptível à magainina I; R3, linhagem resistente à magainina I; magainina, amostras incubadas com magainina I. Em verde e roxo, destaque para as bandas do marcador.

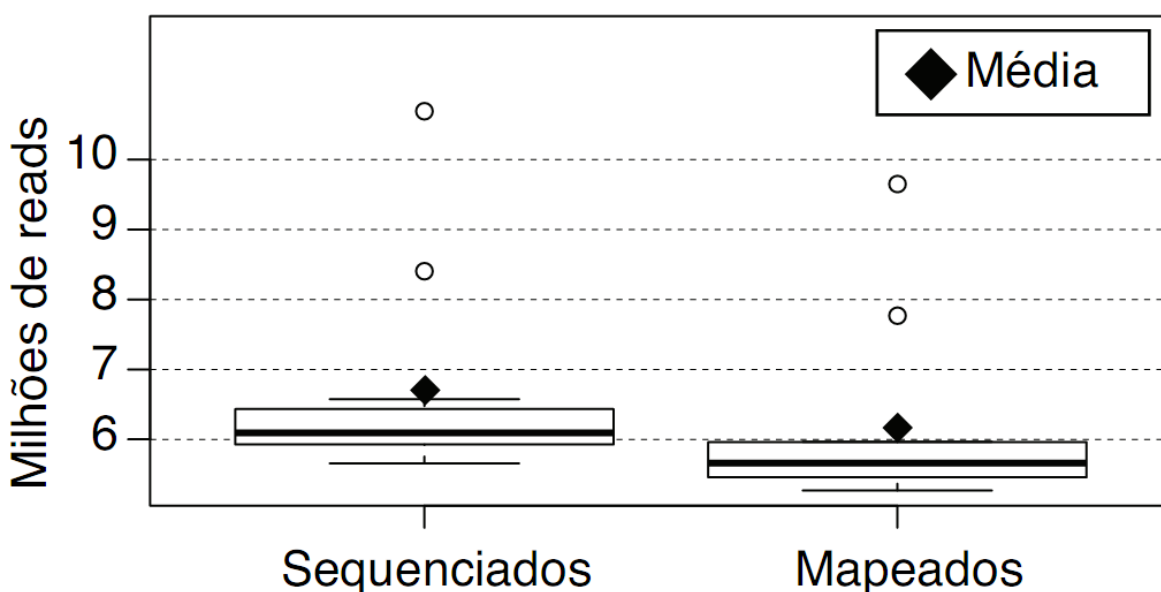
Após a validação, as bibliotecas de cDNA foram misturadas e aplicadas em um poço na placa de sequenciamento (*lane*) da plataforma MiSeq<sup>®</sup> (Illumina), sendo realizado duas corridas independentes e gerando um total variável de 5.656.216 à 10.693.190 de sequências de qualidade, dependendo da amostra observada, analisadas através de suas duas extremidades (*paired-end reads*), conforme Tabela 12. Sabe-se que as plataformas Illumina geralmente são capazes de gerar em média mais de 5 milhões de sequências *paired-end* de 150 pares de bases por dia de experimento, dependendo da plataforma utilizada (Caporaso *et al.*, 2012), como observado nesse trabalho.

**Tabela 12.** Quantidade de fragmentos obtidos no sequenciamento das linhagens de *Escherichia coli* susceptível e resistente à magainina I.

Dados do RNA-seq		
Amostra	Sequenciado	Mapeado
C1 I	5.957.612	5.589.274
C1 II	5.964.594	5.461.862
C1 III	6.093.102	5.659.438
C1Mag I	6.291.368	5.955.644
C1Mag II	6.193.486	5.762.294
C1Mag III	6.574.548	5.965.994
R3 I	5.887.624	5.452.088
R3 II	5.894.438	5.268.358
R3 III	10.693.190	9.650.462
R3Mag I	5.656.216	5.283.418
R3Mag III	8.406.434	7.767.608

O resultado demonstra a quantidade de sequências obtidas após o sequenciamento e posteriormente após serem mapeadas em relação ao genoma de referência para *Escherichia coli* (RefSeq|NC\_010468.1) com o programa Bowtie2. I, II e III, triplicatas de cada tratamento; C1, linhagem susceptível à magainina I; R3, linhagem resistente à magainina I; Mag, linhagens incubadas com magainina I.

Essas sequências resultantes do RNA-seq de cada tratamento foram mapeadas de acordo com o genoma de referência para *E. coli* e foi possível observar um total de sequências mapeadas variando de 5.268.358 até 9.650.462 sequências de 150 pares de bases, dependendo da amostra (Tabela 12), que correspondeu a uma cobertura de sequenciamento de aproximadamente 96-98% de acordo com cada tratamento analisado. Na Figura 17 pode-se analisar a média da quantidade de sequências obtidas entre as réplicas após o sequenciamento que foi de aproximadamente 6,5 milhões de *reads*, bem como a média da quantidade de sequências mapeadas, de 6 milhões de *reads*, indicando basicamente que a maioria das sequências obtidas foram mapeadas em relação ao genoma de referência.



**Figura 17.** Média da quantidade de fragmentos (*reads*) sequenciados e mapeados das linhagens susceptível e resistente na presença ou ausência de magainina I. As amostras controle e susceptível foram sequenciadas e os fragmentos obtidos foram mapeados em relação ao genoma de referência para *Escherichia coli* (RefSeq|NC\_010468.1) utilizando o programa Bowtie2.

O RNA-Seq realizado em plataformas Illumina tem sido utilizado com sucesso no estudo de bactérias (Osmundson *et al.*, 2013), bem como na identificação de microrganismos em amostras clínicas, como demonstrado para RNA vírus presentes em amostras de fezes e sangue (Batty *et al.*, 2013). Nesse estudo, a quantidade de sequências que alinharam em regiões codificantes no genoma de referência foi avaliada, sendo possível obter o valor absoluto de expressão gênica em cada uma dessas regiões. Dessa forma, foram assinalados 4219 genes no total, entre as réplicas, através da base de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), que foram analisados quanto à expressão diferencial significativa entre as linhagens resistente e susceptível à magainina I na presença ou ausência desse peptídeo.

### **6.3.2. Análise comparativa da expressão gênica diferencial entre as linhagens resistente e susceptível à magainina I**

A análise estatística dos valores de expressão gênica (*fold change*) obtidos nas regiões codantes foi utilizada para apreciação dos genes diferencialmente expressos em cada um dos tratamentos. Dentre os 4219 genes inicialmente identificados, 80 genes apresentaram expressão diferencial significativa ( $p < 0,05$ ) em pelo menos um dos tratamentos (Tabela 13), incluindo aqueles regulados positivamente e negativamente.

**Tabela 13.** Genes com expressão diferencial entre as linhagens de *Escherichia coli* susceptível e resistente à magainina I identificados por RNA-seq e participação nos processos biológicos.

Comparação da expressão gênica diferencial							Descrição gênica	Processo biológico
Identificação	Cm-C	R-C	Rm-C	R-Cm	Rm-Cm	Rm-R		
EcolC_1141	0,00510275	0,94827628	0,00111853	0,00917975	0,24130584	0,00173615	Provável transportador ácido 3-fenilpropiónico	Transporte
EcolC_0917	0,03471484	0,39154633	0,0345537	0,00479586	0,9793596	0,00578935	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_1310	0,2221068	0,6217985	0,02723035	0,04400968	0,32704022	0,00733531	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_1462	0,01673774	0,7476043	0,04182849	0,00529356	0,99021349	0,013702	Proteína ribossomal 50s L25	Proteína da subunidade 50s ribossomal
EcolC_0537	0,04617358	0,71545127	0,04859446	0,01233058	0,98811	0,01476252	Permease triptofano	Transporte de triptofano
EcolC_2919	0,08682308	0,88771284	0,03325684	0,03437681	0,72948275	0,0151578	YbgC hidrolase tioester acil-CoA	Biosíntese lipídica
EcolC_1906	0,97000741	0,04578135	0,66327512	0,08087424	0,45562142	0,01666777	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_1355	0,00229632	0,99715177	0,0207959	0,00190262	0,55188183	0,01685091	Acetiltransferase fosfato	Regulação global de sinal
EcolC_2728	0,00452597	0,98197116	0,02891989	0,00310151	0,73221076	0,01932867	Epimerase/desidratase NAD-dependente	Oxidoredução
EcolC_2321	0,99511739	0,99911716	0,01744975	0,98214802	0,01361181	0,02010918	Proteína de choque-fago PspA	Integridade da membrana celular
EcolC_2387	0,08151176	0,99746813	0,02071077	0,10417845	0,54480735	0,02543394	Desidrogenase bifuncional acetaldeído-CoA/álcool	Metabolismo de álcoois
EcolC_0473	0,00586719	0,72907373	0,00850797	0,01958279	0,99676418	0,02582764	Citocromo D ubiquinol oxidase subunidade III	Respiração aeróbica
EcolC_0656	0,03356668	0,9987536	0,03085236	0,02790591	0,96766663	0,02617609	3,4-diidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase	Biosíntese de riboflavina
EcolC_2237	0,07889196	0,97820226	0,0434443	0,04745046	0,8647729	0,02791615	Família LysR de regulador de transcrição	Hidrólise de mureína
EcolC_3673	0,01766676	0,9518036	0,01710894	0,03353879	0,96464899	0,03026902	Fosfopentomutase	Metabolismo de purina
EcolC_3245	0,9995063	0,28911507	0,30127091	0,3292197	0,26772971	0,03168587	Proteína hipotética	Proteína hipotética



EcolC_4167	0,05637695	0,66261329	0,13882743	0,01319659	0,98432036	0,03559079	3-octaprenil-4-hidroxibenzoato carboxi- liase	Biosíntese de metabólitos secundários
EcolC_0697	0,02248881	0,92534014	0,07463389	0,01085858	0,950389	0,03681841	Proteína hidrogenase 2 HybA	Metabolismo energético Biosíntese de aminoacil- tRNA; Biosíntese de metabólitos secundários
EcolC_1272	0,07965738	0,99900733	0,04632751	0,06664301	0,8828091	0,03962844	Glutamil-tRNA sintetase	Homeostase de metais de transição
EcolC_0247	0,19529841	0,82496277	0,11409017	0,06346848	0,91158114	0,04186132	ATPase transportador zinco/cadmium/mercúrio	Transporte de proteínas através da membrana plasmática; Sistema de secreção
EcolC_3560	0,87399442	0,89711308	0,0990691	0,99992188	0,04137644	0,0442326	SecM regulador SecA	Metabolismo de ácido graxo
EcolC_3399	0,16488101	0,99999843	0,04819639	0,16152373	0,64909531	0,0473246	Acil-CoA desidrogenase	Oxidoredução
EcolC_1599	0,91083161	0,61027568	0,21024689	0,30176588	0,42489667	0,04811593	Epimerase/desidratase NAD-dependente	Manutenção de envelope celular; Cisteíno peptidase
EcolC_1472	0,02959591	0,98849974	0,03447317	0,04400513	0,99235202	0,04929067	Provável lipoproteína de membrana externa	Divisão celular
EcolC_0799	0,07507198	0,98405577	0,03372789	0,1189131	0,78718195	0,05033551	Proteína associada ao anel-Z	Sinalização transmembrânica
EcolC_3484	0,18741868	0,46531878	0,00972151	0,87031486	0,1274395	0,05241871	Zinco metalopeptidase RseP	Biosíntese de triptofano
EcolC_2367	0,02541127	0,82462709	0,01998925	0,07647069	0,92847451	0,05265827	Subunidade alfa da triptofano sintase	Integridade da membrana celular
EcolC_2639	0,03261301	0,99982724	0,05863382	0,02964496	0,99984768	0,053688	Proteína A de membrana externa	Oxidoredução e nitroredução
EcolC_4166	0,05184122	0,96333212	0,03269773	0,095813	0,89121157	0,05602246	FMN redutase	Sistema de secreção
EcolC_1109	0,02139236	0,88463585	0,02654082	0,05332427	0,99430413	0,06059379	Peptidase I sinal	

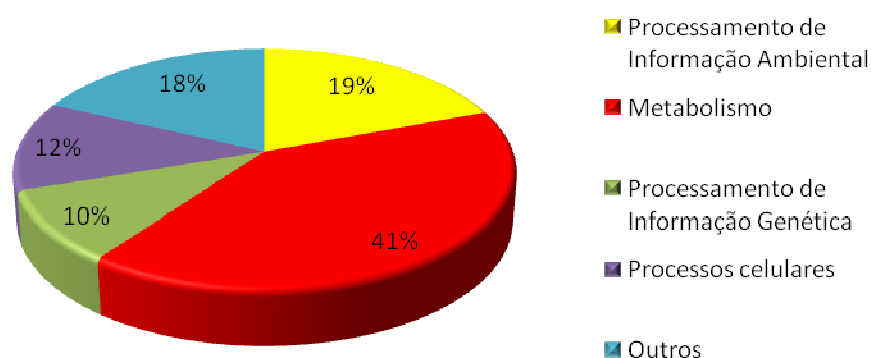
EcolC_2471	0,55256087	0,96491296	0,03682281	0,80149726	0,18167307	0,06275424	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_0629	0,94669126	0,99455364	0,04899465	0,99012573	0,0918774	0,06489165	Família PadR-símile de regulador de transcrição	Detoxificação
EcolC_0698	0,01118842	0,99430703	0,05249668	0,01492358	0,86208374	0,06988168	Provável subunidade hidrogenase 2b do citocromo	Oxidação de hidrogênio e respiração
EcolC_2693	0,12602475	0,87689293	0,0322968	0,32359736	0,57786483	0,07604884	Formato acetiltransferase	Metabolismo de piruvato
EcolC_3002	0,02927214	0,6829578	0,28525473	0,00764889	0,55194645	0,07706263	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_3485	0,54922012	0,30001217	0,00950575	0,94462286	0,04237246	0,07992503	CDP-diglicerídeo sintase	Metabolismo de fosfolípidos
EcolC_3222	0,01231164	0,96575915	0,06148859	0,02130182	0,84065874	0,10527199	Proteína Tsx formadora de canal nucleosídeo-específica	Formação de canal específico
EcolC_1253	0,07719903	0,30854114	0,74114408	0,00753469	0,41868097	0,10744644	Desidrogenase de cadeia pequena	Oxidoredução
EcolC_0005	0,06813004	0,74305026	0,36696456	0,01872219	0,75753008	0,11589682	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_0170	0,00694674	0,89687545	0,0515729	0,01537377	0,67811354	0,11595076	Fosfoetanolamina transferase	Biosíntese de LPS; Modificação da proteína flagelar FlgG.
EcolC_1740	0,07529531	0,97354187	0,21730745	0,04374397	0,9573517	0,13392788	Ativador transcricional FlhD	Síntese flagelar e divisão celular
EcolC_3161	0,01392917	0,83774045	0,05213426	0,03876065	0,92729443	0,13818377	Metilada-DNA-proteína-cisteína metiltransferase	Reparo de DNA
EcolC_3983	0,06291459	0,9967335	0,18358609	0,04832088	0,95940059	0,14493894	Provável proteína de resposta a estresse	Resposta a estresse
EcolC_4082	0,02059616	0,92798373	0,07444999	0,04383321	0,93287077	0,15103488	Proteína ribossomal 50s L31	Proteína da subunidade 50s ribossomal
EcolC_4126	0,26880951	0,56717765	0,64100408	0,04707398	0,93136728	0,16214922	Formato desidrogenase-O subunidade gama	Metabolismo microbiano
EcolC_2482	0,02088131	0,92108198	0,08066384	0,04570773	0,91638614	0,16764711	N-acetyl-D-glucosamina quinase	Metabolismo de açúcares

								de grupo amino e nucleotídeo; Biosíntese de metabólitos secundários
EcolC_3252	0,03500731	0,15034247	0,01064636	0,68978693	0,557441	0,17232331	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_0785	0,05137596	0,9999758	0,20381764	0,04882726	0,89058833	0,19482402	Frutose-bisfosfato aldolase	Glicólise/Gliconeogênese
EcolC_1733	0,04006502	0,44397699	0,85007474	0,0061163	0,18478272	0,20680991	Família de proteína ferritina Dps	Proteção do DNA
EcolC_3475	0,09817028	0,57420025	0,04786656	0,50416886	0,83182031	0,22548485	Acetil-CoA carboxilase carboxiltransferase subunidade alfa	Biosíntese de ácido graxo
EcolC_3838	0,01949633	0,9969989	0,29146859	0,01536977	0,39712762	0,23406239	Regulador HflC da protease FtsH	Hidrolase de membrana
EcolC_0699	0,03971899	0,58761341	0,05282239	0,21715691	0,99876522	0,2414144	Hidrogenase 2 subunidade maior	Metabolismo microbiano
EcolC_0932	0,02643561	0,9880499	0,17576884	0,03940392	0,72158756	0,2521078	CTP sintetase	Metabolismo de pirimidina
EcolC_1227	0,01419191	0,98497258	0,36924534	0,00953008	0,23514596	0,25525331	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_1785	0,07138865	0,26336459	0,02640554	0,75104438	0,70207251	0,27392805	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_2658	0,2469005	0,49405359	0,04985625	0,92919174	0,51058739	0,27790075	Proteína fimbrial	Aderência
EcolC_1324	0,02941744	0,70461865	0,08249174	0,12109607	0,97545486	0,29105517	Mureína endopeptidase penicilina-insensível	Peptídeoglicana hidrolase
EcolC_3217	0,02155152	0,36476531	0,0396458	0,20744027	0,99987976	0,30207881	Proteína de antiterminação transcricional NusB	Biosíntese de ribossomo
EcolC_1738	0,03059461	0,9998636	0,28061731	0,03342035	0,57613253	0,30290628	Trealose-6-fosfato sintase	Metabolismo de carboidrato
EcolC_0964	0,58518585	0,26931129	0,03152065	0,89345047	0,14435337	0,31901465	ftsB	Divisão celular
EcolC_2590	0,02066655	0,99682945	0,42409317	0,01620173	0,28582012	0,34530897	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_0933	0,01422449	0,99065766	0,26060014	0,02017309	0,33610724	0,35671523	Fosfopiruvato hidratase	Glicólise/Gliconeogênese
EcolC_4005	0,02522182	0,98186862	0,24762394	0,03998637	0,55590615	0,3677255	Glicose-6-fosfato isomerase	Glicólise/Gliconeogênese
EcolC_1095	0,03304042	0,99956998	0,34406705	0,03764514	0,51500066	0,38282612	Tioredoxina 2	Oxidoredução
EcolC_1263	0,85454226	0,08289285	0,80152075	0,02975856	0,42691077	0,38764822	Sistema PTS fosfohistidinoproteína-	Sistema fosfotransferase

							hexose fosfotransferase Hpr	
EcolC_2449	0,04302282	0,73063286	0,13230945	0,16825777	0,95680319	0,42116619	Inibidor de formação de septo	Divisão celular
EcolC_1739	0,01712555	0,77030711	0,15774932	0,05782409	0,59308519	0,45329064	Proteína de estresse universal UspC	Resposta a estresse
EcolC_0618	0,03808312	0,99982835	0,5039117	0,03459185	0,39589216	0,46961685	Proteína contendo domínio helix-turn-helix	Regulação de transcrição
EcolC_0842	0,01691463	0,91450072	0,35307665	0,03751009	0,29044734	0,63973009	Xantina desidrogenase subunidade XdhA	Metabolismo de purina
EcolC_2368	0,03031882	0,99970227	0,69226906	0,03400341	0,21364212	0,73638572	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_0250	0,02550274	0,51990511	0,19937287	0,16250211	0,65383044	0,77063613	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_0985	0,15372678	0,38417302	0,93002276	0,0171771	0,09876136	0,78737261	Proteína HypB de incorporação de níquel a hidrogenase	Biosíntese de hidrogenases
EcolC_0982	0,09284769	0,8986616	0,99566016	0,03802695	0,18408653	0,83470996	Expressão de hidrogenase/formação de proteína HypE	Biosíntese de hidrogenases
EcolC_0841	0,0805806	0,99998608	0,82453043	0,07719233	0,03949535	0,83824013	Xantina desidrogenase subunidade XdhB	Metabolismo de purina
EcolC_0240	0,03995339	0,98279436	0,67869952	0,06356386	0,28121551	0,84406971	Proteína de ligação ao transportador ABC	Transporte ABC
EcolC_3665	0,04034057	0,66792747	0,44170812	0,18294157	0,47427163	0,94338883	Provável transportador ABC ligado ao ATP	Transporte ABC
EcolC_0984	0,19244095	0,42905273	0,79624052	0,02392919	0,07928394	0,95012933	Chaperona ligada a hidrogenase	Biosíntese de hidrogenases
EcolC_0755	0,17313959	0,48288482	0,78551363	0,0247809	0,07004454	0,9757254	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_2213	0,02089558	0,35034379	0,31151748	0,20993458	0,39531689	0,99091702	Proteína hipotética	Proteína hipotética
EcolC_0090	0,02484078	0,99999428	0,99915016	0,02560147	0,03520656	0,99864899	ADP-L-glicero-D-mano-heptose-6-epimerase	Biosíntese de LPS

Resultados obtidos de acordo com os valores de *fold change* em cada dupla analisada. C, linhagem susceptível na ausência de magainina I; Cm, linhagem susceptível na presença de magainina I; R, linhagem resistente na ausência de magainina I; Rm, linhagem resistente na presença de magainina I; Em rosa (■), os valores de p (*p-value*) que apontam os genes superexpressos e em verde (■) os valores de p (*p-value*) que apontam os genes subexpressos. Experimento realizado em triplicatas independentes, exceto na amostra R3 na presença de magainina I, realizada em duplicatas independentes. Os valores coloridos são estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

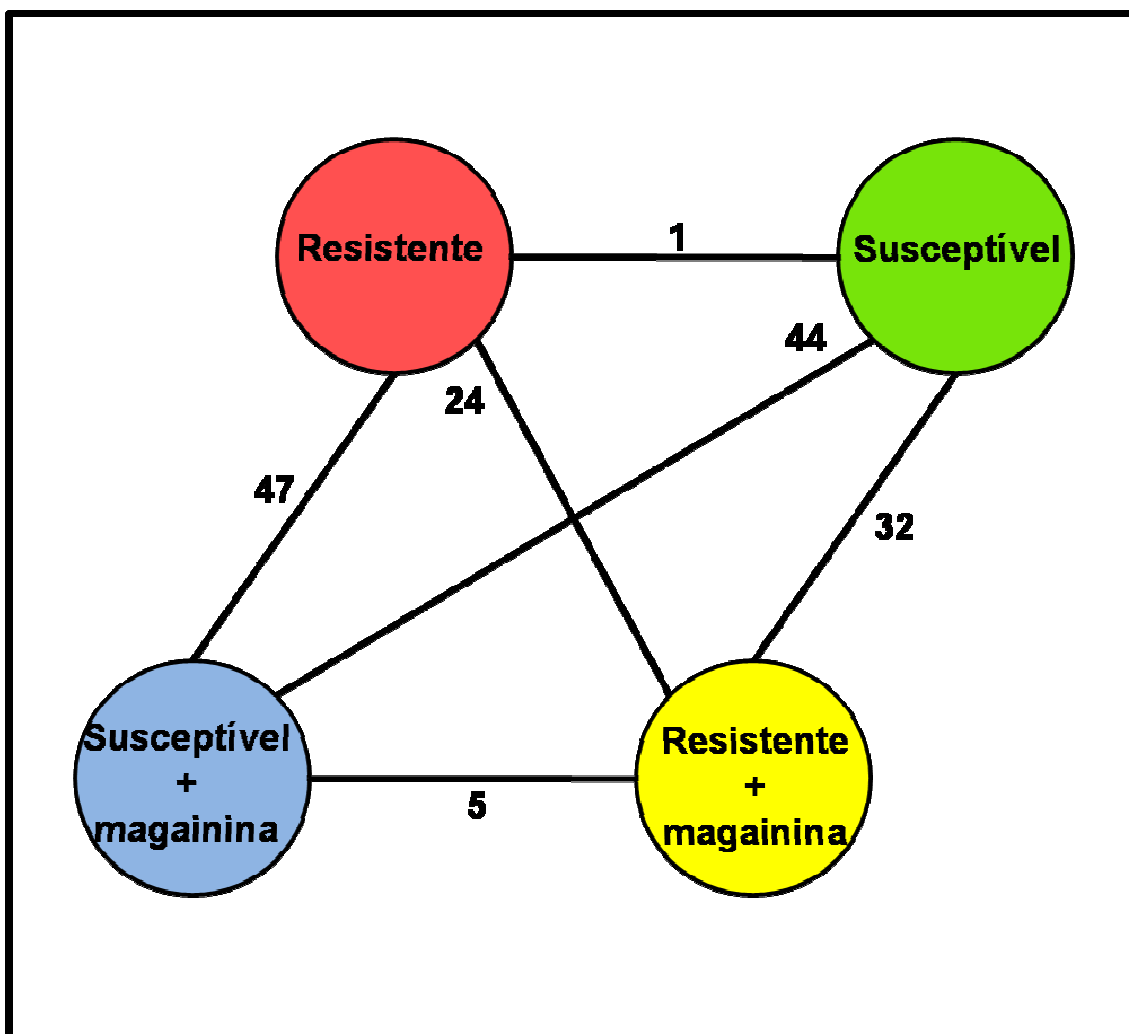
Esse conjunto de genes diferenciais identificados na análise transcriptômica foi comparado com a base de dados do KEGG Orthology (KOs) para a construção do perfil funcional e mapeamento biológico. Foram obtidas 85 atribuições de KOs, as quais foram divididas em cinco classes biológicas que podem ser visualizadas na Figura 18. O grupo de KOs com maior representatividade foi o relacionado ao metabolismo (41% dos genes diferencialmente expressos), o que poderia ser justificado por mudanças no metabolismo das bactérias para se adaptarem ao microambiente e sobreviverem em condições de estresse ambiental (Ivanov *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2010; Shprung *et al.*, 2012).



**Figura 18.** Distribuição em classes biológicas dos genes diferencialmente expressos nos grupos experimentais identificados por análise transcriptômica.

Em seguida, os grupos experimentais foram comparados em pares (Tabela 13), quanto à análise de expressão diferencial, sendo possível identificar entre o grupo susceptível sem magainina e o grupo susceptível com magainina, 44 genes diferencialmente expressos; entre o grupo resistente sem magainina e resistente com magainina, 24 genes diferencialmente expressos; entre o grupo resistente com

magainina e o susceptível sem magainina, 32 genes diferencialmente expressos; entre o grupo resistente sem magainina e o susceptível com magainina, 47 genes diferencialmente expressos; entre o grupo resistente e susceptível, ambos sem magainina, 1 gene diferencialmente expresso; e entre o grupo resistente e susceptível, ambos na presença de magainina I, 5 genes diferencialmente expressos foram identificados (Figura 19 e Tabela 13).



**Figura 19.** Comparação dos genes diferencialmente expressos identificados entre os grupos analisados. As linhagens utilizadas foram C1, susceptível à magainina I e R3, resistente à magainina I na presença ou ausência desse peptídeo antimicrobiano.

### 6.3.2.1. Linhagem resistente *versus* susceptível na ausência de magainina I

Dentre os genes identificados foi possível observar que na ausência de magainina I em ambas as linhagens, resistente e susceptível, apenas 1 gene com expressão diferencial foi observado (Tabela 13). Esse gene (EcolC\_1906) encontra-se regulado positivamente, por cerca de 1,03 vezes a mais, e foi identificado como uma proteína hipotética (Tabela 13). Um alinhamento foi realizado utilizando o programa *nucleotide* BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) com a sequência referente a esse único gene diferencial identificado nas condições descritas anteriormente, para verificar a existência de homólogos e o grau de identidade entre os mesmos. Essa busca permitiu observar que a sequência de nucleotídeos alinhou-se com mais sete sequências de bactérias Gram negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter koseri* e *Salmonella enterica*, com identidade variando de 78% à 99%. Em todos os casos, a sequência alinhada foi identificada como proteína hipotética de membrana altamente conservada entre os microrganismos.

Nesse trabalho foram identificados mais 14 genes que codificam proteínas hipotéticas, (EcolC\_0917; EcolC\_1310; EcolC\_3245; EcolC\_2471; EcolC\_3002; EcolC\_0005; EcolC\_3252; EcolC\_1227; EcolC\_1785; EcolC\_2590; EcolC\_2368; EcolC\_0250; EcolC\_0755; EcolC\_2213), que equivalem a aproximadamente 18% dos genes diferencialmente expressos (Tabela 13). Os genes que codificam proteínas hipotéticas são geralmente homólogos a genes com função desconhecida ou ainda genes sem nenhum homólogo. Dessa forma, existe uma escassez de informações sobre as suas funções biológicas, expressão *in vivo* e localização celular, o que dificulta o entendimento das análises funcionais, uma vez que os mesmos ou seus homólogos podem estar correlacionados com funções importantes na célula, o que pode tornar o seu

estudo uma ferramenta importante na busca por genes que codifiquem proteínas inéditas ou ainda não descritas na literatura (Shrivastava *et al.*, 2012).

O resultado observado na ausência de magainina I sugere que a presença desse peptídeo antimicrobiano parece ser crucial para estimular a expressão gênica diferencial e ainda que o fenótipo de resistência à magainina I parece inicialmente estar correlacionado à pressão negativa exercida pelo AMP durante a incubação em concentrações subinibitórias. Os microrganismos apresentam em geral, mecanismos capazes de perceber os sinais do microambiente, e de transferir essa informação para os sistemas de regulação da resposta transcricional, ativando ou inibindo genes importantes para a resposta bacteriana necessária naquele momento (Pränting *et al.*, 2008; Gryllos *et al.*, 2008; Shprung *et al.*, 2012). Dessa forma, a expressão gênica diferencial observada na linhagem resistente à magainina I parece ser induzida principalmente em resposta à presença desse peptídeo no microambiente.

#### **6.3.2.2. Linhagem resistente *versus* susceptível na presença de magainina I**

Com o intuito de verificar se na presença de magainina I, a expressão gênica diferencial seria intensificada, as linhagens foram incubadas previamente com magainina I e comparadas entre si. Na presença de magainina I em pelo menos uma das condições testadas foram observados 20 genes superexpressos e 24 subexpressos na comparação entre susceptível com e sem magainina; 10 genes superexpressos e 14 subexpressos na comparação entre resistente com e sem magainina I; 25 genes superexpressos e 22 subexpressos na comparação entre susceptível com magainina e resistente sem magainina; 13 genes subexpressos e 19 subexpressos na comparação entre resistente com magainina e controle sem magainina (Tabela 13). Os resultados corroboram com a hipótese anterior de estímulo da magainina I.



Ainda em relação às comparações entre os tratamentos, quanto à expressão diferencial, foi possível observar que sob as mesmas condições experimentais e na presença de concentrações subinibitórias de magainina I, a linhagem resistente apresentou 5 genes diferencialmente expressos quando comparado à linhagem susceptível (Figura 19), estando 3 deles superexpressos e 2 subexpressos (Tabela 13). Esses dados sugerem que as alterações observadas no fenótipo de resistência bacteriana à magainina I provavelmente são resultado de modificações na expressão gênica bacteriana, que permite com que a linhagem resistente responda de forma diferente ao mesmo estímulo dado à linhagem susceptível, correlacionadas com a resistência bacteriana à magainina I.

De acordo com a Tabela 13, os genes diferencialmente expressos na comparação entre as linhagens resistentes e susceptíveis incubadas com magainina I, foram analisados para identificação da descrição gênica (KEGG) e participação em processos biológicos (banco de dados do Pubmed). Portanto essas proteínas expressas pelos genes diferencialmente expressos foram a proteína fago-choque PspA (EcolC\_2321), a SecM regulador SecA (EcolC\_3560), a xantina desidrogenase subunidade XdhB (EcolC\_0841), a CDP-diglicerídeo sintase (EcolC\_3485) e a ADP-L-glicero-D-mano-heptose-6-epimerase (EcolC\_0090).

#### **6.3.2.2.1. Proteína fago-choque PspA (EcolC\_2321)**

O envelope celular de bactérias Gram negativas controla a passagem de moléculas através da membrana celular, incluindo estruturas como a parede celular, o flagelo e o complexo sistema de secreção, formando uma barreira de permeabilidade que dificulta a passagem de íons e estabiliza a força motora de prótons (*Proton-Motive*

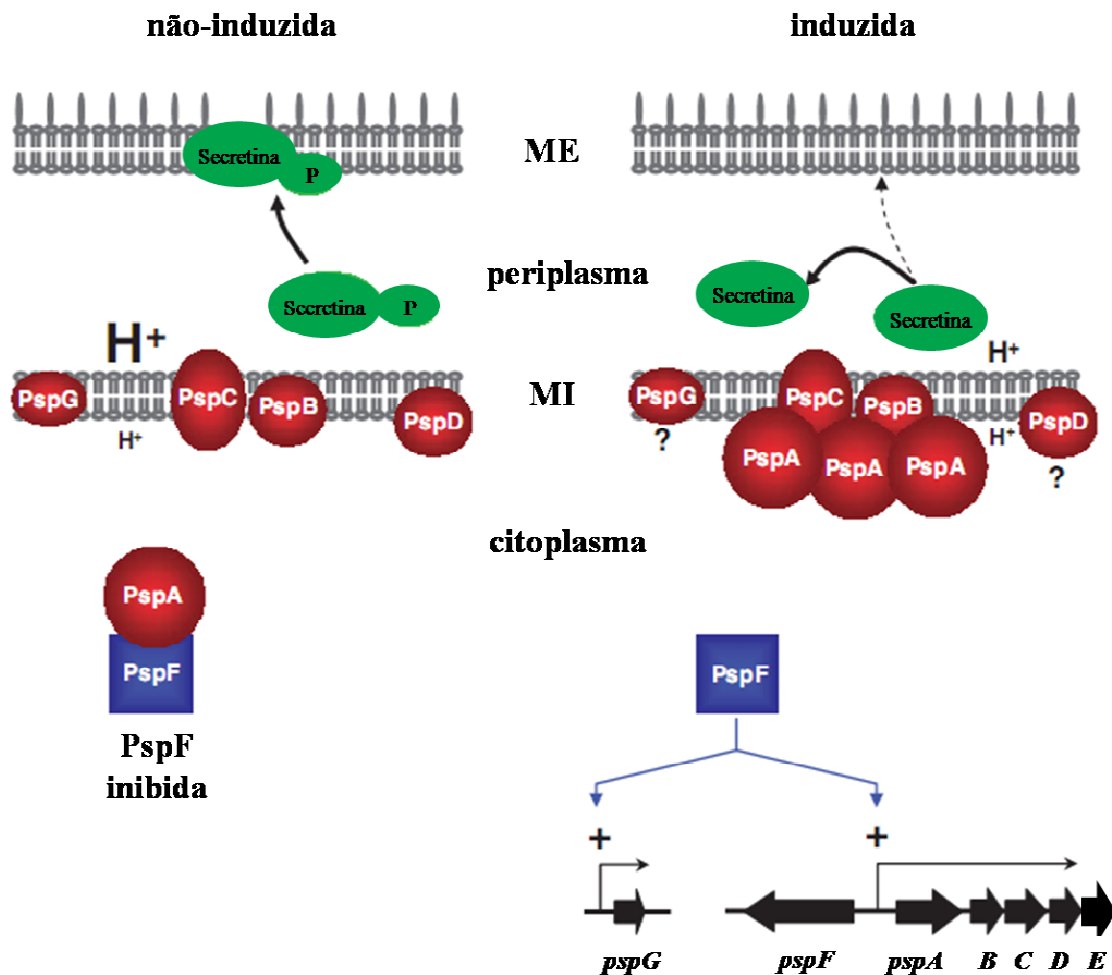
*Force*, do inglês) (Darwin, 2005). Os principais sistemas especializados de resposta a estresse extracitoplasmático em *E. coli* são os sistemas RpoE, Cpx e Psp.

Nesse trabalho foi possível observar que o gene que codifica a proteína fago-choque PspA (EcolC\_2321), uma das proteínas do sistema Psp, encontra-se aproximadamente 2,34 vezes mais expresso na linhagem resistente do que na linhagem susceptível, ambas na presença de magainina I (Tabela 13). A PspA foi primeiramente identificada em *E. coli*, como uma proteína de 25 kDa fortemente induzida após a infecção de bacteriófago filamentosos, e posteriormente constatou-se que a mesma também foi induzida por estresse no microambiente como choque térmico, alteração na osmolaridade, elevada concentração de etanol e deslocamento de proteínas do envelope, como a secretina (Brissette *et al.*, 1990; Darwin, 2005).

Posteriormente a proteína PspA foi descrita em outros organismos como *Bacillus subtilis* (Mascher *et al.*, 2004), *Salmonella entérica* (Becker *et al.*, 2005), *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Erwinia carotova*, *Vibrio cholerae*, *Photobacterium luminescens*, *Shewanella oneidensis*, *Photobacterium profundum*, *Idiomarina loihiensis*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Zymomonas mobilis* (Darwin, 2005) e a sua expressão influencia diretamente a virulência, a viabilidade celular e a resistência bacteriana durante diferentes condições de estresse ambiental (Dworkin *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2005).

A importância da resposta do sistema Psp tem aumentado significativamente com a observação de que esse sistema apresenta um papel importante na virulência de *Yersinia* sp., na formação de biofilme por *E. coli* e sua ativação em *Shigella* sp. e *Salmonella* sp. durante a infecção em macrófagos (Darwin, 2005). Estudos demonstram que a proteína PspA interage com componentes da membrana celular (Figura 20) e pode estar envolvida na manutenção da integridade da membrana citoplasmática bacteriana

(Mascher *et al.*, 2004), bem como da força motora de prótons (*PMF*, iniciais do inglês), contribuindo para a manutenção do potencial elétrico de membrana e controle de permeabilidade seletiva (Becker *et al.*, 2005).



**Figura 20.** Modelo de ação do sistema de resposta Psp em *E. coli* e *Y. enterocolitica*. Em condições normais a PspA se liga à PspF e previne a ativação da transcrição. Muitas condições podem induzir a resposta Psp, muitas das quais reduzem a força motora de prótons. O deslocamento de proteínas do envelope, como a secretina, que pode ser causada artificialmente pela remoção da proteína P semelhante à chaperona, é um sinal específico de indução. Uma ou ambas as proteínas da membrana citoplasmática PspB e PspC podem perceber o sinal de indução e se ligar à PspA. Essa ligação libera a PspF, ativando a transcrição dos genes *psp*, aumentando principalmente a quantidade de PspA na membrana citoplasmática com função de auxiliar na manutenção da força motora de prótons e na integridade da membrana. ME, membrana externa; MI, membrana interna. Fonte: Adaptada de Darwin (2005).

O fato do gene *pspA* estar superexpresso na linhagem de *E. coli* resistente à magainina I, sugere que frente ao estresse ambiental causado pela magainina I, a qual é capaz de interferir diretamente na integridade da membrana citoplasmática, provocando a sua desestabilização, dissipação do gradiente eletroquímico e ruptura, a linhagem resistente consegue perceber essa sinalização ambiental, aumentar a transcrição do gene *pspA*, que codifica a proteína PspA, e manter de forma mais eficiente, o potencial elétrico e a integridade da membrana bacteriana, contrapondo o mecanismo de ação desse AMP, protegendo a bactéria de sua ação danosa e justificando a capacidade dessa linhagem resistir com maior eficiência do que a susceptível, ao estresse ambiental provocado pela magainina.

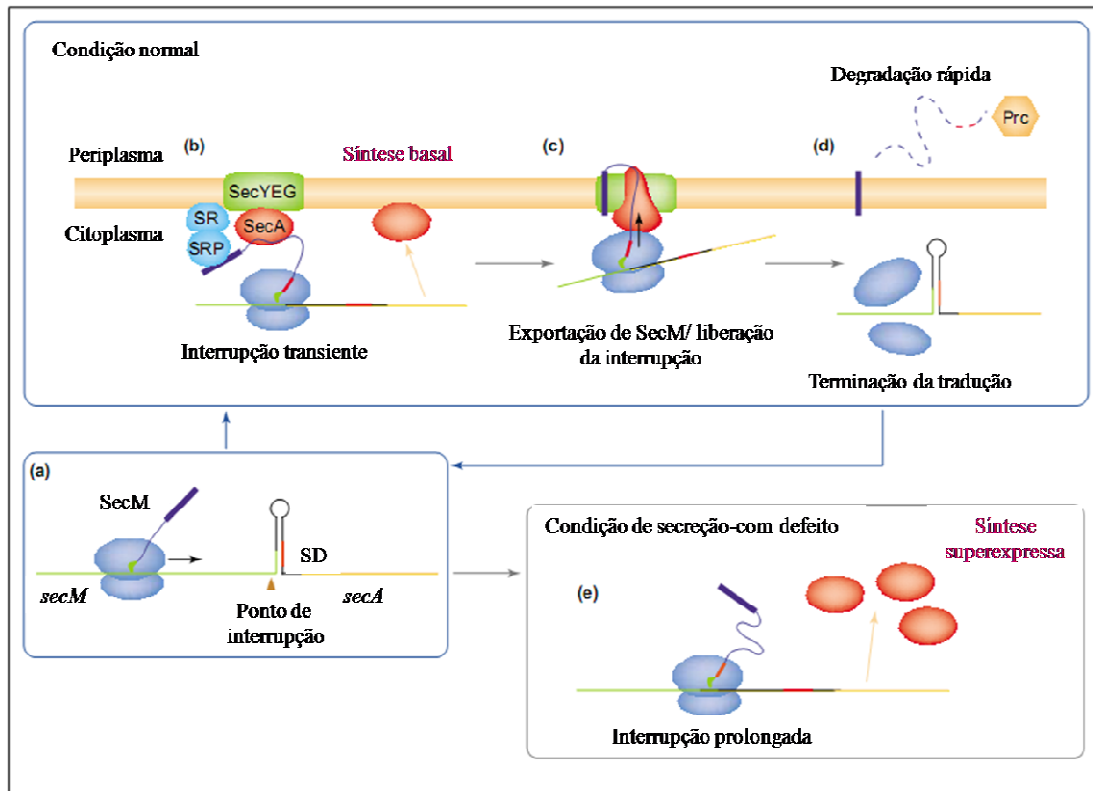
Em suma, PspA pode ser considerada a principal proteína efetora do sistema Psp envolvida na contenção do estresse sofrido pelo microrganismo baseada em várias observações, como a alta conservação da PspA em homólogos, a elevada concentração de PspA quando o sistema Psp é induzido, a deleção de *pspA* resulta na alteração da força motora de prótons da membrana e a PspA previne a fuga de prótons de membrana celular injuriadas (Kobayashi *et al.*, 2007; Horstman e Darwin, 2012), justificando a sua atuação efetiva na manutenção da integridade da membrana bacteriana.

#### **6.3.2.2.2. SecM regulador SecA (EcolC\_3560)**

Outro gene, que codifica a proteína SecM regulador SecA (EcolC\_3560), 1,56 vezes mais expresso na linhagem resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível, sob concentrações subinibitórias desse AMP (Tabela 13), também parece estar correlacionado com a capacidade da *E. coli* resistir ao estresse ambiental (Yang *et al.*, 2013) provocado pelo peptídeo, conforme detalhado em seguida.

A proteína translocase Sec parece ser responsável pela translocação e transporte da maior classe de proteínas extracitoplasmáticas através da membrana citoplasmática ou interna de *E. coli* e ainda pela inserção de proteínas na membrana citoplasmática (Nakatogawa *et al.*, 2004). A Sec translocase é formada por um canal de condução de proteínas altamente conservado, denominado SecYEG e pela proteína SecA, uma ATPase (Driessen e Nouwen, 2008). A regulação estritamente controlada da secreção protéica responsiva de *secA* baseia-se na secreção da proteína chamada inicialmente de proteína gene X e posteriormente renomeada como proteína SecM de “monitor de secreção” (Sarker *et al.*, 2000; Plessis *et al.*, 2011).

Essa proteína SecM, cujo gene encontra-se superexpresso na linhagem resistente, é uma proteína periplasmática codificada por um gene da primeira fase de leitura do operon *SecA* e modula a tradução de *secA* de maneira específica ativando-a sob condições de estresse, como elevada temperatura, presença de azida e deficiência na secreção protéica (Nakatogawa *et al.*, 2004) (Figura 21). Então, a tradução de SecM aparentemente é crucial para a célula bacteriana manter a quantidade suficiente de SecA, o transporte eficiente de proteínas através da membrana e consequentemente a sua viabilidade, propiciando de uma forma geral, uma maior capacidade de sobrevivência bacteriana frente à magainina, no caso da linhagem resistente a esse AMP.



**Figura 21.** Controle traducional de *secA* em resposta a atividade celular de secreção de proteínas. (a) *secM* e *secA* são co-transcritos. A sequência *Shine Dalgarno* (S-D) de iniciação da tradução para *secA* tende a ser ocluída pela estrutura em *loop* formada pela região intergênica, resultando em baixa frequência de iniciação da tradução de *secA*. (b) A tradução de *secM* é pausada na Pro166, antes da terminação, enquanto o polipeptídeo SecM nascente co-traduzido é marcado pela partícula de reconhecimento de sinal (SRP) para a Sec translocase. Durante o período de pausa do ribossomo, a estrutura em *loop* é rompida e a sequência S-D é exposta para permitir a tradução de *secA* por outro(s) ribossomo(s). Então SecA é sintetizada próximo da membrana, levando a uma síntese basal de moléculas ativas. (c) Em células normais, a tradução de SecM é interrompida logo que ocorre a liberação da molécula através da reação ativa de exportação. (d) SecM madura é exportada e proteases (Prc-protease periplasmática) rapidamente a degradam. E no lado citosólico, a estrutura de *loop* do mRNA regenera-se assim que o ribossomo separa-se dele. (e) Sob condições de reduzida atividade de secreção, como em baixas temperaturas, a tradução de *secM* é prolongada (aumentando a exposição da sequência S-D), resultando em alta frequência de tradução de *secA*. Adaptada de Nakatogawa *et al.* (2004).

Além disso, a regulação de SecA pela proteína SecM e a superexpressão do gene *secM* na linhagem resistente à magainina I, também pode estar correlacionada, de forma indireta, com o efluxo de magainina I para fora da célula bacteriana, uma vez que a capacidade das bactérias perceberem e responderem às concentrações subinibitórias e não-letais de AMPs, como as catelicidinas, pode induzir a expressão de fatores de virulência em bactérias patogênicas, como mecanismos de efluxo, e representar uma resposta de adaptação contrária aos AMPs, aumentando a resistência, virulência e sobrevivência do patógeno (Gryllos *et al.*, 2008; Kandaswamy *et al.*, 2013).

Cabe ressaltar que mutações no aparato Sec (*secA*, *secD* e *secE*) também podem ativar a síntese de PspA (Jones *et al.*, 2003; Serek *et al.*, 2004) e sabe-se que o transporte eficiente de proteínas pelo sistema *sec* está diretamente atribuído à expressão da proteína PspA (Darwin, 2005), o que pode explicar novamente o fato dos genes que codificam as proteínas PspA (EcolC\_2321) e SecM regulador SecA (EcolC\_3560) estarem regulados positivamente na linhagem resistente à magainina I em comparação com a susceptível (Rm-Cm, Tabela 13). Além disso, esses dois genes também estão superexpressos na linhagem resistente com magainina em comparação com a linhagem resistente sem magainina I, indicando que a presença desse AMP parece ser muito importante para a expressão diferencial dos mesmos (Tabela 13).

#### **6.3.2.2.3. Xantina desidrogenase subunidade XdhB (EcolC\_0841)**

Outro gene superexpresso na linhagem de *E. coli* resistente à magainina I na presença de magainina (Tabela 13), com *fold* de 1,9, codifica a xantina desidrogenase subunidade XdhB (EcolC\_0841). A proteína xantina desidrogenase (XDH) pertence à maior e mais diversa família de enzimas contendo o co-fator molibdeno (*Moco*, iniciais do inglês), a família xantina oxidase (Hualin *et al.*, 2000). Essa família ainda tem como

membros, a xantina oxidase, a aldeído oxidase, a 4-hidroxibenzoil coenzima A redutase, a quinolina oxidoreductase e as CO desidrogenases (Hualin *et al.*, 2000). Essas enzimas são essenciais para a maioria de todos os organismos, de bactérias a plantas e animais (Leimkuhler *et al.*, 1999) e catalizam a hidroxilação de substratos utilizando o solvente água como fonte de oxigênio (Ivanov *et al.*, 2003). A XDH, codificada pelos *xdhA*, *xdhB* e *xdhC*, consiste em uma enzima heterotrimérica que cataliza duas reações metabólicas, a conversão de hipoxantina em xantina e a conversão de xantina em ácido úrico, sendo essa última reação, o primeiro passo para o catabolismo de purina (Hualin *et al.*, 2000).

As linhagens de *E. coli*, diferentemente de outras bactérias, como *Klebsiella pneumoniae* por exemplo, frequentemente não degradam purinas como fonte de carbono ou nitrogênio (Reitzer, 2003). Entretanto, trabalhos de Hualin e colaboradores (2000) demonstraram que as purinas estimulam o crescimento da *E. coli* em condições reduzidas de nitrogênio; que a XDH contribui para a recuperação de purinas; e que mutantes deficientes nessa enzima, apresentam alteração no catabolismo de aminoácidos durante o crescimento em condições reduzidas de nitrogênio. Essas considerações demonstram que a bactéria apresenta mais um mecanismo para se adaptar ao ambiente sob condições de estresse, o que novamente indica uma vantagem que a linhagem de *E. coli* resistente à magainina I pode apresentar em relação ao controle susceptível, sob presença desse AMP. É possível observar também que o gene codificante para a xantina desidrogenase subunidade XdhA (EcolC\_0842) estava regulado positivamente na linhagem resistente sem magainina em relação ao controle com magainina I (Tabela 13).

A habilidade das bactérias em perceber e responder apropriadamente à presença de substâncias com atividade antimicrobiana torna-se crucial para a sua sobrevivência



(Mascher *et al.*, 2004). Dessa forma, a maior concentração das proteínas correlacionadas com estresse e com alterações no microambiente pode ser considerada uma vantagem para sobrevivência, o que pode justificar a correlação entre a resistência observada nessa linhagem (R3), com a superexpressão dos genes que codificam a PspA, a SecM e a xantina desidrogenase, indicando que essas enzimas podem ser alvos interessantes para a melhor compreensão dos mecanismos de resistência bacteriana aos AMPs.

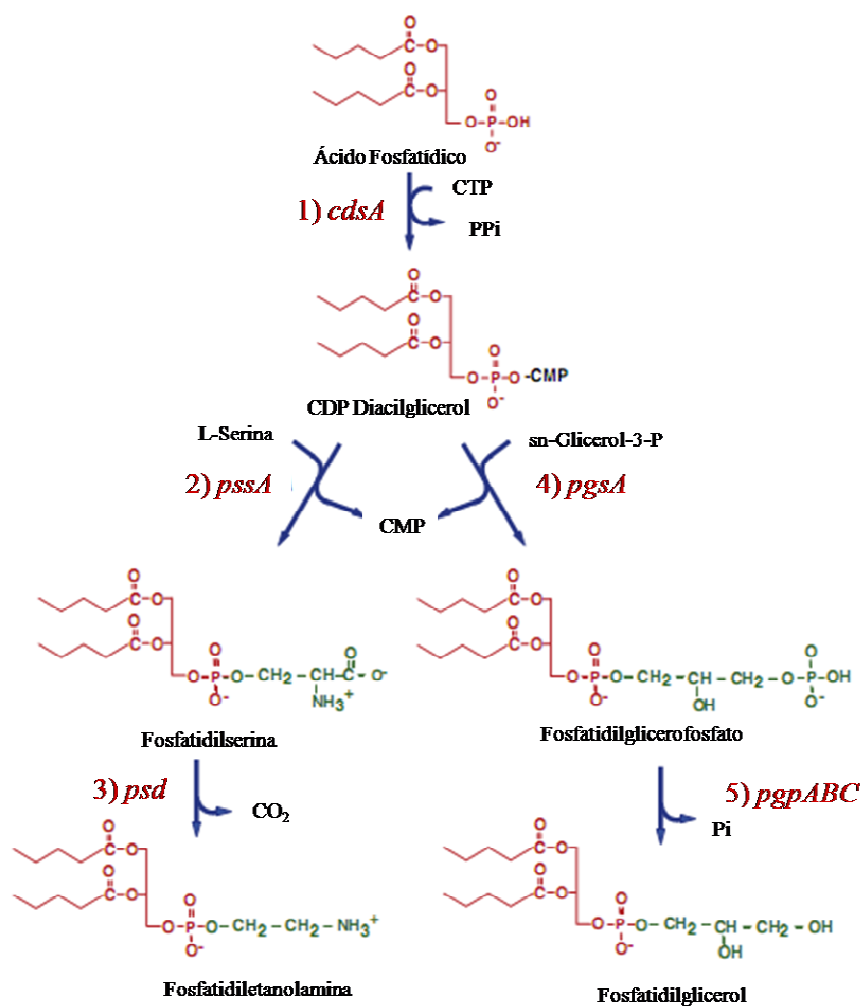
#### **6.3.2.2.4. CDP-diglicerídeo sintase (EcolC\_3485) e ADP-L-glicero-D-mano-heptose-6-epimerase (EcolC\_0090)**

Já em relação aos genes subexpressos na linhagem de *E. coli* resistente em comparação com a susceptível na presença de magainina I (Rm-Cm, Tabela 13), foi possível observar que eles codificam as proteínas CDP-diglicerídeo sintase (EcolC\_3485), envolvida no metabolismo de fosfolipídeos e a ADP-L-glicero-D-mano-heptose-6-epimerase (EcolC\_0090), envolvida na biosíntese de LPS. Ambos os genes apresentaram um redução na expressão de aproximadamente 1,02 na linhagem resistente em comparação com a susceptível (Tabela 13), sob as condições avaliadas.

Sabe-se que as bactérias Gram negativas, como a *E. coli*, apresentam membranas interna (MI) e externa (ME) (Metzner e Raetz, 2010), ricas em fosfolipídios e em fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS), respectivamente (Cordwell, 2006). Portanto essas moléculas são componentes importantes para a formação da parede celular bacteriana e conseqüentemente para a permeabilidade seletiva, o controle osmótico e sobrevivência desse microrganismo (Nikaido, 2003). Apesar do estudo dos fosfolipídeos e de sua biossíntese ter se iniciado em 1920 em plantas e animais, apenas nos anos 60, o estudo do metabolismo bacteriano de fosfolipídeos foi iniciado,

utilizando *E. coli* como modelo experimental (Dowhan, 2013). Na biosíntese de fosfolípidos, assim como em eucariotos, o ácido fosfatídico (*PA*, iniciais do inglês) parece ser o precursor de todos os fosfolípidos-glicerol de *E. coli*, como o fosfatidiletanolamina (*PE*, iniciais do inglês) e o fosfatidilglicerol (*PG*, iniciais do inglês) (Dowhan, 2013).

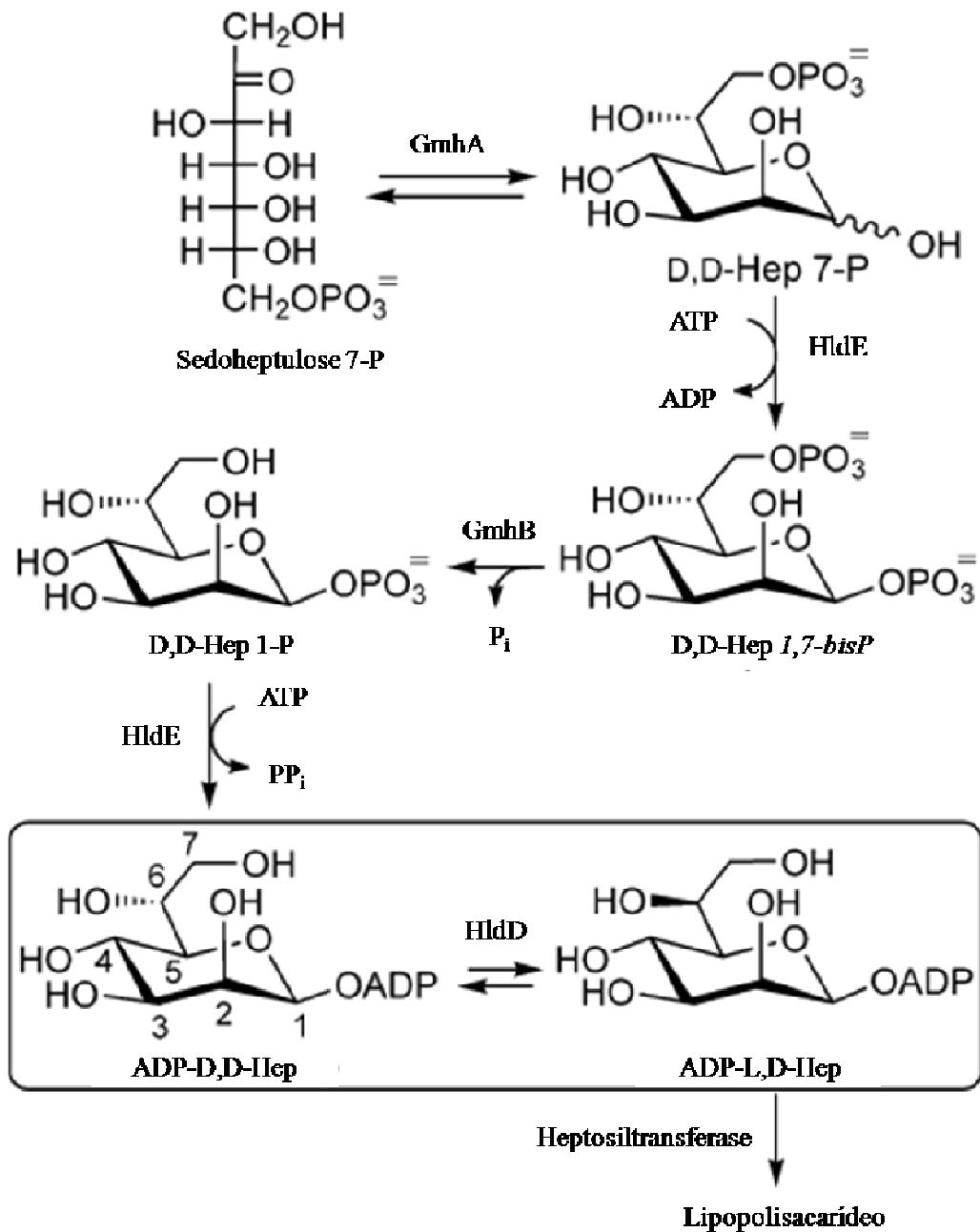
Assim como o *PA*, a CDP-diglicerídeo sintase (EcolC\_3485), também denominada de CDP-diacilglicerol sintase (*CDP-DAG*, iniciais do inglês), codificada pelo gene *cdsA*, parece ser essencial para a biosíntese de todos os fosfolípidos de *E. coli*, como pode ser observado na via metabólica demonstrada na Figura 22, e consequentemente pode ser considerada uma enzima fundamental para a formação da parede celular bacteriana e controle do acesso de moléculas à membrana interna do microrganismo através de transporte pela membrana (Nikaido, 2003; Dowhan, 2013).



**Figura 22.** Via metabólica de síntese de fosfolipídeos em *E. coli*. As enzimas e o nome do respectivo gene estão listados: 1. CDP-diacilglicerol sintase (*cdsA*); 2. Fosfatidilserina sintase (*pssA*); 3. Fosfatidilserina descarboxilase (*psd*); 4. Fosfatidilglicerofosfato sintase (*pgsA*); 5. Fosfatidilglicerofosfato fosfatase (*pgp*) codificada por três genes; CMP, citidina monofosfato; CTP, citidina trifosfato. Adaptada de Dowhan (2013).

O segundo gene subexpresso na linhagem resistente à magainina I sob as condições analisadas, o gene *hldD* (Tabela 13), codifica a proteína ADP-L-glicero-D-mano-heptose-6-epimerase (EcolC\_0090). Essa enzima é uma epimerase que atua na via de biosíntese de L-glicero-D-mano-heptose, um açúcar conservado na região principal do lipopolissacarídeo (*LPS*, iniciais do inglês) de bactérias Gram negativas (Morrison e Tanner, 2007).

LPS é o principal componente da membrana externa da parede de bactérias Gram negativas, sendo constituído por três partes: lipídeo A (endotoxina), que ancora o LPS na membrana celular externa; um domínio principal e o polímero repetido de antígeno-O imunogênico, que consiste em um oligosacarídeo de 1-40 unidades dependendo de cada espécie bacteriana. O domínio principal é formado por um oligosacarídeo não repetitivo constituído de 6 à 10 açúcares principais e açúcares superiores não usuais como ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (*Kdo*, do inglês) e L-glicero-D-mano-heptose (*L,D-Hep*, do inglês) (Morrison *et al.*, 2005). Na biosíntese de LPS, a *ADP-L,D-Hep* é derivada de sedoheptulose 7-fosfato e gerada através de uma epimerização reversível catalizada pela enzima ADP-L-glicero-D-mano-heptose-6-epimerase (HldD ou AGME, antigamente denominada de RfaD), que promove a inversão estereoquímica do Carbono 6 (C-6'') da heptose da ADP-D-glicero-D-mano-heptose em ADP-L-glicero-D-mano-heptose, conforme demonstrado na Figura 23. Na última etapa de síntese, as heptosiltransferases introduzem *L-D-Hep* na estrutura crescente do LPS (Morrison *et al.*, 2005; Morrison e Tanner, 2007).



**Figura 23.** Biosíntese do açúcar ADP-L,D-Hep do domínio principal do lipopolisacárido (LPS). A reação catalisada pela enzima ADP-β-L-glicero-D-manno-heptose-6-epimerase (HldD) está circulada em destaque. Adaptada de Morrison e Tanner (2007).

Foi possível observar a importância dessa enzima para a bactéria, validando as enzimas envolvidas na biosíntese do LPS como potenciais alvos para o desenvolvimento de substâncias que podem ser utilizadas em associação com antibióticos disponíveis para o controle de infecções (Morrison e Tanner, 2007; Mayer e

Tanner, 2007). Além disso, variações na estrutura do LPS podem ser críticas para a capacidade da bactéria se adaptar ao ambiente e para a virulência como demonstrado em *Haemophilus influenzae* por Schweda *et al.*(2007).

De uma forma geral, os dois genes que foram identificados nesse trabalho como regulados negativamente na linhagem resistente em comparação à linhagem susceptível na presença de magainina I e que codificam as CDP-diglicerídeo sintase e ADP-L-glicero-D-mano-heptose-6-epimerase, conforme descrito anteriormente, estão correlacionados com a constituição da superfície bacteriana. Alterações na constituição da parede celular bacteriana podem dificultar bastante a interação inicial eletrostática da magainina com o LPS da membrana externa, o deslocamento de íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  da membrana externa e por fim, o acesso da magainina I à membrana citoplasmática, o principal alvo de ação desse peptídeo, interferindo na sua eficácia antimicrobiana e tornando a bactéria resistente ao seu mecanismo de ação (Huang *et al.*, 2010; Shprung *et al.*, 2012).

Cabe salientar que o fato desses genes estarem subexpressos poderia significar dificuldade para sobrevivência da bactéria, uma vez que mutantes sem atividade de epimerase e mutantes no metabolismo de fosfolipídeos, sintetizam LPS truncado e têm dificuldade na síntese de fosfolipídeos, respectivamente, resultando em redução na patogenicidade, dificuldade de crescimento, e em alguns casos, aumento de susceptibilidade a certos antibióticos (Mayer e Tanner, 2007; Dowhan, 2013). Porém o que foi observado no trabalho é que na presença de magainina I, a linhagem resistente consegue sobreviver de forma mais eficiente, como demonstrado nos resultados e discussão do capítulo I, do que a linhagem susceptível.

Provavelmente o fato de a bactéria conseguir resistir ao microambiente, alterando a expressão de genes de virulência nesse momento de estresse (Shprung *et al.*,

2012), reflete na sua capacidade de modificar as propriedades da sua superfície e passar sem ser notada pelo AMP ou ainda responder de forma mais apropriada à pressão do microambiente (Mascher *et al.*, 2004), sendo uma vantagem crucial para sua sobrevivência e estando diretamente correlacionada com a resistência bacteriana aos AMPs (Shprung *et al.*, 2012).

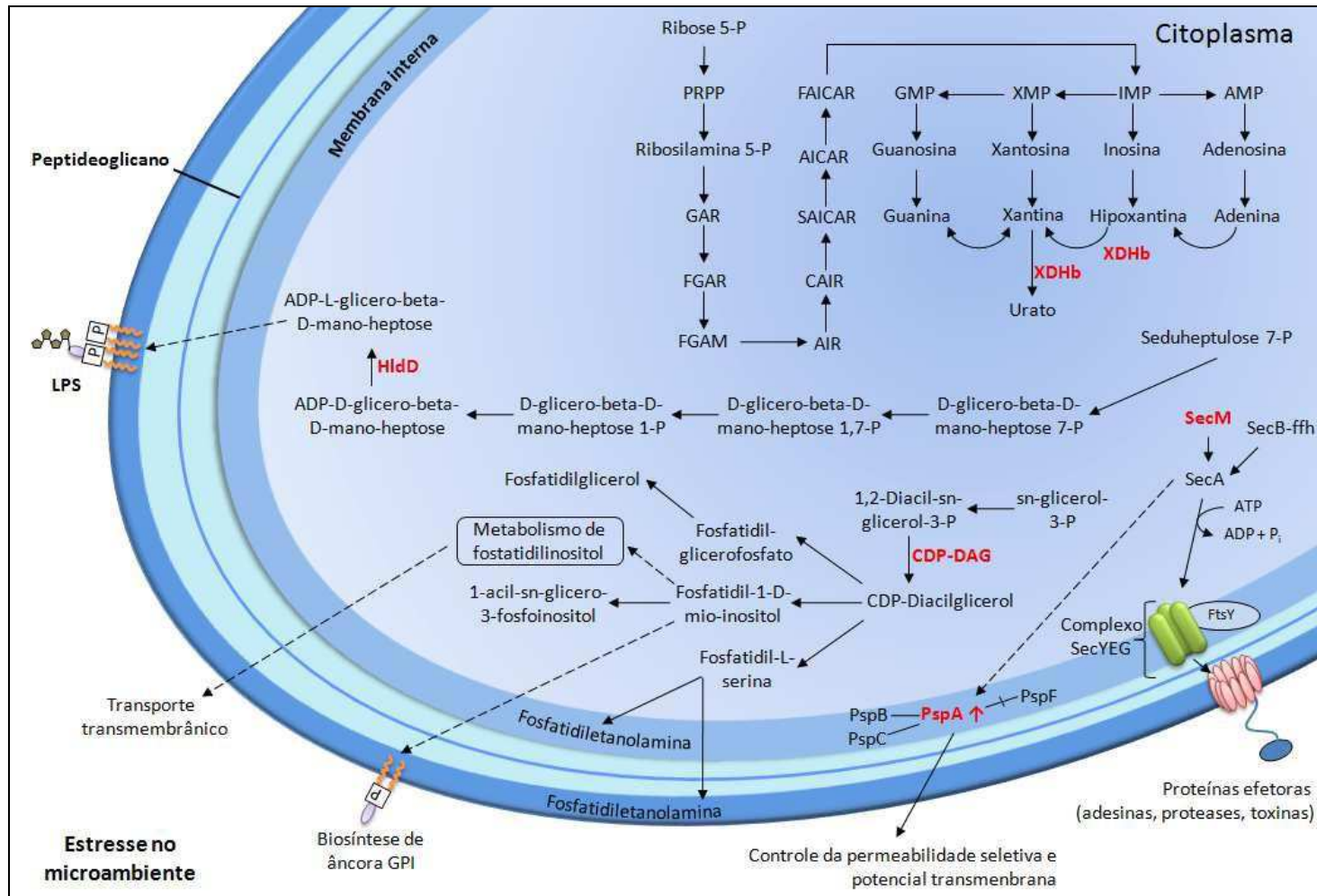
De fato, Shprung *et al.* (2012) demonstraram em linhagens de *Salmonella typhimurium*, que um dos mecanismos de resposta de bactérias Gram negativas às alterações do microambiente, o sistema PhoP-PhoQ, o qual promove a transcrição de muitos genes incluindo enzimas que modificam o LPS da parede celular bacteriana, tornando-a mais espessa e hidrofóbica, pode ser altamente ativado na presença de AMPs, resultando em linhagens resistentes à ação desses peptídeos. Tejada *et al.* (1995) também constataram que, como o LPS parece ser um dos principais alvos de muitos peptídeos catiônicos, a estrutura do mesmo na parede celular bacteriana desempenha um papel importante na resistência de *Brucella ssp.* aos *CAMPs*. Saar-Dover *et al.* (2012) demonstraram que em *Streptococcus* Grupo B (GBS), a D-alanilação dos ácidos lipotécóicos (*LTAs*, iniciais do inglês), um dos principais componentes da parede celular de bactérias Gram positivas, aumenta a resistência bacteriana aos *CAMPs*, correlacionada com a redução da carga aniônica total na parede celular e devido a alteração da conformação dos *LTAs*, que resulta em aumento na densidade e rigidez da parede celular, reduzindo sua permeabilidade e dificultando a penetração dos *CAMPs*. Essas características permitem que a cepa consiga resistir à ação dos peptídeos antimicrobianos.

Portanto, esses genes identificados como subexpressos na linhagem resistente na presença de magainina I, e que estão correlacionados com a composição e conformação da parede celular bacteriana, podem possuir várias funções relacionadas à aquisição de

resistência, capazes de propiciar: (i) a redução da carga aniônica total da parede celular, o que resulta em menor atração da magainina I pelo LPS, conseqüentemente reduzindo a sua interação com a membrana; (ii) a alteração na conformação dos fosfolipídeos e LPS tornando a parede celular mais empacotada e densa, reduzindo a quantidade efetiva de peptídeo na membrana; (iii) a alteração na conformação da parede celular, tornando-a mais rígida e reduzindo a sua permeabilidade e entrada do peptídeo; (iv) a dificuldade de acesso do peptídeo à membrana citoplasmática, reduzindo a sua capacidade de desestabilizá-la e de promover a sua ruptura.

De uma forma geral, os genes identificados nesse estudo como superexpressos ou subexpressos na linhagem R3 resistente à magainina I em comparação à linhagem susceptível C1, na presença deste AMP (Tabela 13), podem ser considerados alvos interessantes para o estudo de resistência à magainina I, uma vez que a redução ou aumento na sua expressão gênica representa um mecanismo de proteção da *E. coli* contra a ação desse AMP, como demonstrados na Figura 24, que descreve as vias metabólicas que os mesmos participam. Esses resultados corroboram com a hipótese de que alterações observadas no fenótipo de resistência bacteriana à magainina I podem ser resultado principalmente de modificações no controle bacteriano de expressão gênica, que ficam evidentes na presença de magainina I.





**Figura 24.** Descrição das vias metabólicas das proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos identificados na linhagem de *E. coli* resistente à magainina I em comparação com a linhagem susceptível na presença desse peptídeo. Análise obtida a partir do mapa de vias metabólicas do KEGG. KOs encontrados neste experimento estão em vermelho, evidenciando seu papel na via metabólica.  $\longrightarrow$ , efeito direto;  $\dashrightarrow$ , efeito indireto;  $\text{---}$ , ligação/associação entre proteínas;  $\text{---}$ , dissociação de proteínas. SecM é modulador de secreção bacteriana; SecA possui função ATPase e se liga ao complexo SecYEG acoplado ao FtsY, uma partícula de reconhecimento de sinal no receptor. PspA, PspB, PspC, PspF, proteínas do sistema Psp de secreção; PRPP, 5-fosfo-alfa-D-ribose-1-difosfato; GAR, 5'-fosforibosilglicinamida; FGAR, 5'-fosforibosil-N-formilglicinamida; FGAM, 1-(5'-fosforibosil)-N-formilglicinamida; AIR, 1-(5'-fosforibosil)-5-aminoimidazol; CAIR, 1-(5-fosfo-D-ribosil)-5-amino-4-carboxilato-imidazol; SAICAR, 1-(5'-fosforibosil)-5-amino-4-(N-succinocarboxamida)-imidazol; AICAR, 1-(5'-fosforibosil)-5-amino-4-imidazolcarboxamida; FAICAR, 1-(5'-fosforibosil)-5-formamido-4-imidazolcarboxamida; AMP, adenosina monofostato; IMP, inosina monofostato; GMP, guanosina monofostato; XMP, xantossina monofostato; XDHb, Xantina-desidrogenase subunidade B; CDP-DAG, Fosfatidato citidililtransferase; HldD, ADP-L-glicero-D-mano-heptose 6-epimerase; LPS, Lipopolissacarídeo; GPI, Glicosilfosfatidilinositol.

Genes importantes também foram identificados nas outras condições avaliadas nesse estudo. A identificação, na linhagem resistente à magainina I, de genes superexpressos que codificam proteínas que participam do metabolismo de formato e piruvato (Benoit *et al.*, 1998), como a formato acetiltransferase (EcolC\_2693) e principalmente a formato desidrogenase-O subunidade gama, *FDH-O* (EcolC\_4126) (Tabela 13) também pode ser considerada uma vantagem de adaptação dessa linhagem, uma vez que Crouch *et al.* (2005) demonstraram que a adição de ácidos orgânicos como succinato e formato podem proteger a bactéria *Salmonella enterica* dos efeitos letais do peptídeo antimicrobiano BPI-derivado P2, sendo essa proteção correlacionada também com a presença do complexo desidrogenase, como a formato desidrogenase ligada ao nitrato (*FDH-N*, iniciais do inglês), aumentando a resistência bacteriana aos AMPs em geral.

Comparando-se ainda a linhagem de *E. coli* resistente à magainina I na presença ou ausência do peptídeo foi possível identificar a expressão diferencial aumentada do gene que codifica o provável transportador ácido 3-fenilpropiónico (EcolC\_1141), um membro da bomba de efluxo multidroga MFS, que está diretamente associado com a habilidade da célula bacteriana de limitar o acesso de agentes antimicrobianos aos seus respectivos alvos. Esse sistema é considerado um dos mecanismos mais eficientes de resistência bacteriana (De Rossi *et al.*, 2002).

Sabe-se que ao longo da evolução as bactérias desenvolveram mecanismos de regulação sofisticados para modificar as propriedades da sua superfície e para perceber as pressões do microambiente em geral, no caso dos *CAMPs* não seria diferente, uma vez que a percepção da sua presença e resposta dinâmica é um eficiente mecanismo de proteção da célula bacteriana, no objetivo de resistir à ação desses peptídeos e conseqüentemente à morte (Mascher *et al.*, 2004; Saar-Dover *et al.*, 2012).

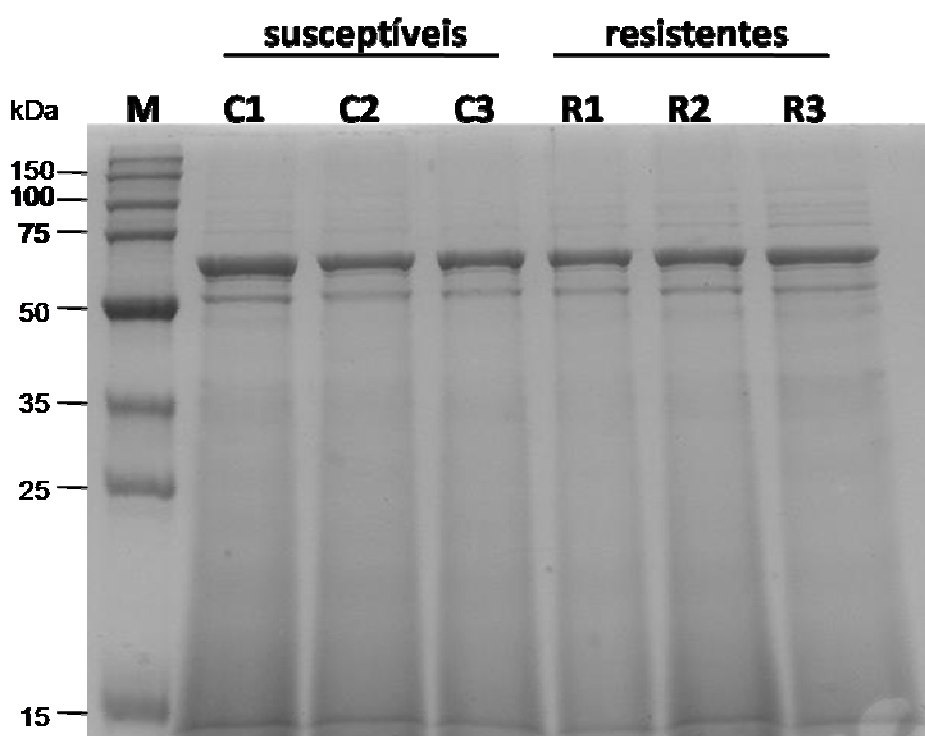
#### **6.4. CAPÍTULO IV – Análises proteômicas preliminares do secretoma das linhagens de *E. coli* susceptíveis e resistentes à magainina I por metodologia *in-gel*.**

Sistemas de secreção de proteínas são críticos para os processos de agentes patogênicos uma vez que secretam proteínas tais como toxinas, adesinas, enzimas hidrolíticas e proteínas efetoras que manipulam as vias de sinalização de virulência e interação patógeno-hospedeiro (Deng *et al.*, 2012). Deste modo, a identificação de proteínas secretadas permite uma melhor compreensão dos fatores de virulência e fenótipo desta bactéria, além de possibilitar a empregabilidade da maquinaria bacteriana para obtenção de moléculas bioativas.

Sendo assim, neste trabalho foi averiguado a capacidade das linhagens de *E. coli* susceptíveis (C1-C3) e resistentes (R1-R3) à magainina I secretarem proteínas diferenciais quando comparadas entre si. Para tanto, utilizou-se como estratégia a comparação por análises por géis bidimensionais das proteínas do meio de cultura após o cultivo. A abordagem proteômica baseada em géis (*in-gel*) tem sido considerada até o momento o pilar da análise proteômica comparativa e possui um grande poder de separação de misturas protéicas complexas (Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2013).

Inicialmente, as linhagens susceptíveis e resistentes foram cultivadas em 2 L de meio LB por 3 h e as amostras do secretoma, contendo as proteínas secretadas durante o crescimento bacteriano, foram utilizadas para obtenção dos extratos protéicos conforme descrito em material e métodos. Dessa forma, após a padronização do protocolo adequado para a obtenção dos extratos protéicos (Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006), foi possível observar uma concentração protéica de 3 mg. mL<sup>-1</sup> e rendimento de aproximadamente 9 mg de proteínas totais, para cada amostra (Tabela 7).

Em seguida, foram aplicados no gel de poliacrilamida 50  $\mu$ g de cada amostra para observar o perfil de massa molecular do secretoma bacteriano de todos os isolados para observar o perfil de massa molecular do secretoma bacteriano de todos os isolados por SDS-PAGE. Portanto, o padrão protéico de massa molecular observado para as proteínas do secretoma foi praticamente idêntico entre as cepas resistentes e susceptíveis, inviabilizando a utilização desses dados para o estudo proteômico comparativo relacionado aos mecanismos de resistência antimicrobiana (Figura 25).

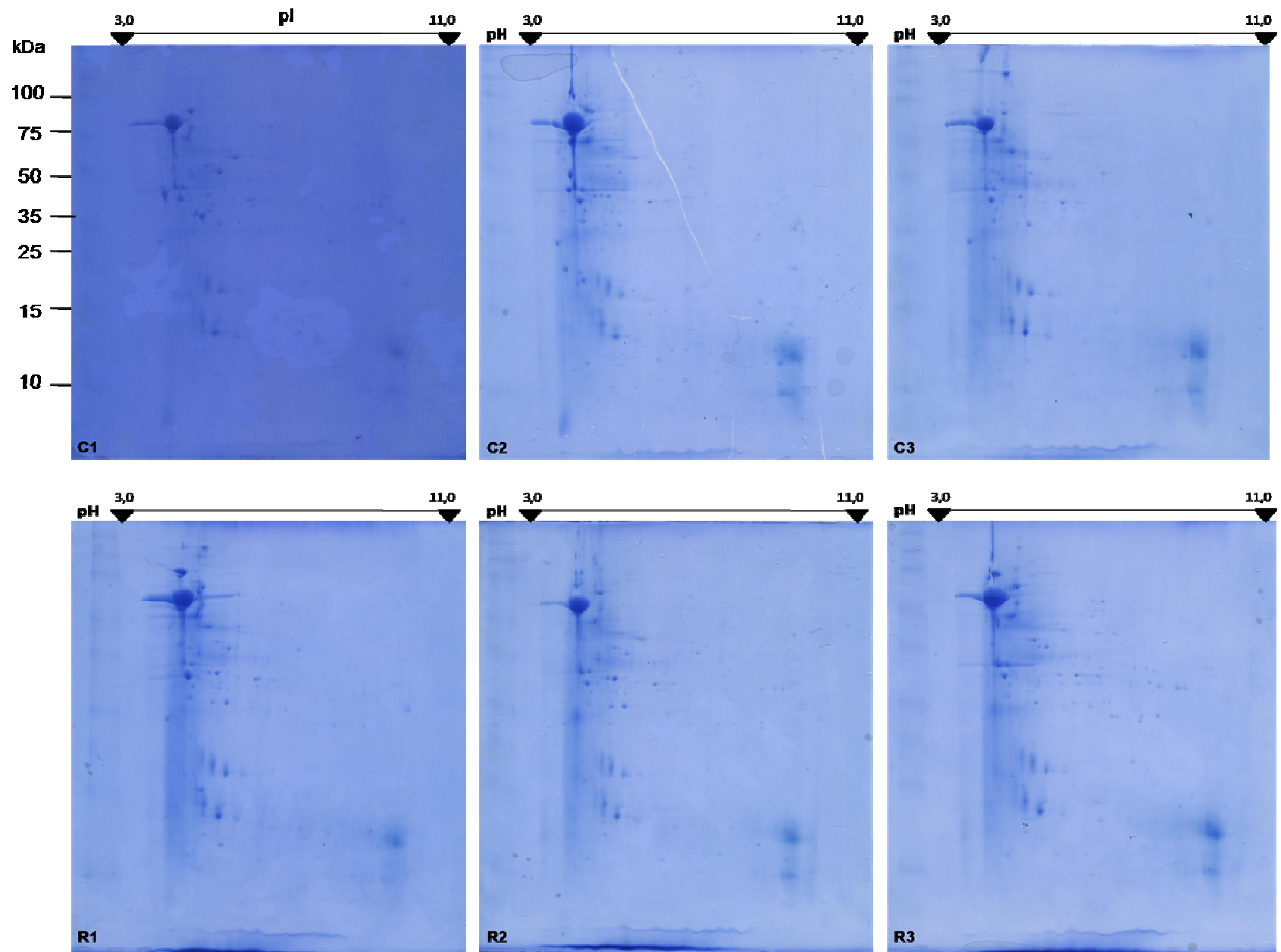


**Figura 25.** Perfil de massa molecular do secretoma dos isolados de *E. coli* resistente e susceptível à magainina I por SDS-PAGE 12%. M – marcador de massa molecular *Broad Range Protein Molecular Weight Marker* (Promega); C1 a C3, linhagens susceptíveis à magainina I; R1 a R3, linhagens resistentes à magainina I; Foram utilizados 50  $\mu$ g de amostra protéica dialisada em cada poço.

Nesse sentido, no intuito de detectar as diferenças significativas entre os padrões protéicos do secretoma dos isolados resistentes e susceptíveis à magainina I, os

experimentos de 2-DE foram feitos. Foram realizados experimentos pilotos para padronizar a quantidade de amostra protéica que deve ser utilizada por gel e os parâmetros de corrida eletroforética e o resultado preliminar de um piloto, utilizando 1 mg de extrato protéico, pode ser observado na Figura 26.

Para a etapa de focalização isoeétrica foram utilizadas *strips* com variação abrangente de pH entre 3 – 11, entretanto os *spots* observados nos géis apresentaram variação de distribuição de pI entre 3 e 5 (Figura 3). Com a finalidade de separação por massa molecular, foram realizados géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%, a fim de retenção de moléculas de menor massa, obtendo-se uma distribuição de *spots* de massa molecular variando entre 12 até aproximadamente 80 kDa (Figura 26).



**Figura 26.** Análise comparativa dos géis 2-DE do secretoma das linhagens de *E. coli* susceptíveis e resistentes a magainina I. C1, C2 e C3, linhagens susceptíveis; R1, R2 e R3, linhagens resistentes à magainina I. pI, ponto isoeletrônico.

As réplicas dos géis apresentando boa definição e quantidade de *spots* suficientes para permitir a análise secretômica comparativa entre as cepas resistentes e susceptíveis à magainina I, já foram realizadas e as análises de imagem através do programa ImageMaster Platinum 7.0 serão desenvolvidas para comparar as imagens obtidas, e a partir daí calcular o nível de similaridade entre os géis; permitindo a seleção de pontos protéicos (*spots*) de interesse para posterior sequenciamento através de espectrometria de massas (MALDI-ToF/ToF) e comparação entre as proteínas identificadas em cada grupo, dando continuidade ao estudo do secretoma.

## 7. CONCLUSÕES

Conforme descrito nesse trabalho, foram obtidos resultados interessantes na busca pela compreensão dos mecanismos bioquímicos e moleculares de aquisição de resistência da *E. coli* ao peptídeo antimicrobiano magainina I. Os resultados observados permitiram inferir que:

- As análises por MALDI-TOF MS, MALDI BioTyper e flexAnalysis possibilitaram a identificação das linhagens de *E. coli* resistentes e susceptíveis à magainina, bem como a distinção entre as mesmas.
- A resistência à magainina I parece ser bastante específica a esse peptídeo.
- As análises proteômicas comparativas do lisado total por nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, mostraram que a maioria das proteínas identificadas estavam correlacionadas com o metabolismo bacteriano, principalmente de carboidratos.
- As proteínas superexpressas na linhagem resistente à magainina I parecem estar envolvidas, de uma forma geral, na alteração da superfície bacteriana, no efluxo de magainina para fora da célula, na transdução de sinal para controle transcricional e consequentemente na manutenção da homeostase celular bacteriana.
- As análises transcriptômicas comparativas por RNA-seq demonstraram que a maioria dos genes com expressão diferencial estava correlacionada com o metabolismo bacteriano.
- Na linhagem resistente *versus* susceptível à magainina I na presença do peptídeo, foram identificados 5 genes diferencialmente expressos, provavelmente envolvidos na



composição e organização das membranas, em mecanismos de resposta a estresse ambiental e homeostase celular.

Em suma, nesse trabalho foi possível observar de uma forma geral, que a *E. coli*, foi capaz de perceber o microambiente e de responder a esse estímulo ativando ou inibindo genes importantes para a resposta celular necessária naquele momento e que assim como acontece com a exposição persistente e contínua aos antibióticos convencionais, a resistência aos AMPs também pode ser estabelecida sob essas mesmas condições, uma vez que a bactéria consegue desenvolver mecanismos de adaptação a esse ambiente, observada pela expressão de proteínas diferenciais inclusive na ausência subsequente desse peptídeo, como observado nesse modelo de resistência bacteriana ao AMP magainina I. Esses dados trazem uma alerta em relação à possibilidade de resistência aos AMPs, exigindo um cuidado maior no manejo clínico quando da incorporação dessas substâncias como alternativas terapêuticas e ainda contribuem para o entendimento dos mecanismos moleculares de resistência aos AMPs.

## 8. PERSPECTIVAS

Esse trabalho faz parte de uma linha de pesquisa que visa compreender e caracterizar a resistência bacteriana aos peptídeos antimicrobianos. Os dados obtidos indicam que existem genes e proteínas interessantes envolvidos nessa resposta. Por isso, como perspectivas do trabalho e dando continuidade na busca por melhor compreensão desses mecanismos de resistência, serão realizados experimentos de microscopia eletrônica e de fluorescência no intuito de verificar alterações morfológicas na membrana bacteriana e ainda alterações nos sistemas de efluxo, como sugerido pelos genes e proteínas diferencialmente expressos correlacionados com a conformação e constituição da membrana celular. Além disso, serão desenvolvidas linhagens de *E. coli* mutantes para alguns genes eleitos no intuito de compreender melhor a função das proteínas por eles codificadas e a participação na fisiologia bacteriana sob as mesmas condições descritas nesse trabalho. Esses estudos podem contribuir para o entendimento da resistência aos AMPs e ainda na busca por quimioterapia alternativa para o tratamento principalmente das IRaS causadas por bactérias multidroga resistentes.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. G.; MARQUES, S. G.; MONTEIRO-NETO, V.; CARVALHO, R. M. L.; GONÇALVES, A. G. Nosocomial infection and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing Enterobacteriaceae in Northeast Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 4, p. 441-446. 2011.
- ACOSTA, M. B.; FERREIRA, R. C.; PADILLA, G.; FERREIRA, L. C.; COSTA, S. O. Altered expression of oligopeptide-binding protein (OppA) and aminoglycoside resistance in laboratory and clinical *Escherichia coli* strains. **J Med Microbiol**, v. 49, n. 5, p. 409-13. 2000.
- AGERBERTH, B.; LEE, J. Y.; BERGMAN, T.; CARLQUIST, M.; BOMAN, H. G.; MUTT, V.; JORNVALL, H. Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. **Eur J Biochem**, v. 202, n. 3, p. 849-54. 1991.
- AKTAS, Z.; ARIDOGAN, A.; KAYACAN, C. B.; AYDIN, D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. **J Microbiol**, v. 45, n. 4, p. 286-90. 2007.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Arch Med Res**, v. 36, n. 6, p. 697-705. 2005.
- ALBUQUERQUE, S. E. DE; CAVALCANTE, R. D.; PONCE, D.; FORTALEZA, C. M. Epidemiology of healthcare-associated infections among patients from a hemodialysis unit in southeastern Brazil. **Braz J Infect Dis**, In Press. 2013.
- ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 251-9. 2010.
- ALMIRON, M.; LINK, A. J.; FURLONG, D.; KOLTER, R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. **Genes Dev**, v. 6, n. 12B, p. 2646-54. 1992.
- AMICHE, M.; GALANTH, C. Dermaseptins as models for the elucidation of membrane-acting helical amphipathic antimicrobial peptides. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, n. 8, p. 1184-93. 2011.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, v. 18, n. 3-4, p. 533-7. 1997.
- ANVISA Ministério da Saúde Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. *Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. 2007.
- APECIH - ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR *Infecções hospitalares no Brasil: uma medida de sua magnitude nos anos 1990 e comparação com os índices europeus*. Disponível em: <[http://www.apecih.org.br/infecoos\\_hospitalares.htm](http://www.apecih.org.br/infecoos_hospitalares.htm)>. Acesso em: 20 fev. 2013.
- ARCIDIACONO, S.; SOARES, J. W.; MEEHAN, A. M.; MAREK, P.; KIRBY, R. Membrane permeability and antimicrobial kinetics of cecropin P1 against *Escherichia coli*. **J. Pept. Sci**, v. 15, p. 398-403. 2009.

- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-resistant bugs in the 21 st century-a clinical super-challenge. **N Engl J Med**, v. 360, n. 5, p. 439-443. 2009.
- ARNOLD, R. J.; REILLY, J. P. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. **Anal Biochem**, v. 269, n. 1, p. 105-12. 1999.
- ASAKURA, H.; KAWAMOTO, K.; HAISHIMA, Y.; IGIMI, S.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, S. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. **Res Microbiol**, v. 159, n. 9-10, p. 709-17. 2008.
- AUJARD, Y.; RAJGURU, M.; BINGEN, E. [Nosocomial infections in pediatrics. Problems and perspectives]. **Pathol Biol (Paris)**, v. 48, n. 10, p. 909-20. 2000.
- BARNETT, A. G.; PAGE, K.; CAMPBELL, M.; MARTIN, E.; RASHLEIGH-ROLLS, R.; HALTON, K.; PATERSON, D. L.; HALL, L.; JIMMIESON, N.; WHITE, K.; GRAVES, N. The increased risks of death and extra lengths of hospital and ICU stay from hospital-acquired bloodstream infections: a case-control study. **BMJ Open**, v. 3, p. e003587. 2013.
- BARRA, D.; SIMMACO, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. **Tibtech**. v. 13. p. 205-209. 1995.
- BATTY, E. M.; WONG, T. H.; TREBES, A.; ARGOUD, K.; ATTAR, M.; BUCK, D.; IP, C. L.; GOLUBCHIK, T.; CULE, M.; BOWDEN, R.; MANGANIS, C.; KLENERMAN, P.; BARNES, E.; WALKER, A. S.; WYLLIE, D. H.; WILSON, D. J.; DINGLE, K. E.; PETO, T. E.; CROOK, D. W.; PIAZZA, P. A modified RNA-Seq approach for whole genome sequencing of RNA viruses from faecal and blood samples. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66129. 2013.
- BATTY, E. M.; WONG, T. H.; TREBES, A.; ARGOUD, K.; ATTAR, M.; BUCK, D.; IP, C. L.; GOLUBCHIK, T.; CULE, M.; BOWDEN, R.; MANGANIS, C.; KLENERMAN, P.; BARNES, E.; WALKER, A. S.; WYLLIE, D. H.; WILSON, D. J.; DINGLE, K. E.; PETO, T. E.; CROOK, D. W.; PIAZZA, P. A modified RNA-Seq approach for whole genome sequencing of RNA viruses from faecal and blood samples. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66129. 2013.
- BECEIRO, A.; LLOBET, E.; ARANDA, J.; BENGOCHEA, J. A.; DOUMITH, M.; HORNSEY, M.; DHANJI, H.; CHART, H.; BOU, G.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 7, p. 3370-9. 2011.
- BECHINGER, B. Insights into the mechanisms of action of host defence peptides from biophysical and structural investigations. **J Pept Sci**, v. 17, n. 5, p. 306-14. 2011.
- BECKER, L. A.; BANG I.; CROUCH, M-L; FANG, F. C. Compensatory role of PspA, a member of the phage shock protein operon, in rpoE mutant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Mol Microbiol**, v. 56, n. 4, p. 1004-1016. 2005.
- Bellido, M. L.; Radpour, R.; Lapaire, O.; De Bie, I.; Hösli, I.; Bitzer, J.; Hmadcha, A.; Zhong, X. Y.; Holzgreve, W. MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma. **Biol Reprod**, v. 82, n. 4, p. 745-750. 2010.

- BENOIT, S.; ABAIBOU, H.; MANDRAND-BERTHELOT, M. A. Topological analysis of the aerobic membrane-bound formate dehydrogenase of *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 180, n. 24, p. 6625-34. 1998.
- BERKOWITZ, B. A.; BEVINS, C. L.; ZASLOFF, M. A. Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides. **Biochem Pharmacol**, v. 39, n. 4, p. 625-9. 1990.
- BERTHOUMIEUX, S.; BRILLI, M.; KAHN, D.; DE JONG, H.; CINQUEMANI, E. On the identifiability of metabolic network models. **J Math Biol**. 2012.
- BIZZINI, A.; ZHAO, C.; BUDIN-VERNEUIL, A.; SAUVAGEOT, N.; GIARD, J. C.; AUFRAY, Y.; HARTKE, A. Glycerol is metabolized in a complex and strain-dependent manner in *Enterococcus faecalis*. **J Bacteriol**, v. 192, n. 3, p. 779-85. 2010.
- BOMAN, H. G.; AGERBERTH, B.; BOMAN, A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. **Infect. Immun**, v. 61, p. 2978-2984. 1993.
- BOUDREAU, M. A.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Messenger functions of the bacterial cell wall-derived muropeptides. **Biochemistry**, v. 51, n. 14, p. 2974-90. 2012.
- BRISSETTE, J. L.; RUSSEL, M.; WEINER, L.; MODEL, P. Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 3, p. 862-6. 1990.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat Rev Microbiol**, v. 25, n. 3, p. 238-250. 2005.
- CAMARA, J. E.; HAYS, F. A. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 389, n. 5, p. 1633-8. 2007.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME J**, v. 6, n. 8, p. 1621-4. 2012.
- CARDOSO, K.; GANDRA, R. F.; WISNIEWSKI, E. S.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K.; FELIPACH-NETO, V.; HAUS, L. F.; SIMÃO, R. C. DnaK and GroEL are induced in response to antibiotic and heat shock in *Acinetobacter baumannii*. **J Med Microbiol**, v. 59, p. 1061-1068. 2010.
- CASTANIE-CORNET, M. P.; BRUEL, N.; GENEVAUX, P. Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. **Biochim Biophys Acta**. 2013.
- CETIN, E. S.; GUNES, H.; KAYA, S.; ARIDOGAN, B. C.; DEMIRCI, M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 43, n. 6, p. 524-9. 2010.
- CHARYULU, E. M.; GNANAMANI, A. Identification and discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from burn wound sites using PCR and authentication with MALDI-TOF-MS. **Indian J Microbiol**, v. 52, n. 3, 337-345. 2012.
- CORDWELL, S. J. Technologies for bacterial surface proteomics. **Current Opinion in Microbiology**, 9:320-329, 2006.

- COSSU, A.; SECHI, L. A.; BANDINO, E.; ZANETTI, S.; ROSU, V. Expression profiling of *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* and *Mycobacterium smegmatis* in acid-nitrosative multi-stress displays defined regulatory networks. **Microbiol Pathogen**, v. 31, p. 1-8. 2013.
- CROUCH, M.; BECKER, L. A.; BANG, I.; TANABE, H.; QUELLETTE, A. J.; FANG, F. C. The alternative factor is required for resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to antimicrobial peptides. **Mol Microbiol**, v. 56, n. 3, p. 789-799. 2005.
- CUNEO, M. J.; CHANGELA, A.; MIKLOS, A. E.; BEESE, L. S.; KRUEGER, J. K.; HELLINGA, H. W. Structural analysis of a periplasmic binding protein in the tripartite ATP-independent transporter family reveals a tetrameric assembly that may have a role in ligand transport. **J Biol Chem**, v. 283, n. 47, p. 32812-20. 2008.
- DARWIN, A. J. The phage-shock-protein response systems, a microreview. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 3, p. 621-628. 2005.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 3, p. 417-33. 2010.
- DE ROSSI, E.; ARRIGO, P.; BELLINZONI, M.; SILVA, P. A.; MARTIN, C.; AINSA, J. A.; GUGLIERAME, P.; RICCARDI, G. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Med**, v. 8, n. 11, p. 714-24. 2002.
- DENG, W.; YU, H. B.; HOOG, C. L.; STOYNOV, N.; YULLING, L.; FOSTER, L. J.; FINLAY, B. B. Quantitative proteomic analysis of type III secretome of enteropathogenic *Escherichia coli* reveals an expanded effector repertoire for attaching/effacing bacterial pathogens. **Mol Cell Proteomics**, v.11, p. 692-709. 2012.
- DOWHAN, W. A retrospective: use of *Escherichia coli* as a vehicle to study phospholipid synthesis and function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, n. 3, p. 471-94. 2013.
- DRIESSEN, A. J.; NOUWEN, N. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. **Annu Rev Biochem**, v. 77, p. 643-67. 2008.
- DU PLESSIS, D. J.; NOUWEN, N.; DRIESSEN, A. J. The Sec translocase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, n. 3, p. 851-65. 2011.
- DUCLOHIER, H. Anion pores from magainins and related defensive peptides. **Toxicology**, v. 87, n. 1-3, p. 175-88. 1994.
- DWORKIN, J.; JOVANOVIĆ, G.; MODEL, P. The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of s54 dependent transcription. **J Bacteriol**, v. 182, p. 311-319. 2000.
- EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. **J Pept Sci**. v. 40., n. 17., p. 298-305. 2011.
- FEY, S. J.; LARSEN, P. M. 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. **Curr Opin Chem Biol**, v. 5, n. 1, p. 26-33. 2001.
- FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Antibiotics for emerging pathogens. **Science**, v. 325, n. 5944, p. 1089-93. 2009.
- FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. **Bull World Health Organ**, v. 79, n. 8, p. 780-90. 2001.

- FULMER, P. A.; LUNDIN, J. G.; WYNNE, J. H. Development of antimicrobial peptides (AMPs) for use in self-decontaminating coatings. **American Chemical Society**, v. 2, n. 4, p. 1266-1270. 2010.
- GEROMANOS, S. J.; VISSERS, J. P. C.; SILVA, J. C.; DORSCHER, C. A.; LI, G. Z.; GORENSTEIN, M. V.; BATEMAN, R. H.; LANGRIDGE, J. I. The detection, correlation and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. **Proteomics**, v. 9, p. 1638-1695. 2009.
- GESELL, J.; ZASLOFF, M.; OPELLA, S. J. Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. **J Biomol NMR**, v. 9, n. 2, p. 127-35. 1997.
- GEVAERT, K. Chromatographic Isolation of Methionine-containing Peptides for Gel-free Proteome Analysis: Identification Of More Than 800 *Escherichia coli* Proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 11, p. 896-903. 2002.
- GIEDRAITIENE, A.; VITKAUSKIENE, A.; NAGINIENE, R.; PAVILONIS, A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (Kaunas)**, v. 47, n. 3, p. 137-46. 2011.
- GIL, F.; IPINZA, F.; FUENTES, J.; FUMERON, R.; VILLARREAL, J. M.; ASPEE, A.; MORA, G. C.; VASQUEZ, C. C.; SAAVEDRA, C. The ompW (porin) gene mediates methyl viologen (paraquat) efflux in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Res Microbiol**, v. 158, n. 6, p. 529-36. 2007.
- GOULTER-THORSEN, R. M.; GENTLE, I. R.; GOBIUS, K. S.; DYKES, G. A. The DNA protection during starvation protein (Dps) influences attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, n. 8, p. 939-41. 2011.
- GRYLLOS, I.; TRAN-WINKLER, H. J.; CHENG, M. F.; CHUNG, H.; BOLCOMBE, R., 3RD; LU, W.; LEHRER, R. I.; WESSELS, M. R. Induction of group A Streptococcus virulence by a human antimicrobial peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 43, p. 16755-60. 2008.
- HANEY, E. F.; HUNTER, H. N.; MATSUZAKI, K.; VOGEL, H. J. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: Linking structure to function? **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, p. 1639-1655. 2009.
- HENNIG-PAUKA, I.; KOCH, R.; HOELTIG, D.; GERLACH, G. F.; WALDMANN, K. H.; BLECHA, F.; BRAUER, C.; GASSE, H. PR-39, a porcine host defence peptide, is prominent in mucosa and lymphatic tissue of the respiratory tract in healthy pigs and pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **BMC Res Notes**, v. 5, p. 539. 2012.
- HERASIMENKA, Y., BENINCASA, M., MATTIUZZO, M., CESCUTTI, P., GENNARO, R., RIZZO, R. Interaction of antimicrobial peptides with bacterial polysaccharides from lung pathogens. **Peptides**, 26:1127-1132, 2005.
- HICKS, R.P.; MONES, E.; KIM, H.; KOSER, B.W.; NICHOLS, D.A.; BHATTACHARJEE, A. K. Comparison of the conformation and electrostatic surface properties of magainin peptides bound to sodium dodecyl sulfate and dodecylphosphocholine micelles. **Biopolymers**, v. 68, n. 4, 459-470. 2008.

- HORSTMAN, N. K.; DARWIN, A. J. Phage shock proteins B and C prevent lethal cytoplasmic membrane permeability in *Yersinia enterocolitica*. **Mol Microbiol**, v. 85, n. 3, p. 445-60. 2012.
- HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8347-52. 2000.
- HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein Cell**, v. 1, n. 2, p. 143-152. 2010.
- HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; HULTEN, E. A.; BAJAKSOUZIAN, S.; ADAMS, J. M.; DONSKEY, C. J.; ECKER, D. J.; MASSIRE, C.; ESHOO, M. W.; SAMPATH, R.; THOMSON, J. M.; RATHER, P. N.; CRAFT, D. W.; FISHBAIN, J. T.; EWELL, A. J.; JACOBS, M. R.; PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 12, p. 4114-23. 2006.
- IVANOV, N. V.; HUBALEK, F.; TRANI, M.; EDMONDSON, D. E. Factors involved in the assembly of a functional molybdopyranopterin center in recombinant *Comamonas acidovorans* xanthine dehydrogenase. **Eur J Biochem**, v. 270, n. 23, p. 4744-54. 2003.
- JONAS, K.; LIU, J.; CHIEN, P.; LAUB, M. T. Proteotoxic stress induces a cell-cycle arrest by stimulating Lon to degrade the replication initiator DnaA. **Cell**, v. 154, n. 3, p. 623-36. 2013.
- JONES, D. Composition and properties of the family Enterobacteriaceae. **Soc. Appl. bacterial Symp Ser.**, v. 17. p. 1S-19S. 1998.
- JONES, S. E.; LLOYD, L. J.; TAN, K. K.; BUCK, M. Secretion defects that activate the phage shock response of *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 185, p. 6707-6711.
- JORTH, P.; TRIVEDI, U.; RUMBAUGH, K.; WHITELEY, M. Probing Bacterial Metabolism during Infection Using High-Resolution Transcriptomics. **J Bacteriol**, v. 195, n. 22, p. 4991-8. 2013.
- KAMENSEK, S.; ZGUR-BERTOK, D. Global transcriptional responses to the bacteriocin colicin M in *Escherichia coli*. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 42. 2013.
- KANDASWAMY, K.; LIEW, T. H.; WANG, C. Y.; HUSTON-WARREN, E.; MEYER-HOFFERT, U.; HULTENBY, K.; SCHRODER, J. M.; M, G. C.; NORMARK, S.; HENRIQUES-NORMARK, B.; HULTGREN, S. J.; KLINE, K. A. Focal targeting by human beta-defensin 2 disrupts localized virulence factor assembly sites in *Enterococcus faecalis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2013.
- KIM, J.; PARK, S.; YOON, M.; HAHM, K.; PARK, Y. C-terminal amidation of PMAP-23: translocation to the inner membrane of Gram negative bacteria. **Amino Acids**, v. 40, p. 183-195. 2011.
- KLEVENS, R. M.; EDWARDS, J. R.; RICHARDS, C. L. Jr; HORAN, T. C.; GAYNES, R. P.; POLLOCK, D. A.; CARDO, D. M. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. **Public Health Rep.**, v. 122, n. 2, p. 160-166. 2007
- KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. **Mol Cell**, v. 37, n. 3, p. 311-20. 2010.
- KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, v. 118, n. 1, p. 1-36. 2010.



- KOSCIUCZUK, E. M.; LISOWSKI, P.; JARCZAK, J.; STRZALKOWSKA, N.; JOZWIK, A.; HORBANCZUK, J.; KRZYZEWSKI, J.; ZWIERZCHOWSKI, L.; BAGNICKA, E. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 12, p. 10957-70. 2012.
- KURASHIMA-ITO, K.; MOROMISATO, K.; NISHIMURA, K.; WALCHLI, M.; TAME, J. R.; ITO, Y. Backbone <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N assignments of a 59 kDa *Salmonella typhimurium* periplasmic oligopeptide binding protein, OppA. **Biomol NMR Assign**, v. 1, n. 1, p. 37-9. 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685. 1970.
- LAUGHLIN, T. F.; AHMAD, Z. Inhibition of Escherichia coli ATP synthase by amphibian antimicrobial peptides. **Int J Biol Macromol**, v. 46, n. 3, p. 367-74. 2010.
- LECLERQ, S.; HARMS, J. S.; ROSINHA, G. M.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. Induction of a th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. **J Med Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 20-6. 2002.
- LEE, J. Y.; BOMAN, A.; CHUANXIN, S.; ANDERSSON, M.; JORNVALL, H.; MUTT, V.; BOMAN, H. G. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. **Proc Natl Acad**, v. 86, p. 9159-9162. 1989.
- LEIMKUHLER, S.; ANGERMULLER, S.; SCHWARZ, G.; MENDEL, R. R.; KLIPP, W. Activity of the molybdopterine-containing xanthine dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus* can be restored by high molybdenum concentrations in a moeA mutant defective in molybdenum cofactor biosynthesis. **J Bacteriol**, v. 181, n. 19, p. 5930-9. 1999.
- LEVINE, D. P. Vancomycin: a history. **Clin Infect Dis**, v. 42 Suppl 1, p. S5-12. 2006.
- LEVY, C. E. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. **ANVISA Ministério da Saúde - Brasil**, 2004.
- LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat. Med.**, v. 10, p. 122-129. 2004.
- LI, G. Z.; VISSERS, J. P. C.; SILVA, J. C.; GOLICK, D.; GORENSTEIN, M. V.; GEROMANOS, S. J. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, v. 9, p. 1696-1719. 2009.
- LIMA, T. B.; PINTO, M. F.; RIBEIRO, S. M.; DE LIMA, L. A.; VIANA, J. C.; JUNIOR, N. G.; CANDIDO EDE, S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Bacterial resistance mechanism: what proteomics can elucidate. **FASEB J**, v. 27, n. 4, p. 1291-303. 2013.
- LIN, J. S.; SHAW, G. C. Regulation of the kduID operon of *Bacillus subtilis* by the KdgR repressor and the ccpA gene: identification of two KdgR-binding sites within the kdgR-kduI intergenic region. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 3, p. 701-10. 2007.
- LIN, X. M.; YANG, J. N.; PENG, X. X.; LI, H. A novel negative regulation mechanism of bacterial outer membrane proteins in response to antibiotic resistance. **J Proteome Res**, v. 9, n. 11, p. 5952-9. 2010.

- LIPSITCH, M.; BERGSTROM, C. T.; LEVIN, B. R. The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals: paradoxes and prescriptions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 4, p. 1938-1943. 2000.
- LIPSKY, B. A.; HOLROYD, K. J.; ZASLOFF, M. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: A randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. **Clin Infect Dis**, v. 47, p. 1537–1545. 2008.
- LIU, Y. F.; YAN, J. J.; LEI, H. Y.; TENG, C. H.; WANG, M. C.; TSENG, C. C.; WU, J. J. Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. **Infect Immun**, v. 80, n. 5, p. 1815-22. 2012.
- LLARRULL, L. I.; TESTERO, S. A.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. The future of the beta-lactams. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 551-7. 2010.
- LODISH, H., BERK, A.; ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P. B. D., DARNELL, J. E.. New York: W.H. Freeman & Co. **Molecular Cell Biology** 2000.
- LOHNER, K. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. **Gen Physiol Biophys**, v. 28, p. 105-116. 2009.
- LOU, H.; CHEN, M.; BLACK, S. S.; BUSHELL, S. R.; CECCARELLI, M.; MACH, T.; BEIS, K.; LOW, A. S.; BAMFORD, V. A.; BOOTH, I. R.; BAYLEY, H.; NAISMITH, J. H. Altered antibiotic transport in OmpC mutants isolated from a series of clinical strains of multi-drug resistant *E. coli*. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25825. 2011.
- MALAKHOVA, M. V.; VERESHCHAGIN, V. A.; IL'INA, E. N.; GOVORUN, V. M.; FILIMONOVA, O.; GRUDININA, S. A.; SIDORENKO, S. V. MALDI-ToF mass-spectrometry in analysis of genetically determined resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones. **Antibiot. Khimioter.**, v. 52, n. 1-2, p. 10-7. 2007.
- MALLICK, P.; KUSTER, B. Proteomics: a pragmatic perspective. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 7, p. 695-709. 2010.
- MARIA-NETO, S.; CANDIDO EDE, S.; RODRIGUES, D. R.; DE SOUSA, D. A.; DA SILVA, E. M.; DE MORAES, L. M.; OTERO-GONZALEZ ADE, J.; MAGALHAES, B. S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Deciphering the magainin resistance process of *Escherichia coli* strains in light of the cytosolic proteome. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 1714-24. 2012.
- MARTINEZ DE TEJADA, G.; PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; MORIYON, I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. **Infect Immun**, v. 63, n. 8, p. 3054-61. 1995.
- MARTINEZ, A.; KOLTER, R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. **J Bacteriol**, v. 179, n. 16, p. 5188-94. 1997.
- MASCHER, T.; ZIMMER, S. L.; SMITH, T. A.; HELMANN, J. D. Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 2888-96. 2004.
- MATLOW, A. G.; MORRIS, S. K. Control of antibiotic-resistant bacteria in the office and clinic. **CMAJ**, v. 180, n. 10, p. 1021-4. 2009.
- MAYER, A.; TANNER, M. E. Intermediate release by ADP-L-glycero-D-manno-heptose 6-epimerase. **Biochemistry**, v. 46, n. 20, p. 6149-55. 2007.

- MELLMANN, A.; BIMET, F.; BIZET, C.; BOROVSKAYA, A. D.; DRAKE, R. R.; EIGNER, U.; FAHR, A. M.; HE, Y.; ILINA, E. N.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; MANCINELLI, L.; MOUSSAOUI, W.; PREVOST, G.; PUTIGNANI, L.; SEACHORD, C. L.; TANG, Y. W.; HARMSSEN, D. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 11, p. 3732-4. 2009.
- MONNET, V. Bacterial oligopeptide-binding proteins. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 10, p. 2100-14. 2003.
- MORRISON, J. P.; READ, J. A.; COLEMAN, W. G., JR.; TANNER, M. E. Dismutase activity of ADP-L-glycero-D-manno-heptose 6-epimerase: evidence for a direct oxidation/reduction mechanism. **Biochemistry**, v. 44, n. 15, p. 5907-15. 2005.
- MORRISON, J. P.; TANNER, M. E. A two-base mechanism for *Escherichia coli* ADP-L-glycero-D-manno-heptose 6-epimerase. **Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 3916-24. 2007.
- MOSQUITO, S.; RUIZ, J.; BAUER, J. L.; OCHOA, T. J. [Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli*- associated diarrhea]. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 28, n. 4, p. 648-56. 2011.
- MURAD, A. M.; SOUZA, G. H.; GARCIA, J. S.; RECH, E. L. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). **J Sep Sci**, v. 34, p. 2618-2630. 2011.
- MUROI, M.; SHIMA, K.; IGARASHI, M.; NAKAGAWA, Y.; TANAMOTO, K. Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for discrimination of laboratory-derived antibiotic-resistant bacteria. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 35, n. 10, p. 1841-5. 2012.
- MUTZ, K.; HEILKENBRINKER, A.; LONNE, M.; WALTER, J.; STAHL, F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Curr Opin Biotech**, v. 24, p. 22-30. 2013.
- NAGAO, M. A. multicentre analysis of epidemiology of the nosocomial bloodstream infections in Japanese university hospitals. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 19, p. 852-858. 2013.
- NAKATOGAWA, H.; MURAKAMI, A.; MORI, H.; ITO, K. SecM facilitates translocase function of SecA by localizing its biosynthesis. **Genes Dev**, v. 19, n. 4, p. 436-44. 2005.
- NANDI, B.; NANDY, R. K.; SARKAR, A.; GHOSE, A. C. Structural features, properties and regulation of the outer-membrane protein W (OmpW) of *Vibrio cholerae*. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 9, p. 2975-86. 2005.
- NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial Activity Of Plant Extracts And Phytochemicals On Antibiotic resistant Bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31:247-256, 2000.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biotechnol.**, v. 29, n. 9, p. 464-472, 2011.
- NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 4, p. 593-656. 2003.
- OLAECHEA, P. M.; INSAUSTI, J.; BLANCO, A.; LUQUE, P. [Epidemiology and impact of nosocomial infections]. **Med Intensiva**, v. 34, n. 4, p. 256-67. 2010.

- OSMUNDSON, J.; DEWELL, S.; DARST, S. A. RNA-Seq Reveals Differential Gene Expression in *Staphylococcus aureus* with Single-Nucleotide Resolution. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76572. 2013.
- PARK, S. H.; CHOI, S. M.; LEE, D. G.; KIM, J.; CHOI, J. H.; KIM, S. H.; KWON, J. C.; YOO, J. H. Emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of community-onset bacteremia in South Korea: risk factors and clinical outcomes. **Microb Drug Resist**, v. 17, n. 4, p. 537-544. 2011.
- PARTRIDGE, S. R. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram negative bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v. 35, n. 5, p. 820-55. 2011.
- PATERSON, D. L. Resistance in Gram negative bacteria: Enterobacteriaceae. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 5 Suppl 1, p. S20-8; discussion S64-73. 2006.
- PELEGRINI, P. B.; NORONHA, E. F.; MUNIZ, M. A.; VASCONCELOS, I. M.; CHIARELLO, M. D.; OLIVEIRA, J. T.; FRANCO, O. L. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1764, n. 6, p. 1141-6. 2006.
- PENG, X.; XU, C.; REN, H.; LIN, X.; WU, L.; WANG, S. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance. **J. Proteome Res.**, v. 4, n. 6, p. 2257-65. 2005.
- PERRON, G. G.; ZASLOFF, M.; BELL, G. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. **Proceedings of the Royal Society B**. v. 273. p. 251-256. 2006.
- PIEPER, R.; GATLIN-BUNAI, C. L.; MONGODIN, E. F.; PARMAR, P. P.; HUANG, S. T.; CLARK, D. J.; FLEISCHMANN, R. D.; GILL, S. R.; PETERSON, S. N. Comparative proteomic analysis of *Staphylococcus aureus* strains with differences in resistance to the cell wall-targeting antibiotic vancomycin. **Proteomics**, v. 6, n. 15, p. 4246-58. 2006.
- PILLAI, A.; UENO, S.; ZHANG, H.; LEE, J. M.; KATO, Y. Cecropin P1 and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode *Ascaris suum*. **Biochem J**, v. 390, p. 207-214. 2005.
- PITTET, D.; ALLEGRANZI, B.; STORR, J.; BAGHERI NEJAD, S.; DZIEKAN, G.; LEOTSAKOS, A.; DONALDSON, L. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. **J Hosp Infect**, v. 68, n. 4, p. 285-92. 2008.
- PRANTING, M.; NEGREA, A.; RHEN, M.; ANDERSSON, D. I. Mechanism and fitness costs of PR-39 resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 8, p. 2734-41. 2008.
- PREHNA, G.; ZHANG, G.; GONG, X.; DUSZYK, M.; OKON, M.; MCINTOSH, L. P.; WEINER, J. H.; STRYNADKA, N. C. A protein export pathway involving *Escherichia coli* porins. **Structure**, v. 20, n. 7, p. 1154-66. 2012.
- PUJIC, P.; DERVYN, R.; SOROKIN, A.; EHRLICH, S. D. The kdgRKAT operon of *Bacillus subtilis*: detection of the transcript and regulation by the kdgR and ccpA genes. **Microbiology**, v. 144 ( Pt 11), p. 3111-8. 1998.
- REITH, J.; MAYER, C. Peptidoglycan turnover and recycling in Gram positive bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 92, n. 1, p. 1-11. 2011.

- REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annu Rev Microbiol**, v. 57, p. 155-76. 2003.
- RINALDI, A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 799-804. 2002.
- ROELANTS, K.; FRY, B.G.; YE, L.; STIJLEMANS, B.; BRYS, L.; KIK, P.; CLYNEN, E.; SCHOofs L.; CORNELIS, P.; BOSSUYT, F. Origin and functional diversification of an amphibian defense peptide arsenal. **PLOS**, v. 9, n. 8, p. 1-16. 2013.
- ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; LE BIHAN, M. C.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; ROEPSTORFF, P. 2D gels still have a niche in proteomics. **J Proteomics**. 2013.
- ROSENTHAL, V. D. Health-care-associated infections in developing countries. **Lancet**, v. 377, p. 186-188. 2011.
- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin Infect Dis**, v. 52, n. 9, p. 1138-43. 2011.
- SAAR-DOVER, R.; BITLER, A.; NEZER, R.; SHMUEL-GALIA, L.; FIRON, A.; SHIMONI, E.; TRIEU-CUOT, P.; SHAI, Y. D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B streptococcus by increasing the cell wall density. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 9, p. e1002891. 2012.
- SANG, Y.; BLECHA, F. Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions. **Dev Comp Immunol**, v. 33, n. 3, p. 334-43. 2009.
- SANTOS, K. V.; DINIZ, C. G.; VELOSO LDE, C.; DE ANDRADE, H. M.; GIUSTA MDA, S.; PIRES SDA, F.; SANTOS, A. V.; APOLONIO, A. C.; DE CARVALHO, M. A.; FARIAS LDE, M. Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam. **Res Microbiol**, v. 161, n. 4, p. 268-75. 2010.
- SARKER, S.; RUDD, K. E.; OLIVER, D. Revised translation start site for secM defines an atypical signal peptide that regulates *Escherichia coli* secA expression. **J Bacteriol**, v. 182, n. 19, p. 5592-5. 2000.
- SCHMID, G.; MATHIESEN, G.; ARNTZEN, M. O.; EIJSINK, V. G.; THOMM, M. Experimental and computational analysis of the secretome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 921-30. 2013.
- SCHWEDA, E. K.; RICHARDS, J. C.; HOOD, D. W.; MOXON, E. R. Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: implication in virulence. **Int J Med Microbiol**, v. 297, n. 5, p. 297-306. 2007.
- SCOTT II, R. D. Division of Healthcare Quality Promotion National Center for Preparedness, Detection, and Control of Infectious Diseases Coordinating Center for Infectious Diseases Centers for Disease Control and Prevention. **Report: The direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention**. 2009.
- SEREK, J.; BAUER-MANZ, G.; STRUHALLA, G.; VAN DEN BERG, L.; KIEFER, D.; DALBEY, R.; KUHN, A. *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. **EMBO J**, v. 23, n. 2, p. 294-301. 2004.

- SHARMA, P.; KUMAR, B.; GUPTA, Y.; SINGHAL, N.; KATOCH, V. M.; VENKATESAN, K.; BISHT, D. Proteomic analysis of streptomycin resistant and sensitive clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proteome Sci**, v. 8, p. 59. 2010.
- SHEN, C. J.; KUO, T. Y.; LIN, C. C.; CHOW, L. P.; CHEN, W. J. Proteomic identification of membrane proteins regulating antimicrobial peptide resistance in *Vibrio parahaemolyticus*. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 4, p. 1398-407. 2010.
- SHPRUNG, T.; PELEG, A.; ROSENFELD, Y.; TRIEU-CUOT, P.; SHAI, Y. Effect of PhoP-PhoQ activation by broad repertoire of antimicrobial peptides on bacterial resistance. **J Biol Chem**, v. 287, n. 7, p. 4544-51. 2012.
- SHRIVASTAVA, A. K.; PANDEY, S.; SINGH, P. K.; RAI, S.; RAI, L. C. *alr0882* encoding a hypothetical protein of *Anabaena* PCC7120 protects *Escherichia coli* from nutrient starvation and abiotic stresses. **Gene**, v. 511, p. 248-255. 2012.
- SIEVERT, D. M.; RICKS, P.; EDWARDS, J. R.; SCHNEIDER, A.; PATEL, J.; SRINIVASAN, A.; KALLEN, A.; LIMBAGO, B.; FRIDKIN, S. Antimicrobial-Resistant pathogens associated with Healthcare-Associated Infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 34, n. 1, p. 1-14. 2013.
- SILVA, J. C.; GORENSTEIN, M. V.; LI, G. Z.; VISSERS, J. P. C.; GEROMANOS, S. J. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition, **Mol Cell Proteomics**, v. 5, p. 144-156. 2005.
- SORAVIA, E.; MARTINI, G.; ZASLOFF, M. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus granular* gland secretions. **FEBS Lett**, v. 228, n. 2, p. 337-40. 1988.
- SPLITH, K.; NEUNDORF, I. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. **Eur Biophys J**, v. 40, n. 4, p. 387-97. 2011.
- SPOERING, A. L.; VULIC, M.; LEWIS, K. GlpD and PlsB participate in persister cell formation in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 188, n. 14, p. 5136-44. 2006.
- STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; BENNICH, H.; BOMAN, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 1, p. 246-248. 1981.
- STRAUSS, J.; KADILAK, A.; CRONIN, C.; MELLO, C. M.; CAMESANO, T. A. Binding, inactivation and adhesion forces between antimicrobial peptides cecropin P1 and pathogenic *E. coli*. **Colloids Surf. B. Biointerfaces**, v. 75, p. 156-164. 2010.
- SYKES, R. The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 9, p. 1842-52. 2010.
- TAN, K. E.; ELLIS, B. C.; LEE, R.; STAMPER, P. D.; ZHANG, S. X.; CARROLL, K. C. Prospective evaluation of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 10, p. 3301-3308. 2012.

- TANCA, A.; BIOSA, G.; PAGNOZZI, D.; ADDIS, M. F.; UZZAU, S. Comparison of detergent-based sample preparation workflows for LTQ-Orbitrap analysis of the *Escherichia coli* proteome. **Proteomics**, v. 13, n. 17, p. 2597-607. 2013.
- TANIGUCHI, Y.; CHOI, P. J.; LI, G. W.; CHEN, H.; BABU, M.; HEARN, J.; EMILI, A.; XIE, X. S. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 533-8. 2010.
- TAVEIRNE, M. E.; THERIOT, C. M.; LIVNY, J.; DIRITA, V. J. The complete *Campylobacter jejuni* transcriptome during colonization of a natural host determined by RNAseq. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e73586. 2013.
- THOMMA, B. P. H. J.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. Plant defensins. **Plant**, v. 216, p. 193-202. 2002.
- TRAN, T. T.; PANESSO, D.; MISHRA, N. N.; MILEYKOVSKAYA, E.; GUAN, Z.; MUNITA, J. M.; REYES, J.; DIAZ, L.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E.; SHAMOO, Y.; DOWHAN, W.; BAYER, A. S.; ARIAS, C. A. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis* diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids. **MBio**, v. 4, n. 4. 2013.
- VAN VEEN, S. Q.; CLAAS, E. C. J.; KUIJPER, E. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 900-907. 2010.
- VANDERNOOT, V. A.; LANGEVIN, S. A.; SOLBERG, O. D.; LANE, P. D.; CURTIS, D. J.; BENT, Z. W.; WILLIAMS, K. P.; PATEL, K. D.; SCHOENIGER, J. S.; BRANDA, S. S.; LANE, T. W. cDNA normalization by hydroxyapatite chromatography to enrich transcriptome diversity in RNA-seq applications. **Biotechniques**, v. 53, n. 6, p. 373-80. 2012.
- VINCENT, J.-L.; RELLO, J.; MARSHALL, J.; SILVA, E.; ANZUETO, A.; MARTIN, C. D.; MORENO, R.; LIPMAN, J.; GOMERSALL, C.; SAKR, Y.; REINHART, K. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **JAMA**, v. 302, n. 21, p. 2323-2329. 2009.
- WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2369-2375. 2003.
- WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, p. 2782-2786. 2006.
- WHO. Prevention of hospital-acquired infections. A practical guide. **World Health Organization**. 2 ed. Malta, 2002.
- WHO. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. **World Health Organization**. Geneva, 2011.
- WHO. WHO Guidelines on hand hygiene in health-care. **World Health Organization**. França, 2009.
- WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 440-64. 2010.

- WINSTANLEY, T.; COURVALIN, P. Expert systems in clinical microbiology. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 3, p. 515-56. 2011.
- WOLLHEIM, C.; GUERRA, I. M.; CONTE, V. D.; HOFFMAN, S. P.; SCHREINER, F. J.; DELAMARE, A. P.; BARTH, A. L.; ECHEVERRIGARAY, S.; COSTA, S. O. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum beta-lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 2, p. 138-43. 2011.
- WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 10, p. 1451-70. 2005.
- WU, X. B.; TIAN, L. H.; ZOU, H. J.; WANG, C. Y.; YU, Z. Q.; TANG, C. H.; ZHAO, F. K.; PAN, J. Y. Outer membrane protein OmpW of *Escherichia coli* is required for resistance to phagocytosis. **Res Microbiol**, v. 164, n. 8, p. 848-55. 2013.
- XI, H.; SCHNEIDER, B. L.; REITZER, L. Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine-dehydrogenase in purine salvage. **J Bacteriol**, v. 182, p. 5332–5341. 2000.
- YANG, C. K.; LU, C. D.; TAI, P. C. Differential Expression of Secretion Machinery During Bacterial Growth: SecY and SecF Decrease While SecA Increases During Transition from Exponential Phase to Stationary Phase. **Curr Microbiol**, v. 67, n. 6, p. 682-7. 2013.
- YING, B. W.; SENO, S.; KANEKO, F.; MATSUDA, H.; YOMO, T. Multilevel comparative analysis of the contributions of genome reduction and heat shock to the *Escherichia coli* transcriptome. **BMC Genomics**, v. 14, p. 25. 2013.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**. v. 415. p. 389-395. 2002.
- ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 15, p. 5449-53. 1987.
- ZBINDEN, A.; BOTTGER, E. C.; BOSSHARD, P. P.; ZBINDEN, R. Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of Gram negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 7, p. 2270-3. 2007.
- ZUCCA, M.; SCUTERA, S.; SAVOIA, D. New antimicrobial frontiers. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 11, n. 10, p. 888-900. 2011.
- ZUCKERMAN JM. Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. **Infect Dis Clin North Am**. v.18. n.621. 2004.
- ZURBIG, P.; MISCHAK, H. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for biomarker discovery and diagnosis of kidney diseases. **Contrib Nephrol**, v. 160, p. 107-26. 2008.



## 10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### Artigos publicados

- ALMEIDA, K. C.; LINDOLFO, L. C.; ALCÂNTARA, K. C. Syphilis in pregnant women attending a public health unit in Anápolis, Goiás, Brazil. **RBAC**. v. 41, n. 3, p. 181-184. 2009.

- CADAVID-RESTREPO, G.; GASTARDELO, T. S.; FAUDRY, E.; DE ALMEIDA, H.; BASTOS, I. M. D.; NEGREIROS, R. S.; LIMA, M. M.; ASSUMÇÃO, T. C.; ALMEIDA, K. C.; RAGNO, M.; EBEL, C.; RIBEIRO, B. M.; FELIX, C. R.; SANTANA, J. M. The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases. **BMC Biochemistry**, v. 12, p. 46. 2011.

### Artigo aceito para publicação

- LIMA, T. B.; RIBEIRO, S. M.; MOTTA, D. O.; ALMEIDA, K. C.; MARIA-NETO, S.; LARA, M. B.; SOUZA FILHO, C. R.; PARACHIN, N. S.; MAGALHÃES, B. S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Antibiotic combinations for controlling colistin-resistant *Enterobacter cloacae*. AAC01143-13R1. Aceito na **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** em Julho de 2013.

### Artigo submetido para publicação

- ALMEIDA, K. C.; LIMA, T. B.; MOTTA, D. O.; SILVA, O. N.; MAGALHÃES, B. S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Investigating specific bacterial resistance to AMPs by using a magainin I-resistant *Escherichia coli* model. Submetido na revista **Journal of Antibiotics**.

# Sífilis em gestantes atendidas em uma unidade de saúde pública de Anápolis, Goiás, Brasil

Syphilis in pregnant women attending a public health unit in Anápolis, Goiás, Brazil

Keyla Caroline de Almeida<sup>1</sup>, Ludmilla Costa Lindolfo<sup>1</sup> & Keila Correia de Alcântara<sup>2</sup>

**RESUMO** - A sífilis congênita, por ser considerada importante causa de morbimortalidade perinatal e resultar em seqüelas ao neonato, tornou-se uma doença de notificação compulsória no Brasil e meta de erradicação. Portanto, visando diagnosticar casos de sífilis entre gestantes da rede pública de Anápolis-Goiás e avaliar o perfil socioeconômico das mesmas, aplicou-se um questionário e coletou-se sangue para realização do VDRL nas gestantes da Unidade de Saúde do Progresso. A amostragem foi composta por 59 gestantes com idade média de 23 anos, casadas, com residência própria e considerável nível de instrução. Foram identificadas 44,1% de gestantes no primeiro trimestre gestacional, sendo que 49,2% não relatavam teste anterior para a infecção e 35,6% desconheciam sua sorologia para HIV/AIDS. A frequência da utilização de preservativos e o conhecimento geral sobre a sífilis mostraram-se insatisfatórios. Apenas uma gestante foi soro-reagente puro no VDRL. Os dados da Secretaria Municipal de Saúde e do SINAN sobre a sífilis congênita apresentaram divergências ( $p < 0,05$ ). Portanto, torna-se evidente a necessidade de fortalecer a vigilância epidemiológica do município, através da implementação de medidas capazes de prevenir a sífilis congênita e erradicá-la.

**PALAVRAS-CHAVE** - Sífilis. Diagnóstico. VDRL. Prevenção.

**SUMMARY** - The congenital syphilis, for being considered an important cause of newborn morbidity and mortality, became an illness of obligatory notification in Brazil and purpose of eradication of the Health department. Therefore, aiming at to diagnosis cases of gestational syphilis in women attended in a public unit at Anápolis city-Goiás and to evaluate the socioeconomic profile of them, it was applied a socioeconomic questionnaire to the pregnant and collected a blood sample to make the non-treponemic test (VDRL - Venereal Diseases Research Laboratory) for diagnosis of syphilis. The group of study was composed by 59 pregnant women with average age 23 years, married, with own residence, and a good educational level. 44.1% of pregnant were in the first trimester of gestational age, 49.2% of those ones had never carried through previous test for the infection and 35.6% were unaware of their HIV serology. Among them the frequency of use of condoms was very low, as well as the common knowledge of syphilis. A pregnant was identified as pure serum-reagent in test VDRL. The data gotten in the City department of Health on of notification of congenital syphilis had shown different when compared with the data of the referring SINAN. Therefore, becomes evident the necessity to improve the epidemiological vigilance through the implementation of capable measures to prevent congenital syphilis and to promote its eradication.

**KEYWORDS** - Syphilis. Diagnosis. VDRL. Prevention.

## INTRODUÇÃO

A sífilis é uma infecção crônica causada pela bactéria *Treponema pallidum*, habitualmente transmitida por contato sexual, podendo ainda ser transmitida por contato pessoal não-sexual, transfusão sanguínea e infecção intra-útero. A maior frequência da doença é observada durante as idades de 20 a 24 anos, o que é preocupante por ser justamente o período de idade fértil das mulheres, o que pode acarretar a transmissão vertical da sífilis, resultando na sífilis congênita e seus agravos aos neonatos (9,17).

A sífilis em gestantes passou a ser de notificação compulsória em julho de 2005, mas a notificação da sífilis congênita já era um agravo de notificação compulsória no Brasil desde 1986 e meta de erradicação do Ministério da Saúde em 1993, por ser um agravo que admite prevenção e tratamento ainda no pré-natal. Porém, o baixo nível sócio-econômico, promiscuidade sexual, assistência pré-natal inadequada, baixa escolaridade e ainda o subregistro e a subnotificação desse agravo, estão entre os fatores de risco que favorecem a constante prevalência da sífilis congênita no país (2, 16, 3).

A taxa de prevalência para sífilis ativa em parturientes em 2004 era de aproximadamente 1,6% (e de 0,42% para HIV), com uma estimativa de cerca de 50 mil parturientes com sífilis ativa e de 12 mil nascidos vivos com sífilis congênita (considerando uma taxa de transmissão vertical de 25%). Essa prevalência variou de 1,9% na região Nordeste a 1,3%

na região Centro-Oeste. No Brasil, calcula-se que 3,5% das gestantes tenham esta doença e que exista, ainda na atualidade, uma taxa média por ano de 1,9 casos de sífilis congênita por 1000 nascidos vivos e uma mortalidade perinatal de até 40% (2, 3). É possível notar um aumento na incidência de sífilis congênita que em 2000 era de 1,3 casos por mil nascidos vivos. Só em 2007, 1999 casos novos de sífilis em gestantes foram notificados ao Ministério da Saúde (3).

O diagnóstico precoce da infecção materna, através da identificação do *T. pallidum*, e o tratamento imediato com penicilina benzatina parenteral continua sendo a melhor forma de prevenção da sífilis congênita (12, 22, 6, 11, 7, 13, 4). O diagnóstico da doença pode ser realizado através dos testes treponêmicos (FTA-ABS, TPHA e MHA-TP) e não-treponêmicos (VDRL e RPR), sendo que o VDRL é utilizado como teste sorológico de primeira escolha na rede pública por ser altamente sensível, ter fácil manuseio e baixo custo (1, 11, 5). Portanto, o Ministério da Saúde recomenda a realização do VDRL no 1° e 3° trimestre de gestação, além de sua realização no momento do parto, se possível for, objetivando o diagnóstico eficaz da doença e a intervenção medicamentosa precisa para prevenir a transmissão vertical da sífilis e propiciar a redução das taxas de sífilis congênita no Brasil (2). Apesar dessas medidas a sífilis congênita permanece sendo uma causa importante de morbidade e mortalidade perinatal e um agravo de saúde pública ainda distante da erradicação tanto no Brasil quanto em outros países (18).

Recebido em 03/06/2008

Aprovado em 27/04/2009

<sup>1</sup>Graduadas em Farmácia pela Universidade Estadual de Goiás

<sup>2</sup>Mestre em Medicina Tropical pela Universidade Federal de Goiás

## OBJETIVOS

Tendo em vista o grande número de gestantes com sífilis, a importância da doença no contexto na morbimortalidade perinatal, a necessidade de se conhecer a realidade de cada local e a proposta de erradicação da sífilis congênita proposta pelo Ministério da Saúde, este trabalho objetivou diagnosticar casos de sífilis entre gestantes atendidas na rede pública do município de Anápolis – Goiás, bem como analisar os aspectos socioeconômicos e comportamentais das mesmas, no intuito de contribuir de forma científica e social para a implementação de medidas de prevenção e consequente erradicação da sífilis congênita nesse município.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi avaliada e aprovada pelo comitê de ética associado ao SISNEP (CAAE 0052.0.168.000-06, DOC: 0362). Foram selecionadas para o estudo, 59 gestantes que estavam em atendimento pré-natal na Unidade Municipal de Saúde do Progresso (SUS) da cidade de Anápolis-Go, após o consentimento livre e esclarecido.

Essas pacientes foram submetidas a um questionário socioeconômico e uma coleta de 5,0mL do sangue venoso em tubo seco e devidamente identificado, para obtenção do soro. As amostras foram analisadas no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Goiás (Unu-CET), através da realização do teste VDRL para verificar a presença de reaginas sífilíticas no soro (11, 15).

A análise dos dados sobre a notificação de sífilis na gestação e de sífilis congênita no município de Anápolis foram obtidos através da Secretária Municipal de Saúde e do SINAN (20). Todos os dados passaram por análise estatística descritiva.

## RESULTADOS

A faixa etária entre as gestantes incluídas no estudo variou de 15 a 38 anos, com média de 23 anos e uma maior frequência da idade de 20 anos (11,9%). Aproximadamente 63% (n=37) das gestantes relataram serem casadas. Avaliando-se o perfil social dessas gestantes como dados relacionados ao grau de escolaridade, ao tipo de residência, à renda mensal familiar e à quantidade de filhos, constatou-se que 42,4% (n=25) das gestantes possuíam de 8-11 anos de estudo, 54,2% (n=32) possuíam renda mensal familiar entre 2 e 3 salários mínimos, sendo que 67,8% (n=40) possuíam residência própria e 50,8% (n=30) eram primíparas (Tabela 1).

A Tabela 2 traz os resultados obtidos quanto ao comportamento de risco para doenças sexualmente transmitidas e a idade gestacional no momento do estudo. Das gestantes selecionadas para o estudo, 44,1% (n=26) se encontravam no primeiro trimestre gestacional e 22,0% (n=13) no último trimestre; 50,8% (n=30) iniciaram a vida sexual entre 16 e 20 anos de idade; 79,7% (n=47) relatavam ter um único parceiro. Em torno de 90% das gestantes analisadas relataram não fazer parte de um grupo de exposição, pois não tinham contato com parceiros contaminados nem apresentavam tatuagens. No entanto, mais de 50% (n=34) das gestantes declararam nunca fazerem uso de preservativos, o que as coloca em um grupo de risco potencial para as doenças sexualmente transmissíveis.

Já em relação ao conhecimento sobre a sífilis e sua transmissão, 50,8% (n=30) desconhecem completamente o assunto. Ao serem questionadas sobre a existência de outras doenças, inclusive DSTs (Doenças Sexualmente Transmissíveis), 91,5% (n=54) das gestantes declararam-se saudá-

veis e 100% (n=59) afirmaram ausência total de DSTs. Quando questionadas a respeito da realização de testes anteriores para sífilis, 49,2% (n=29) das gestantes relataram a não realização do mesmo em outro momento (Figura 1). Quanto à sorologia para HIV/AIDS, 64,4% (n=38) apresentaram resultado negativo, sendo que o restante, 35,6% (n=21) desconheciam a realização anterior do teste.

Na avaliação da sorologia não-treponêmica, através da realização do teste de VDRL, 1,7% (n=1) apresentou-se como soro-reagente puro, porém em diluições de 1:2, 1:4 e 1:8 o resultado foi negativo, demonstrando que pode ter sido decorrente do quadro de cicatriz sorológica, por exposição anterior à infecção, ou ainda pelo próprio estado gravídico que pode fornecer resultados falso-positivos em determinadas situações por causa ainda desconhecida (13).

Os dados relativos à notificação da sífilis congênita em Anápolis-GO obtidos através da Secretaria de Saúde e do SINAN demonstraram uma diferença estatisticamente significativa quando confrontados, com exceção do ano de 2003 que apresentou a notificação em ambos os sistemas de 12 casos de sífilis congênita (Tabela 3).

Além disso, dados relativos à sífilis na gestação, não foram encontrados nos anos anteriores a 2006, e só nesse ano já tinham sido registrados 07 casos na Secretaria de Saúde de Anápolis. Em relação aos casos notificados de sífilis gestacional no município através do SINAN, não houve nenhum registro encontrado em todos os anos pesquisados.

TABELA I

Perfil socioeconômico das gestantes em estudo (n=59)

CARACTERÍSTICA	FREQÜÊNCIA		PERCENTAGEM (%)
	A		
Naturalidade	Anápolis	30	50,8
	Cidade Vizinha	16	27,1
	Outros Estados	13	22,0
Escolaridade	1 - 3 anos	2	3,4
	4 - 7 anos	16	27,1
	8 - 11 anos	25	42,4
	12 ou mais	16	27,1
	Renda Mensal Familiar	1 salário mínimo	20
	2 - 3 mínimos	32	54,2
	4 - 5 mínimos	6	10,2
	Outros	1	1,7
Quantidade de filhos	Nenhum	30	50,8
	Um	19	32,2
	Dois	6	10,2
	Três ou mais	4	6,8

TABELA II

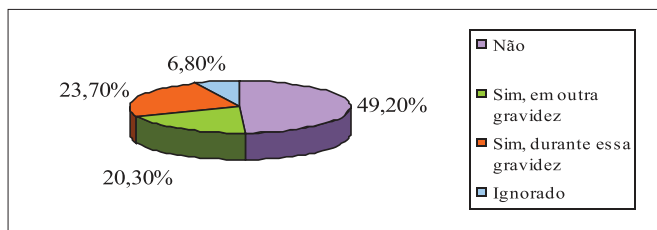
Avaliação do comportamento de risco para DST's (n=59).

COMPORTAMENTO DE RISCO	FREQÜÊNCIA	PERCENTAGEM (%)	
Idade gestacional	Primeiro trimestre	26	47,5
	Segundo trimestre	18	30,5
	Terceiro trimestre	13	22,0
Início da vida sexual	12 a 15 anos	17	28,8
	16 a 20 anos	30	50,8
	Maior de 20 anos	12	20,3
Número de parceiros	Um	47	79,7
	Dois a três	9	15,3
	Quatro a cinco	2	3,4
Contato com parceiro contaminado por sífilis	Não	57	96,6
	Ignorado	2	3,40
Presença de tatuagens	Sim	6	10,2
	Não	53	89,8
Utilização de preservativos	Sempre	05	8,5
	Eventualmente	20	33,9
	nunca	34	57,6

**TABELA III**  
**Comparação entre os casos notificados de sífilis congênita na Secretaria Municipal de Saúde de Anápolis –GO e no SINAN.**

LOCAL DE NOTIFICAÇÃO	ANO DE NOTIFICAÇÃO					TOTAL
	2001	2002	2003	2004	2005	
Secretaria de Saúde	0	0	12	05	02	19
SINAN	03	13*	12	06	03	37*

\*p<0,05



**Figura 1 - Realização anterior de teste para diagnóstico da sífilis.**

### DISCUSSÃO

Este trabalho permitiu identificar um "novo" perfil de gestantes. Como exposto, seria de se esperar uma amostragem de adolescentes pertencentes a níveis sócio-econômicos menos favorecidos e de baixa escolaridade. No entanto, a maioria das gestantes era de jovens com idade média de 23 anos, com considerável grau de escolaridade, estando casadas e possuindo moradia própria.

Apesar dessa diferença de perfis ser positiva em primeira instância, esta não influenciou sobre outros fatores como conhecimento sobre DST's. O que se pode inferir que mesmo possuindo tal escolaridade, estas gestantes desconheciam a sífilis, sua sorologia para HIV/AIDS, e a real necessidade da utilização de preservativos.

A baixa percentagem de gestantes que havia realizado o teste de VDRL em gestações anteriores, e também a baixa percentagem de gestantes que realizaram o teste no primeiro trimestre da atual gestação permitem questionar as adoção das medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde para a erradicação da infecção. Este fato mostra a necessidade de maior esforço por parte dos profissionais de saúde para incentivarem as gestantes a realizarem o teste durante o pré-natal e também de usarem preservativos durante as relações, deixando explícito o que a sífilis pode acarretar as mesmas, a seus parceiros e, principalmente, a seus bebês. Unidades de Saúde como a relatada, promovem palestras esclarecedoras, mas estas não são totalmente aceitas, evidenciando assim, a carência de incentivo profissional.

A sífilis congênita representa uma das maiores falhas no sistema de saúde de uma população, expondo a fragilidade da atenção básica de saúde na comunidade, quando a mesma está presente habitualmente (14).

Avaliando-se o que foi exposto, tornou-se evidente a subnotificação desse importante agravo no município de Anápolis-GO, o que não diverge de outras regiões do país, ficando claro que apesar da sífilis congênita ser uma doença de notificação compulsória, essa ação continua sendo negligenciada nos serviços públicos e privados de assistência à saúde (21), já que nem mesmo os casos de sífilis gestacional foram notificados.

A subnotificação dos casos contribui para a persistência dessa infecção, constituindo um agravante, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de políticas de saúde

e de vigilância epidemiológica para o monitoramento da sífilis materna e congênita no município. Apesar da importância da sífilis congênita, a quantidade de trabalhos publicados no Brasil enfocando estratégias para sua eliminação ainda é bastante pequena (19).

Portanto, com intuito de contribuir para controle e erradicação desse agravo, a realização de um pré-natal mais oportuno, com consultas de melhor qualidade, inclusive fornecendo informações detalhadas as gestantes sobre as DST's e a importância do acompanhamento e do tratamento que se fizer necessário é de extrema importância, assim como: a descentralização dos locais de realização dos testes, em concordância com outros autores, o que permitiria um resultado mais rápido e conseqüentemente um tratamento mais precoce da infecção e a motivação e capacitação dos profissionais de saúde, no que se refere ao diagnóstico da doença, às medidas de conduta adotadas e à notificação da sífilis gestacional e congênita (8, 10).

Dessa forma, apenas assegurando um maior comprometimento de todos os participantes dos sistemas de saúde, esse agravo poderá ser controlado, almejando-se ainda, futuramente, a erradicação tão esperada da sífilis congênita, representando também uma melhoria na qualidade dos serviços de saúde oferecidos em prol do bem-estar da sociedade.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos à enfermeira Rosângela Alves e aos colaboradores da Unidade de Saúde do Progresso e da OSEGO (Unidade de Saúde Jundiá).

### REFERÊNCIAS

- BARSANTI, C. et al. Diagnóstico de sífilis congênita: comparação entre testes sorológicos na mãe e no recém-nascido. Revista da sociedade brasileira de medicina tropical. Uberaba, v. 32, n. 6, p. 1-10, nov./dez. 1999. Disponível em < www.scielo.com.br > Acesso em 03 de nov. de 2005.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Projeto de eliminação de sífilis congênita. Manual de assistência e vigilância epidemiológica. Brasília. 1998.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico AIDST, Brasília, ano IV, n.1, p.38-44, jul/dez 2006 janeiro a junho. 2007.
- BRASIL a. Ministério da Saúde. Definição de caso de sífilis congênita, 2005. Disponível em: < www.aids.gov.br > Acesso em: 03 de nov. de 2005.
- BRASIL b. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Guia de vigilância epidemiológica, Brasília. ed. 6, p. 673-683, 2005.
- BERMAN, S. M. Maternal syphilis: pathophysiology and treatment. Bulletin of the World Health Organization, Genebra. v. 82, n.6, p. 1-14, jun. 2004. Disponível em: < www.scielo.com.br > Acesso em: 22 de abr. de 2006.
- CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Treatment guidelines. Sexually transmitted diseases. Atlanta. 2006. 30p. Disponível em: < www.cdc.gov > Acesso em 15 de set. de 2006.
- DEPERTHESS, B. D. et al. Maternal and congenital syphilis programmes: case studies in Bolivia, Kenya and South Africa. Bulletin of the World Health Organization, Genebra. v. 82, n. 6, p. 410-416, jun. 2004. Disponível em: < www.scielo.com.br > Acesso em: 18 de jan. de 2006.
- DUARTE, R. G. As mais comuns DST. In: \_\_\_\_\_. Sexo, sexualidade e DST. São Paulo: Moderna, 1995. p. 81-95.
- FITZGERALD, D. W. et al. Decreased congenital syphilis incidence in Haiti's rural artibonite region following decentralized prenatal screening. American journal of public health, Washington. v. 93, n. 3, p. 444-446, mar. 2003. Disponível em: < www.pubmedcentral.gov > Acesso em 22 de fev. de 2006.
- LIMA, B.G.C. Mortalidade por sífilis nas regiões brasileiras, 1980-1995. Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial, Rio de Janeiro, v.39, n.4, p.1-10, 2002. Disponível em < www.scielo.com.br > Acesso em 05 de dez. de 2005.

12. OMS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the management of sexually transmitted infections. Geneva, 2003. 98p. Disponível em: < www.who.int/en > Acesso em: 10 de ago. de 2006.
13. OPAS, ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Eliminación de la sífilis congénita en América Latina y el Caribe. Marco de referência para su implementación. Washington: BIBLIOTECA SEDE, 2005. 66 p.
14. PASSOS, M. R. L. et al. Estudo de equivalência entre azitromicina e penicilina G benzatina no tratamento da sífilis. *Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis*, [S.l.]. v. 16, n. 1, p. 52-66, 2004.
15. PAVIA, C. S.; DRUTZ, D. J. Doenças causadas por espiroquetas. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARLOW, T. G. *Imunologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 570-576.
16. PAZ, L. C. et al. Vigilância epidemiológica da sífilis congênita no Brasil: definição de casos. *Boletim epidemiológico AIDST, Brasília*, ano 1, n.1, p. 12-17, jan./jun.2004.
17. RIVITTI, E. A. Sífilis adquirida. In: BELDA JÚNIOR, W. et al. *Doenças sexualmente transmissíveis*. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 9-21.
18. SARACENI, V.; LEAL, M. C. Avaliação da efetividade das campanhas para eliminação da sífilis congênita na redução da morbi-mortalidade perinatal: município do Rio de Janeiro, 1999-2000. *Caderno de saúde pública*, Rio de Janeiro. v.19, n.6, p.1-17, set./ out. 2003. Disponível em: < www.scielo.com.br > Acesso: em 01 de nov. de 2005.
19. SARACENI, V.; LEAL, M. C.; HARTZ, Z. M. A. Avaliação de campanhas de saúde com ênfase na sífilis congênita: uma revisão sistemática. *Revista brasileira de saúde materno infantil*, Recife. v. 5, n. 3, p. 263-273, jul./ set. 2005. Disponível em: < www.scielo.com.br > Acesso: em 12 de abr. de 2006.
20. SMS. Secretaria Municipal de Saúde do município de Anápolis-GO. *Vigilância epidemiológica de Anápolis - SINAN*, 2006.
21. VIEIRA, A. A. Contribuição ao estudo epidemiológico de sífilis congênita no município de Carapicuíba-SP: ainda uma realidade em 2002. *Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis*, [S.l.]. v. 17, n. 1, p. 10-17, 2005.
22. WOODS, C. R. Syphilis in children: congenital and acquired. *Seminars in pediatric infectious diseases*, [S.l.]. v. 16, n. 1, p. 245-257, jun. 2005.

**ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:**

Keila Correia de Alcântara  
 Rua J-60 Qd.137 LT.28. Setor Jaó  
 CEP 74674-260 Goiânia - Goiás  
 E-mail- keilalcantara yahoo com.br.

# Credibilidade e Confiança.

## PNCQ

33 anos contribuindo para o desenvolvimento dos laboratórios clínicos de todo o Brasil.

Diagnosticos precisos para os médicos

Credibilidade para seu laboratório

Confiança para a sociedade

**Participe!**

www.pncq.org.br  
 pncq@pncq.org.br  
 (21)2569-6867



**Programa  
 Nacional de  
 Controle de  
 Qualidade**

**PNCQ**

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases

Gloria Cadavid-Restrepo<sup>1,2†</sup>, Thiago S Gastardelo<sup>1†</sup>, Eric Faudry<sup>3,4,5</sup>, Hugo de Almeida<sup>1</sup>, Izabela MD Bastos<sup>6</sup>, Raquel S Negreiros<sup>1</sup>, Meire M Lima<sup>1</sup>, Teresa C Assumpção<sup>1,7</sup>, Keyla C Almeida<sup>1</sup>, Michel Ragno<sup>3,4,5</sup>, Christine Ebel<sup>5,8,9</sup>, Bergmann M Ribeiro<sup>1</sup>, Carlos R Felix<sup>1</sup> and Jaime M Santana<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Pathogens depend on peptidase activities to accomplish many physiological processes, including interaction with their hosts, highlighting parasitic peptidases as potential drug targets. In this study, a major leucyl aminopeptidolytic activity was identified in *Trypanosoma cruzi*, the aetiological agent of Chagas disease.

**Results:** The enzyme was isolated from epimastigote forms of the parasite by a two-step chromatographic procedure and associated with a single 330-kDa homohexameric protein as determined by sedimentation velocity and light scattering experiments. Peptide mass fingerprinting identified the enzyme as the predicted *T. cruzi* aminopeptidase EAN97960. Molecular and enzymatic analysis indicated that this leucyl aminopeptidase of *T. cruzi* (LAPTc) belongs to the peptidase family M17 or leucyl aminopeptidase family. LAPTc has a strong dependence on neutral pH, is mesophilic and retains its oligomeric form up to 80°C. Conversely, its recombinant form is thermophilic and requires alkaline pH.

**Conclusions:** LAPTc is a 330-kDa homohexameric metalloaminopeptidase expressed by all *T. cruzi* forms and mediates the major parasite leucyl aminopeptidolytic activity. Since biosynthetic pathways for essential amino acids, including leucine, are lacking in *T. cruzi*, LAPTc could have a function in nutritional supply.

## Background

The kinetoplastid protozoan *Trypanosoma cruzi* is the aetiological agent of Chagas disease, a debilitating chronic infection that is highly prevalent in Latin America and a worldwide concern because of human migration. Its complex life cycle includes four main distinctive developmental stages. In the insect vector, blood trypomastigotes transform into dividing epimastigotes that, after growth, undergo differentiation into the infective metacyclic trypomastigotes. In the cytoplasm of mammalian cells, metacyclic trypomastigotes transform into amastigotes that multiply and differentiate into trypomastigotes, which can reach the blood stream upon host cell disruption [1]. There is no vaccine for prevention of

Chagas disease and the drugs currently employed in treatment strategies are toxic and ineffective in inhibiting disease progression to the chronic phase, resulting in thousands of deaths each year. In this context, the molecular and functional characterization of *T. cruzi* targets is necessary for the development of new chemotherapeutics for Chagas disease [2,3].

Peptidase activities are implicated in many aspects of the physiology of organisms, as well as in pathogen-host cell interface and pathogenesis, and are thus considered good drug targets [4,5]. *T. cruzi* growth, differentiation, dissemination through host tissues and infection of mammalian cells are highly dependent on proteolytic activities. The genome of *T. cruzi* contains many genes homologous to those encoding proteases which are considered virulence factors in other pathogens. However, only a few of these enzymes have been functionally characterized to date. Among them, cathepsin L, which is known as cruzipain, is associated with both *T. cruzi*

\* Correspondence: jsantana@unb.br

† Contributed equally

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, The University of Brasília, Brasília, 70910-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

development and infection [6,7]. Oligopeptidase B and POP Tc80, which are members of the prolyl oligopeptidase family of serine proteases, play important roles during parasite entry into mammalian cells [8-10]. *T. cruzi* differentiation depends on proteasome activity, while antibodies against surface metalloproteases partially block infection by trypomastigotes [11,12]. Additionally, the cysteine protease cathepsin B, a serine carboxypeptidase, and, more recently, two cytosolic metalloproteases, a serine oligopeptidase and two aspartyl proteases have been biochemically characterized [13-17]. In contrast, the study of aminopeptidases has been limited to the detection of such activity in cell extracts of *T. cruzi* epimastigotes [18].

Leucyl aminopeptidases (EC 3.4.11.1; LAPs) are metalloaminopeptidases that catalyse the removal of N-terminal amino acid residues, preferentially leucine, from proteins and peptides. LAPs comprise a diverse set of enzymes with different biochemical and biophysical properties, are found in animals, plants and microorganisms, and play important roles in physiological processes, such as the catabolism of endogenous and exogenous proteins, peptide and protein turnover and processing, modulation of gene expression, antigen processing and defence [19]. LAPs in the peptidase family M17 show two unrelated domains, with the active site in the C-terminal domain. Their activities require two metal ions, are found to be maximal at neutral/basic pH, and are sensitive to bestatin and amastatin [20]. Because of their essential functions in the life cycle of microorganisms such as *Plasmodium*, *Fusobacterium nucleatum*, and the African trypanosome, LAPs are emerging as novel and promising pathogen targets for drug design [21-23]. Furthermore, LAPs are considered potential vaccine candidates, as evidenced by specific immune protection of sheep and cattle against fascioliasis [24].

The aim of this study was to examine leucyl aminopeptidase activity present in the developmental forms of *T. cruzi*. We report the identification, purification and characterization of the major leucyl aminopeptidolytic activity mediated by a hexameric 330-kDa leucyl aminopeptidase of *T. cruzi* (LAPTc), whose assembly does not depend on interchain disulfide bonds. Its molecular and enzymatic properties lead us to classify LAPTc as an archetypal member of the peptidase family M17. Different from its recombinant form that is alkaline and thermophilic, LAPTc purified from epimastigotes is neutral, mesophilic, and retains its oligomeric structure after losing activity at 80°C. Our data suggest that the enzyme localizes within vesicles in the cytoplasm of epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes of *T. cruzi*. We postulate that LAPTc might be a potential target for the development of new drugs to treat *T. cruzi* infections.

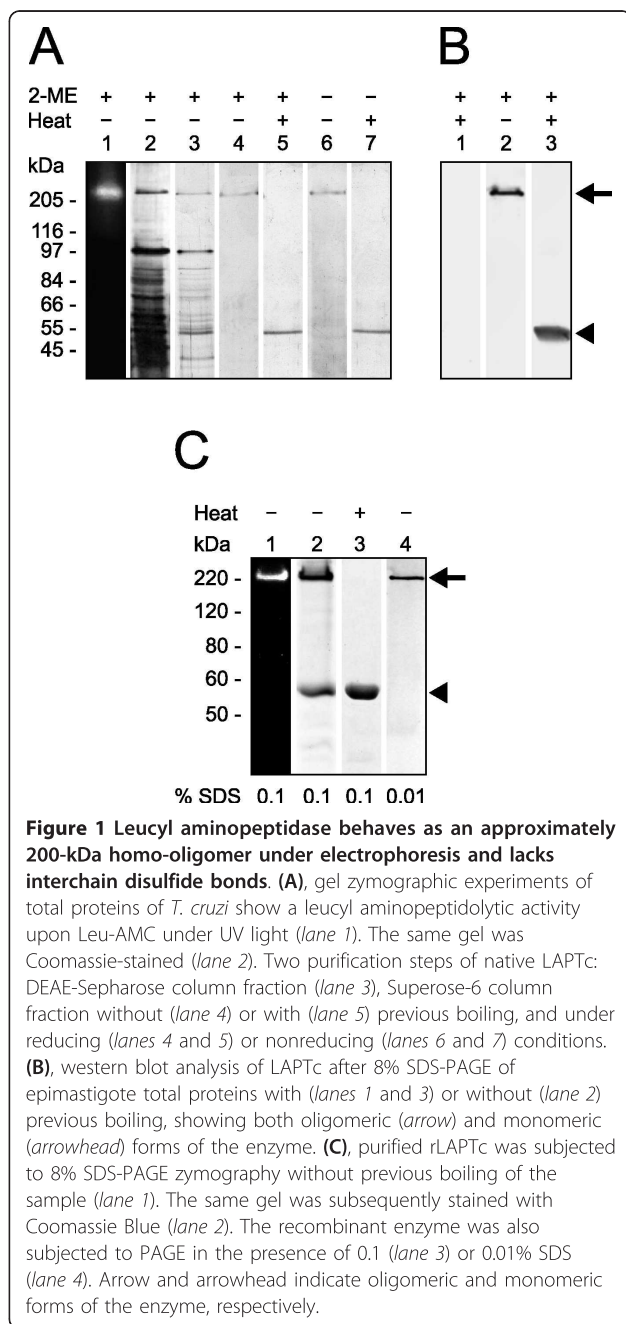
## Results

### *T. cruzi* enzyme extract mediates hydrolysis of the aminopeptidase substrate Leu-AMC

The sequencing of *T. cruzi* genome revealed genes coding for putative peptidases that mediate aminopeptidolytic activities <http://www.tcruzidb.org/tcruzidb/home-orig.jsp>. To identify such activities in *T. cruzi*, we prepared enzyme extract from epimastigote forms of the parasite and incubated it with Leu-AMC, *N*-CBZ-Leu-AMC, Pro-AMC or Asp-AMC. Under these experimental conditions, only Leu-AMC was hydrolyzed by the enzyme extract from epimastigotes, with a calculated specific enzymatic activity of  $45.86 \pm 3.75$  mU/mg of protein. The values of specific enzymatic activity obtained with enzyme extracts prepared from trypomastigotes and amastigotes were  $30.56 \pm 3.00$  and  $56.46 \pm 4.62$  mU/mg of protein, respectively. These results may suggest that this enzymatic activity is differentially regulated in the parasitic forms. Since the enzyme extract failed to hydrolyze *N*-CBZ-Leu-AMC (the blocked version of Leu-AMC), the hydrolysis of Leu-AMC may be mediated by a leucyl aminopeptidase. The molecular mass of the enzyme displaying such activity was estimated by gel enzymography. For this assay, the proteins present in the enzyme extract were separated by SDS-PAGE, followed by gel washing for enzymatic activity recovery and incubation in reaction buffer containing Leu-AMC. A single fluorescent band just above 200 kDa molecular mass was revealed which corresponded to free AMC released upon hydrolysis of the substrate (Figure 1A, lane 1). The enzymatic activity on Leu-AMC was observed to co-localize with a protein band upon staining of the same gel (Figure 1A, lane 2).

### Leucyl aminopeptidase is assembled into a homooligomer

The enzyme mediating hydrolysis of Leu-AMC was purified to homogeneity from freshly prepared enzyme extract by a combination of ion exchange and size exclusion chromatography with final yield and purification factor of 65 and 42%, respectively. The leucyl aminopeptidase activity was eluted from a DEAE-Sepharose column from 0.54 to 0.63 M NaCl as a single peak of activity. The active fractions were further purified on a Superose-6 HR column; again a single 300-kDa peak of enzymatic activity was observed (results not shown), which indicates that, under the conditions of this experiment, only one peptidase in the enzyme extract prepared from *T. cruzi* epimastigotes displays hydrolysis of Leu-AMC. The lack of hydrolysis of fluorogenic protease substrates such as Pro-AMC, Asp-AMC, *N*-CBZ-Leu-AMC, Gly-Phe-AMC, Gly-Arg-AMC, and Gly-Pro-AMC, as well as the protein substrates bovine serum albumin, immunoglobulin G and gelatin (not shown)



suggests that the purified aminopeptidase displays narrow-spectrum activity.

The electrophoretic profiles of enzymatic active fractions on Leu-AMC obtained at each purification step are shown in Figure 1A (*lanes 3 and 4*). A single Coomassie-stained band of approximately 200 kDa is seen after 8% SDS-PAGE under reducing conditions without previous boiling of the sample, which indicates that the aminopeptidase was obtained with high purity. However, when the purified enzyme was heated to 100°C for 5 min prior to electrophoretic analysis under reducing conditions, only

a single 55-kDa protein band was revealed upon staining of the gel (*lane 5*). These data indicate that this active leucyl aminopeptidase is assembled into a homo-oligomer formed by monomers of about 55 kDa. We could not assess whether the monomer mediates enzymatic activity because it was only obtained upon boiling the oligomeric aminopeptidase.

To investigate the involvement of inter-monomer disulfide bonds in the stabilization of the aminopeptidase's oligomeric state, purified protein, previously boiled or not, was subjected to SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions (Figure 1A, *lanes 4 and 5 versus lanes 6 and 7*, respectively). The presence of a reducing agent did not change the electrophoretic migration pattern of the purified aminopeptidase (*lanes 1-5*). In contrast, high temperature induced monomerization of the protein oligomeric form; the active oligomer was only seen in the gels where the samples had not been previously heated to 100°C (*lanes 1-4 and 6*), while its 55-kDa monomer was revealed upon sample boiling (*lanes 5 and 7*). Since monomerization of the endogenous aminopeptidase occurs regardless of the presence of reducing conditions, we conclude that inter-monomer disulfide bonds do not take part in the assembly of the active oligomer.

#### Mass spectrometry identification of the purified aminopeptidase

The molecular identity of the aminopeptidase with specificity for Leu-AMC was assessed by peptide mass fingerprinting. For this experiment, the purified native enzyme was digested with trypsin and the resulting peptides were subjected to MALDI-TOF analysis. Mass values of the detected peptides were compared to those theoretically deduced from sequences deposited in the database. Ten peptides showed mass matches to peptides obtained from theoretical digestion of the predicted leucyl aminopeptidase of *T. cruzi* EAN97960 (Table 1), which is encoded by gene ID Tc00.1047053508799.240 <http://www.tcruidb.org/tcruidb/home-ori.jsp>. This leucyl aminopeptidase gene (*laptc*) encodes for a 520-amino acid protein with a calculated molecular mass of 55,891 Da, and whose sequence does not comprise a predicted peptide signal. These observations correlate well with our experimental data showing that the purified enzyme displays leucyl aminopeptidase activity.

According to sequence homology, this leucyl aminopeptidase of *T. cruzi* (LAPTc) belongs to the metallo-peptidase M17 family, also known as the leucyl aminopeptidase family [25]. It shares 34 to 66% identity to other members of the M17 family, including assigned and unassigned leucyl aminopeptidases of kinetoplastid parasites. Multiple amino acid sequence alignments (Figure 2A) also revealed that the C-terminal portion is



**Table 1 Identification of *T. cruzi* protease by peptide mass fingerprinting**

Tryptic peptide masses (Da)		Identified amino acid sequences
Experimental data <sup>a</sup> (in-gel digestion)	<i>T. cruzi</i> aminopeptidase (in silico digestion)	
2,193.39	2,192.38	<sup>36</sup> K.THTAGLASTFWILGTHAQLR.E <sup>56</sup>
2,749.63	2,748.62	<sup>36</sup> K.THTAGLASTFWILGTHAQLR↓.EDALKE <sup>51</sup>
1,764.03	1,763.02	<sup>62</sup> K.ELPFYCPAVAEAIQR.V <sup>76</sup>
3,011.58	3,010.57	<sup>182</sup> RLTVWFTPAPNPSPSELVWATSTQLCQR.L <sup>209</sup>
2,437.36	2,436.35	<sup>210</sup> RLVDAPTNLLNTATFAEVAQSYAKE <sup>232</sup>
1,742.99	1,741.98	<sup>310</sup> R.DMGGAAAVFCGFLTAVR.L <sup>326</sup>
1,977.11	1,976.10	<sup>412</sup> R.HAGIFVNDEEEELSFLKA <sup>428</sup>
2,590.34	2,589.34	<sup>432</sup> R.VSGETCFVLYCPEYHVFERS <sup>452</sup>
1,538.92	1,537.92	<sup>504</sup> K.ATGFGPALLMEYLR.N <sup>517</sup>
1,554.90	1,553.89	<sup>504</sup> K.ATGFGPALLMEYLR.N <sup>517</sup>

<sup>a</sup> Masses are MH<sup>+</sup> monoisotopic, with accuracy up to 0.2 Da. The enzyme was digested with trypsin, and masses of resulting peptides were determined by MALDI-TOF mass spectrometry and compared to theoretical ones produced by *in silico* digestion of proteins found in the database (NCBI nr). An oxidation of methionine is indicated as M. A missed cleavage is indicated as ↓.

the most conserved region in this family, reaching 72% identity and 83% similarity between *T. cruzi* and *T. brucei*. The sequence of LAP<sup>Tc</sup> comprises the highly conserved active site (Lys<sup>299</sup> and Arg<sup>373</sup>), metal binding residues (Lys<sup>287</sup>, Asp<sup>292</sup>, Asp<sup>310</sup>, Asp<sup>369</sup> and Glu<sup>371</sup>) and the signature NTDAEGRL sequence of the M17 family [26]. The phylogenetic tree shows divergent groups of proteins that cluster by phylum or class (Figure 2B). It is interesting to note that bacteria, mammalia, viridiplantae and apicomplexa have an indication of a common ancestor with a strong bootstrap support. Kinetoplastid sequences are divided in two defined clades, again with very strong bootstrap support. One group of kinetoplastids comprises sequences annotated as aminopeptidases and the other group contains sequences assigned as leucyl aminopeptidases. Although these two clades are members of the M17 family, their sequence divergence indicates that the ancestral trypanosomatid giving origin to both *Leishmania* and *Trypanosoma* already contained these two enzymes.

#### LAP<sup>Tc</sup> assembles into a hexamer

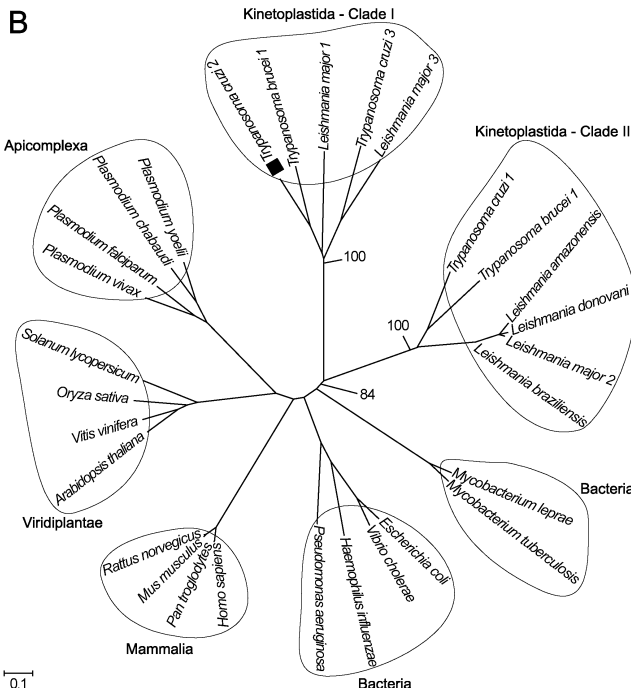
The recombinant active and soluble form of LAP<sup>Tc</sup> was produced in *E. coli* containing a His-tag at its N-terminus. It was purified by affinity chromatography on a nickel column upon elution with 200 mM imidazol and then submitted to size exclusion chromatography. The activity co-migrates with the main protein peak of 320 kDa (not shown) that was submitted to SDS-PAGE analysis. In-gel enzymography of the gel showed that only a 220-kDa protein band mediates enzymatic activity on Leu-AMC when PAGE was carried out without previous heating of the sample and in the presence of 0.1% SDS (Figure 1C, lane 1). Protein bands of about 220 and 55 kDa were revealed upon staining of the same gel (Figure 1C, lane 2). Under the same experimental conditions,

sample boiling resulted in complete monomerization of rLAP<sup>Tc</sup> (Figure 1C, lane 3). Unlike its endogenous form that conserves an oligomeric structure in the presence of 0.1% SDS (Figure 1A), rLAP<sup>Tc</sup> is very sensitive to this detergent and is only entirely seen as an oligomer in the presence of SDS as low as 0.01% (Figure 1C, lane 4). These data show that, regardless of their sensitivity to SDS, both endogenous and recombinant forms of LAP<sup>Tc</sup> behave the same when submitted to PAGE and size exclusion chromatography.

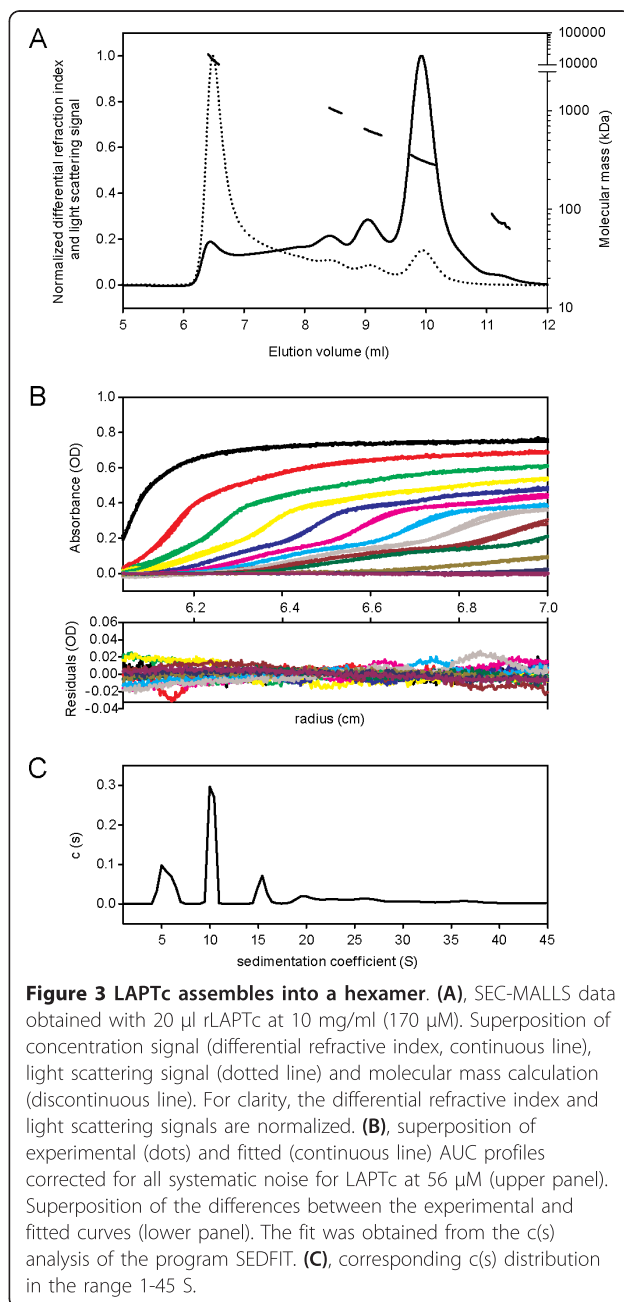
To solve the divergence in its molecular mass determination, we further submitted affinity chromatography purified rLAP<sup>Tc</sup> to SEC-MALLS and to analytical ultracentrifugation analysis. MALLS measurements allow the molecular mass of macromolecules in solution to be calculated, taking into account the absolute concentrations obtained with a differential refractive index detector. The elution profile showed the presence of five resolved peaks corresponding to different oligomeric species eluting at 6.5, 8.5, 9, 10 and 11.2 ml (Figure 3A, continuous line). The main protein peak was eluted at 10 ml and represents 45% of the mass recovery. As expected, light scattering measurements (Figure 3A, dotted line) exhibited higher signal for the larger species eluting first, given that light scattering is directly related to the concentration and molecular mass of the observed objects. Molecular mass calculations (Figure 3A, discontinuous line) revealed that the first protein peak (6.5 ml) corresponds to highly aggregated species with molecular masses above 10,000 kDa. The peaks eluting at 8.5, 9, 10 and 11.2 ml correspond to oligomers of 1025, 625, 314 and 176 kDa, respectively. In conclusion, SEC-MALLS experiments showed that rLAP<sup>Tc</sup> is predominantly assembled into a 314-kDa oligomer, but other minor species, not detectable during the purification procedure of the endogenous enzyme, also co-exist (Table 2).

**A**

<i>T. cruzi</i> 1	WITKELAPIC-VKVRHVLREKIRGAGDNLIVVKGSRHKKVLLVVEEYTC-NRHSDE-ATALVKGKVFDFCGGLSLKPA	292
<i>T. brucei</i> 1	ITQGYAKAIG--FDVIV CDDLDCRFRYGGIVSVGKAAFEAPRIVLITLWTP--KGTVPKVVSLVKGKIVDFCGGLAUKPA	303
<i>L. major</i> 1	ITAAAYAAEIG--VDMIVIKGDDLEKRYGGIVSVGKCAQYPAHIVLIRNRNEAAEGAKNIVVKGKIVDFCGGLAUKPA	312
<i>T. cruzi</i> 2	VQSYAKPIIG--CAVDVICGDELREKRYGGIVSVGKCAEAAPRIVLITLWTP--KDETRKKVALVKGKIVDFSGGLSLKPT	301
<i>T. brucei</i> 2	WIHQELAPIC-IKVQNVLHCEOLEKAFNLIVVKGSKHDPVLLVVEEYTC-DKRSNK-ATALVKGKVFDFCGGLNKKPF	326
<i>L. major</i> 2	WKKYMIPEG-IKVRKVLRCOLEKAFCHLLIVVGRGSRYPPLVLLVLEYTC-NPRSSA-TTALVKGKVFDFCGGLNKKPY	339
<i>L. braziliensis</i>	WKKYMIPEG-IKVRKVLRCOLEKAFCHLLIVVGRGSRYPPLVLLVLEYTC-NPRSSA-TTALVKGKVFDFCGGLNKKPY	229
<i>E. coli</i>	QARQLDSDYSKRVITRVEGECOMRELEMHSLAVGCGSONESLMSVHEEYTC-NASEDARPIVLVKGLTFDFSGGLSIKPS	284
<i>A. thaliana</i>	PELNLASMYSDVMTANIINEECCRELKMGSYLVAASANEFFHFIHITKYP-SSGPVKTKLALVKGKTFDFSGGYNIKTG	365
<i>H. sapiens</i>	IIEKNLKSASSKTEVHIRPKSWIPEQAMCSFLSVARGSDPELVFLEIHYK-SPNANEPPLVFGKGLTFDFSGGLSIKAS	296
<i>T. cruzi</i> 1	GS--MEGVHDMGGAATVMSTIKATAALQLP-----VNVVAVGLAENITGDSYFSSITTSRRKLTVEVNRNTDAE	362
<i>T. brucei</i> 1	DY--MKLMRHMGGAAVFCGFLTAVR-----LQQFVQLSCTLCLAENAIGKSYRNDIIVMKSGLTVEVINTDAE	373
<i>L. major</i> 1	AH--MTNKTDMGGSQVFCFAFINVVRSMKQRTFHSILNIVSVTLCLAENAIGKSYRNDIIVMKSGLTVEVINTDAE	390
<i>T. cruzi</i> 2	NF--MTGMRDMGGAAVFCGFLTAVR-----LQMFTELSCSTLCLAENAIGKSYRNDIITLKSGLTVEVINTDAE	371
<i>T. brucei</i> 2	GS--METMMDMGAATVMATKALALQLP-----VNVVAVGLAENITGDSYFSSITTSRRKLTVEVINTDAE	396
<i>L. major</i> 2	TS--METMMDMGAATVMATKALALQLP-----VNVVAVGLAENITGDSYFSSITTSRRKLTVEVINTDAE	409
<i>L. braziliensis</i>	TS--METMMDMGAATVMATKALALQLP-----VNVVAVGLAENITGDSYFSSITTSRRKLTVEVINTDAE	299
<i>E. coli</i>	EG--MDEMRDMGGAATVMGMRMVALQLP-----INVVAVGLAENITGDSYFSSITTSRRKLTVEVINTDAE	354
<i>A. thaliana</i>	PGCLTELKRFDMGGAAVLLGAAKALGQIKPPG-----VEVHFIVAACENYISGTGRPQDVLITASNGKLTVEVINTDAE	438
<i>H. sapiens</i>	AN--MDLMDMGGAAITCSATVSAKLNLP-----INILGLAPICENMPSGKANKPQDVLVRAKNKLTVEVINTDAE	366
<i>T. cruzi</i> 1	GRLLADLTFVORDAKLARKLKTVIDIATLTGAILIGLGSRRAGLFSNOLHISQHLMASGRSSGDEIWPMPICDEH-KN	441
<i>T. brucei</i> 1	GRVLGEGVVFHATNEL--SFTPDVIDMATLTGAOGIATGRHAGLVVNEEGAAAMLRGREGSGETCFVLYCPEYHEP	451
<i>L. major</i> 1	GRVLGEGVVFATGEQ--DFVPDVIDMATLTGAOGIATGRHAGLVVNEEGAAAMLRGREGSGETCFVLYCPEYHEE	468
<i>T. cruzi</i> 2	GRVLGEGVVFHATHEI--SKPDPVIDMATLTGAOGIATGRHAGLVVNEEGAAAMLRGREGSGETCFVLYCPEYHVT	449
<i>T. brucei</i> 2	GRVLADLITVLOKAKLVKKAIDTIDTATLTGAILVGLGSRAGLFENDIATVQQLMASGRSSGEEVWMPICDEH-OR	475
<i>L. major</i> 2	GRVLADLITVLOKAPLKKKPTRIDTATLTGAILVGLGSRAGLFSPSMLANSLSMAAGTCGEBIWPMPICDEH-KD	488
<i>L. braziliensis</i>	GRVLADLITVLOKAPLKKKPTRIDTATLTGAILVGLGSRAGLFSPSMLANSLSMAAGTCGEBIWPMPICDEH-KD	378
<i>E. coli</i>	GRVLGEGVVFVERFE----PEAVIDVATLTGACVIALGHHITGLMHNHPLAHEIQAASEQCDRAWRPLGDEY-QE	428
<i>A. thaliana</i>	GRLLADLITVYACNQG----VDKVDIATLTGACIHALGTSMAELYTPSDKLAKEVLAASERSGCKRWRMPLEHYSY-WE	512
<i>H. sapiens</i>	GRLLADLITVYAHFTFN----EKVILNATLTGAMDVALGSGATVEFNSSWIWNKFPASIERGDRWRMPLEHYSY-PRO	441



**Figure 2 Sequence comparison and phylogenetic relationship of LAPTc to other members of the M17 family of metallopeptidases. (A),** Multiple C-portion amino acid sequence alignments of different LAPs. Amino acid sequences from the conserved C-terminal region of LAPs were aligned by the ClustalX program. Amino acids marked in black show 50% identity and those in gray show 50% similarity. Putative metal binding sites (\*), catalytic site (#), and M17 signature (underlined) are indicated. Sequences were obtained from the protein database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the following accession numbers: EAN87580.1 (*T. cruzi* 1) and EAN97960.1 (*T. cruzi* 2), EAN79621.1 (*T. brucei* 1) and AAX70152.1 (*T. brucei* 2), CAJ02694.1 (*L. major* 1) and AAL16097.1 (*L. major* 2), CAM36610.1 (*L. braziliensis*), YP\_672349.1 (*E. coli*), NP\_194821.1 (*A. thaliana*), AAD17527.1 (*H. sapiens*). **(B),** Phylogenetic relationship of LAPTc to other LAPs of different organisms. 29 full-length sequences, derived from the nonredundant (NR) protein database of the NCBI (listed in Experimental Procedures), were aligned by the ClustalX program, and the phylogram was generated with the Mega package after 10,000 bootstraps with the neighbor joining (NJ) algorithm. The bar scale at the bottom represents 10% amino acid substitution per site. LAPTc is indicated by a closed square.

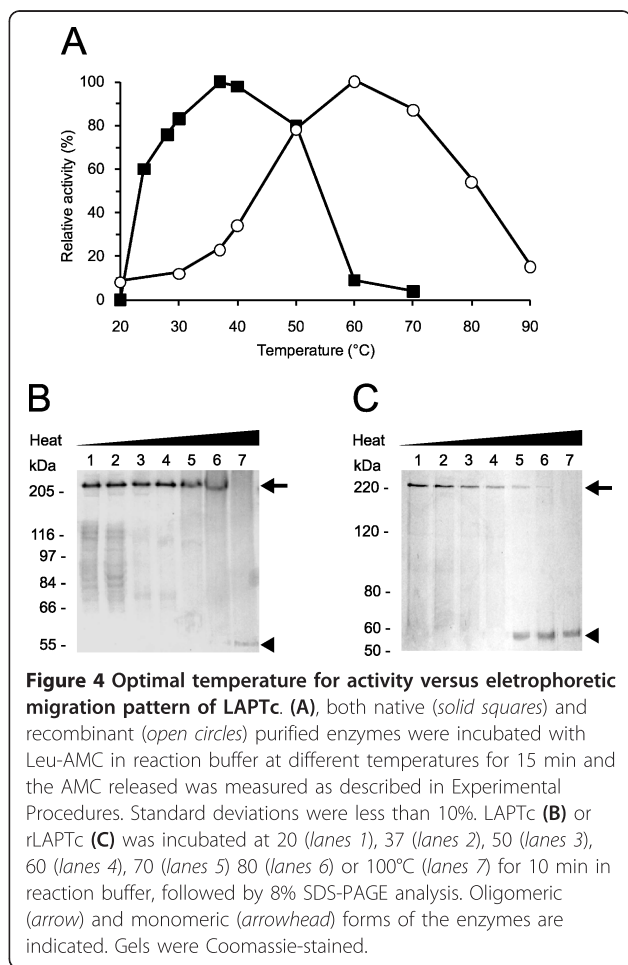


The hexameric form of LAPTc was confirmed by analytical ultracentrifugation (AUC), a versatile and powerful tool for the identification of oligomeric states and the determination of protein molecular masses [27]. Figure 3B shows the experimental and fitted sedimentation velocity profiles obtained at 56  $\mu$ M by monitoring the absorbance at 295 nm. The derived sedimentation coefficient distribution (Figure 3C) exhibits four main species sedimenting at 5.1, 10.2, 15.3 and 19.5 S ( $s_{20,w} = 7.0, 13.9, 20.9$  and 26.6 S, respectively). The  $s$ -value depends on the molar mass,  $M$ , and Stokes radius,  $R_S$ , of the particle, according to the Svedberg equation:  $s = M(1 - \rho\bar{v}) / (N_A 6\pi\eta R_S)$ . To calculate the corresponding molecular masses, calibrated size exclusion chromatography (SEC) was performed with the same samples, giving Stokes radii for the two main species eluting at 9 and 10 ml of 6.8 and 5.7 nm, respectively. The combination of the  $s$ -values of 15.3 and 10.2 S with  $R_S = 6.8$  and 5.7 nm (SEC-AUC method) gives the estimates for the species of  $M = 593$  and 330 kDa, respectively (Table 2), confirming the results obtained by SEC-MALLS. Considering the monomer molecular mass deduced from the sequence, 58.7 kDa, the calculated number of subunits present in the main species eluting at 10 ml is 5.6, suggesting a pentamer or, more likely, a hexamer. Taking into account 5 or 6 as the number of subunits, the inferred  $R_S$  values from the Svedberg equation are 5.1 and 6.1 nm, which correspond to frictional ratios of 1.16 and 1.31, respectively. These are within the values expected for globular proteins. However, the frictional ratio obtained for the pentamer hypothesis is somewhat low for a 330-kDa protein. Thus, these data indicate that the main rLAPTc species is a hexamer. The sedimentation distributions of rLAPTc at 170, 56 and 10  $\mu$ M present the same main features. However, the ratio of hexamer to trimer decreases when the concentration of the enzyme goes from 56 to 10  $\mu$ M. In addition, at concentrations as high as 170  $\mu$ M the amount of large aggregates increases significantly. Our data thus show a complex equilibrium among different multimers depending on enzyme concentration.

**Table 2** Summary of MALLS and AUC experiments

SEC-MALLS			Calibrated SEC-AUC			N° of subunits
Elution volume (ml)	Recovery mass fraction (%)	Molecular mass (kDa)	Stoke radius (nm)	Sedimentation coefficient (S)	Molecular mass (kDa)	
8.5	11	1025	ND	19.5	ND	17.5 <sup>a</sup>
9	13	625	6.8	15.3	593	10.1 <sup>b</sup>
10	45	314	5.7	10.2	330	5.6 <sup>b</sup>
11.2	4	176	ND	5.1	ND	3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> From SEC-MALLS; <sup>b</sup> From SEC-AUC



**Figure 4 Optimal temperature for activity versus electrophoretic migration pattern of LAPTc.** (A), both native (solid squares) and recombinant (open circles) purified enzymes were incubated with Leu-AMC in reaction buffer at different temperatures for 15 min and the AMC released was measured as described in Experimental Procedures. Standard deviations were less than 10%. LAPTc (B) or rLAPTc (C) was incubated at 20 (lanes 1), 37 (lanes 2), 50 (lanes 3), 60 (lanes 4), 70 (lanes 5) 80 (lanes 6) or 100°C (lanes 7) for 10 min in reaction buffer, followed by 8% SDS-PAGE analysis. Oligomeric (arrow) and monomeric (arrowhead) forms of the enzymes are indicated. Gels were Coomassie-stained.

### Recombinant and native forms of LAPTc display distinct activity features

The influence of pH on the activity of purified LAPTc and rLAPTc was determined. Maximal specific activity for the native enzyme was measured at pH 7.0 (data not shown). At pHs 6.0 and 8.0 the recorded specific activities were 45% of that measured at pH 7.0, whereas at

pHs 5.0 and 9.0 the enzyme was shown to be inactive. Conversely, for rLAPTc the optimal pH is 8.0; at pH 7.5 and 9.0 the enzyme loses 60 and 75%, respectively, of its activity recorded at pH 8.0. These data demonstrate that LAPTc has a strong dependence on neutral pH, whereas its recombinant form displays maximal activity at pH 8.0. The optimum temperature for LAPTc activity on Leu-AMC was shown to be 37°C. Nevertheless, the enzyme retained 85% of its activity over a broad temperature range 30-50°C), suggesting stability and absence of regulation depending on the *T. cruzi* host (Figure 4A). In contrast, rLAPTc exhibits a distinct activity profile at different temperatures; specific activity measured at 37°C corresponded to only 25% of the recorded maximal activity observed at 60°C (Figure 4A). These data indicate that the native enzyme is mesophilic, whereas its recombinant form produced in *E. coli* is thermophilic. To study the thermostability of LAPTc, hydrolysis of Leu-AMC by native and recombinant forms of the enzyme was assayed at 37 or 60°C, respectively, after preincubation at different temperatures for either 15 or 240 min (Table 3). Under these experimental conditions, the enzymatic activity of LAPTc was not significantly modified after preincubation at 37°C for 240 min. However, preincubation at higher temperatures resulted in significant loss of enzymatic activity. rLAPTc was shown to be more stable than its native form, which correlates well with its higher optimal temperature of activity.

The Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) and maximal velocity ( $V_{max}$ ) of LAPTc were determined according to the hyperbolic regression method. The endogenous enzyme has a  $K_m$  value of  $12.0 \pm 0.8 \mu\text{M}$  Leu-AMC and its calculated catalytic constant ( $k_{cat}$ ) and catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ) are  $12.47 \pm 1.2 \text{ S}^{-1}$  and  $1.04 \pm 0.09 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ , respectively.  $K_m$ ,  $k_{cat}$  and  $k_{cat}/K_m$  values for rLAPTc are  $185.9 \pm 17.0 \mu\text{M}$ ,  $34.84 \pm 2.9 \text{ S}^{-1}$  and  $0.19 \pm 0.01 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ , in that order. These results show that native and recombinant LAPTc exhibit different kinetic parameters.

**Table 3 LAPTc and rLAPTc thermostability**

Preincubation temperature (°C)	Enzymatic activity (% of control) <sup>a</sup>			
	Preincubation for 15 min		Preincubation for 240 min	
	LAPTc	rLAPTc	LAPTc	rLAPTc
28	92	97	74	94
37	86	98	70	92
40	80	99	51	87
50	52	92	6	43
60	35	87	0	5
70	0	6	0	3
80	0	5	0	3

Purified LAPTc and rLAPTc were preincubated for 15 or 240 min at different temperatures, and then their activities on Leu-AMC were measured at 37 or 60°C, respectively. <sup>a</sup> Control consisted of enzyme activity test without prior incubation. Standard deviation was less than 11%.

### LAPTc retains its oligomeric structure after losing activity

We asked whether the temperature-dependent enzymatic inactivation of LAPTc was due to monomerization of the oligomer. This question was addressed by incubating LAPTc for 15 min at different temperatures, followed by SDS-PAGE analysis. Although its enzymatic activity was almost completely lost at 60°C, the peptidase fully retained its oligomeric form upon preincubation up to 80°C (Figure 4B). Complete disassembly of the oligomer was achieved after boiling the sample, since LAPTc migrated as a single 55-kDa band in the gel. These data indicate that LAPTc keeps its oligomeric form after temperature-induced inactivation. On the other hand, rLAPTc monomerization as a function of temperature correlates well with its loss of activity (Figure 4C).

### LAPTc is a metalloaminopeptidase

The enzymatic activity of LAPTc on Leu-AMC was completely inhibited by 100 μM bestatin, while 250 μM 1,10-phenanthroline and 10 mM EDTA inactivated 83 and 45% of the peptidase activity, respectively (Table 4). LAPTc hydrolytic activity was not sensitive to PMSF, TLCK, E-64, leupeptin or pepstatin A. The activity of the enzyme previously inactivated by EDTA or 1,10-phenanthroline was potentiated by 0.4 mM Mn<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup> and restored to 80% of the control by Zn<sup>2+</sup> but not by Fe<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>. In contrast, assay in the presence of Al<sup>3+</sup> or Co<sup>2+</sup> resulted in considerable inactivation of the enzyme (Table 4). Since LAPTc was specifically inhibited by metal chelating agents such as 1,10-phenanthroline, we consider it a member of the metalloprotease family.

### LAPTc is expressed as an oligomer

To assay the expression of LAPTc by *T. cruzi*, total proteins of epimastigote cells were resolved in SDS-PAGE with or without previous heating to 100°C, transferred to a nitrocellulose membrane and probed with specific

polyclonal antibodies raised against the purified enzyme (anti-LAPTc). Under the conditions of this experiment, anti-LAPTc reacted only with the oligomeric form of the enzyme where the proteins had not been boiled, and recognized its monomer upon heating epimastigote proteins. These results show that LAPTc is expressed as an oligomer by *T. cruzi* (Figure 1B). Anti-LAPTc antibodies were employed to determine where the enzyme localizes in the parasite through an immunofluorescence assay (Figure 5). Pre-immune serum was used in control experiments. The spot-like labeling pattern observed inside parasite cells suggest that LAPTc is located within vesicles in the cytoplasm of epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi*. However, accurate localization of the enzyme in *T. cruzi* forms requires additional experiments.

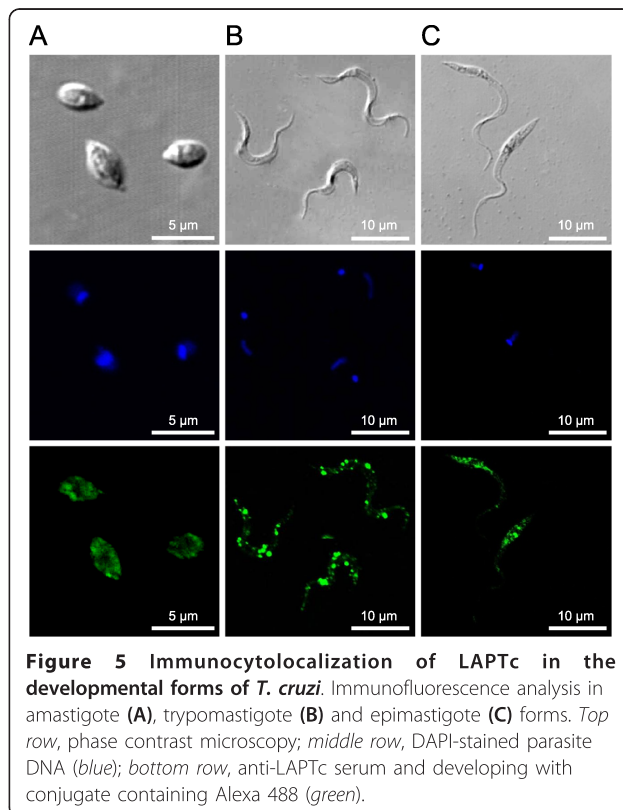
### Discussion

*T. cruzi* whole genome sequencing has revealed 28 genes encoding putative aminopeptidases, amongst which there are three methionine, two aspartic, two puramycin-sensitive and three leucyl aminopeptidases of the M17 family. In the present work, we report the identification, purification and biochemical characterization of a major leucyl aminopeptidase activity of *T. cruzi*. The enzyme displaying this activity is the product of the Tc00.1047053508799.240 gene and was named LAPTc to designate its activity. Under the conditions examined, a single activity on Leu-AMC was observed either during the purification procedure or upon enzymography assay. These results suggest that LAPTc mediates a major leucyl aminopeptidase activity in *T. cruzi* epimastigotes. However, the absence of other such activities could be due to insolubility, low expression levels or instability of the products. For example, in contrast to other *T. cruzi* proteases such as oligopeptidase B and cathepsin B, the activity of POPTc80 cannot be detected by enzymographic assay due to irreversible denaturation [13,28,29]. The absence of detectable hydrolysis of BSA,

**Table 4 Inhibition pattern and cation dependence of LAPTc**

Inhibitor	Enzymatic activity (% of control) <sup>a</sup>							
	No cation	Mn <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	Co <sup>2+</sup>
10 mM EDTA	55	149	117	80	50	44	11	5
250 μM 1,10-phenanthroline	17	135	115	78	18	20	5	4
100 μM bestatin	3	ND <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2 mM PMSF	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10 μM E-64	98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10 μM TLCK	97	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1 mM leupeptin	99	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
200 μM pepstatin A	102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> LAPTc was incubated with inhibitor before enzymatic assay at 37°C with Leu-AMC. Peptidase incubated with EDTA or 1,10-phenanthroline was dialyzed against reaction buffer prior to incubation with 20 μM Leu-AMC and 0.4 mM MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, or CoCl<sub>2</sub>. Results represent means from three independent experiments carried out in triplicate. Standard deviations were less than 10%. <sup>b</sup> ND, not determined.



**Figure 5 Immunocytolocalization of LAPTc in the developmental forms of *T. cruzi*.** Immunofluorescence analysis in amastigote (A), trypomastigote (B) and epimastigote (C) forms. Top row, phase contrast microscopy; middle row, DAPI-stained parasite DNA (blue); bottom row, anti-LAPTc serum and developing with conjugate containing Alexa 488 (green).

gelatin, Pro-AMC and Asp-AMC substrates suggests that the activity of LAPTc is restrictive, which is in agreement with the specificities of M17 family members that are associated with degradation and processing of peptides and proteins by removing specific N-terminal amino acid residues [30]. The differentiated expression of LAPTc activity by *T. cruzi* forms might be due to their different requirements of metabolites and processing of peptides and proteins. Epimastigotes live in axenic cultures, trypomastigotes are infective and found mainly in the blood and amastigotes divide inside mammalian host cells.

Aminopeptidases are widely distributed in animals, plants and microorganisms, and found in the extracellular milieu, in the cytoplasm, in many subcellular organelles, and as components of membranes [19]. These enzymes are either monomeric or multimeric, comprising one, two, four or six subunits. Although members of the M17 family have been mainly described as multimeric, some of them behave as monomeric. For example, recombinant LAPs of *Leishmania* spp. and *P. falciparum* exhibit a homohexameric structure, while those of *Haemaphysalis longicornis*, *Schistosoma monsoni* and *Schistosoma japonicum* seem to be monomeric enzymes [21,31-33]. In contrast, LAPTc displays an electrophoretic migration pattern corresponding to a homotetramer. However, it must be taken into account that

some proteins display abnormal migration both in SDS-PAGE and size exclusion chromatography [34], and assembly of recombinant proteins might differ from that of their native forms. In addition, LAPTc three-dimensional structure may contribute to its fast migration since it was not heated before PAGE. Oligopeptidase B of *T. cruzi* also displays abnormal electrophoretic migration under the same experimental conditions [35]. Nevertheless, other enzymes such as *T. cruzi* cathepsin B and the hexameric leucyl aminopeptidase of *Borrelia burgdorferi* (TAP<sub>Bb</sub>) show the expected migration [13,36]. The hexameric nature of LAPTc was thus confirmed by analytical ultracentrifugation and MALLS assays, which are accurate techniques to determine molecular masses of macromolecules in the absence of any interaction with matrices or surfaces. As it has been observed for members of the M17 and M29 families, such as leucyl aminopeptidase of bovine lens, aminopeptidase A of *E. coli*, and TAP<sub>Bb</sub> [36-38], the oligomeric assembly of LAPTc does not require the presence of interchain disulfide bonds because monomerization occurs in the absence of a reducing agent. The oligomeric structures of these enzymes may be maintained through hydrogen bridges, Van der Waals and hydrophobic interactions as is observed for bovine lens aminopeptidase [26]. The advantage of multimeric over monomeric structures is still unclear, but it is possible that a quaternary structure allows not only hydrophobic regions to be hidden within the protein assembly but also the reduction of the macromolecule surface in contact with the medium, thus restraining the amount of water required to stabilize these proteins [39]. The association between enzymatic activity and multimeric structure of leucyl aminopeptidases suggests that either the active sites are formed at the subunit junctions or the three dimensional assembly stabilizes the active site of each monomer. The latter hypothesis is supported by the fact that the activity of bovine lens leucyl aminopeptidase depends on the stabilization of each monomer active site by the structure of the oligomer [26].

LAPTc comprises several distinctive characteristics of M17 leucyl aminopeptidases. In addition to conserved amino acid sequences, especially at the C-terminus, which contains two M17 Pfam domains, it also lacks the HEXXH signature found in the M1 family. Amino acid sequences deduced from cDNAs from many genomes have revealed amino acid sequence homologies in organisms as diverse as bacteria and mammals, particularly around residues involved in catalysis and metal ion binding [19]. As expected, LAPTc shows the highest identity with the M17 leucyl aminopeptidases of the kinetoplastids *L. major* and *T. brucei*, and less extensively with the unassigned aminopeptidase II of *T. cruzi*. Despite conservation of amino acid sequences, M17

members show variable pH and temperature optima. Although LAPTc is active over a broad range of temperatures, its activity shows a marked dependence on neutral pH, since at pH 6 and 8 the enzymatic activity is only 45% of that measured at pH 7. Furthermore, the enzyme is completely inactive at pH 5 and 9. It should be taken into account that an enzyme may mediate its activity over a broad pH range, depending on the substrate. Recombinant forms of *Leishmania* spp. LAPs show optimal activity at pH 8.0-8.5 on Leu-AMC and have zinc as a cofactor but its 62-kDa monomer does not mediate enzyme activity [31].

The distinguishable features between the two forms of the enzyme might be explained by folding differences, given that rLAPTc was produced in *E. coli* and LAPTc isolated from *T. cruzi*. The higher sensitivity of rLAPTc to SDS is in agreement with this hypothesis. This correlates well with observations that recombinant members of M17 assemble into active oligomers at 60-70°C and alkaline pHs [19]. Temperatures above 70°C, however, promote inactivation of the thermophilic TAP<sub>Bb</sub>, a member of the M29 family of metallopeptidases, through a transition from the hexameric to the monomeric state [36]. Since the active form of both endogenous enzymes lack interchain disulfide bonds, the oligomeric state of LAPTc is even more resistant to high temperatures than that of TAP<sub>Bb</sub>. However, the three-dimensional structure of LAPTc seems to unfold at 60°C, the optimal activity temperature of TAP<sub>Bb</sub>. In spite of displaying leucyl aminopeptidase activity, sequence identity among members of M29 and M17 families is almost absent. Resolution of three-dimensional structures of M29 peptidases may lead to a better understanding of the evolution and activity mechanism of the leucyl aminopeptidase superfamily members.

Members of M17 aminopeptidases have a broad range of functional properties beyond the degradation of peptides. In animals, plants and bacteria, these enzymes have been implicated in many physiological processes such as protein turnover, regulation of cell redox status, cataract development, MHC I-dependent antigen processing and presentation to cytotoxic T cells, nutritional supply, transcriptional regulation, protein and peptide maturation and defense [19,40]. A *P. falciparum* M17 peptidase is involved in amino acid uptake and regulation and, thus, is considered a virulence factor [21]. Arphamenine-A, an aminopeptidase inhibitor, restrains *in vitro* growth of *T. brucei*, a close relative of *T. cruzi* [23]. In this study, we show that LAPTc mediates the major leucyl aminopeptidase activity in *T. cruzi* extracts and, thus, it likely has important functions in physiological processes involving protein and peptide processing, degradation of proteins and amino acid recycling. *T. cruzi*, *Leishmania* spp. and *T. brucei* lack the biosynthetic pathways to synthesize the

essential amino acids of humans, including leucine [41]. In spite of the metabolic relevance of amino acids for these parasites, their transport and recycling are poorly known. Although many putative amino acid transporter genes have been identified *in silico*, only arginine and proline transporters have been biochemically characterized in *T. cruzi* [42-44]. Considering that a biosynthetic pathway is missing, *T. cruzi* must acquire leucine through specific transport and/or recycling. Since amastigotes live and divide within host cells where the concentration of free amino acids is low, leucine aminopeptidases would play a major role in leucine supply to the parasite through hydrolysis of exogenous and endogenous proteins and peptides. Inactivation of LAPTc activity by specific inhibitors or through gene disruption may help reveal its functional properties and thus its importance to the host-*T. cruzi* interface.

## Conclusions

LAPTc is a 330-kDa homohexameric enzyme that mediates the major leucyl aminopeptidase activity in *T. cruzi*. Inter-monomer disulfide bonds do not take part in the assembly of the active oligomer. LAPTc is a member of the metallopeptidase M17 family or leucyl aminopeptidase family. It retains its oligomeric structure after losing activity and is expressed by all *T. cruzi* forms.

## Methods

### Parasites and preparation of enzyme extract

*T. cruzi* epimastigote, amastigote and trypomastigote forms from Berenice stock were cultured and purified as described previously [10]. Cell-free extracts were prepared from 100 ml of epimastigote culture ( $5 \times 10^7$  cells/ml) in the log phase. Parasites were harvested by centrifugation ( $5,000 \times g$  for 20 min at 4°C) and washed four times in PBS. Cells were resuspended in 1.0 ml of Milli-Q water in the presence of 10  $\mu$ M of the protease inhibitors *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guandino)butane (E-64; Sigma-Aldrich) and tosyl-lysylchloromethane (TLCK; Sigma-Aldrich) and disrupted by three cycles of freezing at -20°C and thawing. The insoluble material was removed by centrifugation ( $20,000 \times g$  for 20 min at 4°C) and the supernatant, referred to hereafter as enzyme extract, was immediately used for the assays or stored at -80°C. Protein content was determined by the Bradford method.

### Assay of peptidase activity

*T. cruzi* aminopeptidase activity was assayed on the fluorogenic substrates *L*-Leu-7-amido-4-methylcoumarin (Leu-AMC), *N*-carbobenzyloxy-Leu-AMC (N-Cbz-Leu-AMC), *L*-Pro-AMC (Pro-AMC) and Asp-AMC, which were purchased from Sigma-Aldrich. Enzyme activity

was determined by measuring the fluorescence of AMC released by hydrolysis of the substrates as described previously [28]. Assays were performed by incubating 1.0  $\mu$ l of enzyme extract (2.5  $\mu$ g of protein) or 30 ng of purified LAP<sub>Tc</sub>, as specified, for 15 min at the desired temperature in 100  $\mu$ l final volume of reaction buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5) in the presence of 20  $\mu$ M fluorogenic substrate. Enzymatic activity is expressed in mU/mg, where 1 U represents 1 mmol of released AMC/min. In-gel leucyl aminopeptidase activity of either enzyme extract (5  $\mu$ g) or purified LAP<sub>Tc</sub> (0.1  $\mu$ g) was performed on 8% SDS-PAGE essentially as described previously [29]. Samples were solubilized in Laemmli buffer containing 0.1 or 0.01% SDS and subjected to electrophoresis at 4°C under non-reducing conditions without prior heating to 100°C. Next, the gel was washed 4 times in reaction buffer, 20 min each time, and incubated at 37°C for up to 30 min in the presence of 50  $\mu$ M Leu-AMC. To determine kinetic parameters, purified LAP<sub>Tc</sub> was incubated in reaction buffer with variable Leu-AMC concentrations (1 to 100  $\mu$ M) and the enzyme reaction was carried out as described above. Kinetic parameters were determined by fitting the rate data to the Michaelis-Menten equation.  $k_{cat}$  was calculated by the equation  $k_{cat} = V_{max}/[E]_0$ , where  $[E]_0$  represents the active enzyme concentration.

#### LAP<sub>Tc</sub> purification and electrophoretic analysis

*T. cruzi* peptidase with specificity for Leu-AMC was purified from freshly prepared enzyme extract by fast liquid chromatography. Enzyme extract (1 ml; 5.6 mg of protein) was buffered with 25 mM Tris-HCl pH 7.5, filtered through a 0.22  $\mu$ m membrane and applied to a DEAE-Sepharose CL-6B (Sigma-Aldrich) column (5 cm  $\times$  1 cm), previously equilibrated with 25 mM Tris-HCl, pH 7.5. After washing the column, bound proteins were eluted with a linear gradient performed in the same buffer from 0.3 to 0.65 M NaCl for 30 min, and then from 0.66 to 1.0 M NaCl for 10 min at a 0.5 ml/min flow rate. Fractions of 0.25 ml were collected on ice, and an aliquot of each fraction was assayed with Leu-AMC. Enzymatically active fractions were pooled and concentrated to 250  $\mu$ l with a Centricon 100 (Amicon) at 4°C. The solution was then submitted to size exclusion chromatography on a Superose 6 HR 10/30 column (GE Healthcare) isocratically perfused with 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, at a 0.3 ml/min flow rate for 80 min, and calibrated with bovine serum albumin (67 kDa), aldolase (158 kDa), catalase (232 kDa), ferritin (440 kDa), and thyroglobulin (669 kDa). Each 250- $\mu$ l fraction was instantly stored on ice until enzyme activity assay, and the active ones were pooled and concentrated to 100  $\mu$ l as above. Then, 30 ng of the purified protein were subjected to 8% SDS/PAGE under non-reducing

conditions without previous boiling, and the gel silver-stained. The presence of interchain disulfide bonds, the molecular mass and the oligomeric structure of the enzyme were evaluated by electrophoresis as described previously [36].

#### Identification of *T. cruzi* aminopeptidase by peptide mass fingerprinting

The purified native protein (2  $\mu$ g) was digested with trypsin (Promega, Madison, Wis) at 37°C for 12 h for peptide mass fingerprinting as described [45]. The digested sample was applied to a MALDI-TOF Reflex mass spectrometer (Bruker Daltonics). Experimentally measured peptide molecular masses were subjected to a protein identity search against the nonredundant database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) via BioTool 2.0 (Bruker Daltonics) and the Mascot program <http://www.matrixscience.com>. The following parameters were used for database searches: monoisotopic mass accuracy up to 0.2 Da for internally calibrated spectra; up to one missed cleavage site; carbamidomethylation of cysteine as fixed chemical modification; and oxidation of methionine as variable chemical modification. The protein was identified as a leucyl aminopeptidase (LAP; accession number EAN97960).

#### Phylogenetic relationship of LAP<sub>Tc</sub> with other LAPs

Twenty-nine sequences were selected from the nonredundant (NR) protein database of NCBI after a search for M17 family members from different organisms under the following accession numbers: EAN97960.1, EAN99056.1 and EAN87580.1 (*T. cruzi* 1, 2 and 3, respectively), EAN79621.1 and AAX70152.1 (*Trypanosoma brucei* 1 and 2, respectively), CAJ02694.1, CAJ06706.1 and AAL16097.1 (*Leishmania major* 1, 2 and 3, respectively), CAM36610.1 (*Leishmania braziliensis*), AAL16095.1 (*Leishmania amazonensis*), AAL16096.1 (*Leishmania donovani*), AAD17527.1 (*Homo sapiens*), XP\_001162589.1 (*Pan troglodytes*), NP\_077754.2 (*Mus musculus*), NP\_001011910.1 (*Rattus norvegicus*), NP\_252520.1 (*Pseudomonas aeruginosa*), ZP\_01789367.1 (*Haemophilus influenzae*), YP\_672349.1 (*Escherichia coli*), YP\_001217999.1 (*Vibrio cholerae*), CAC31245.1 (*Mycobacterium leprae*), NP\_216729.1 (*Mycobacterium tuberculosis*), NP\_194821.1 (*Arabidopsis thaliana*), CAN66364.1 (*Vitis vinifera*), NP\_001066684.1 (*Oryza sativa*), CAA69614.1 (*Solanum lycopersicum*), XP\_744254.1 (*Plasmodium chabaudi*), EAA21300.1 (*Plasmodium yoelii*), XP\_001348613.1 (*Plasmodium falciparum*) and XP\_001615930.1 (*Plasmodium vivax*). Sequence alignments were conducted with the ClustalX software package [46]. Phylogenetic analysis and statistical neighbor-joining bootstrap tests of the phylogenies were performed with the Mega package [47].



### Cloning and expression of the recombinant enzyme (rLAPTc)

According to the sequence of the gene encoding LAPTc (gene ID Tc00.1047053508799.240; <http://www.tcruzidb.org/tcruzidb/home-ori.jsp>), specific primers (forward primer 5' -CTAGTGACATATGAACAGACCTCCTGCTACA - 3', NdeI site in bold, and reverse primer 5' -TAGTGA~~CTCGAGTTATCGTAAATTACGAAGATATTCC~~ - 3', XhoI in bold) were designed and used to amplify the *laptc* open reading frame from *T. cruzi* genomic DNA. The PCR product was cloned into the pCR2.1-TOPO vector. The clone was digested with NdeI and XhoI and the 1563 bp full-length fragment was cloned into the pET-19b expression vector (Novagen). Gene cloning was confirmed by DNA sequencing. The N-terminal His-tagged rLAPTc was produced in *E. coli* BL21(DE3) through 1.0 mM IPTG induction at 20°C over 5 h. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, 0.2% lysozyme, pH 7.9), submitted to sonication on ice and centrifuged at 15,000 × *g* for 10 min at 4°C. Then, the supernatant was submitted to affinity chromatography on a nickel column and rLAPTc was eluted with 400 mM imidazole and further purified by size exclusion chromatography on a Superose 6 HR 10/30 column as described above. rLAPTc, the main peak of activity obtained after the last purification step, was used for enzymatic assays and analyzed by 8% PAGE in the presence of 0.1 or 0.01% SDS, followed by Coomassie staining of the gel.

### Molecular organization assay: analytical ultracentrifugation and light scattering

Sedimentation velocity experiments were performed using a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge and an AN-60 TI rotor (Beckman Coulter). Experiments were carried out at 10°C for rLAPTc, obtained after affinity chromatography, at 170, 56 and 10 μM in 25 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, corresponding to absorbancies at 280 nm of 3.5, 1.2 and 0.2, respectively. A volume of 110 μl (for the most concentrated sample) or 420 μl was loaded into 0.3 or 1.2 cm path cells and centrifuged at 42,000 rpm. Scans were recorded every 6 min, overnight, at 295 and 285 nm and by interference. We used the Sednterp software (free available at <http://www.jphilo.mailway.com>) to estimate the partial specific volume of the polypeptide chain,  $\bar{v}$ , the solvent density,  $\rho = 1.00667$  g/ml, and the solvent viscosity,  $\eta = 1.335$  mPa.s, at 10°C. Sedimentation profiles were analyzed by the size-distribution analysis of Sedfit (freely available at <http://www.analyticalultracentrifugation.com>). In Sedfit, finite element solutions of the Lamm equation for a large number of discrete, independent species, for which a relationship between mass, sedimentation and

diffusion coefficients,  $s$  and  $D$ , is assumed, are combined with a maximum entropy regularization to represent a continuous size-distribution [48]. We used typically 200 generated data sets, calculated on a grid of 300 radial points and using fitted frictional ratio for sedimentation coefficients comprised between 1 and 50 S. For the regularization procedure a confidence level of 0.68 was used.

The molecular mass of LAPTc in solution was also determined by size exclusion chromatography coupled to multiangle laser light scattering (SEC-MALLS) and refractometry (RI). rLAPTc (20 μl), purified by affinity chromatography as above, at 170 μM (10 mg/ml) in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, was injected in a KW 804 column preceded by a guard column (Shodex), equilibrated in the same solvent, at 20°C with a flow rate of 0.5 ml/min. Protein concentration was measured on-line by refractive index (RI) measurements using an Optilab rEX (Wyatt Technology) and considering  $\partial n/\partial c = 0.186$  ml/g. On-line MALLS detection was performed with a miniDAWN TREOS detector (Wyatt Technology) using laser emitting at 658 nm. Data were analyzed and weight-averaged molar masses were calculated using the ASTRA software (Wyatt Technology Corp.). Elution profiles (left ordinate axis) were monitored by RI. The molecular mass distribution (right ordinate axis) was determined from combined MALLS and RI data.

### Assay of optimal pH and temperature for activity and thermostability of LAPTc

The optimal pH for activity of both endogenous and recombinant LAPTc was determined as described above in 50 mM acetic acid-50 mM MES-50 mM Tris-HCl buffer adjusted to the desired pH. To assay the optimal temperature for aminopeptidase activity, reactions took place at 20, 25, 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 or 100°C in reaction buffer. Enzyme thermostability was assayed by incubating the purified proteins at the same temperatures for either 15 or 240 min in reaction buffer before the aminopeptidase activity assay on Leu-AMC. An 8% SDS-PAGE analysis of the molecular organization of the native or recombinant LAPTc followed. PAGE was performed in the presence of 0.1 or 0.01% SDS without previous boiling of either protein.

### Inhibition pattern and cation dependence of LAPTc

Different concentrations of tosyl-lysylchloromethane (TLCK), bestatin, EDTA, *L-trans*-epoxysuccinylleucylamido-(4-guanidino) butane (E-64), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1,10-phenanthroline, leupeptin, or phosphoramidon were incubated with 50 ng of purified LAPTc in 100 μl reaction buffer for 20 min at room temperature before the substrate was added. Enzymatic reactions were monitored as described above. All

inhibitors were from Sigma-Aldrich. To assess the effects of cations on enzymatic activity, purified LAPTc was incubated in reaction buffer containing 10 mM EDTA or 250  $\mu$ M 1,10-phenanthroline for 30 min at room temperature. After extensive dialysis against reaction buffer at 4°C, 20  $\mu$ M Leu-AMC (final concentration) and AlCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, or ZnCl<sub>2</sub> (final concentration, 0.4 mM) were added to the reaction system, followed by a 15 min incubation at 37°C. Hydrolysis of the substrate was measured as described above. Controls consisted of enzymatic reactions carried out either without EDTA or 1,10-phenanthroline treatments or in the absence of cations.

#### Analysis of expression and immunocytolocalization of LAPTc

One 4-month-old female rabbit was immunized with 13  $\mu$ g of purified LAPTc emulsified in complete Freund's adjuvant followed by two biweekly boosters with the enzyme in incomplete Freund's adjuvant. Four days after the last booster, serum was collected and Western blotting monitored the presence of anti-LAPTc specific antibodies. To assay the expression of LAPTc by *T. cruzi* epimastigotes, total parasite proteins were subjected to 8% SDS-PAGE with or without previous heating to 100°C and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked by incubation in 5% (w/v) non-fat milk/PBS for 3 h at room temperature. Blots were incubated in 1% non-fat milk/PBS for 2 h in the presence of either pre-immune or immune serum diluted to 1:400, followed by extensive washing in PBS. Then, the membranes were incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG diluted to 1:2000, washed in PBS and the immunocomplexes revealed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate/Nitro Blue Tetrazolium (Promega). For immunofluorescence, epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi* were fixed overnight at 4°C with 3.7% formaldehyde, air-dried on poly-L-lysine-coated glass slides, permeabilized with 0.2% (v/v) Triton X-100 and incubated with pre-immune or anti-LAPTc serum (1:50 in 1% non-fat milk/PBS) for 2 h at room temperature. After extensive washing in 1% non-fat milk/PBS, cells were incubated with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG for 1 h. This was followed by washing and staining parasite DNAs with 5  $\mu$ g/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) for 5 min. Glass slides were washed, mounted and observed with a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

#### Acknowledgements

We thank Dr Marcelo Valle de Sousa from The University of Brasília for mass spectrometry analysis, and Aline Le Roy from the AUC and Protein Analysis On Line (PAOL) platforms of the Partnership for Structural Biology and the

Institut de Biologie Structurale in Grenoble (PSB/IBS) for performing experiments and analysis. This work was supported by grants from CNPq, FINEP, FAP-DF, PRONEX, CAPES and UnB, Brazil.

#### Author details

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, The University of Brasília, Brasília, 70910-900, Brazil. <sup>2</sup>Department of Bioscience, Universidad Nacional de Colombia, Núcleo El Volador, Calle 59A No 63-20, Medellín, Colombia. <sup>3</sup>Biology of Cancer and Infection IRTSV CEA, UMR1036 INSERM, Grenoble, France. <sup>4</sup>Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses ERL5261, CNRS, Grenoble, France. <sup>5</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble, France. <sup>6</sup>Faculty of Ceilândia, The University of Brasília, Brasília, 70910-900, Brazil. <sup>7</sup>Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institutes of Health, Rockville, MD 20852, USA. <sup>8</sup>CEA, Institut de Biologie Structurale, F-38027 Grenoble, France. <sup>9</sup>CNRS, UMR 5075, Institut de Biologie Structurale, F-38027 Grenoble, France.

#### Authors' contributions

GCR and TSG were involved in all of the experimental and theoretical work. EF, MR and CE performed the analytical centrifugation and light scattering experiments and commented on the manuscript. HA and TCA helped with data analysis and sequence alignment. KCA, MML and RSN participated in the biochemical studies. BMR and CRF were involved in the cloning and kinetic experiments. IMDB participated in the design and coordination of the experiments. JMS conceived of the study, participated in its design and coordination and drafted the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Received: 9 February 2011 Accepted: 23 August 2011

Published: 23 August 2011

#### References

1. Yoshida N: Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 2006, **78**(1):87-111.
2. de Souza W: Chagas' disease: facts and reality. *Microbes Infect* 2007, **9**(4):544-545.
3. Moncayo A, Silveira AC: Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, **104**(Suppl 1):17-30.
4. Klemba M, Goldberg DE: Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* 2002, **71**:275-305.
5. Bastos IM, Motta FN, Charneau S, Santana JM, Dubost L, Augustyns K, Grellier P: Prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma brucei* hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. *Microbes Infect* 2010, **12**(6):457-466.
6. Santos CC, Scharfstein J, Lima AP: Role of chagasin-like inhibitors as endogenous regulators of cysteine proteases in parasitic protozoa. *Parasitol Res* 2006, **99**(4):323-324.
7. Scharfstein J: Parasite cysteine proteinase interactions with alpha 2-macroglobulin or kininogens: differential pathways modulating inflammation and innate immunity in infection by pathogenic trypanosomatids. *Immunobiology* 2006, **211**(1-2):117-125.
8. Caler EV, Vaena de Avalos S, Haynes PA, Andrews NW, Burleigh BA: Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* 1998, **17**(17):4975-4986.
9. Grellier P, Vendeville S, Joyeau R, Bastos IM, Drobecq H, Frappier F, Teixeira AR, Schrevel J, Davioud-Charvet E, Sergheraert C, Santana JM: *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J Biol Chem* 2001, **276**(50):47078-47086.
10. Bastos IM, Grellier P, Martins NF, Cadavid-Restrepo G, de Souza-Ault MR, Augustyns K, Teixeira AR, Schrevel J, Maigret B, da Silveira JF, Santana JM: Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J* 2005, **388**(Pt 1):29-38.
11. de Diego JL, Katz JM, Marshall P, Gutierrez B, Manning JE, Nussenzweig V, Gonzalez J: The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry* 2001, **40**(4):1053-1062.
12. Cuevas IC, Cazzulo JJ, Sanchez DO: gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. *Infect Immun* 2003, **71**(10):5739-5749.

13. Garcia MP, Nobrega OT, Teixeira AR, Sousa MV, Santana JM: Characterisation of a *Trypanosoma cruzi* acidic 30 kDa cysteine protease. *Mol Biochem Parasitol* 1998, **91**(2):263-272.
14. Parussini F, Garcia M, Mucci J, Agüero F, Sanchez D, Hellman U, Aslund L, Cazzulo JJ: Characterization of a lysosomal serine carboxypeptidase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2003, **131**(1):11-23.
15. Niemirowicz G, Parussini F, Agüero F, Cazzulo JJ: Two metalloproteinases from the protozoan *Trypanosoma cruzi* belong to the M32 family, found so far only in prokaryotes. *Biochem J* 2007, **401**(2):399-410.
16. da Silva-Lopez RE, Morgado-Diaz JA, dos Santos PT, Giovanni-De-Simone S: Purification and subcellular localization of a secreted 75 kDa *Trypanosoma cruzi* serine oligopeptidase. *Acta Trop* 2008, **107**(2):159-167.
17. Pinho RT, Beltramini LM, Alves CR, De-Simone SG: *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of aspartyl proteases. *Exp Parasitol* 2009, **122**(2):128-133.
18. Healy N, Greig S, Enahoro H, Roberts H, Drake L, Shaw E, Ashall F: Detection of peptidases in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes using chromogenic and fluorogenic substrates. *Parasitology* 1992, **104**(Pt 2):315-322.
19. Matsui M, Fowler JH, Walling LL: Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol Chem* 2006, **387**(12):1535-1544.
20. Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(Database):D270-272.
21. Stack CM, Lowther J, Cunningham E, Donnelly S, Gardiner DL, Trenholme KR, Skinner-Adams TS, Teuscher F, Grembecka J, Mucha A, Kafarski P, Lua L, Bell A, Dalton JP: Characterization of the *Plasmodium falciparum* M17 leucyl aminopeptidase. A protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development. *J Biol Chem* 2007, **282**(3):2069-2080.
22. Rogers AH, Gunadi A, Gully NJ, Zilm PS: An aminopeptidase nutritionally important to *Fusobacterium nucleatum*. *Microbiology* 1998, **144**(Pt 7):1807-1813.
23. Knowles G: The effects of arphamenine-A, an inhibitor of aminopeptidases, on in-vitro growth of *Trypanosoma brucei brucei*. *J Antimicrob Chemother* 1993, **32**(1):172-174.
24. Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C, Tort JF: *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol Biochem Parasitol* 2008, **158**(1):52-64.
25. Rawlings ND, Barrett AJ: Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 1993, **290**(Pt 1):205-218.
26. Burley SK, David PR, Taylor A, Lipscomb WN: Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**(17):6878-6882.
27. Ebel C: Analytical ultracentrifugation. State of the art and perspectives. *Protein Structures: Methods in Protein Structure and Stability Analysis* New York: Nova Science Publishers; 2007, 229-260.
28. Santana JM, Grellier P, Schrevel J, Teixeira AR: A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J* 1997, **325**(Pt 1):129-137.
29. Santana JM, Grellier P, Rodier MH, Schrevel J, Teixeira A: Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **187**(3):1466-1473.
30. Taylor A: Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J* 1993, **7**(2):290-298.
31. Morty RE, Morehead J: Cloning and characterization of a leucyl aminopeptidase from three pathogenic *Leishmania* species. *J Biol Chem* 2002, **277**(29):26057-26065.
32. Hatta T, Kazama K, Miyoshi T, Umemiya R, Liao M, Inoue N, Xuan X, Tsuji N, Fujisaki K: Identification and characterisation of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Int J Parasitol* 2006, **36**(10-11):1123-1132.
33. McCarthy E, Stack C, Donnelly SM, Doyle S, Mann VH, Brindley PJ, Stewart M, Day TA, Maule AG, Dalton JP: Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol* 2004, **34**(6):703-714.
34. Faudry E, Santana JM, Ebel C, Vernet T, Teixeira AR: Salivary apyrases of *Triatoma infestans* are assembled into homo-oligomers. *Biochem J* 2006, **396**(3):509-515.
35. Fernandes LC, Bastos IM, Lauria-Pires L, Rosa AC, Teixeira AR, Grellier P, Schrevel J, Santana JM: Specific human antibodies do not inhibit *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase B and cathepsin B, and immunoglobulin G enhances the activity of trypomastigote-secreted oligopeptidase B. *Microbes Infect* 2005, **7**(3):375-384.
36. Bertin PB, Lozzi SP, Howell JK, Restrepo-Cadavid G, Neves D, Teixeira AR, de Sousa MV, Norris SJ, Santana JM: The thermophilic, homohexameric aminopeptidase of *Borrelia burgdorferi* is a member of the M29 family of metalloproteinases. *Infect Immun* 2005, **73**(4):2253-2261.
37. Burley SK, David PR, Sweet RM, Taylor A, Lipscomb WN: Structure determination and refinement of bovine lens leucine aminopeptidase and its complex with bestatin. *J Mol Biol* 1992, **224**(1):113-140.
38. Strater N, Sherratt DJ, Colloms SD: X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *EMBO J* 1999, **18**(16):4513-4522.
39. Goodsell DS, Olson AJ: Soluble proteins: size, shape and function. *Trends Biochem Sci* 1993, **18**(3):65-68.
40. Lowther WT, Matthews BW: Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings. *Chem Rev* 2002, **102**(12):4581-4608.
41. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, et al: The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 2005, **309**(5733):416-422.
42. Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber A, Alves MJ, Bouvier LA, Flawia MM, Torres HN: Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. *FEBS Lett* 2002, **526**(1-3):111-114.
43. Silber AM, Tonelli RR, Martinelli M, Colli W, Alves MJ: Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol* 2002, **49**(6):441-446.
44. Bouvier LA, Silber AM, Galvao Lopes C, Canepa GE, Miranda MR, Tonelli RR, Colli W, Alves MJ, Pereira CA: Post genomic analysis of permeases from the amino acid/auxin family in protozoan parasites. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **321**(3):547-556.
45. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996, **68**(5):850-858.
46. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG: The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(24):4876-4882.
47. Kumar S, Tamura K, Nei M: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004, **5**(2):150-163.
48. Schuck P: Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* 2000, **78**(3):1606-1619.

doi:10.1186/1471-2091-12-46

Cite this article as: Cadavid-Restrepo et al: The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTC) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metalloproteinases. *BMC Biochemistry* 2011 **12**:46.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





## 20 **Abstract**

21 *Enterobacter cloacae* is a Gram-negative bacterium associated with high morbidity  
22 and mortality in intensive-care patients due to its resistance to multiple antibiotics.  
23 Currently, therapy against multi-resistant bacteria consists in use of colistin (CST), in spite  
24 of its toxic effects at higher concentrations. In this context, CST-resistant *E. cloacae* strains  
25 were challenged with lower levels of CST combined with other antibiotics in order to  
26 reduce CST-associated side effects. CST-resistant *E. cloacae* (ATCC 49141) strains were  
27 generated by serial propagation in sub-inhibitory CST concentrations at 37 °C for 2-3 h. A  
28 negative control group was obtained through the same procedure in Luria-Bertani (LB)  
29 broth without antibiotic. After this, three CST-resistant and three non-resistant replicates  
30 were isolated. The identity of all the strains was confirmed by MALDI-TOF MS and  
31 VITEK® 2 and MicroScan® analysis. Furthermore, cross resistances to other antibiotics  
32 were checked by disk diffusion and automated systems, showing that all strains presented  
33 intrinsic resistance to penicillin, cephalosporin (except fourth-generations), monobactam  
34 and some associations of penicillin and  $\beta$ -lactamase inhibitors. In order to assess a novel  
35 therapy against CST-resistant *E. cloacae*, the synergistic effects of vancomycin,  
36 erythromycin, chloramphenicol (CHL), and ampicillin in combination with CST were  
37 determined. The synergistic effects of the combined use of CST and CHL were observed  
38 via the broth microdilution checkerboard method, and this combination was capable of  
39 inhibiting the induced CST-resistant strains as well as two CST-resistant clinical strains. In  
40 summary, the data reported here showed for the first time the possible therapeutic use of  
41 CST-CHL for infections caused by CST-resistant *E. cloacae*.

42 **Keywords:** antibiotics, *Enterobacter cloacae*, synergism, resistance, CST.

43

## 44 Introduction

45

46 *Enterobacter cloacae* complex is considered a group of Gram-negative bacteria  
47 genetically and phenotypically similar to *E. absuriae*, *E. cloacae*, *E. homaechei*, *E. kobei*,  
48 *E. ludwigii* and *E. nimipressurialis* species presenting 61 to 67% of DNA identity (1). The  
49 increasing number of epidemiological studies, highlighting severe cases of bacteremia  
50 caused by the *E. cloacae* complex, reflects the particular importance of understanding these  
51 microorganisms as clinical pathogens (2).

52 Among bacteria of this complex, *E. cloacae* is an important nosocomial pathogen  
53 that causes a wide variety of diseases including infections in the respiratory and urinary  
54 tracts, the skin, cardiac and soft tissues, the intra-abdominal organs and the eyes (3). This  
55 situation has been aggravated since *E. cloacae* possesses the ability to develop resistance to  
56 most carbapenems (4, 5), aztreonam (6), quinolones (3, 7) and sulfonamides (8), thus  
57 producing an urgent need for novel therapeutic drug development.

58 However, it is important to emphasize that while ten percent of antibiotics in clinical  
59 trial phases II or III may be suitable for Gram-positive bacterial infection treatment, only  
60 five percent can be used against Gram-negative bacteria (9). This is due to the presence of  
61 the outer bacterial membranes of gram-negative bacteria that act as a barrier, decreasing  
62 interaction and penetration of molecules with larger size and/or hydrophobic properties  
63 including some antibiotics (10).

64 This panorama along with the emergence of multi-resistant Gram-negative bacteria  
65 such as *A. baumannii*, the meningitis etiologic agent, and *Pseudomonas aeruginosa*, which

66 causes cystic fibrosis, have prompted the reintroduction of CST to the market (11). This  
67 antimicrobial is a cationic polypeptide, composed of a cyclic decapeptide linked by an  $\alpha$ -  
68 amide linkage to a fatty acyl chain (12). In general, CST acts by modifying the negative  
69 charges of the outer membrane of Gram-negative bacteria via an electrostatic interaction  
70 with negatively charged phosphate residues in the core region of the lipid A component of  
71 lipopolysaccharides (LPS) (13). This interaction with lipid A could increase membrane  
72 permeability, thus leading the bacterium to its death (14). Moreover, CST also shows anti-  
73 endotoxin activity due to its ability to decrease the exacerbated immunological response  
74 (14-16). This anti-endotoxin activity seems to be essential to decrease the development of  
75 septicemia, which clearly improves patient mortality (15).

76         However, despite the fact that CST has clinical use against a broad spectrum of  
77 Gram-negative bacteria including *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* sp, *Enterobacter* sp.  
78 and *P. aeruginosa* (17), its administration must be used cautiously since nephrotoxicity is  
79 reported among 14 to 24% of patients in intensive care units. Additionally, it is important to  
80 note that the increased use of CST in intact form, or an inactive pro-drug form named CST  
81 methanesulfonate (18), could promote resistance development (19).

82         Since the development of new antibiotics for use against Gram-negative bacteria has  
83 been limited, strategies involving the combination of antibiotics have been employed in  
84 order to obtain synergy by reducing the necessity for higher bactericidal doses while  
85 limiting side effects (20).

86         In general, the utilization of CST in combination with other antibiotics presents  
87 several diverse advantages including the reduction of toxic effects in mammalian and



88 epithelial cells (21), the alteration of pharmacokinetic characteristics which might increase  
89 absorption of others drugs during inhalation therapy (22), and finally the prevention of  
90 drug resistant organisms (19). There is evidence in other studies that the use of a  
91 combination of antibiotics with different mechanisms of action could force bacteria to  
92 undergo multiple mutations in order to become resistant, thus slowing the emergence of  
93 resistant strains considerably (23).

94 In this context, the *E. cloacae* strain (ATCC 49141) was cultivated with CST in  
95 order to select for CST-resistant *E. cloacae* strains. In order to provide a novel treatment  
96 against CST resistant strains, the use of CST combined with others antibiotics of different  
97 mechanisms of action were evaluated, including antibiotics that act in cell walls, as well as  
98 in DNA, RNA and protein synthesis.

99

## 100 **Materials and Methods**

101

### 102 **Bacterial strains**

103 *Enterobacter cloacae* (ATCC 49141) KwikStik (639P) MBL (Plast Labor) was used  
104 as the bacterial model strain. A single colony of *E. cloacae* was isolated by the streak  
105 method in Luria-Bertani (LB) solid medium and propagated in LB broth at 37 °C, and the  
106 cell suspension was stored in sterile 10% glycerol at -80 °C. All of the ensuing experiments  
107 were carried out from this original stock. The bacterial cells' growth rate from the original  
108 culture was established by measuring the optical density (OD) at 595 nm, which was

109 monitored at 30 min intervals in LB broth at a constant temperature (37 °C) and with  
110 shaking (240 rpm). The direct relationship between OD and CFU was established based on  
111 the drop surface plate method (24), and a standard growth curve was constructed and  
112 calibrated. In addition, two other clinical strains were used in synergism analyses. One  
113 strain (1437710) had its resistance checked by PCR showing the *Klebsiella pneumonia*  
114 carbapenemase resistance mechanism. Moreover, another strain (1383251) showed high  
115 CST resistance levels. Both strains were collected from the blood of patients from hospitals  
116 in Brasilia, Brazil. These strains were characterized and provided by the Central Laboratory  
117 of Public Health (LACEN-DF), a public diagnostic laboratory in the Federal District of  
118 Brazil.

119

#### 120 **Evaluation of antimicrobial susceptibility via microdilution**

121 The minimum inhibitory concentrations (MICs) of CST sodium methanesulfonate  
122 (Sigma-Aldrich) were tested in LB broth in a 96-well polypropylene microplate by  
123 microdilution assay according to the CLSI document M07-A8 (25). Bacteria [*E. cloacae*  
124 original cell ATCC 49141; strains NR-CST (Non-Resistant 1, 2 or 3); R-CST (Resistant 1,  
125 2 or 3)] in  $2 \times 10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup> were added in triplicate to wells containing increasing  
126 concentrations of antibiotics at 0-256 µg.mL<sup>-1</sup>. Milli-Q water was used as a negative  
127 control. The plates were incubated at 37 °C at 40 rpm for 16 h and the OD<sub>600</sub> was measured  
128 at 30 min intervals using a microplate reader (Biotek) for bacterial growth. After  
129 incubation, the absence of viable cells in non-turbid wells was confirmed by culture in LB  
130 agar.

131

132 **Preparation of antibiotic-resistant *E. cloacae***

133           The sub-inhibitory concentration of CST sodium methanesulfonate (Sigma-Aldrich)  
134 used for the preparation of *E. cloacae* resistant strains was half the value of the determined  
135 CST MIC for the *E. cloacae* wild-type strain (designated 0.5 x MIC), as reported in Peng *et*  
136 *al.* (26). First, a pre-inoculum was prepared in 2.5 mL of LB broth to which a single colony  
137 of *E. cloacae* original stock was added. The pre-inoculum was incubated at 37 °C and 240  
138 rpm until reaching the middle of its exponential growth phase as monitored at 595 nm. A  
139 fresh LB broth supplemented with 0.5 x MIC CST was inoculated with 10<sup>5</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> of *E.*  
140 *cloacae* from the pre-inoculum culture and subjected to the same growth conditions for 2 h  
141 until the end of the exponential phase. From this first inoculated generation, 10 successive  
142 propagations were repeated in the presence of CST at 0.5 x MIC in order to induce  
143 resistance. During each propagation, four generations were obtained, and the generation  
144 time was 20 min, resulting in 40 generations after 10 propagations. In parallel, *E. cloacae*  
145 was cultivated at the same generation number in the absence of CST and used as a negative  
146 control strain. The bacterial suspensions of the last propagations were spread on a CST-free  
147 LB agar plate and cultured overnight at 37 °C. Three CST-susceptible colonies were  
148 selected and isolated by the streak plate method in LB agar at 37 °C. The presence or  
149 absence of CST resistance was evaluated by the broth microdilution assay previously  
150 described, and all isolated colonies were challenged with the full CST MIC (4 µg.mL<sup>-1</sup>). In  
151 addition, all colonies were also individually plated in LB agar and supplemented with the  
152 full CST MIC and cultured overnight at 37 °C. When present, a single colony was selected  
153 and isolated by the streak plate method in LB agar at 37 °C. CST-resistant colonies were

154 named R1, R2, and R3, while the control CST-susceptible colonies were named NR1, NR2,  
155 and NR3. Bacterial suspensions were stored in sterile 10% glycerol at -80 °C.

156

#### 157 **MALDI-TOF MS strain identification.**

158 *E. cloacae* ATCC 49141, *E. cloacae* CST susceptible (NR1, NR2, NR3) and *E.*  
159 *cloacae* CST resistant (R1, R2 and R3) strains were sub-cultured for 12 h in solid LB  
160 medium. Six colonies of each strain were transferred to a vial containing 1 mL of 70%  
161 ethanol. Each suspension was centrifuged at 13,000 x *g* for 2 min, the supernatant was  
162 discarded and the pellet resuspended in 10 µL of acetonitrile and 70% formic acid in a 1:1  
163 ratio (v/v). The sample was centrifuged again at 13,000 x *g* for 2 min, and 1 µL of the  
164 supernatant was applied to a MALDI plate (Bruker Daltonics) and air dried at room  
165 temperature. Subsequently, a further 1 µL aliquot of a saturated matrix solution of α-cyano-  
166 4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile and 0.3% trifluoroacetic acid was then added  
167 to the spot. Samples were analyzed on a MicroFlex LT mass spectrometer (Bruker  
168 Daltonics) in positive linear mode using the MBT method. Over 24 spectra of each strain  
169 were acquired over the *m/z* range of 2000 to 20000 Da for protein profile generation.

170

#### 171 **Bruker MALDI BioTyper spectral analysis**

172 Spectra were smoothed and the baseline was corrected and compared against the  
173 MALDI Biotyper database version 3.0, containing 3995 reference microorganisms at the  
174 time of comparison. The standard parameters of the pattern-matching algorithm were  
175 applied. The MALDI Biotyper output consists of a log (score) in the range 0-3.0, computed

176 by comparing the peak list for an unknown strain with the reference. A log (score) above  
177 2.0 is indicative of good correlation within species level. According to Mellmann *et al.* (1),  
178 a score value distance of at least 0.15 between the two best-scored species is defined as  
179 necessary for precise species identification.

180

### 181 **MSP dendrogram**

182

183 In addition to identifying all *E. cloacae* strains by MALDI-TOF MS, a main  
184 spectrum (MSP) of each *E. cloacae* strain was built upon the combination of 24  
185 individually acquired mass spectra. For the MSP creation, all processing steps were  
186 automatically performed using the default settings of the FlexControl software (Bruker  
187 Daltonics) which considers mass above 2000 Da, tolerance of distance of 300, tolerance of  
188 peak 25 and intensity correction function 0.25. Also, the construction dendrogram was  
189 performed by the standard of the FlexControl software (Bruker Daltonics) which consisted  
190 in analyzing the following mass range from 3000 to 15000 Da with a resolution set to one,  
191 the factor of compression set to 10, intensity smoothed by the Savitzky Golay algorithm  
192 and the baseline subtracted. The MSP of each *E. cloacae* resistant and susceptible strains to  
193 CST were compared with the original ATCC strain and then assigned to a specific cluster  
194 on the cluster analysis tree.

195

### 196 **Strain identification and susceptibility assay by automated systems**

197           The stock culture strains (*E. cloacae* ATCC 49141, NR1, NR2, NR3 controls and  
198 R1, R2, R3 resistant strains) were sub-cultured twice on LB agar plates and then grown on  
199 MacConkey agar plates at 37 °C for 16 h. Next, all the procedures were carried out  
200 according to manufacturer's directions.

201           The bacterial suspension for the VITEK® 2 system (bioMérieux) was prepared  
202 picking up 1-3 colonies with a sterile swab from each strain. Then it was diluted in 0.9%  
203 saline and the turbidity was adjusted to 0.5 McFarland standard in the turbidity meter  
204 DensiChek® (bioMérieux). This inoculum was immediately used to load VITEK® 2 test  
205 cards. The test cards used were ID-GNBcard for gram-negative identification and the AST-  
206 N105 containing CST test for antimicrobial susceptibility testing (AST). The antibiotic  
207 drugs tested were amikacin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, ampicillin/tazobactam,  
208 aztreonam, cephalothin, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, ciprofloxacin, CST,  
209 gentamicin, meropenem, imipenem, ertapenem and tigecycline.

210           Furthermore, the bacterial inoculum for the MicroScan® WalkAway® system  
211 (Siemens) was prepared with a wand by the Prompt™ Inoculation System in a standard  
212 solution from the manufacturer, and all test panel wells were loaded with Renok  
213 rehydrating. The MC50 test panel was used for both identification and resistance detection  
214 tests. The antibiotic resistance phenotypes were tested for amikacin, ampicillin,  
215 amoxilin/clavulanate, aztreonam, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, cefazolin, ceftazidime,  
216 ceftriaxone, cefuroxime, ciprofloxacin, gentamicin, levofloxacin, meropenem, imipenem,  
217 ertapenem, piperacillin, piperacillin/tazobactam, tetracycline, ticarcillin/clavulanate,  
218 tobramycin, and trimethoprim/sulfamethoxazole, and the results were obtained by software  
219 analysis. For bacterial identification via automated systems, the standard results from the

220 organism tested were compared to the specific taxonomic database to determine a  
221 quantitative value for proximity, and a numerical probability calculation was also  
222 performed. Different qualitative confidence levels of identification were assigned based on  
223 the numerical probability calculation, such as 96-99% of probability, excellent; 93-95%,  
224 very good; 89-92%, good; 85-88%, acceptable. Values outside these ranges were classified  
225 as low discrimination or unidentified organism. Regarding the AST, both automated  
226 systems calculated the MIC for each antimicrobial drug tested after incubation. The  
227 interpretative breakpoints for MIC obtained from automated systems were analyzed  
228 according to the interpretative criteria of CLSI M100-S20 (27), and the strain was classified  
229 as susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R) according to each antibiotic tested.

230 In relation to the clinical strains, the identification and antibiotic resistance  
231 phenotypes were analyzed by the MicroScan® WalkAway® system (Siemens) using MC  
232 42 test panel that differ to MC 50 with different antibiotics including cephalotin, CHL,  
233 colistin, meropenem, piperacillin, piperacillin/tazobactam, tetracycline,  
234 ticarcillin/clavulanate, tigecycline and tobramycin.

235

### 236 **Evaluation of antimicrobial susceptibility by disk diffusion**

237 All *E. cloacae* strains were evaluated by a disk diffusion test. For these analyses,  
238 distinct classes of antimicrobial disks (Newprov) were selected including  $\beta$ -lactam classes  
239 such as penicillin [ampicillin (10  $\mu$ g) and oxacyllin (1  $\mu$ g)], cephalosporin [cefepime (30  
240  $\mu$ g), cefalotin (30 $\mu$ g), ceftazidime (30 $\mu$ g) and cefotaxime (30)], carbapenems (10  $\mu$ g) and  
241 meropenem (10 $\mu$ g)], monobactam [aztreonam (30  $\mu$ g)] and  $\beta$ -lactamase inhibitors

242 [amoxicillin/clavulanic acid (30 µg), piperacillintazobactam (100/10), ampicillin-subactam  
243 (10/10)]. In addition, antibiotics that act on the protein synthesis inhibitor were also  
244 available, such as CHL (30 µg), tetracycline (30 µg), aminoglycoside [gentamicin (10 µg)  
245 and amikacin (30 µg) and macrolide classes such as erythromycin (15 µg). Furthermore,  
246 one quinolone [ciprofloxacin (5 µg)] and one antimicrobial peptide [polymyxin (300 UI)]  
247 were also tested. For these analyses, *E. cloacae* ATCC 49141 was cultured in Mueller-  
248 Hinton agar plates, and then different antibiotics were applied to the disk content and  
249 further incubated at 37 °C for 18 h. After incubation, each plate was examined and the  
250 inhibition zone was measured to the nearest whole millimeter. The zone diameter  
251 breakpoints were interpreted according to Table 2A in CLSI document M100-S20 (27).

252

### 253 **Synergy evaluation by checkerboard assay.**

254 CST activity in combination with other antibiotics, such as vancomycin  
255 hydrochloride from *Streptomyces orientalis*, erythromycin hydrate, ampicillin and CHL (all  
256 from Sigma) were used for the synergism assay against CST-resistant strains. Stock  
257 solutions of all antibiotics (1000 µg.mL<sup>-1</sup>) were prepared in sterile distilled water. Plates  
258 were set up with increasing concentrations of CST (0-256 µg.mL<sup>-1</sup>) in the horizontal wells  
259 and other antibiotics, including either vancomycin, or erythromycin, or ampicillin, or CHL,  
260 all at concentrations of 0-256 µg.mL<sup>-1</sup> in the vertical wells, and inoculated with 10<sup>5</sup>  
261 CFU.mL<sup>-1</sup> of *E. cloacae* R3 prepared in LB broth. In addition, similar analyses were  
262 performed using two clinically isolated strains, characterized and supplied by a public  
263 diagnosis laboratory (the LACEN-DF of the Federal District, Brazil). After incubation for



264 16 h at 37 °C, the absence of viable cells in non-turbid wells was confirmed by plating the  
265 culture in LB agar. Checkerboard results were interpreted by calculating the fractional  
266 inhibitory concentration indices (FICIs) (13). FICIs were calculated as follows: (MIC of  
267 CST in combination with other antibiotics/MIC of CST alone) + (MIC of other antibiotics  
268 in combination with CST/MIC of other antibiotics alone). The FIC index was interpreted as  
269 follows: synergy (FICI < 0.5), indifference (0.5 < FICI < 4) and antagonism (FICI > 4).

270

### 271 **Cell cytotoxicity assay**

272 In order to determine the maximum non-toxic concentrations of CST alone, CHL  
273 alone, and CST and CHL combined, cultured RAW 264.7 murine macrophage-like cells  
274 were used. Initially, these cells were maintained in supplemented Dulbecco's modified  
275 eagle medium (DMEM) (Invitrogen) (4 mM L-glutamine, 10% FCS, 2 mM nonessential  
276 amino acids, 50 mg.mL<sup>-1</sup> gentamicin, and 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin/streptomycin) in the  
277 presence of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The cell viability was further evaluated by 3-(4,5-  
278 dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT; Sigma) (5 mg mL<sup>-1</sup> in  
279 phosphate buffered saline). Briefly, cells were seeded in 96-well microliter plates (B&D) in  
280 a concentration of  $1.0 \times 10^5$  cells per well, in DMEM medium, supplemented with  
281 antibiotics at different concentrations. After 24 h of incubation, 60% of the medium was  
282 then removed, and 10 µL of the MTT solution was added to each well of the plate and  
283 incubated for 4 h in the presence of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The blue formazan product generated  
284 was dissolved by the addition of 100 µL of 100% DMSO (Mallinckrodt Chemical) per well.  
285 The polypropylene plates were then gently swirled for 5 min, at room temperature, to

286 dissolve the precipitate. The absorbance was monitored at 575 nm using a microplate  
287 spectrophotometer (Bio-Tek). Cytotoxicity was determined as a percentage of the  
288 maximum value after subtracting the background. The results were expressed as the  
289 percentage of each sample compared to the negative control (phosphate buffered saline pH  
290 7.4) and cell culture incubated in a lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, and  
291 0.1% Triton X-100) (28-30).

## 292 **Statistical analysis**

293 The results are presented as the mean  $\pm$  the SD. The statistical significance of the  
294 experimental results was determined by Student's *t*-test. Values of  $p < 0.05$  were considered  
295 statistically significant. Prism version 5.0 was used for all statistical analyses.

296

## 297 **Results**

298

### 299 **CST-resistant strain obtained**

300 Initially, the correlation of absorbance with CFU was established for *E. cloacae*  
301 (ATCC 49141) (see Fig. S1A in the supplemental material). From the correlational result,  
302 0.08 AU was determined to corresponded to  $5 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. This was used as the initial  
303 bacterial concentration applied in the antimicrobial susceptibility assays. Bactericidal  
304 activity was verified using 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of CST (see Fig. S1B). In order to induce resistance to  
305 CST,  $\frac{1}{2}$  MIC (4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) was utilized for sequential growth of *E. cloacae*. All three  
306 resistant strains, isolated after sequential cultivation in the presence of CST, demonstrated a

307 considerable increase of CST tolerance growth in the presence of concentrations lower than  
308  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for R1 strain,  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for R2 and  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for R3 (see Fig. S2 A-C).  
309 The *E. cloacae* colonies isolated from sequential cultivation without antibiotic were named  
310 NR1, NR2, and NR3 and showed MIC of  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of CST, similar to ATCC (data not  
311 shown).

312

### 313 **Strain identification by MALDI-TOF MS and automated systems**

314 In order to confirm whether the selected bacterial colonies were indeed *E. cloacae*,  
315 several identifications techniques were performed. First, Bruker Biotyper MALDI-TOF  
316 mass spectrometry was applied for the rapid identification of all *E. cloacae* strains. The  
317 protein profiles of all *E. cloacae* strains (Figure 1) matched the protein profiles of *E.*  
318 *cloacae* 20105-2 CHB and *E. ludwigii* 16688T DSM strains present in the database with a  
319 log score greater than 2.0 for these two species. However, it is important to emphasize that  
320 all strains had a higher log score for *E. cloacae*. Although the score values obtained would  
321 imply little distinction between *E. cloacae* and *E. ludwigii* spectra, the parameters  
322 established by Mellmann *et al.* (1) confirm that differences in log score values higher than  
323 0.15 are sufficient to correctly identify the species as *E. cloacae*.

324 In order to corroborate the identity of the tested strains, two other methods were  
325 utilized: two automatic systems provided by VITEK® 2 and MicroScan® WalkAway®.  
326 Both microbiology automated methods confirmed that all strains included in this study  
327 were *E. cloacae* with a confidence level of 98%, and 99.99% for the VITEK and  
328 MicroScan equipment, respectively (data not shown).

329

### 330 **Distinguishing *E. cloacae* CST-susceptible and resistant strains**

331

332           Considering that CST-resistant strains showed an increased tolerance to this  
333 antibiotic, the possibilities of distinguishing between resistant and non-resistant strains  
334 were tested utilizing MALDI-TOF MS. These analyses were conducted in MALDI-TOF  
335 MS that could easily detect modifications in molecular masses. These alterations could  
336 have originated from mutations in the bacterial genome resulting in exchanges in amino  
337 acid sequences that would consequently modify the molecular masses of the corresponding  
338 gene product (31).

339           Initially it was verified that the controls strains named non- resistant (NR) have a  
340 small degree of distance from the original cell (ATCC 49141). However, both NR and  
341 ATCC49141 strains have a greater degree of distance from the CST-resistant strain (Figure  
342 2). This result indicates that these resistant strains present physiological differences that can  
343 be rapidly detected by MALDI-TOF MS, therefore hinting that MALDI-TOF MS used in  
344 conjunction with the Biotyper analysis software can not only serve for species identification  
345 but also to discriminate bacterial antibiotic resistance.

346

### 347 **Bacterial growth and cross-resistance evaluation**

348

349           In order to identify the standard of susceptibility of all *E. cloacae* strains [*E. cloacae*  
350 Original cell ATCC 49141; strains NR-CST (Non-Resistant 1, 2 or 3); R-CST (Resistant 1,

351 2 or 3)] to antibiotics of different classes, two methods were used: the automated and the  
352 diffusion disk. In such analyses, it was possible to verify that all strains have a similar  
353 susceptibility standard, except for CST. In this case, the resistance process was only  
354 observed in CST-resistant strains, as was expected (Table 1). These data suggest that the  
355 difference between CST-resistant and CST-susceptible strains was only reported for CST  
356 and not for other antibiotics. In summary, no cross-resistance was obtained for other  
357 antimicrobials tested here.

358         When clinical strains were challenged with antibiotics it was verified that both  
359 strains presented CST and  $\beta$ -lactam resistance. Additionally, both strains showed resistance  
360 to antibiotics not previously identified. While the 1437710 strain previously characterized  
361 at LACEN-DF as *Klebsiella pneumoniae*, carbapenemase also showed resistance to other  
362 antibiotics including tetracycline, tobramycin and piperacillin (Table 1), the 1383251 strain  
363 was also resistant to amikacin (Table 1), showing that both strains are multi-resistant to  
364 commercial antibiotics.

365

#### 366 **Synergy evaluation by checkerboard assay**

367         Initially, the CST MICs against CST resistant *E. cloacae* strain were determined  
368 showing MICs of  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for R1 strain,  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for R2 and  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for R3.  
369 Since the highest CST resistance was observed in *E. cloacae* R3, this strain was selected to  
370 perform synergistic assays. The *E. cloacae* R3 susceptibility was determined in the range  
371 between 2 and  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$  against CHL, vancomycin, erythromycin and ampicillin. The  
372 MIC observed for CHL treatment was  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Otherwise vancomycin, erythromycin

373 and ampicillin showed that the MIC was higher than 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . After MIC analyses, the  
374 synergism assays were performed using CST in combination with other antibiotics  
375 including CHL, vancomycin, erythromycin and ampicillin in the range of 2 to 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .  
376 Four combinations of CST and CHL showed synergistic activities against *E. cloacae* R3,  
377 while three combinations showed indifferent activities against this bacterium. In order to  
378 confirm the synergistic effect of CST and CHL, further analyses were conducted against  
379 two clinical *E. cloacae* strains: 1437710 and 1383251. These analyses showed similar  
380 synergistic effects of the combined CST and CHL treatment against these clinical strains  
381 and also in the sub-culture of *E. cloacae* ATCC 49141, which resulted in major resistant  
382 level to CST, named *E. cloacae* R3 (Table 2). CST combined with vancomycin,  
383 erythromycin and ampicillin was indifferent, not showing any synergistic effect against  
384 such bacterial strains (data not shown).

385

### 386 **Cell cytotoxicity assay**

387 In order to evaluate whether the combination of antibiotics proposed here could  
388 cause any damage to mammalian host-cells, cell line RAW 264.7 was incubated with  
389 different concentrations of CST and CHL alone and in combination. MTT assay revealed  
390 that the use of CHL at 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (4 x MIC) (Figure 3A) and CST (Figure 3B) reduced  
391 cell viability for ~39.7% ( $p < 0.01$ ) in comparison to the control. When cells were treated  
392 with 128  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  CST ( $p < 0.05$ ), the cell viability was reduced to 26.3%. Cells treated  
393 with CHL at lower concentrations showed a smooth cell viability reduction without  
394 statistical significance. The combination of CHL and CST in concentrations of 4 and 128

395  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  , respectively, decreased cell viability to 23.8% ( $p < 0.05$ ) (Figure 3C).  
396 Furthermore, the CHL and CST combination at concentrations of 8 and 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ,  
397 respectively, decreased cell viability to 25.3% ( $p < 0.05$ ) (Figure 3D).

398

## 399 **Discussion**

400

401 Infections caused by multi-drug-resistant *E. cloacae* strains are increasing  
402 worldwide (32). This situation has been aggravated by widespread dissemination and by  
403 difficulties in the precise identification of such species. Current phenotypical and molecular  
404 characterizations present difficulties in identifying six species of the Enterobacter genus  
405 including *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* and *E.*  
406 *nimipressuralis* (33).

407 In general, the discrimination of these species involves single-locus-based molecular  
408 methods like sequence analysis of *oriC*, *gyrB*, *rpoB* or *hsp60* genes which result in distinct  
409 genetic clusters. Nevertheless, not all clusters could be successfully assigned to a specific  
410 species (34). Other molecular methods described for accurate identification of these species  
411 involve comparative genomic hybridization analysis; in particular, its combination with  
412 multi-locus sequence analysis proved successful (35, 36). However, these approaches are  
413 time- and cost- and labor- consuming to be utilized in routine clinical analysis. For these  
414 reasons, the application of MALDI-TOF MS was sought as an alternative method in order  
415 to correctly confirm species identity (37).

416 In this study, the application of MALDI-TOF mass spectrometry and two automated  
417 systems, VITEK and MicroScan, confirmed that all strains identified are *Enterobacter*  
418 *cloacae*. These automated methods, routinely used in the clinical microbiology laboratory,  
419 allow for bacterial identification by colorimetric reaction analysis and fluorescence  
420 quantification (18, 38, 39). Each automated method compares tested samples to the  
421 database of each taxon given by the software, then provides a numerical probability  
422 calculation in order to qualify the identification level (18). All strains assayed were  
423 identified as *E. cloacae* as expected. A 98% rate of accuracy in identification was reported,  
424 which was described as an “excellent” level of confidence for identification according to  
425 the VITEK software.

426 Although, both automated methods have been efficient in identifying *E. cloacae*  
427 species, both require more time (24-48h) when compared to the utilization of MALDI-TOF  
428 MS, which is capable of identifying strains in a few minutes. Additionally, the use of the  
429 Biotype 100™ (BioMérieux) system and other conventional tests including biochemical,  
430 microbiological and molecular identification at the DNA and mRNA levels (40-42) is  
431 necessary in some cases for accurate identification. These results demonstrate that MALDI-  
432 TOF MS was successfully applied for the precise identification of species belonging to the  
433 *E. cloacae* complex, consequentially influencing the correct diagnosis and treatment of  
434 infectious diseases (3). In addition, MALDI-TOF MS analyses allowed for the distinction  
435 of susceptible and CST-resistant bacteria. Recent studies have demonstrated that MALDI-  
436 TOF MS analysis may be used to differentiate bacterial strains with resistance to a single  
437 antibiotic such as carbapenem-resistant *Bacteroides fragilis* (43), methicillin-resistant *S.*



438 *aureus* (44), *E. coli* resistant to streptothricin or streptomycin or kanamycin (45), and  
439 fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* (46).

440 In order to identify the susceptibility of strains to diverse antibiotics, four methods  
441 were utilized: the two automated methods (VITEK and MicroScan), the microdilution  
442 method and the diffusion disk method. In these analyses, all *E. cloacae* strains were verified  
443 to be resistant to penicillin, first-, second- and third-generations of cephalosporin,  
444 monobactam, ampicillin/sulbactam and amoxicillin/clavulanate (Table 1). According to Hilty  
445 *et. al* (47), *E. cloacae* is naturally resistant to penicillin, first- and second-generation  
446 cephalosporin and amoxicillin/clavulanic acid owing to the production of chromosomal  
447 AmpC  $\beta$ -lactamases (cAmpC). It is important to emphasize that all *E. cloacae* strains were  
448 susceptible to cefepime, a fourth-generation cephalosporin, which exerts a low level of  
449 activation of cAmpC enzymes. The hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring by these enzymes has  
450 previously been reported to be very low (47). These bacteria are susceptible to all  
451 carbapenems except ertapenem. This could occur since ertapenem has the addition of two  
452 different chemical groups, when compared to other carbapenems. First, ertapenem has a  
453 carboxyphenyl group, carbomoiipirrolidin amino-alkylthio, linked to a benzoate group at  
454 position 2 of the carbapenem ring, and second, a hydrogen is replaced by a methyl group at  
455 position 1 (48). These modifications confer greater increases in structural lipophilicity as  
456 well as an anionic charge to the molecules, clearly differentiating ertapenem from other  
457 carbapenems (48).

458 The difficulty in identification as well as the different virulence and resistance levels  
459 of *E. cloacae* complex is a challenge when deciding an appropriate choice of therapy.  
460 Pharmacodynamic studies have shown the risk of resistance increases with the use of CST

461 monotherapy, indicating that combined therapies should be considered for the clinical use  
462 of CST, both in terms of efficacy and preventing the development of resistance (49).

463 Many studies support the use of CST in combination with other antibiotics including  
464 cecropin A against clinical CST-resistant strains of *A. baumannii* (50). In other  
465 studies utilizing *A. baumannii* susceptible to CST, synergistic effects were demonstrated  
466 with use of CST with vancomycin or, trimethoprim, and also with trimethoprim and  
467 sulfamethoxazole (10). In these same studies a decrease of growth of CST-resistant strains  
468 of *A. baumannii* and *Klebsiella pneumonia* were also reported; however, synergistic effects  
469 in any combination were verified against CST-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains  
470 (10).

471 Previous studies evidenced other combinations of CST and other antibiotics of  
472 different classes against *A. baumannii* including therapy with CST plus tigecycline (51) as  
473 well as the triple combination of CST with rifampicin and imipenem (50) or meropenem  
474 (52). In addition, *in vivo* synergistic effects have been described with CST associated with  
475 rifampicin/imipenem/ciprofloxacin against multi-drug-resistant *P. aeruginosa*, but better  
476 synergistic effects were produced by combining CST and rifampicin. Moreover, the  
477 therapeutic potential of using CST combined with rifampicin in bactericidal activity against  
478 multi-drug-resistant strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* has also been reported (53,  
479 54).

480 For these reasons, the synergistic effects of CST with other antibiotics that differ  
481 greatly in physicochemical and biopharmaceutical properties in *E. cloacae* CST-resistant  
482 strains were evaluated here for the first time. The synergistic effects of CST (polymyxin) in

483 association with other antibiotics such as vancomycin (glycopeptide), erythromycin and  
484 ampicillin (both  $\beta$ -lactam) and CHL (protein synthesis inhibitor) were analyzed,  
485 demonstrating that the association of CST with  $\beta$ -lactams, erythromycin and ampicillin and  
486 a glycopeptide (vancomycin) was ineffective. A similar result was found in a previous  
487 study using vancomycin plus CST against CST-resistant *P. aeruginosa* strains (10).  
488 However, in this study, the combination of vancomycin with CST was effective against  
489 CST-resistant *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumonia* (10).

490         According O'Hara *et al.* (55), the synergistic effect could have occurred due to outer  
491 membrane damage caused by CST, which could have facilitated the entrance of large  
492 molecules including vancomycin. However, it is important to mention that the levels of  
493 CST tolerance can interfere in this response, since CST resistance found in Gram-negative  
494 bacteria had been associated with molecular modifications such as LPS modifications (12,  
495 56). This alteration could result in the reduction of the bacterial membrane's negative  
496 charge and consequently decrease the CST-LPS affinity (56). In summary, CST is not able  
497 to destabilize membranes and consequently vancomycin is unable to enter the bacterial  
498 cells. For this reason, the level of resistance could affect the synergistic activity of  
499 combined antibiotics.

500         It is important to emphasize that synergistic effects of CST in association with CHL  
501 against induced CST-resistant strains (R3) as well as clinical strains 1437710 and 1383251  
502 were observed here. Here, small quantities of CST ( $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and CHL ( $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) were  
503 capable of controlling the multi-resistant microorganisms, demonstrating that this  
504 combination could be utilized in clinical strategies to reduce collateral effects and  
505 antimicrobial costs, thus improving the effectiveness of clinical treatment. In general,

506 synergistic effects observed with CST and CHL combinations could have occurred due to  
507 the possible interaction of CST in the Gram-negative bacterial membrane, assisting in the  
508 input of CHL (CHL), which then probably bonded to a 50S ribosomal subunit, blocking  
509 vital bacterial functions like peptidultranferase activities. This obstruction could have led to  
510 an inhibition of amino acid transference from the A site to the P site of the tRNA,  
511 decreasing the end of translation and impeding the movement of a ribosomal substrate  
512 through the peptidultranferase center (57).

513 Previous studies have reported the susceptibility of *E. cloacae* to CHL alone (58) and  
514 in combination with ethyl acetate extract of *Salvia officinalis* (59). The activity of CHL in  
515 association with ethyl acetate extract of *Salvia officinalis* also decreases the growth of *S.*  
516 *aureus*, *Bacillus subtilis*, *K. pneumoniae*, *E. coli* and *Proteus mirabilis* (59). Moreover, the  
517 synergistic effect of CHL in association with P5, a hybrid peptide of cecropin and magainin  
518 2, is able to reduce *S. aureus* growth (60). It is important to emphasize that this peptide P5  
519 also showed synergistic effects in combination with isepamicin, an aminoglycoside that  
520 acts by inhibiting protein synthesis against antibiotic-resistant *P. aeruginosa* in patients  
521 with cholelithiasis (61). According to these authors, P5 acts on the bacterial cell wall and  
522 assists isepamicin in permeating the wall. These data corroborate with the hypothesis that  
523 the combination of AMPs, including CST with a protein synthesis inhibitor can reduce  
524 bacterial development by allowing CHL greater access to the cell interior. It is noteworthy  
525 that some studies demonstrated that others antibiotic combinations may promote synergistic  
526 effects against *E. cloacae* including the combination of imipinem and CST (15). Similar  
527 data was obtained by the combination of moxifloxacin, a fourth-generation fluoroquinolone

528 and piperacillin/tazobactam or additionally the combination of moxifloxacin with cefepime,  
529 a fourth-generation cephalosporin (62).

530 Additionally, the triple combination of CST with cefepime and amikacin, an  
531 aminoglycoside, has been used against *E. cloacae* cefotaxime-susceptible strains (63) as  
532 well as in combat of *E. cloacae* ceftazidime-resistant strains (64). In these two assays, the  
533 combination of these antibiotics caused a reduction of pulmonary infection caused by  
534 resistant and susceptible strains to thirty-generation cephalosporin (63, 64). In another  
535 study, a triple combination of CST and rifampicin and imipinem (65) have been reported as  
536 effective in controlling *E. cloacae* producer of metallo  $\beta$ -lactamases. These authors  
537 described that the combination of a drug that acts in cell walls plus another that acts in cell  
538 membranes, in association with a inhibit of DNA and RNA synthesis, is capable of  
539 eliminating the infection caused by these bacteria.

540 Considering that in some cases the combination of two or more antibiotics can cause  
541 toxic effects, the *in vitro* cytotoxicity was analyzed here. For this propose, RAW 264.7  
542 monocyte cells were used in order to evaluate the proposed therapy safeness. In these  
543 analyses, a reduction of approximately 40% of cell viability was observed when  
544 mammalian cells were treated with  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of CHL and CST concentrations. Similar  
545 results have been observed with the use of CHL at concentrations higher than  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  
546 where 50% cytotoxicity was observed (17, 18, 23, 25).

547 However, when utilizing CHL and CST, in two combinations referent to synergistic  
548 effect as  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of CHL +  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of CST, or  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of CHL +  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of  
549 CST, cytotoxic effects to RAW 264.7 monocyte cells were not observed here. Thus, the

550 results obtained here strongly indicate that the combination of these two antibiotics could  
551 be a feasible strategy for allowing dose reductions for effective bacterial control with a  
552 concomitant reduction in the collateral toxic effects in mammalian cells.

553 In conclusion, the synergistic effects of CST with CHL against induced CST-resistant  
554 *E. cloacae* strains as well as against clinical multi-resistant strains were clearly  
555 demonstrated. The clinical application of these two antibiotics might be considered for  
556 infection control, since the synergistic effects could decrease the dose, treatment costs and  
557 toxic effects inherent to CST and CHL treatments.

558

#### 559 **Acknowledgements**

560 This study was supported by grants from CNPq, CAPES, FAPDF, EMBRAPA and UCB.

561

#### 562 **References**

- 563 1. **Mellmann, A., F. Bimet, C. Bizet, A. D. Borovskaya, R. R. Drake, U. Eigner, A.**  
564 **M. Fahr, Y. He, E. N. Ilina, M. Kostrzewa, T. Maier, L. Mancinelli, W.**  
565 **Moussaoui, G. Prevost, L. Putignani, C. L. Seachord, Y. W. Tang, and D.**  
566 **Harmsen.** 2009. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser  
567 desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification  
568 of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **47**:3732-3734.

- 569 2. **Kremer, A. N., and H. Hoffmann.** 2012. Subtractive hybridization yields a silver  
570 resistance determinant unique to nosocomial pathogens in the *Enterobacter cloacae*  
571 complex. *J. Clin. Microbiol.* **50**:3249-3257.
- 572 3. **He, G. X., C. Thorpe, D. Walsh, R. Crow, H. Chen, S. Kumar, and M. F.**  
573 **Varela.** 2011. EmmdR, a new member of the MATE family of multidrug  
574 transporters, extrudes quinolones from *Enterobacter cloacae*. *Arch. Microbiol.*  
575 **193**:759-765.
- 576 4. **Yang, F. C., J. J. Yan, K. H. Hung, and J. J. Wu.** 2012. Characterization of  
577 ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital. *J. Clin.*  
578 *Microbiol.* **50**:223-226.
- 579 5. **Heller, I., K. Grif, and D. Orth.** 2012. Emergence of VIM-1-carbapenemase-  
580 producing *Enterobacter cloacae* in Tyrol, Austria. *J. Med. Microbiol.* **61**:567-571.
- 581 6. **Panopoulou, M., E. Alepopoulou, A. Ikonomidis, A. Grapsa, E. Paspalidou,**  
582 **and S. Kartali-Ktenidou.** 2010. Emergence of VIM-12 in *Enterobacter cloacae*. *J.*  
583 *Clin. Microbiol.* **48**:3414-3415.
- 584 7. **Hornsey, M., M. J. Ellington, M. Doumith, G. Scott, D. M. Livermore, and N.**  
585 **Woodford.** 2010. Emergence of AcrAB-mediated tigecycline resistance in a clinical  
586 isolate of *Enterobacter cloacae* during ciprofloxacin treatment. *Int. J. Antimicrob.*  
587 *Agents* **35**:478-481.
- 588 8. **Nigro, S. J., and R. M. Hall.** 2011. GI<sub>sul2</sub>, a genomic island carrying the *sul2*  
589 sulphonamide resistance gene and the small mobile element CR2 found in the  
590 *Enterobacter cloacae* subspecies *cloacae* type strain ATCC 13047 from 1890,

- 591 *Shigella flexneri* ATCC 700930 from 1954 and *Acinetobacter baumannii* ATCC  
592 17978 from 1951. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:2175-2176.
- 593 9. **Coates, A. R., and G. Halls.** 2012. Antibiotics in phase II and III clinical trialsn.  
594 *Handb. Exp. Pharmacol.*:167-183.
- 595 10. **Vidaillac, C., L. Benichou, and R. E. Duval.** 2012. *In vitro* synergy of CST  
596 combinations against CST-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*  
597 *aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*  
598 **56**:4856-4861.
- 599 11. **Zucca, M., S. Scutera, and D. Savoia.** 2011. New antimicrobial frontiers. *Mini*  
600 *Rev. Med. Chem.* **11**:888-900.
- 601 12. **Moffatt, J. H., M. Harper, P. Harrison, J. D. Hale, E. Vinogradov, T. Seemann,**  
602 **R. Henry, B. Crane, F. St Michael, A. D. Cox, B. Adler, R. L. Nation, J. Li, and**  
603 **J. D. Boyce.** 2010. CST resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by  
604 complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob. Agents Chemother.*  
605 **54**:4971-4977.
- 606 13. **Gordon, N. C., K. Png, and D. W. Wareham.** 2010. Potent synergy and sustained  
607 bactericidal activity of a vancomycin-CST combination versus multidrug-resistant  
608 strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:5316-5322.
- 609 14. **Gupta, S., D. Govil, P. N. Kakar, O. Prakash, D. Arora, S. Das, P. Govil, and A.**  
610 **Malhotra.** 2009. CST and polymyxin B: a re-emergence. *Indian J. Crit. Care Med.*  
611 **13**:49-53.



- 612 15. **Srivastava, S., and J. K. Ghosh.** 2013. Introduction of a lysine residue promotes  
613 aggregation of temporin L in lipopolysaccharides and augmentation of its  
614 antiendotoxin property. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:2457-2466.
- 615 16. **David, S. A.** 2012. Antimicrobial peptides for gram-negative sepsis: a case for the  
616 polymyxins. *Front. Immunol.* **3**:252.
- 617 17. **Lin, X. M., J. N. Yang, X. X. Peng, and H. Li.** 2010. A novel negative regulation  
618 mechanism of bacterial outer membrane proteins in response to antibiotic resistance.  
619 *J. Proteome Res.* **9**:5952-5959.
- 620 18. **Lo-Ten-Foe, J. R., A. M. de Smet, B. M. Diederens, J. A. Kluytmans, and P. H.**  
621 **van Keulen.** 2007. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, estest,  
622 broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for CST in  
623 clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter*  
624 *baumannii* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3726-3730.
- 625 19. **Kasiakou, S. K., A. Michalopoulos, E. S. Soteriades, G. Samonis, G. J.**  
626 **Sermaides, and M. E. Falagas.** 2005. Combination therapy with intravenous CST  
627 for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in  
628 patients without cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3136-3146.
- 629 20. **Shlaes, D. M.** 2013. New beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations in  
630 clinical development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**:105-114.
- 631 21. **Naghmouchi, K., J. Baah, D. Hober, E. Jouy, C. Rubrecht, F. Sane, and D.**  
632 **Drider.** 2013. Synergistic Effect between CST and Bacteriocins in Controlling

- 633 Gram-Negative Pathogens and Their Potential To Reduce Antibiotic Toxicity in  
634 Mammalian Epithelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:2719-2725.
- 635 22. **Wallace, S. J., R. L. Nation, J. Li, and B. J. Boyd.** 2013. Physicochemical aspects  
636 of the coformulation of CST and azithromycin using liposomes for combination  
637 antibiotic therapies. *J. Pharm. Sci.* **102**:1578-1587.
- 638 23. **Olofsson, S. K., and O. Cars.** 2007. Optimizing drug exposure to minimize  
639 selection of antibiotic resistance. *Clin. Infect. Dis.* **45 Suppl 2**:S129-136.
- 640 24. **Pomales-Lebron, A., and C. Fernandez.** 1952. A method for estimating the  
641 number of bacteria in liquids and tissues. *J. Bacteriol.* **64**:837-845.
- 642 25. **CLSI.** 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that  
643 grow aerobically, Approved Standard - 8th ed. CLSI document M07-A8. Clinical  
644 and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 645 26. **Peng, X., C. Xu, H. Ren, X. Lin, L. Wu, and S. Wang.** 2005. Proteomic analysis  
646 of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa*  
647 responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance. *J. Proteome Res.*  
648 **4**:2257-2265.
- 649 27. **CLSI.** 2010. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests,  
650 Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Clinical and  
651 Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 652 28. **Lopez-Abarrategui, C., A. Alba, O. N. Silva, O. Reyes-Acosta, I. M.**  
653 **Vasconcelos, J. T. Oliveira, L. Migliolo, M. P. Costa, C. R. Costa, M. R. Silva,**  
654 **H. E. Garay, S. C. Dias, O. L. Franco, and A. J. Otero-Gonzalez.** 2012.

- 655 Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived  
656 from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie* **94**:968-974.
- 657 29. **Silva, O. N., W. F. Porto, L. Migliolo, S. M. Mandal, D. G. Gomes, H. H.**  
658 **Holanda, R. S. Silva, S. C. Dias, M. P. Costa, C. R. Costa, M. R. Silva, T. M.**  
659 **Rezende, and O. L. Franco.** 2012. Cn-AMP1: a new promiscuous peptide with  
660 potential for microbial infections treatment. *Biopolymers* **98**:322-331.
- 661 30. **Pasupuleti, M., A. Schmidtchen, A. Chalupka, L. Ringstad, and M. Malmsten.**  
662 2009. End-tagging of ultra-short antimicrobial peptides by W/F stretches to  
663 facilitate bacterial killing. *PLoS One* **4**:e5285.
- 664 31. **Josten, M., M. Reif, C. Szekat, N. Al-Sabti, T. Roemer, K. Sparbier, M.**  
665 **Kostrzewa, H. Rohde, H. G. Sahl, and G. Bierbaum.** 2013. Analysis of the  
666 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrum of  
667 *Staphylococcus aureus* Identifies Mutations That Allow Differentiation of the Main  
668 Clonal Lineages. *J. Clin. Microbiol.* **51**:1809-1817.
- 669 32. **Kremer, A., and H. Hoffmann.** 2012. Prevalences of the *Enterobacter cloacae*  
670 complex and its phylogenetic derivatives in the nosocomial environment. *Eur. J.*  
671 *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**:2951-2955.
- 672 33. **Paauw, A., M. P. Caspers, F. H. Schuren, M. A. Leverstein-van Hall, A.**  
673 **Deletoile, R. C. Montijn, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2008. Genomic diversity  
674 within the *Enterobacter cloacae* complex. *PLoS One* **3**:e3018.
- 675 34. **Pavlovic, M., R. Konrad, A. N. Iwobi, A. Sing, U. Busch, and I. Huber.** 2012. A  
676 dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species

- 677 identification within the *Enterobacter cloacae* complex. FEMS Microbiol. Lett.  
678 **328**:46-53.
- 679 35. **Hoffmann, H., and A. Roggenkamp.** 2003. Population genetics of the  
680 nomenclature species *Enterobacter cloacae*. Appl. Environ. Microbiol. **69**:5306-5318.
- 681 36. **Pereira, C. L., J. C. Antunes, R. M. Goncalves, F. Ferreira-da-Silva, and M. A.**  
682 **Barbosa.** 2012. Biosynthesis of highly pure poly-gamma-glutamic acid for  
683 biomedical applications. J. Mater. Sci. Mater. Med. **23**:1583-1591.
- 684 37. **Perez, A., M. Poza, A. Fernandez, C. Fernandez Mdel, S. Mallo, M. Merino, S.**  
685 **Rumbo-Feal, M. P. Cabral, and G. Bou.** 2012. Involvement of the AcrAB-TolC  
686 efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*.  
687 Antimicrob. Agents Chemother. **56**:2084-2090.
- 688 38. **Barry, J., A. Brown, V. Ensor, U. Lakhani, D. Petts, C. Warren, and T.**  
689 **Winstanley.** 2003. Comparative evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert  
690 System (AES) in five UK hospitals. J. Antimicrob. Chemother. **51**:1191-1202.
- 691 39. **Winstanley, T., and P. Courvalin.** 2011. Expert systems in clinical microbiology.  
692 Clin. Microbiol. Rev. **24**:515-556.
- 693 40. **Risch, M., D. Radjenovic, J. N. Han, M. Wydler, U. Nydegger, and L. Risch.**  
694 2010. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically  
695 relevant bacteria. Swiss Med. Wkly. **140**:w13095.
- 696 41. **Munoz Bellido, J. L., S. Vega Castano, L. Ferreira, F. Sanchez Juanes, and J.**  
697 **M. Gonzalez Buitrago.** 2012. Proteomic applications in the Clinical Microbiology  
698 laboratory. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. **30**:383-393.

- 699 42. **Mezzatesta, M. L., F. Gona, and S. Stefani.** 2012. *Enterobacter cloacae* complex:  
700 clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* **7**:887-902.
- 701 43. **Wybo, I., A. De Bel, O. Soetens, F. Echahidi, K. Vandoorslaer, M. Van**  
702 **Cauwenbergh, and D. Pierard.** 2011. Differentiation of *cfiA*-negative and *cfiA*-  
703 positive *Bacteroides fragilis* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-  
704 time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **49**:1961-1964.
- 705 44. **Wolters, M., H. Rohde, T. Maier, C. Belmar-Campos, G. Franke, S. Scherpe,**  
706 **M. Aepfelbacher, and M. Christner.** 2011. MALDI-TOF MS fingerprinting  
707 allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
708 lineages. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**:64-68.
- 709 45. **Muroi, M., K. Shima, M. Igarashi, Y. Nakagawa, and K. Tanamoto.** 2012.  
710 Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass  
711 spectrometry for discrimination of laboratory-derived antibiotic-resistant bacteria.  
712 *Biol. Pharm. Bull.* **35**:1841-1845.
- 713 46. **Malakhova, M. V., V. A. Vereshchagin, E. N. Il'ina, V. M. Govorun, O.**  
714 **Filimonova, S. A. Grudinina, and S. V. Sidorenko.** 2007. MALDI-ToF mass-  
715 spectrometry in analysis of genetically determined resistance of *Streptococcus*  
716 *pneumoniae* to fluoroquinolones. *Antibiot. Khimioter.* **52**:10-17.
- 717 47. **Hilty, M., P. Sendi, S. N. Seiffert, S. Droz, V. Perreten, A. M. Hujer, R. A.**  
718 **Bonomo, K. Muhlemann, and A. Endimiani.** 2013. Characterisation and clinical  
719 features of *Enterobacter cloacae* bloodstream infections occurring at a tertiary care

- 720 university hospital in Switzerland: is cefepime adequate therapy? *Int. J. Antimicrob.*  
721 *Agents* **41**:236-249.
- 722 48. **Martinez, M. J., M. I. Garcia, E. G. Sanchez, and J. E. Sanchez.** 2010. Available  
723 carbapenems: Properties and differences. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **28** 53-  
724 64.
- 725 49. **Lim, L. M., N. Ly, D. Anderson, J. C. Yang, L. Macander, A. Jarkowski, 3rd,**  
726 **A. Forrest, J. B. Bulitta, and B. T. Tsuji.** 2010. Resurgence of CST: a review of  
727 resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy* **30**:1279-  
728 1291.
- 729 50. **Saugar, J. M., M. J. Rodriguez-Hernandez, B. G. de la Torre, M. E. Pachon-**  
730 **Ibanez, M. Fernandez-Reyes, D. Andreu, J. Pachon, and L. Rivas.** 2006.  
731 Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against CST-resistant clinical strains  
732 of *Acinetobacter baumannii*: molecular basis for the differential mechanisms of  
733 action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1251-1256.
- 734 51. **Peck, K. R., M. J. Kim, J. Y. Choi, H. S. Kim, C. I. Kang, Y. K. Cho, D. W.**  
735 **Park, H. J. Lee, M. S. Lee, and K. S. Ko.** 2012. In vitro time-kill studies of  
736 antimicrobial agents against blood isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter*  
737 *baumannii*, including CST- or tigecycline-resistant isolates. *J. Med. Microbiol.*  
738 **61**:353-360.
- 739 52. **Biancofiore, G., C. Tascini, M. Bisa, G. Gemignani, M. L. Bindi, A. Leonildi, G.**  
740 **Giannotti, and F. Menichetti.** 2007. CST, meropenem and rifampin in a

- 741 combination therapy for multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* multifocal  
742 infection. A case report. *Minerva Anesthesiol.* **73**:181-185.
- 743 53. **Tascini, C., G. Gemignani, S. Ferranti, E. Tagliaferri, A. Leonildi, A. Lucarini,**  
744 **and F. Menichetti.** 2004. Microbiological activity and clinical efficacy of a CST  
745 and rifampin combination in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*  
746 infections. *J. Chemother.* **16**:282-287.
- 747 54. **Timurkaynak, F., F. Can, O. K. Azap, M. Demirbilek, H. Arslan, and S. O.**  
748 **Karaman.** 2006. *In vitro* activities of non-traditional antimicrobials alone or in  
749 combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and  
750 *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int. J. Antimicrob.*  
751 *Agents* **27**:224-228.
- 752 55. **O'Hara, J. A., L. A. Ambe, L. G. Casella, B. M. Townsend, M. R. Pelletier, R.**  
753 **K. Ernst, R. M. Shanks, and Y. Doi.** 2013. Activities of Vancomycin-Containing  
754 Regimens against CST-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains.  
755 *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:2103-2108.
- 756 56. **Gunn, J. S.** 2008. The Salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide  
757 modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.*  
758 **16**:284-290.
- 759 57. **Xaplanteri, M. A., A. Andreou, G. P. Dinos, and D. L. Kalpaxis.** 2003. Effect of  
760 polyamines on the inhibition of peptidyltransferase by antibiotics: revisiting the  
761 mechanism of CHL action. *Nucleic Acids Res.* **31**:5074-5083.

- 762 58. **Traub, W. H., R. Haberle, and D. Bauer.** 1984. Characterization of two clinical,  
763 multiple-drug-resistant isolates of *Enterobacter cloacae*. *Chemotherapy* **30**:308-  
764 321.
- 765 59. **Stefanovic, O. D., D. D. Stanojevic, and L. R. Comic.** 2012. Synergistic  
766 antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and  
767 antibiotics. *Acta Pol. Pharm.* **69**:457-463.
- 768 60. **Park, Y., S. N. Park, S. C. Park, S. O. Shin, J. Y. Kim, S. J. Kang, M. H. Kim,**  
769 **C. Y. Jeong, and K. S. Hahm.** 2006. Synergism of Leu-Lys rich antimicrobial  
770 peptides and CHL against bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**:24-32.
- 771 61. **Park, S. C., Y. Park, and K. S. Hahm.** 2011. The role of antimicrobial peptides in  
772 preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *Int. J.*  
773 *Mol. Sci.* **12**:5971-5992.
- 774 62. **Jung, R., M. Husain, M. K. Choi, and D. N. Fish.** 2004. Synergistic Activities of  
775 Moxifloxacin Combined with Piperacillin-Tazobactam or Cefepime against  
776 *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Acinetobacter baumannii*  
777 Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1055-1057.
- 778 63. **Mimoz, O., A. Jacolot, C. Padoin, J. Caillon, K. Louchahi, M. Tod, K. Samii,**  
779 **and O. Petitjean.** 1997. Cefepime and amikacin synergy against a cefotaxime-  
780 susceptible strain of *Enterobacter cloacae* *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob.*  
781 *Chemother.* **39**:363-369.



- 782 64. **Mimoz, O., A. Jacolot, C. Padoin, M. Tod, K. Samii, and O. Petitjean.** 1998.  
783 Cefepime and amikacin synergy *in vitro* and *in vivo* against a ceftazidime-resistant  
784 strain of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**:367-372.
- 785 65. **Tascini, C., L. Urbani, G. Biancofiore, G. M. Rossolini, A. Leonildi, G.**  
786 **Gemignani, M. L. Bindi, C. Mugnaioli, F. Filipponi, and F. Menichetti.** 2008.  
787 CST in combination with rifampin and imipenem for treating a blaVIM-1 metallo-  
788 beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* disseminated infection in a liver  
789 transplant patient. *Minerva Anestesiol* **74**:47-49.
- 790
- 791

792 **Figure Legends**

793

794

795 **Figure 1:** MALDI-TOF mass spectra of *E. cloacae* strain [(*E. cloacae* Original cell ATCC  
796 49141; strains NR-colistin (Non-Resistant 1, 2 or 3); R-colistin (Resistant 1, 2 or 3)]. The  
797 proteins were analyzed on a MicroFlex LT mass spectrometer in positive linear mode using  
798 the MBT method. Axis “Y” shows the intensity and axis “X” shows mass/charge.

799

800 **Figure 2:** MSP dendrogram obtained from “main spectra profiles” of *E. cloacae* strain [(*E.*  
801 *cloacae* Original cell ATCC 49141; strains NR-colistin (Non-Resistant 1, 2 or 3); R-colistin  
802 (Resistant 1, 2 or 3)].

803

804 **Figure 3:** Effect of antibiotics on cell viability. RAW264.7 was incubated for 24 h with  
805 different concentrations of antibiotics. Cell viability was measured following a standard  
806 MTT assay procedure. The mean absorbance of the control values representing 100% cell  
807 viability, and the mean absorbance of treated cells was related to control values to  
808 determine sensitivity. Error bars represent standard deviation from mean cell viability of  
809 three independent experiments performed in triplicate.

810

811

812

813

814 **Supplementary**

815

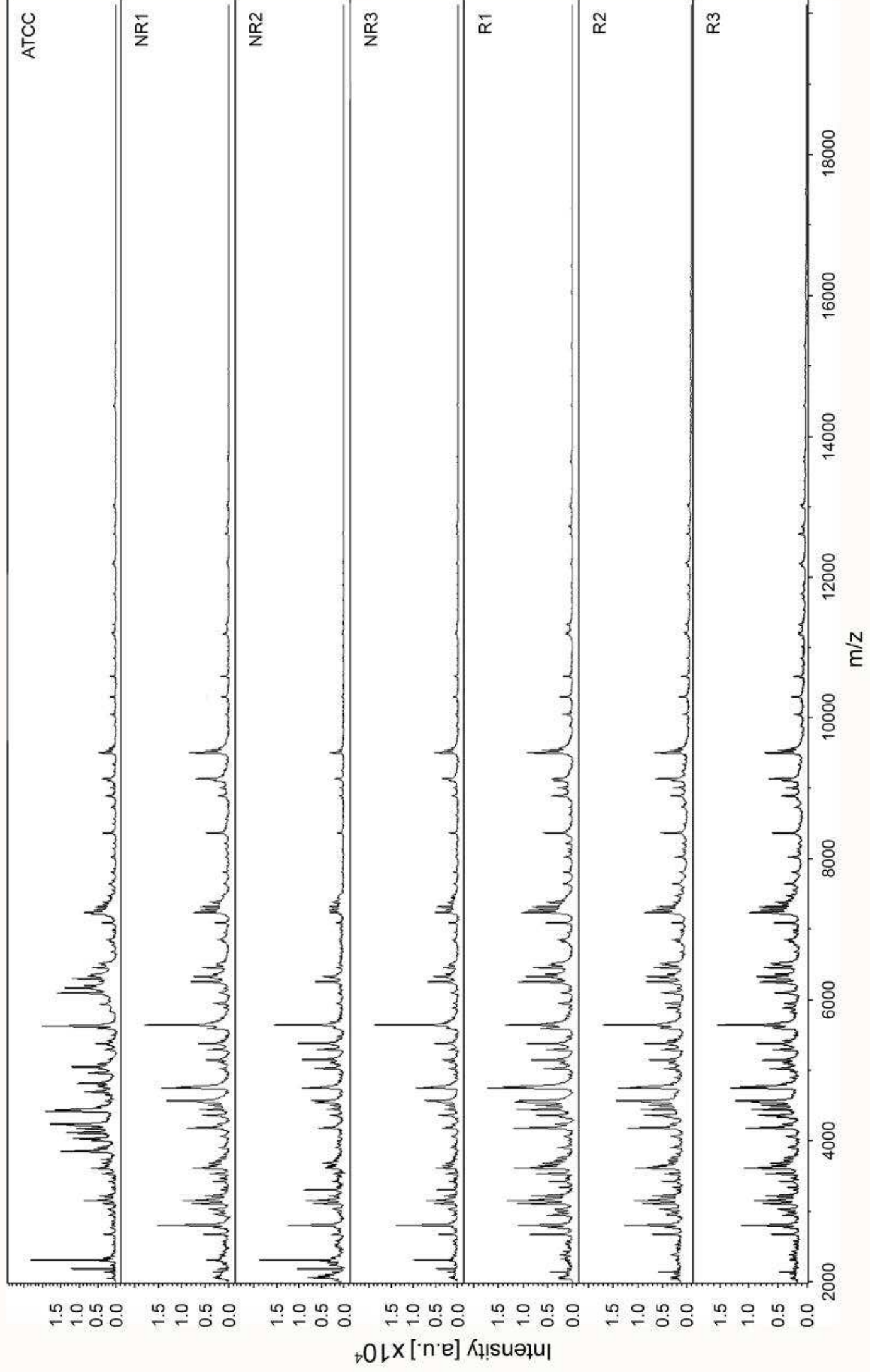
816

817 **Figure S1: A)** *Enterobacter cloacae* (ATCC 49141) growth curve. The curve was  
818 established in LB broth by measuring the optical density (OD) at 595 nm. Readings were  
819 monitored at 30 min intervals at a constant temperature (37°C) and with shaking (40 rpm);  
820 **B)** Evaluation of antimicrobial susceptibility of *E. cloacae* (ATCC 49141) to colistin  
821 sodium methanesulfonate was performed in LB broth supplemented with colistin at  
822 different concentrations (0-512 µg.mL<sup>-1</sup>). The mixture was incubated (37°C) for 15 h, and  
823 the suspension turbidity was monitored at 595 nm in a microplate reader. MilliQ water was  
824 used as a negative control. The experiment was performed in triplicate.

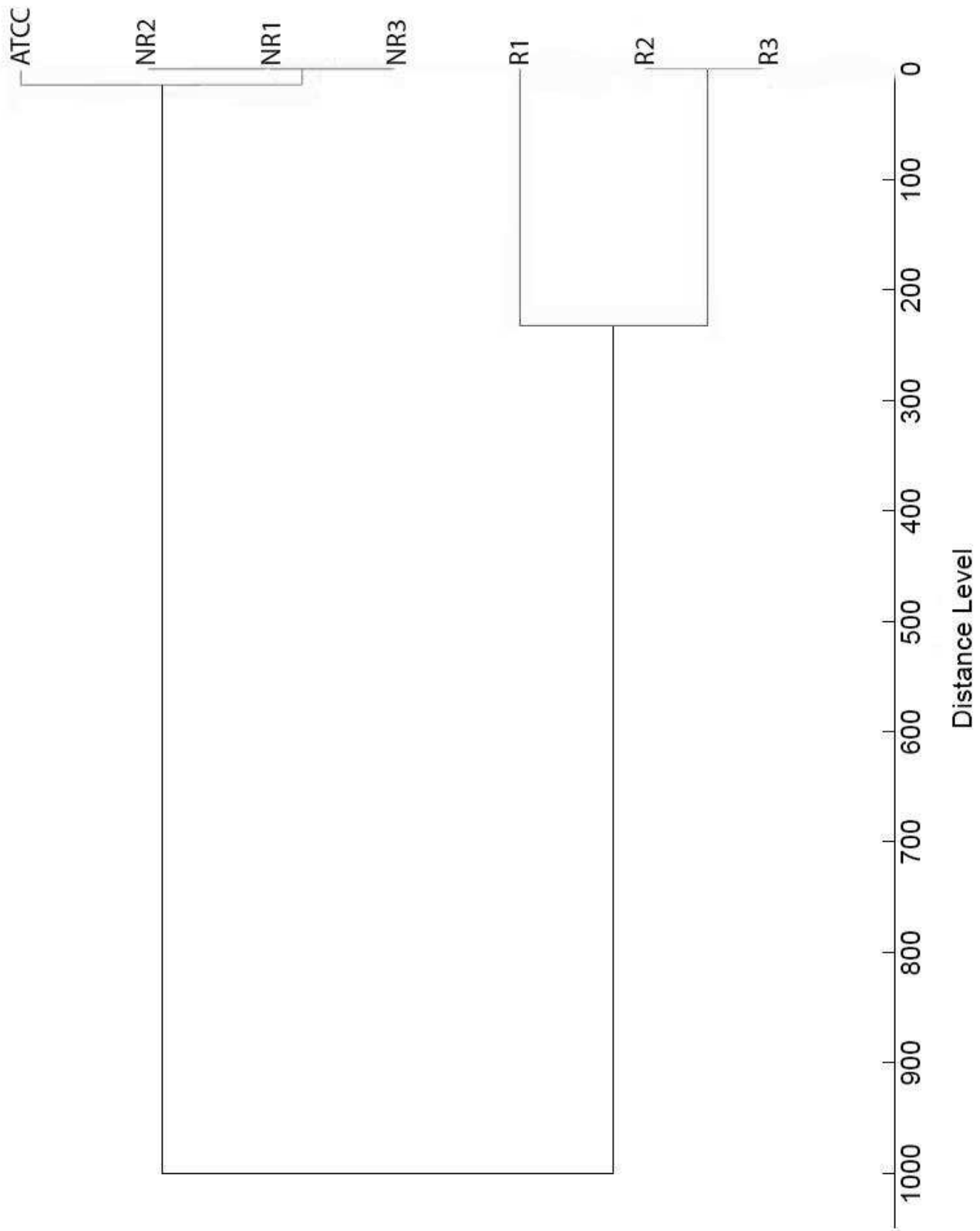
825

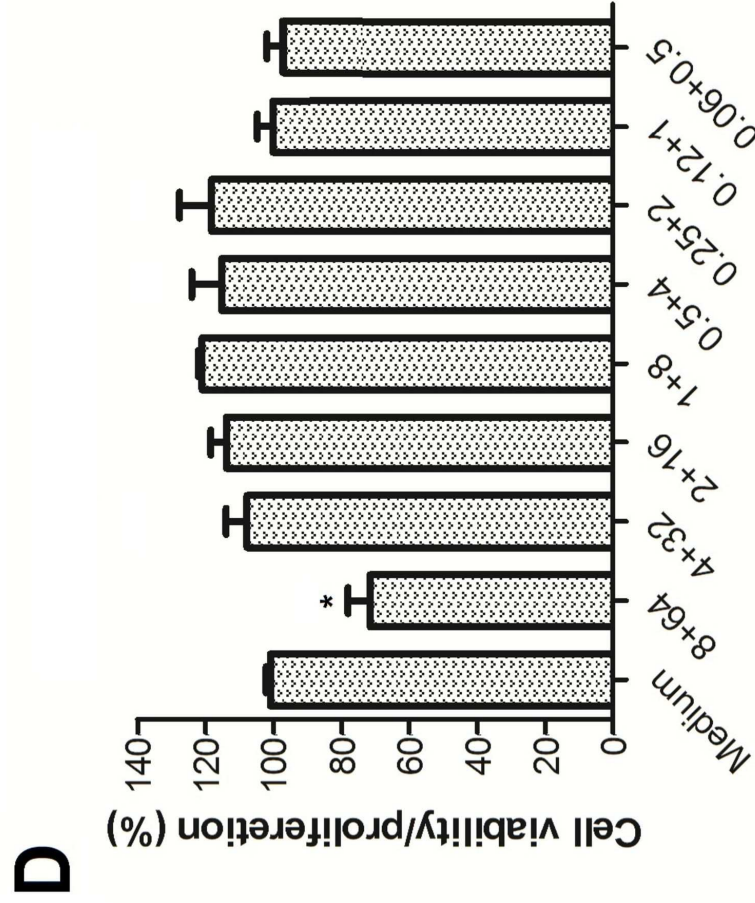
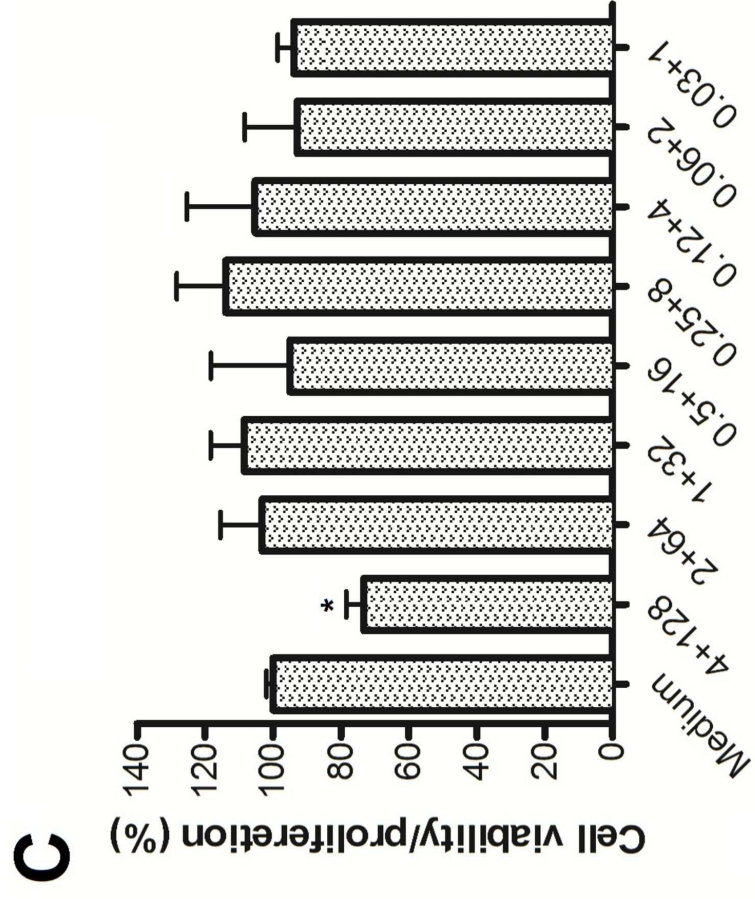
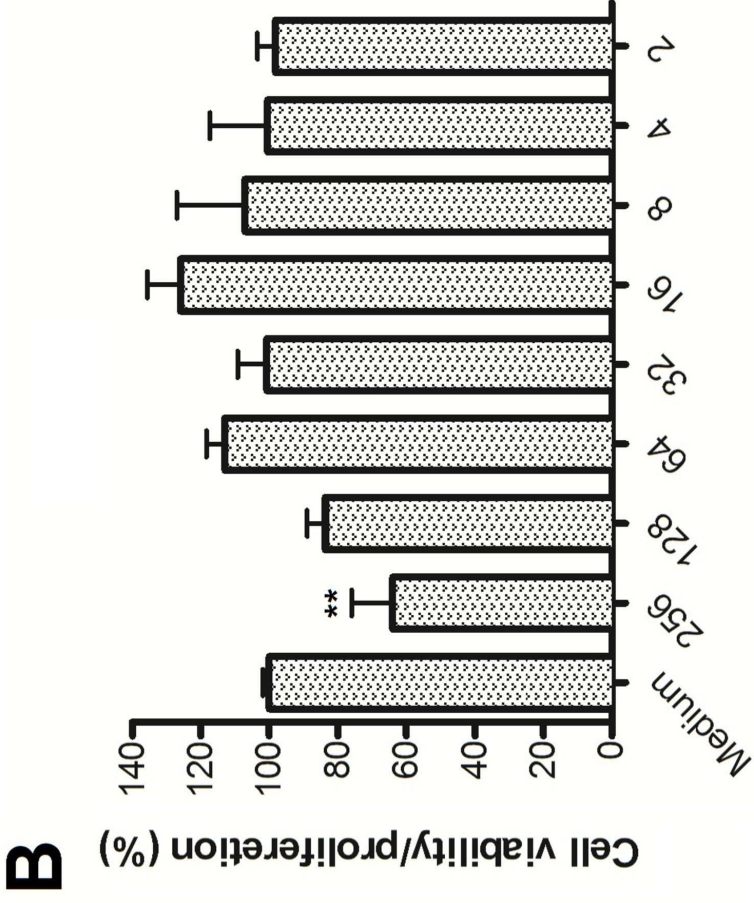
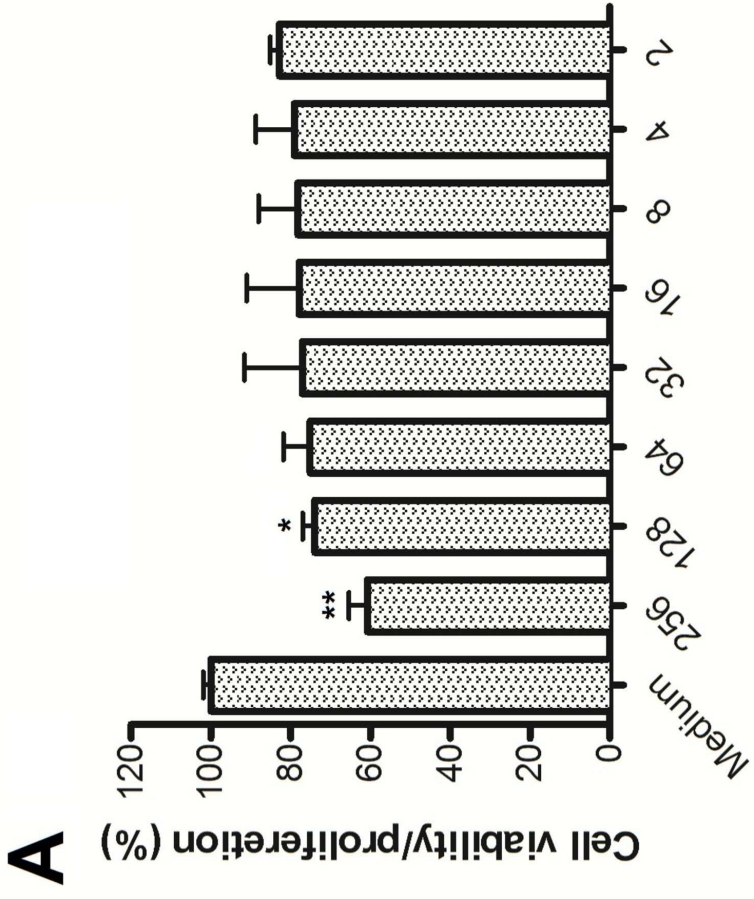
826 **Figure S2:** Evaluation of colistin-resistant *E. cloacae* antimicrobial susceptibility. Curves  
827 were established by measuring the optical density (OD) at 595 nm, which was monitored at  
828 30 min intervals in LB broth at a constant temperature (37°C) and with shaking (40 rpm).  
829 **A)** resistant 1 –R1; **B)** resistant 2 –R2; **C)** resistant 3 –R3.

830



**Figure 2**







Meropenem	S	S	R	S	S	I	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	I	-	R
Piperacillin	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	R
Piperacillin/Tazobactam	S	S	R	S	S	I	S	S	I	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	-	-
Tetracycline	-	S	S	-	S	S	-	S	S	-	S	S	-	S	S	-	S	S	-	S	S	-	R
Ticarcillin/Clavulanate	-	I	-	-	I	-	-	I	-	-	I	-	-	I	-	-	I	-	-	I	-	-	-
Tigecycline	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	-	-
Tobramycin	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	R
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	S	R

Results obtained according to the interpretive criteria of the CLSI M100-S21. V, VITEK® 2 (bioMérieux); M, MicroScan® WalkAway® (Siemens); D, disc diffusion test; –, not tested; ATCC, *E. cloacae* ATCC 49141 strain; NR1, NR2 and NR3, colistin susceptible *E. cloacae* strains; R1, R2 and R3, colistin resistant *E. cloacae* strains; S, sensitive; I, intermediate; R, resistant.





**Table 2.** Synergy evaluation of combination between colistin and chloramphenicol by checkerboard assay.

Antibiotic combination below of the MIC which inhibited the <i>E. cloacae</i> growth											
<i>E. cloacae</i> colistin resistant (R3)				<i>E. cloacae</i> clinical strain colistin resistant (1383251)				<i>E. cloacae</i> clinical strain KPC (1437710)			
COL	CHL	FICI	Interpretation	COL	CHL	FICI	Interpretation	COL	CHL	FICI	Interpretation
(µg/mL)	(µg/mL)	(COL+CHL)	(COL+CHL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(COL+CHL)	(COL+CHL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(COL+CHL)	(COL+CHL)
512	0		Inhibition of growth	512	0	MIC of COL	MIC of COL	512	0		Inhibition of growth
256	0	MIC of COL	MIC of COL	64	1	0.18	Synergism	128	0	MIC of COL	MIC of COL
64	1	0.31	Synergism	32	1	0.12	Synergism	32	8	0.26	Synergism
32	1	0.18	Synergism	16	1	0.09	Synergism	16	8	0.14	Synergism
16	2	0.18	Synergism	8	1	0.08	Synergism	8	16	0.09	Synergism
8	4	0.28	Synergism	4	4	0.26	Synergism	4	64	0.16	Synergism
0	16	MIC of CHL	MIC of CHL	0	16	MIC of CHL	MIC of CHL	0	512	MIC of CHL	MIC of CHL

The fractional inhibitory concentration index (FICI) of resistant *E. cloacae* R3 using the checkerboard technique. Colistin (COL), chloramphenicol (CHL). The FICI was calculated by the formula:  $FICI = (MIC \text{ of COL in combination with CHL} / MIC \text{ of COL alone}) + (MIC \text{ of CHL in combination with COL} / MIC \text{ of CHL alone})$ . The FICI was interpreted as follows: synergy ( $FICI < 0,5$ ), indifferent ( $0,5 > FICI < 4$ ) and antagonism ( $FICI > 4$ ).

**Investigating specific bacterial resistance to AMPs by using a magainin  
I-resistant *Escherichia coli* model**

**Running head: Magainin I resistance specificity**

Keyla C de Almeida<sup>1,2</sup>, Thais B Lima<sup>1</sup>, Dielle O Motta<sup>1</sup>, Osmar N Silva<sup>1</sup>, Beatriz S Magalhães<sup>1</sup>,  
Simoni C Dias<sup>1</sup> and Octávio L Franco<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Campus Avançado Asa Norte - SGAN 916 Avenida W5, Brasília- DF, Brasil - CEP: 70790-160.*

<sup>2</sup>*Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF, Brasil - CEP: 70910-900.*

Corresponding author: Octavio Luiz Franco - [ocfranco@gmail.com](mailto:ocfranco@gmail.com)

Phone number: +55 61 34487167/ +55 61 34487220 Fax number: + 55 61 33474797

Website: <http://www.capb.com.br>

## **Abstract**

Antimicrobial peptides (AMPs) are multifunctional compounds that may show antimicrobial and immunomodulatory activities. With the rapid increase in the incidence of multidrug resistant bacteria, there is an enormous interest in AMPs as templates for the production of new antibiotics. However, there are concerns that the therapeutic administration of AMPs can select resistant strains. In order to distinguish between resistant and non-resistant strains and verify resistance specificity to AMPs, in this study a magainin I-resistant *Escherichia coli* model was used. First, the identity of all strains was confirmed by MALDI-TOF MS, VITEK 2 and MicroScan, and the susceptible and magainin-resistant strains were successfully differentiated by MALDI-TOF MS analysis. Furthermore, cross-resistances to a broad spectrum of antibiotics were evaluated, showing that all *E. coli* strains are susceptible to the drugs tested, suggesting that the resistance seems to be specific to AMPs. Finally, the specific resistance to magainin I compared to other AMPs was checked by microdilution. This experiment showed that the magainin MICs were 62  $\mu\text{M}$  and 104  $\mu\text{M}$  for susceptible and resistant strains, respectively, the other AMPs MICs were 3.4  $\mu\text{M}$  to PR-39, 43  $\mu\text{M}$  to PMAP-23 and 1.2  $\mu\text{M}$  to cecropin P1 for all strains, demonstrating that no cross-resistance was developed, confirming that the resistance seems to be essentially specific to magainin I. In summary, the data reported here reinforce the proposal that magainin I seems not to be merely a membrane disruptor, showing different molecular targets in pathogenic bacteria.

**Keywords:** antimicrobial peptides/ *Escherichia coli*/ magainin I/ resistance specificity

## Introduction

There is an emerging global health concern: while bacteria increasingly adapt and develop mechanisms to become resistant to the broad spectrum of conventional antimicrobial drugs, the discovery and development of new antibiotic drugs is clearly in decline (1- 3). Infectious diseases caused by resistant bacteria are commonly associated with higher mortality and morbidity levels in hospitals worldwide (4- 6). This situation is made even worse by a poor pipeline for the discovery of new antibiotics to treat health care-associated multidrug-resistant Gram-negative infections such as in *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. and *Escherichia coli* (7).

For this reason, studies have started work on identifying target molecules that could be the focus for the development of new therapeutic drugs to combat resistant pathogens and to treat severe infectious diseases (8). In this context, the antimicrobial peptides (AMPs) commonly produced in the innate immunity response of most living organisms, *i.e.*, microorganisms, plants and animals, have been suggested as the future for antimicrobial therapies, being considered promising lead compounds for the development of new classes of antimicrobial drugs (7- 9).

AMPs are effective small polypeptides widespread among organisms ranging from the microorganism to humans (10- 12). Their mechanisms of action are not fully elucidated (8), but in general they are correlated with direct interaction on bacterial membranes to form pores leading to membrane disturbance and cell lysis (13, 14). However, several studies have shown other AMPs with different mechanisms of action, including varied strategies to kill pathogens, such as inhibition of DNA, RNA and protein synthesis, inhibition of membrane proteins and enzymes, activation of autolysins, interference in cell wall formation, formation of macropinosomes (15-18)

and immunomodulatory activities (19, 20), *i.e.*, angiogenesis, cytokine production, chemotactic function (21), histamine and prostaglandin release and modification of cell migration and maturation (13). The mechanisms of AMP action seem to be highly complex, and these mechanisms might work together to provide a potential antimicrobial activity.

The magainins isolated from a skin secretion of the African clawed frog *Xenopus laevis* (22), are  $\alpha$ -helical cationic peptides of 23 amino acids residue length with bactericidal activity. So far, the main proposed modes of action for magainins are correlated with the random insertion of the peptide hydrophobic regions into the bacterial membrane, forming pores, disturbing membrane stability and further causing cell membrane disruption (14, 23). However, the internalization of magainin by *E. coli* has been observed, suggesting a possible intracellular target and perhaps a different and more complex mechanism of action than only membrane pore formation (16).

Despite the complexity of AMPs' mechanism of action, resistance to AMPs after bacterial adaptation is emerging, as observed for *Salmonella enterica* with resistance to PR-39 (24) and *E. coli* resistant to magainin I (25). The latter one will be studied in this work to better understand bacterial acquired resistance to this compound before it occurs, which could mean better preparation for the development of a new generation of antibiotics. Therefore, in order to explore the mechanisms of action and resistance of AMPs, we sought a bacterial AMP-resistant model among susceptible and magainin I-resistant strains of *E. coli*. The *E. coli* strains were first differentiated between susceptible and resistant strains to magainin I by using MALDI-TOF MS analysis and then the level of resistance specificity to magainin I was evaluated and compared to other AMPs and antibiotic drugs.

## **Material and Methods**

### **Bacterial strains**

The magainin I susceptible and resistant strains were prepared from *E. coli* ATCC 8739 (American Type Culture Collection) as previously described (25). Briefly, a single colony of *E. coli* ATCC 8739 isolated by the streak method in Luria-Bertani (LB) solid medium was cultivated in LB broth at 37 °C, shaking at 240 rpm for 16 h in the absence or presence of magainin I at 0.5 x MIC (minimum inhibitory concentration) in order to induce resistance (26). After 10 successive propagations under the same experimental conditions, the colonies selected were grown in LB liquid medium at 37 °C and shaken at 240 rpm for 16 h; the inoculums were stored in sterile 10 % glycerol at -80 °C until the experiments. The bacterial suspensions stock of the magainin-resistant colonies were named R1, R2 and R3, and the control magainin-susceptible colonies were called C1, C2 and C3; these were used in all of the ensuing experiments.

### **Strain identification by automated microbiological systems**

The culture strains (*E. coli* C1, C2, C3 controls and R1, R2, R3 magainin-resistant strains) were propagated on LB agar plates and then sub-cultured on MacConkey agar plates at 37 °C for 16 h. After this, the bacterial inoculum for the MicroScan® WalkAway® system (Siemens) was prepared with a wand by the Prompt™ Inoculation System in a standard manufacturer's solution for all tested strains and the MC50 test panel wells were loaded with Renok rehydrating. The bacterial suspension for the VITEK® 2 system (bioMérieux) was prepared with 1-3 colonies from each strain diluted in 0.9 % saline. In the turbidity meter DensiChek® (bioMérieux), the turbidity was adjusted to 0.5 McFarland standard according to

manufacturer's directions, and this inoculum was immediately used to load the ID-GNBcard for Gram-negative identification. For bacterial identification via automated systems, the biochemical results obtained after sample incubation were compared against the taxonomic database from the software, and a numerical probability calculation was performed to determine a numerical value for proximity. Based on the numerical probability calculation, different confidence levels of identification were assigned, such as 96-99 % of probability, excellent; 93-95 %, very good; 89-92 %, good; 85-88 %, acceptable.

#### **MALDI-TOF MS strain identification**

In order to carry out identification of the strains and differentiate between resistant and susceptible, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and BioTyper software version 3.0 (Bruker) were used. The samples for MALDI-TOF MS were prepared as previously described (27). First, the *E. coli* magainin susceptible (C1, C2 and C3) and the *E. coli* magainin resistant (R1, R2 and R3) strains were cultured for 12 h at 37 °C in solid LB medium. Then six colonies of each strain were individually homogenized in 1 mL of 70 % ethanol. The suspensions were centrifuged at 13 000 g for 2 min and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 10 µL of 70 % formic acid and 100 % acetonitrile in a 1:1 ratio (v/v). Following homogenization, the samples were centrifuged at 13 000 g for 2 min. Then, 1 µL of the final supernatant was applied to a MALDI plate (Bruker Daltonics) and air dried at 25 °C, and a further 1 µL of a saturated matrix solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg. mL<sup>-1</sup>) in 0.3 % trifluoroacetic acid and 50 % acetonitrile was added. The samples were analyzed on a Microflex LRF mass spectrometer (Bruker Daltonics) using the MBT method in a



positive linear mode. More than 24 spectra of each strain were acquired over the m/z range of 2 000 to 20 000 for protein profile generation.

### **Bruker MALDI BioTyper spectral analysis**

The acquired spectra of each strain were smoothed; the baseline was corrected and compared against MALDI Biotyper database version 3.0, which contains 3995 reference microorganisms. The standard parameters of the pattern-matching algorithm were applied. The MALDI Biotyper breakpoints consist of a log (score) in the range 0–3.0 by comparing the peak list for an unknown strain with the reference database, and a score (log) near 2.0 is considered a good correlation within species level (28).

### **MSP dendrogram**

The 24 mass spectra acquired by MALDI TOF MS for each strain were used to construct a main spectrum profile (MSP) to allow bacterial differentiation between the susceptible and resistant *E. coli* strains to magainin I. The MSP dendrogram was performed using the standard parameters of the flexAnalysis software (Bruker Daltonics) considering the mass range from 3 000 to 15 000 Da with a resolution set to one, the factor of compression set to 10, tolerance of distance of 300, tolerance of peak 25, intensity correction function 0.25, the baseline subtracted and intensity smoothed by the Savitzky Golay algorithm. For the differentiation between resistant or susceptible, the MSP of the *E. coli* strains were compared with each other and they were clustered in an analysis tree.

### **Antimicrobial susceptibility assay via MicroScan and VITEK 2 systems**

The bacterial suspensions of all susceptible and magainin I resistant strains were prepared according to manufacturer's directions as described above in strain identification by automated microbiological systems. The antimicrobial susceptibility testing (AST) was performed using the MC50 test panel and the AST-N105 test card for MicroScan® WalkAway® system (Siemens) and VITEK® 2 system (bioMérieux), respectively. The broad spectrum of antibiotic resistance was tested for amikacin, ampicillin, amoxicillin/clavulanate, aztreonam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, cefazolin, ceftriaxone, cefuroxime, ciprofloxacin, gentamicin, levofloxacin, meropenem, imipenem, ertapenem, piperacillin, piperacillin/tazobactam, tetracycline, ticarcillin/clavulanate, tobramycin and trimethoprim/sulfamethoxazole via the MicroScan system and for amikacin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam, aztreonam, cephalothin, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, colistin, gentamicin, meropenem, imipenem, ertapenem and tigecycline via the VITEK 2 system. After incubation, the automated systems calculated the MIC for each antimicrobial tested and the strain was classified as susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R) according to the interpretative breakpoints for MIC described in the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) document M100-S22 (29).

### **Evaluation of AMP susceptibility**

Magainin I (Peptide 2.0 Inc, USA), cecropin P1, PMAP-23 (porcine myeloid antimicrobial 23-amino-acid peptide) and PR-39 (proline-arginine-rich 39-amino-acid peptide) (Hanhong Chemical, China) were synthesized by Fmoc method. These peptides were chosen according to two main characteristics. First, they are from the same family

of magainin I, the cathelicidins, and second, cecropin P1 and PMAP-23 have a similar magainin I mode of action. In contrast, PR-39 has a completely different mechanism of action, allowing the other AMPs and magainin I to be compared.

The lyophilized powder of these peptides was reconstituted in ultrapure sterile water and stored at – 80 °C until use. The concentration and purity (> 95% purity) were assessed by mass spectrometry analyses using an Autoflex Speed mass spectrometer (Bruker Daltonics) by the MBT method in a positive linear mode over the range of 500 to 5 000 Da (28). In order to determine the peptide's minimum inhibitory concentrations (MICs), all the *E. coli* strains were tested in a 96-well polypropylene microplate by broth microdilution method according to CLSI document M07-A9 (30). The bacterial suspension was inoculated to a final concentration of  $5 \times 10^5$  CFU. mL<sup>-1</sup> in LB broth containing increasing concentrations of the peptides at 1.2- 124 μM. Milli-Q water and LB without peptides were used as negative controls and chloramphenicol 99 μM was applied as a positive control. The plates were incubated at 37 °C for 12 h with stirring at 40 rpm and the endpoint of bacterial growth was measured at 595 nm. The experiment was performed in triplicate.

## **Results**

### **Strain identification by automated systems and MALDI-TOF MS**

In order to differentiate between the susceptible and resistant-magainin I *E. coli*, the strains C1-3 and R1-3 were first identified by the microbiology automatic systems VITEK® 2 and MicroScan® WalkAway® and also the Bruker Biotyper MALDI-TOF MS analysis. Using Vitek and MicroScan biochemical analysis, both types of equipment identified all the strains, resistant and susceptible to magainin I, identified as *E. coli*,

showing a confidence identification level of 95 % and 99.99 % provided by VITEK and MicroScan, respectively (data not shown).

The Bruker Biotyper MALDI-TOF mass spectrometry analysis was also applied for fast identification of the *E. coli* strains. All strains C1-3 and R1-3 analyzed in this work matched the protein profiles of the *E. coli* present in the database (Figure 1), consistent with a log pattern-algorithm score of 1.93, which is considered a reliable correlation within species levels.

### **Differentiating between the magainin I-resistant and susceptible *E. coli* strains**

After identifying strains and considering that magainin-resistant strains showed an increased tolerance to this AMP as established by Maria-Neto *et al.* (25), we decided to verify if MALDI-TOF MS analysis could distinguish the bacteria-resistant and non-resistant strains. The MALDI TOF MS analysis in positive linear mode from 2 000 to 20 000 Da demonstrated that all *E. coli* strains showed a similar protein profile among the resistant (R1, R2 and R3) and the susceptible strains (C1, C2 and C3), such as observed in the spectrum of each strain (Figure 1). Despite this similar pattern among the susceptible and resistant strains (Figure 1), some subtle differences must exist, which made it possible to differentiate bacteria-resistant strains. With such data, an MSP was constructed using flexAnalysis software to analyze all the 24 acquired spectra from each strain, and the results were compared in a cluster tree.

The MSP dendrogram showed that all the magainin-resistant strains (R1, R2 and R3) had been grouped in a different cluster from the susceptible strains. The result indicated that the resistant *E. coli* strains, R1, R2 and R3, have a clear degree of distance from susceptible controls *E. coli* C1, C2 and C3 (Figure 2), being grouped in different

branches, showing that subtle modifications in molecular masses from magainin I-resistant strains could probably be detected by this analysis.

### **Susceptibility to antimicrobial drugs**

To identify the susceptibility of the magainin-resistant and susceptible *E. coli* strains to the clinically available antibiotics automated systems, Vitek and MicroScan were applied. In this analysis of bacterial growth in the presence of different antibiotic concentrations according to the standard tests, the MICs of all strains were automatically calculated on both pieces of equipment for each antimicrobial agent tested (Table 1). The MIC results were interpreted according to CLSI (29) parameters, and Table 2 shows that all *E. coli* strains assayed are susceptible to the broad spectrum of antimicrobials tested. These data showed that the magainin-resistant strains did not differ from the magainin-susceptible strains in relation to their susceptibility to commercial antibiotic drugs, suggesting that the resistance observed in R1, R2 and R3 strains seems to be specific to antimicrobial peptides.

### **Evaluation of magainin I-resistant *E. coli* strains for susceptibility/resistance to AMPs**

Next, in order to evaluate if the resistance was specific to magainin I and not only to AMPs in general, three cationic antimicrobial peptides (CAMPs) were chosen for assays: PR-39, PMAP-23 and cecropin P1. These peptides were chosen to investigate specific resistance to magainin I since they are AMPs from the cathelicidin family, to which magainin I also belongs. Cecropin P1 and PMAP-23 have a mechanism of action similar to that of magainin, related to cell lysis mediated by pores in bacterial membranes (13, 14) and PR-39 was also selected because of its completely

different mechanism of action associated with the interruption of DNA and protein synthesis (24) (Table 3). These characteristics allow the comparison between magainin I and other antimicrobial peptides.

The resistance/susceptibility to AMPs of the *E. coli* magainin-resistant and susceptible strains were tested via broth microdilution method. The magainin MICs observed were 62  $\mu\text{M}$  and 104  $\mu\text{M}$  for magainin-susceptible strains (C1, C2, C3) and for magainin-resistant strains (R1, R2, R3), respectively (Table 4). The result denotes, as expected, that the R1, R2 and R3 strains of *E. coli* are resistant to this AMP. In addition, the other CAMPs MIC were 3.4  $\mu\text{M}$  to PR-39, 43  $\mu\text{M}$  to PMAP-23 and 1.2  $\mu\text{M}$  to cecropin P1 for both the magainin-resistant and susceptible strains (Table 4). According to this, no cross-resistance was developed by the magainin-resistant strains for the AMPs tested, and this shows that the resistance observed in R1, R2 and R3 strains seems to be essentially specific to magainin I. The resistance specificity to magainin, evaluated by AST and the microdilution method, demonstrates that this antimicrobial peptide seems not to be merely a membrane disruptor, probably having diverse other targets among pathogenic bacteria. The same could be concluded for the other peptides here evaluated.

## **Discussion**

The prevalence of pathogenic bacteria that are resistant to conventional antibiotic therapies and the growing problem of pathogenic organisms with multiple resistance to traditional antimicrobial agents have inspired a widespread search for new antibacterial agents. In this regard, AMPs may be promising because it is apparently difficult for bacteria to develop resistance to these, probably due to peptides' complex mechanisms of action (9, 31, 32).

In this work, the specificity of resistance to AMPs was investigated by using a magainin I-resistant bacterial model to contribute to a better understanding of magainin's mode of action and resistance. This model was provided by successive propagations with *E. coli* ATCC 8739 at the sub-inhibitory concentration of magainin I in accordance with Maria-Neto and co-workers (25), and in the final process the magainin I-resistant strains were obtained. The resistance to magainin I have begun to be deciphered and differences in global cellular behavior between susceptible and resistant strains have already been observed, suggesting that the magainin-resistant strains develop a general and unspecific defense system that could demonstrate a greater complexity of the magainin I mode of action not yet described in literature (25).

First, in order to identify precisely the *E. coli* strains used in this study, two microbiologic automated systems, the Vitek and MicroScan, and also MALDI-TOF MS confirmed that all the strains identified are *Escherichia coli*. The automated methods, known as expert systems, *i.e.*, VITEK® 2, BD Phoenix® and MicroScan® WalkAway® (33) are often applied in microbiology analysis and allow bacterial identification through a comparison between the colorimetric reaction and fluorescence quantification results obtained from classical biochemical analysis and the database available from the equipment software (34). Then, all the strains were identified as *E. coli*, as expected, with a 95 % score, which is considered very high accuracy for Vitek software, and a 99.99 % score, considered excellent confidence for MicroScan analysis.

Although both automated systems successfully identified all the strains assayed in about 24-48 h, we propose here the use of MALDI-TOF MS for rapid strain identification, which is capable of precisely identifying many strains in the same analysis in a few minutes. The use of this tool in the clinical laboratory allows rapid and

precise identification of the pathogens in infectious diseases, reducing costs and shortening the time to begin the chemotherapy (35, 36), increasing effectiveness and probably reducing therapeutic failure, which are severe problems in acquiring antibiotic resistance (3, 4).

In addition, the MALDI-TOF MS analyses allowed the distinction of susceptible and magainin I-resistant bacteria (Figure 2), which as far as we know is described here for the first time in the literature. This result demonstrated that the difference between the degree of distance from susceptible and resistant strains could be correlated with subtle physiological differences, allowing molecular mass modifications and difference in ions' intensity, which can be easily detected by MALDI-TOF MS analysis (37, 38).

Some studies have demonstrated the use of MALDI-TOF MS to rapidly discriminate between bacterial strains resistant to a single antibiotic or multiple antibiotics, such as observed for *Streptococcus pneumoniae* with different levels of resistance to ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin (39); for colistin-resistant *Enterobacter cloacae* as recently demonstrated by our group (27); for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains (38, 40); and for *E. coli* resistant to different antibiotics (38, 41). The data reported here showed for the first time the possible use of MALDI-TOF MS analyses to discriminate quickly between susceptible and AMP-resistant microorganisms.

With the aim of analyzing the resistance specificity to magainin I, the magainin-resistant and susceptible *E. coli* strains were tested on a broad spectrum of 27 antibiotic drugs routinely applied in clinical treatment from 11 distinct antimicrobial classes using the Vitek and MicroScan systems. These antibiotics tested have distinct mechanisms of action correlated with bacterial metabolism and the physiologic process, such as DNA replication, translation and biosynthesis of bacterial cell wall (8). The AST results



showed that all the magainin-resistant and susceptible strains were susceptible to all the antibiotics tested (Table 1 and 2), confirming that the resistance observed seems to be very specific to AMP.

A recent study by our group with the magainin-resistant *E. coli* strains was carried out in order to decipher the magainin I resistance process through a comparative proteomic analysis. It showed that there was a similar growth pattern between the susceptible and resistant strains and no cross-resistance observed for ampicillin, aztreonam, cephalothin, ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamicin, imipenem and tetracycline tested by a disk diffusion test. However, the most important protein differences in resistant strains were directed to improving cell energy maintenance (~ 49 % of differential identified cytosolic proteins), suggesting an intense energy metabolism in the magainin-resistant strains (25).

Data here reported open new possibilities about the understanding of bacterial resistance that is specific to AMPs. In this context, some questions were immediately raised, such as whether other peptides are effective against the magainin-resistant bacteria. In this work, we sought to better understand the specific resistance of *E. coli* to the magainin I AMP through susceptibility/resistance analysis for other AMPs.

The AMPs tested in this study, PMAP-23, cecropin P1 and PR-39 were chosen because they are included in the same peptide family as magainin, the cathelicidins. This family of cathelicidins, together with that of defensins, belongs to the large group of cationic functional peptides that interact with the microbial membrane through amphipathic properties (21, 42). Cathelicidins comprise a diverse group of small, primarily cationic peptides that are found in myeloid (also named myeloid antimicrobial peptides – MAP) and epithelial tissues, isolated from diverse organisms (21, 43) *i.e.*, the

cecropins from insect tissues (44), the magainins from frog skin (22) and cecropin P1 from a porcine nematode (45).

The cathelicidin family members vary in amino acid sequence (Table 3), structure and size (42, 46), and they have complex mechanisms of action, usually associated with their charge and hydrophobicity pattern, which enable bacterial membrane binding and control subsequent antimicrobial activity (47). In order to verify the specificity of resistance to magainin I, all magainin-resistant and susceptible strains were tested by microdilution with the cathelicidin family members, PR-39, PMAP-23, cecropin P1 and also magainin I. PMAP-23 (porcine myeloid antimicrobial peptide 23), identified from cDNA cloning encoding a putative AMP precursor of porcine bone marrow (48, 49) and cecropin P1, first isolated from the porcine small intestine nematode *Ascaris suum* (45, 50), are amphipathic alpha-helical peptides, composed of 23 and 31 amino acid residues, respectively. The PR-39 (proline-arginine-rich 39-amino-acid peptide), originally isolated from the porcine small intestine (51), is a linear antimicrobial peptide with 39 amino acid residues and an unusual high proline content (~ 49 %) and arginine (~26 %) residues (Table 3) (43). PR-39 AMP mediates bacterial killing via a mechanism that is not involved in pore formation and cell lysis, mainly through stereospecific interaction with bacterial cells, resulting in the interruption of DNA and protein synthesis (24, 43, 52) while the antimicrobial activity of PMAP-23 and cecropin P1 is related to the amphipathic helix interaction and penetration into the lipid bilayer bacterial membrane, forming pores and causing its disruption in a manner similar to that proposed for magainins (43, 53, 54).

Every peptide's mechanism of action described above, similarly to magainin mechanism of action (49, 55, 56), has been associated with the peptide structural conformation, allowing interaction with a bacterial cell either with or without

translocation across biological membranes (24, 43, 52). However, the microdilution results demonstrated that the magainin-resistant strains have not developed cross-resistance to the other AMPs tested (Table 4). These data suggest that the resistance seems to be specific to magainin I in all the resistant strains (R1, R2 and R3), since it was only reported for this AMP (Table 4).

The specific resistance to magainin I, surprisingly observed here, indicates that magainin's mechanism of action, so far proposed and related to forming toroidal pores in the bacterial membrane (56), is probably not as simple as previously thought, since the magainin-resistant *E. coli* strains do not become resistant to the other similar AMPs used. This behavior verified by the magainin-resistant *E. coli* model in this study, may mean a much greater complexity of the AMPs mode of action, in accordance with previous reports that both AMPs activity and resistance development seem not to be result of a single molecular mechanism. (25).

The precise AMPs mechanism of action still remains to be elucidated, and the understanding of AMPs properties can be of extreme importance for clinical development of peptide-based therapies. Thus this work, that proposed to understand the resistance specificity to AMP using a magainin-resistant bacteria model, contributes to the elucidation of the mode of action and the resistance specificity to magainin and even to other cationic AMPs yet not fully understood. Moreover, we expose that more research using different bacterial resistance models have to be explored for a complete knowledge of AMP mode of action and resistance. This perspective to better understand the specific resistance to AMP is very important once these peptides have high potential for clinical application as novel antimicrobial agents in the future to treat the emergent multidrug-resistant bacteria.

## Acknowledgements

This study was supported by grants from CNPq, CAPES, FAPDF and UCB.

## References

1. Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* **325**, 1089-1093 (2009).
2. Conly, J. M. Antimicrobial resistance programs in Canada 1995-2010. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **1**, 10-15 (2012).
3. Rosenthal, V. D. Health-care-associated infections in developing countries. *Lancet* **377**, 186-188 (2011).
4. Park, S. H. *et al.* Emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of community-onset bacteremia in South Korea: risk factors and clinical outcomes. *Microb. Drug Resist.* **17**, 537-544 (2011).
5. World Health Organization. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. WHO, Geneva, Switzerland (2011).
6. Karakoc, C., Tekin, R., Yesilbag, Z. & Cagatay, A. Risk factors for mortality in patients with nosocomial Gram-negative rod bacteremia. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**, 951-957 (2013).
7. Arias, C. A. & Murray B.E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century-a clinical super-challenge. *N. Engl. J. Med.* **360**, 439-443 (2009).
8. Lima, T. B. *et al.* Bacterial resistance mechanism: what proteomics can elucidate. *FASEB J.* **27**, 1-13 (2013).
9. Bocchinfuso, G., Bobone, S., Mazzuca, C., Palleschi, A. & Stella, L. Fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulations in studies on the

- mechanism of membrane destabilization by antimicrobial peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2281-2301 (2011).
10. Hancock, R. E. & Chapple, D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1317-1323 (1999).
  11. Candido, E. S. *et al.* Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB J.* **25**, 3290-3305 (2011).
  12. Fulmer, P. A., Lundin, J. G. & Wynne, J. H. Development of antimicrobial peptides (AMPs) for use in self-decontaminating coatings. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 1266-1270 (2010).
  13. Wiesner, J. & Vilcinskas, A. The ancient arm of the human immune system. *Virulence* **1**, 440-464 (2010).
  14. Huang, Y., Huang, J. & Chen, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell* **2**, 143-152 (2010).
  15. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238-250 (2005).
  16. Splith, K. & Neundorff, I. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *Eur. Biophys. J.* **40**, 387-397 (2011).
  17. Nguyen, L. T., Haney, E. F. & Vogel, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* **29**, 464-472 (2011).
  18. Pushpanathan, M., Gunasekaran, P. & Rajendhran, J. Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. *Int. J. Pept.* **13**, 1-15 (2013).
  19. Steinstraesser, L. *et al.* Innate defense regulator peptide 1018 in wound healing and wound infection. *PLoS ONE* **7**, 1-7 (2012).

20. Pena, O. M. *et al.* Synthetic cationic peptide IDR-1018 modulates human macrophage differentiation. *PLoS ONE* **8**, 1-10 (2013).
21. Steinstraesser, L., Kraneburg, U., Jacobsen, F. & Al-Benna, S. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology* **216**, 322-333 (2011).
22. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 5449-5453 (1987).
23. Imura, Y., Choda, N. & Matsuzaki, K. Magainin 2 in action: distinct modes of membrane permeabilization in living bacterial and mammalian cells. *Biophys. J.* **95**, 5757-5765 (2008).
24. Pranting, M., Negrea, A., Rhen, M. & Andersson, D. I. Mechanism and fitness costs of PR-39 resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2734-2741 (2008).
25. Maria-Neto S. *et al.* Deciphering the magainin resistance process of *Escherichia coli* strains in light of the cytosolic proteome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1714-1724 (2012).
26. Peng, X. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin and tetracycline resistance. *J. Proteome Res.* **4**, 2257-2265 (2005).
27. Lima, T. B. *et al.* Antibiotic combinations for controlling colistin-resistant *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* AAC01143-13R1. Article submitted in 10 August 2013.
28. Mellmann, A., *et al.* High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species

- identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3732-3734 (2009).
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22nd informational supplement. CLSI document M100-S22. CLSI, Wayne, PA (2012).
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 9th ed. Approved standard. CLSI document M07-A9. CLSI, Wayne, PA (2012).
31. Epanand, R. F. *et al.* Dual mechanism of bacterial lethality for a cationic sequence-random copolymer that mimics host-defense antimicrobial peptides. *J. Mol. Biol.* **379**, 38-50 (2008).
32. Mckenna, M. The last resort: Health officials are watching in horror as bacteria become resistant to powerful carbapenem antibiotics — one of the last drugs on the shelf. *Nature* **499**, 394-396 (2013).
33. Winstanley, T. & Courvalin, P. Expert systems in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 515-556 (2011).
34. Zbinden, A., Böttger, E. C., Bosshard, P. P. & Zbinden, R. Evaluation of the colorimetric Vitek 2 card for identification of Gram-negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2270-2273 (2007).
35. Tan, K. E. *et al.* Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3301-3308 (2012).

36. Van Veen, S.Q., Claas, E. C. J. & Kuijper, E. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 900-907 (2010).
37. Arnold, R. J. & Reilly, J. P. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **269**, 105-112 (1999).
38. Muroi, M., Shima, K., Igarashi, M., Nakagawa, Y. & Tanamoto, K. Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry for discrimination of laboratory-derived antibiotic-resistant bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 1841-1845 (2012).
39. Malakhova, M. V. *et al.* MALDI-TOF mass-spectrometry in analysis of genetically determined resistance of *Streptococcus pneumonia* to fluoroquinolones. *Antibiotic. Khimioter.* **52**, 7-10 (2007).
40. Charyulu, E. M., Gnanamani, A. & Mandal, A. B. Identification and discrimination of merhicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated burn wound sites using PCR and authentication with MALDI-TOF-MS. *Indian J. Microbiol.* **52**, 337-345 (2012).
41. Camara, J. E. & Hays, F. A. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1633-1638 (2007).
42. Kosciuczuk, E. M. *et al.* Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 10957-10970 (2012).
43. Sang, Y. & Blecha, F. Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 334-343 (2009).



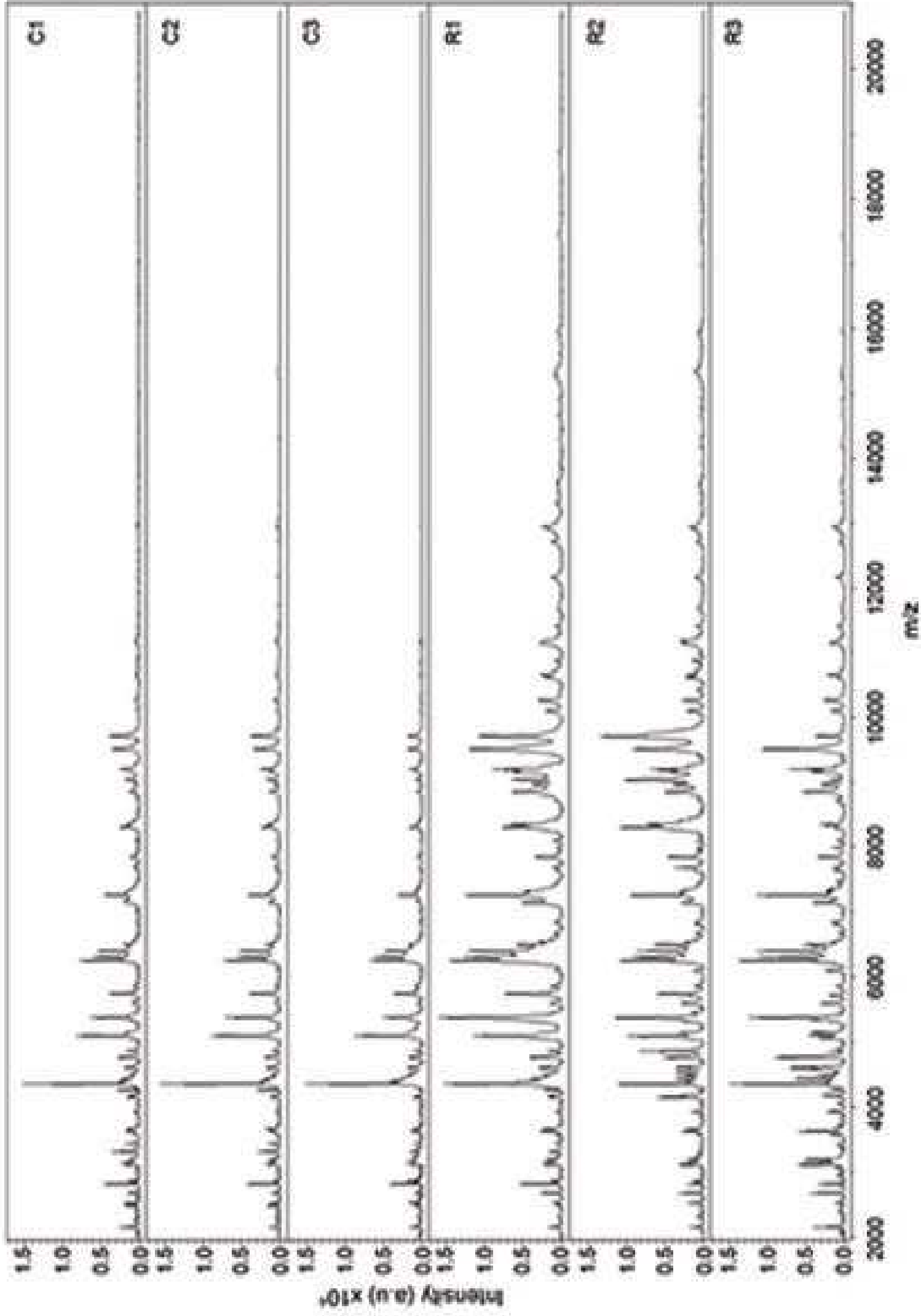
44. Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H. & Boman, H.G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246-248 (1981).
45. Lee, J.Y. *et al.* Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 9159-9162 (1989).
46. Epand, R. M. & Epand, R. F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *J. Pept. Sci.* **17**, 298-305 (2011).
47. Strauss, J., Kadilak, A., Cronin, C., Mello, C. M. & Camesano, T. A. Binding, inactivation and adhesion forces between antimicrobial peptides cecropin P1 and pathogenic *E. coli*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* **75**, 156-164 (2010).
48. Zanetti, M., Storici, P., Tossi, A., Scocchi, M. & Gennaro, R. Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antimicrobial peptide derived from pig myeloid cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 7855-7858 (1994).
49. Kim, J. Y., Park, S. C., Yoon, M. Y., Hahm, K. S. & Park, Y. C-terminal amidation of PMAP-23: translocation to the inner membrane of Gram-negative bacteria. *Amino Acids* **40**, 183-195 (2011).
50. Pillai, A., Ueno, S., Zhang, H., Lee, J. M. & Kato, Y. Cecropin P1 and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode *Ascaris suum*. *Biochem. J.* **390**, 207-214 (2005).
51. Agerberth, B. *et al.* Amino acids sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur. J. Biochem.* **202**, 849-854 (1991).
52. Hennig-Pauka, I. *et al.* PR-39, a porcine host defense peptide, is prominent in mucosa and lymphatic tissue of the respiratory tract in healthy pigs and pigs

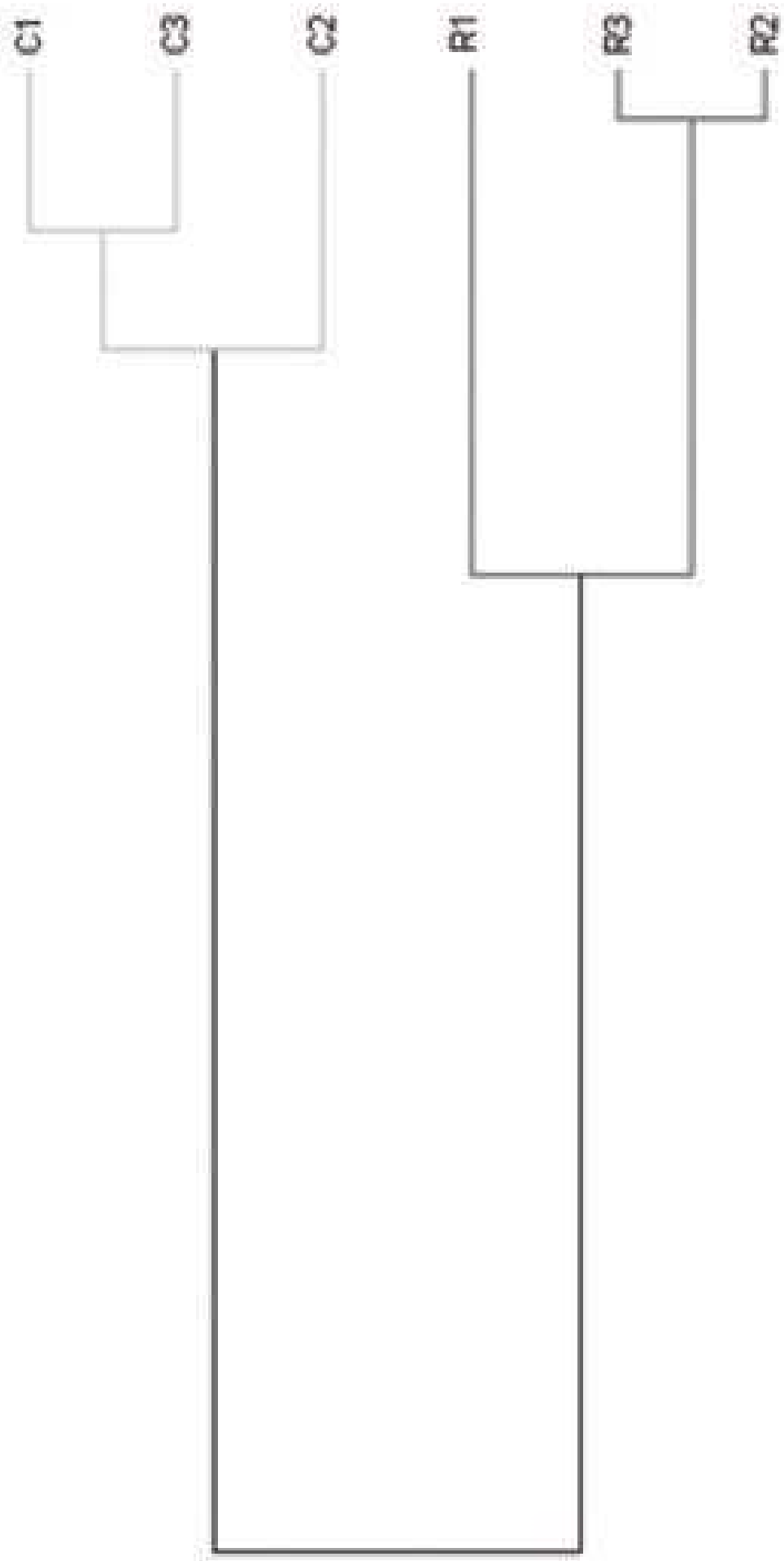
- infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Research Notes* **5**, 539-545 (2012).
53. Boman, H. G., Agerberth, B. & Boman, A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immun.* **61**, 2978-2984 (1993).
54. Arcidiacono, S., Soares, J. W., Meehan, A. M., Marek, P. & Kirby, R. Membrane permeability and antimicrobial kinetics of cecropin P1 against *Escherichia coli*. *J. Pept. Sci.* **15**, 398-403 (2009).
55. Lohner, K. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *Gen. Physiol. Biophys.* **28**, 105-116 (2009).
56. Amiche, M. & Galanth, C. Dermaseptins as models for the elucidation of membrane-acting helical amphipathic antimicrobial peptides. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**, 1184-1193 (2011).

## Figure Legends

**Figure 1.** MALDI-TOF mass spectra of *E. coli* strains. C1-3, magainin I susceptible control strains; R1-3, magainin I resistant strains. The proteins were analyzed on a Microflex LRF mass spectrometer in positive linear mode using the MBT method. Axis “Y” shows the intensity and axis “X” shows mass/charge.

**Figure 2.** MSP dendrogram obtained from “main spectra profiles” of *E. coli* strains (C1-3, magainin I susceptible control strains; R1-3, magainin I resistant strains).





**Table 1.** Comparison of minimum inhibitory concentrations (MICs) determined by VITEK 2 and MicroScan systems.

Antibiotic	Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )											
	<i>E. coli</i> magainin-susceptible strains						<i>E. coli</i> magainin-resistant strains					
	C1		C2		C3		R1		R2		R3	
	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS
Amikacin	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$
Amoxicillin/Clavulanate	-	$\leq 8/4$	-	$\leq 8/4$	-	$\leq 8/4$	-	$\leq 8/4$	-	$\leq 8/4$	-	$\leq 8/4$
Ampicillin	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$	$\leq 2$	$\leq 8$
Ampicillin/Sulbactam	$\leq 2/1$	-	$\leq 2/1$	-	$\leq 2/1$	-	$\leq 2/1$	-	$\leq 2/1$	-	$\leq 2/1$	-
Aztreonam	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$
Cephalothin	4	-	$\leq 2$	-	4	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	4	-
Cefazolin	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$
Cefepime	$\leq 1$	$\leq 8$	$\leq 1$	$\leq 8$	$\leq 1$	$\leq 8$	$\leq 1$	$\leq 8$	$\leq 1$	$\leq 8$	$\leq 1$	$\leq 8$
Cefotaxime	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
Cefoxitin	$\leq 4$	$\leq 8$	$\leq 4$	$\leq 8$	$\leq 4$	$\leq 8$	$\leq 4$	$\leq 8$	$\leq 4$	$\leq 8$	$\leq 4$	$\leq 8$
Ceftazidime	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
Ceftriaxone	-	$\leq 1$	-	$\leq 1$	-	$\leq 1$	-	$\leq 1$	-	$\leq 1$	-	$\leq 1$
Cefuroxime	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$
Ciprofloxacin	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$
Colistin	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-
Ertapenem	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$
Gentamicin	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 4$
Imipenem	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
Levofloxacin	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$	-	$\leq 2$
Meropenem	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$
Piperacillin	-	$\leq 16$	-	$\leq 16$	-	$\leq 16$	-	$\leq 16$	-	$\leq 16$	-	$\leq 16$
Piperacillin/Tazobactam	-	$\leq 16/4$	-	$\leq 16/4$	-	$\leq 16/4$	-	$\leq 16/4$	-	$\leq 16/4$	-	$\leq 16/4$
Tetracycline	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$
Ticarcillin/Clavulanate	-	$\leq 16/2$	-	$\leq 16/2$	-	$\leq 16/2$	-	$\leq 16/2$	-	$\leq 16/2$	-	$\leq 16/2$
Tigecycline	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$	-	$\leq 0.5$
Tobramycin	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$	-	$\leq 4$
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	-	$\leq 2/38$	-	$\leq 2/38$	-	$\leq 2/38$	-	$\leq 2/38$	-	$\leq 2/38$	-	$\leq 2/38$

V2, VITEK® 2 (bioMérieux); MS, MicroScan® WalkAway® (Siemens); -, not tested; C1, C2 and C3 – magainin I susceptible *E. coli* strains; R1, R2 and R3 – magainin I resistant *E. coli* strains. Numerical values are expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Table 2.** Antimicrobial susceptibility testing comparison interpretation of *Escherichia coli* strains by common antibiotic between VITEK and MicroScan systems.

Antibiotic	Susceptibility Interpretation											
	C1		C2		C3		R1		R2		R3	
	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS	V2	MS
Amikacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Amoxilin/Clavulanate	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Ampicillin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicillin/Sulbactam	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
Aztreonam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cephalothin	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
Cefazolin	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Cefepime	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxime	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefoxitin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ceftazidime	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ceftriaxone	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Cefuroxime	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Ciprofloxacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Colistin <sup>a</sup>	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
Ertapenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Levofloxacin	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Piperacillin	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Piperacillin/Tazobactam	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Tetracycline	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Ticarcillin/Clavulanate	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Tigecycline <sup>a</sup>	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
Tobramycin	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S

Results obtained according to the interpretive criteria of the CLSI M100-S23. V2, VITEK® 2 (bioMérieux); MS, MicroScan® WalkAway® (Siemens); C1, C2 and C3, magainin I-susceptible *E. coli* strains; R1, R2 and R3, magainin I-resistant *E. coli* strains; -, not tested; S, sensitive; <sup>a</sup> interpretative breakpoints obtained from software analysis since no parameters were found in CLSI 2012 and 2013 tables.

**Table 3.** Properties of cationic antimicrobial peptides tested in the *Escherichia coli* strains by broth microdilution test.

Peptides	Sequence	Molecular mass (Da)	Isolated source	Mechanism of action	References
Magainin I	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	2409	African frog <i>Xenopus laevis</i> skin secretion	Forming pore to bacterial membrane	(22, 25, 55, 56)
Cecropin P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGPR	3338	Porcine small intestine nematode <i>Ascaris suum</i>	Forming pore to bacterial membrane	(42, 43, 45, 50, 53, 54)
PMAP-23	RIIDLLWRVRRPQKPKFVTWVWR	2961	Porcine bone marrow	Forming pore to bacterial membrane	(42, 43, 48, 49)
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPP	4719	Porcine small intestine tissue	Interruption of DNA and protein synthesis and immunomodulatory functions	(42, 43, 51-53)



**Table 4.** Minimum inhibitory concentrations of distinct cationic antimicrobial peptides tested in the *Escherichia coli* strains.

Peptides	Minimum Inhibitory Concentrations ( $\mu\text{M}$ )						
	ATCC 8739	C1	C2	C3	R1	R2	R3
Magainin I	62	62	62	62	104	104	104
Cecropin P1	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
PMAP-23	43	43	43	43	43	43	43
PR-39	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4

The MICs were obtained by the broth microdilution method according to M07-A9 document (CLSI, 2012) with peptide concentrations ranging from 1.2 to 124  $\mu\text{M}$ ; *E. coli* original strain ATCC 8739; C1-3, magainin I susceptible control strains; R1-3, magainin I resistant strains; Milli-Q water and LB were used as negative controls and chloramphenicol 99  $\mu\text{M}$  was applied as a positive control. The experiment was performed in independent triplicates with  $1 \cdot 10^5$  UFC.  $\text{mL}^{-1}$  bacterial culture for 12 h at 37 °C.