

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

EDUARDA EMERICK GIANNI

**A EXPOSIÇÃO À GENTAMICINA PROMOVE REMODELAMENTO METABÓLICO  
COMO ESTRATÉGIA DE RESISTÊNCIA ADAPTATIVA EM *ESCHERICHIA COLI***

Brasília - DF

2026

EDUARDA EMERICK GIANNI

A EXPOSIÇÃO À GENTAMICINA PROMOVE REMODELAMENTO METABÓLICO  
COMO ESTRATÉGIA DE RESISTÊNCIA ADAPTATIVA EM *ESCHERICHIA COLI*

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Microbiana para a  
Defesa de Mestrado.

Orientadora: Dra. Tatiana Amabile de Campos

Brasília - DF

2026

“There’s always gonna be another mountain  
I’m always gonna wanna make it move  
Always gonna be an uphill battle  
Sometimes, I’m gonna have to lose  
Ain’t about how fast I get there  
Ain’t about what’s waiting on the other side  
It’s the climb.” (Miley Cyrus - The Climb)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, que toda honra e toda glória sejam a Deus. Se eu consegui chegar até aqui foi porque Ele tem me sustentado e guiado por todo o caminho. Sem Ele, nada disso seria possível. A minha fé nEle tem me ajudado a não desistir, apesar das dificuldades e empecilhos.

Gostaria de agradecer especialmente ao meu marido que sempre me apoiou, incentivou e me encorajou a perseguir meus sonhos. Obrigada por toda parceria nesses anos, por ser meu ombro amigo, conselheiro, torcedor e suporte. Obrigada por me acompanhar nas idas à UnB em horários não convencionais para fazer algum experimento, por abraçar todas as outras preocupações para que eu pudesse escrever de forma mais tranquila, e, principalmente, por acreditar em mim quando até eu duvidei. Sem você, esse processo teria sido muito mais difícil, obrigada por carregar o peso dele comigo.

Eu não seria a pessoa que sou hoje se não fosse pela minha mãe, Michelle, meu maior exemplo de mulher, esposa, mãe e profissional. Você fez o possível e o impossível para que eu pudesse chegar aqui e sou indescritivelmente grata por isso. Obrigada por ter sido a minha maior incentivadora nos estudos, por acreditar no meu potencial e por sempre investir em mim. O resultado desse trabalho também é um pouco seu. Também gostaria de agradecer ao Júnior e Davi, que mesmo não entendendo muito de biologia sempre me bombardearam de perguntas sobre o meu trabalho e o que eu fazia, obrigada pelo apoio e interesse. Vocês foram muito especiais nessa caminhada. Não só no mestrado, mas durante boa parte da minha jornada acadêmica. Agradeço também aos meus familiares que me ajudaram em diversos momentos e celebraram comigo momentos especiais. Obrigada a todos vocês por serem a minha base.

Gostaria de agradecer também a minha orientadora, Tatiana. Obrigada por ter aceitado me ensinar e me guiar com esse projeto completamente novo e diferente. Agradeço a oportunidade e confiança. Esse período foi marcado por batalhas pessoais, mas mesmo assim, você não me deixou desamparada e me ajudou na idealização desse projeto. Obrigada pelos ensinamentos que vão além da microbiologia.

Além disso, agradeço também ao pessoal do Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos, vocês foram essenciais nessa jornada. Em especial, agradeço a Rafaella, que além de companheira de laboratório se tornou uma amiga pessoal. Ela foi responsável por me ajudar a buscar artigos que me ajudassem a estruturar a ideia inicial deste trabalho, além de me ajudar constantemente com os protocolos, questionamentos e diversas dúvidas no decorrer da minha trajetória na microbiologia.

Agradeço também a todos aqueles que contribuíram de alguma forma com esse trabalho. Começando pela Professora Ana Flávia, agradeço pela parceria com a parte de proteômica, pelos ensinamentos e pela ajuda nas análises. Também agradeço ao Jaques, que colaborou de forma expressiva na parte do tratamento e análise das proteínas. A colaboração de vocês foi essencial para a realização deste projeto.

Agradeço às pessoas que fizeram parte da minha trajetória na UnB, amigos e professores. Especialmente às amigas que fiz durante a graduação, Ana, Roberta e Yasmim, obrigada por compartilharem comigo os melhores, mas também os momentos mais difíceis dos últimos sete anos. Passar por essa fase não teria sido a mesma coisa sem vocês.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília pela oportunidade de desenvolver este trabalho e contribuir com a ciência no Brasil. Foi um privilégio aprender com professores tão qualificados e experientes, que compõem o programa, através de aulas, seminários e apresentações.

Por fim, gostaria de agradecer à CAPES e à FAP-DF pelo investimento na formação acadêmica de profissionais.

## RESUMO

A resistência adaptativa (RA) aos antimicrobianos é observada quando bactérias são expostas a concentrações subinibitórias (CSI) desses medicamentos. A partir dessas condições, as bactérias podem se adaptar à presença do antimicrobiano e serem capazes de sobreviver e proliferar, inclusive, em concentrações inibitórias desses compostos. Concentrações antimicrobianas subinibitórias podem ser observadas quando o antimicrobiano é utilizado em desacordo à prescrição médica e/ou em ambientes aquáticos devido ao descarte destes medicamentos na rede de esgoto. Neste contexto, a RA contribui de forma significativa à resistência antimicrobiana (RAM), considerada um dos maiores problemas de saúde pública global pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O objetivo do presente trabalho foi induzir RA em linhagens de *Escherichia coli* associadas à infecção do Trato Urinário (uropatogênicas - UPECs) e avaliar os mecanismos fisiológicos associados à aquisição de RA. Para este fim, 3 linhagens (isolado clínico UPEC90 e duas referências CFT073 e J96), foram submetidas à incubação em meio de cultura contendo CSI de antimicrobianos. Foram testadas concentrações crescentes de antimicrobianos até a obtenção de culturas que permaneceram viáveis em cultivo com concentrações antimicrobianas inibitórias. Entre os antimicrobianos e as linhagens testadas, a UPEC90 foi selecionada por adquirir RA à concentração inibitória de Gentamicina (4,0 µg/mL). A linhagem adaptada resultante, denominada CBA UPEC90G4, apresentou maior taxa de crescimento e menor capacidade de formação de biofilme quando comparada à UPEC90. A análise do perfil de expressão diferencial de proteínas demonstrou que a exposição à Gentamicina desencadeou resposta metabólica associada ao metabolismo anaeróbio e superprodução da protease Lon, enzima que degrada proteínas mutadas ou truncadas. Em conjunto estas condições permitiram a sobrevivência da bactéria, uma vez que a Gentamicina necessita de ambiente aeróbio para ter atividade. Além disto, a protease Lon pode estar associada à degradação de proteínas disfuncionais produzidas em razão da ligação do antimicrobiano ao ribossomo bacteriano. Finalmente, os resultados obtidos permitiram identificar os mecanismos fisio-metabólicos associados à aquisição de RA por *Escherichia coli*.

**Palavras-chave:** Resistência aos antimicrobianos; Resistência adaptativa; Concentrações antimicrobianas subinibitórias; Mecanismos de resistência; *Escherichia coli* uropatogênica; Análise proteômica.

## **ABSTRACT**

Adaptive resistance (AR) to antimicrobials is observed when bacteria are exposed to subinhibitory concentrations (SIC) of these drugs. From these conditions, the bacteria can adapt to the presence of the antimicrobial and be able to survive and proliferate, even in inhibitory concentrations of these compounds. Subinhibitory antimicrobial concentrations can be observed when the antimicrobial is used in disagreement with a medical prescription and/or in aquatic environments due to disposal of these drugs in the sewage system. In this context, AR contributes significantly to antimicrobial resistance (AMR), considered one of the biggest global public health problems by the World Health Organization (WHO). The objective of this work was to induce AR in *Escherichia coli* lineages associated with urinary tract infection (uropathogenic - UPECs) and evaluate the physiological mechanisms associated with the acquisition of AR. For this purpose, 3 strains (clinical isolate UPEC90 and two references CFT073 and J96), were submitted to incubation in culture containing antimicrobial SIC. Increasing antimicrobial concentrations were tested until the obtaining of cultures that remained viable in culture with inhibitory antimicrobial concentrations. Among the antimicrobials and strains tested, UPEC90 was selected for acquiring AR at the inhibitory concentration of gentamicin (4.0 µg/mL). The resulting adapted lineage, called CBA UPEC90G4, showed higher growth rate and lower biofilm formation capacity when compared to UPEC90. The analysis of the differential protein expression profile showed that exposure to gentamicin triggered a metabolic response associated with anaerobic metabolism and overproduction of Lon protease, an enzyme that degrades mutated or truncated proteins. Together these conditions allowed the bacteria to survive, since gentamicin needs an aerobic environment to be active. In addition, the Lon protease may be associated with degradation of dysfunctional proteins produced due to antimicrobial binding to the bacterial ribosome. Finally, the results obtained allowed to identify the physio-metabolic mechanisms associated with the acquisition of AR by *Escherichia coli*.

**Keywords:** Antimicrobial resistance; Sub-inhibitory antibiotic concentrations; Adaptive resistance; *Escherichia coli* uropathogenic; Proteomic analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alvos celulares dos principais agentes antibacterianos .....	21
Figura 2. Curvas de crescimento de culturas de <i>Escherichia coli</i> adaptadas às CSI em cultivo em meio LB contendo os antimicrobianos Gentamicina, Cloranfenicol ou Polimixina B .....	37
Figura 3. Tempo de geração (g) da <i>Escherichia coli</i> UPEC90 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Gentamicina (0,1 µg/mL - 4,0 µg/mL) .....	42
Figura 4. Tempo de geração (g) da <i>Escherichia coli</i> CFT073 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Gentamicina (0,1 µg/mL - 4,0 µg/mL) .....	44
Figura 5. Tempo de geração (g) da <i>Escherichia coli</i> UPEC90 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Cloranfenicol (0,1 µg/mL - 0,4 µg/mL) .....	46
Figura 6. Tempo de geração (g) da <i>Escherichia coli</i> CFT073 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Cloranfenicol (0,1 µg/mL - 0,4 µg/mL) .....	47
Figura 7. Tempo de geração (g) da <i>Escherichia coli</i> J96 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Cloranfenicol (0,1 µg/mL - 0,4 µg/mL) .....	49
Figura 8. Tempo de geração (g) da <i>Escherichia coli</i> CFT073 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Polimixina B (0,1 µg/mL - 2,0 µg/mL) .....	50
Figura 9. Tempo de geração (g) da <i>Escherichia coli</i> J96 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Polimixina B (0,1 µg/mL - 2,0 µg/mL) .....	52
Figura 10. Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) obtidas após exposição das linhagens de <i>Escherichia coli</i> UPEC90S/A e CBAs UPEC90G1,6 e UPEC90G4 à concentração inibitória de Gentamicina 4,0 µg/mL por 60 minutos .....	54
Figura 11. Quantificação de biomassa de <i>Escherichia coli</i> aderida em superfície de poliestireno após 5 dias de incubação à 37°C .....	56
Figura 12. Ensaio de motilidade em meio LB (ágar 0,5%) das linhagens de <i>Escherichia coli</i> UPEC90S/A e CBA UPEC90G4, avaliado após 24 h e 48 h de incubação à 37°C .....	58
Figura 13. Proteínas identificadas pela análise LC-MS/MS e selecionadas estatisticamente (Teste T) para análises .....	60
Figura 14. Possíveis mecanismos de resistência adaptativa da <i>Escherichia coli</i> UPEC90G4 à Gentamicina .....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo de geração apresentado pelas linhagens de <i>Escherichia coli</i> cultivadas em LB contendo concentrações crescentes de antimicrobianos e em LB sem antimicrobianos .....	40
---	----

Tabela 2. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) em 1mL de meio LB após incubação de 1 hora em 4 µg/mL de Gentamicina .....	55
---	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de Classes de Antimicrobianos: Mecanismos de Ação e Mecanismos de Resistência correspondente .....	22
Quadro 2. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos antimicrobianos de acordo com os bancos americano (CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute) e brasileiro (BRCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) .....	28
Quadro 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos exibido por linhagens de <i>Escherichia coli</i> uropatogênicas .....	36
Quadro 4. Proteínas associadas ao metabolismo que apresentaram expressão diferencial (teste T < 0,05) entre a linhagem de <i>Escherichia coli</i> UPEC90S/A e CBA UPEC90G4 .....	60
Quadro 5. Proteínas associadas ao processamento da informação genética que apresentaram expressão diferencial (teste T < 0,05) entre a linhagem de <i>Escherichia coli</i> UPEC90S/A e CBA UPEC90G4 .....	66
Quadro 6. Proteínas associadas ao processamento da informação ambiental que apresentaram expressão diferencial (teste T < 0,05) entre a linhagem de <i>Escherichia coli</i> UPEC90S/A e CBA UPEC90G4 .....	67
Quadro 7. Proteínas associadas aos processos celulares que apresentaram expressão diferencial (teste T < 0,05) entre a linhagem de <i>Escherichia coli</i> UPEC90S/A e CBA UPEC90G4 .....	69
Quadro 8. Proteínas sem vias identificadas que apresentaram expressão diferencial (teste T < 0,05) entre a linhagem de <i>Escherichia coli</i> UPEC90S/A e CBA UPEC90G4 .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

BR-CAST: Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CB: Controle branco

CBA: Cultura bacteriana adaptada a antimicrobiano

CIM: Concentração inibitória mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CSI: Concentrações subinibitórias

DO: Densidade óptica

HUB: Hospital Universitário de Brasília

ITU: Infecção do Trato Urinário

LB: Meio de cultura Luria-Bertani

MDR: Multi-drug resistant

OMS: Organização Mundial de Saúde

RA: Resistência adaptativa

RAM: Resistência aos antimicrobianos

S/A: Sem antimicrobiano

UFC: Unidades formadoras de colônia

UNB: Universidade de Brasília

UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica

UPEC90S/A: Linhagem de *Escherichia coli* não submetida à indução de RA

UPEC90G1,6: Linhagem de *Escherichia coli* resultante da adaptação de UPEC90 à 1,6 µg/mL de Gentamicina

UPEC90G1,6: Linhagem de *Escherichia coli* resultante da adaptação de UPEC90 à 4 µg/mL de Gentamicina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	15
1.2. RESISTÊNCIA E TOLERÂNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	16
1.3. RESISTÊNCIA ADAPTATIVA.....	18
1.4. ANTIMICROBIANOS: MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	21
1.4.1. Aminoglicosídeos.....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
4.1. SELEÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS.....	27
4.2. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS..	27
4.3. INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA ADAPTATIVA.....	28
4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS.....	29
4.4.1. Curva de crescimento.....	29
4.4.2. Tempo de geração.....	29
4.4.3. Determinação da sobrevivência bacteriana após incubação em concentração inibitória de antimicrobiano.....	30
4.4.4. Ensaio de produção de biofilme.....	30
4.4.5. Ensaio de motilidade.....	30
4.4.6. Análises estatísticas da caracterização.....	31
4.5. ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR ABORDAGEM PROTEÔMICA.....	31
4.5.1. Preparo dos isolados bacterianos para extração de proteínas.....	31
4.5.2. Extração de Proteínas.....	31

4.5.3. Quantificação e Gel de Poliacrilamida.....	32
4.5.4. Purificação e Digestão.....	32
4.5.5. Dessalinização e Quantificação.....	33
4.5.6. LC-MS/MS.....	34
4.5.7. Análise de dados e estatística.....	34
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
5.1. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA ADAPTATIVA.....	36
5.2. DETERMINAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS ADAPTADAS (CBAs) À CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS.....	53
5.3. PRODUÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO.....	55
5.4. ENSAIO DE MOTILIDADE.....	57
5.5. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA CULTURA S/A E ADAPTADA.....	58
5.5.1. Extração de proteínas.....	58
5.5.2 Perfil diferencial de expressão de proteínas.....	59
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>75</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>9. APÊNDICE A - GEL APÓS EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2019, foi estimado que a resistência aos antimicrobianos foi responsável por 1,27 milhão de óbitos em escala global e contribuiu indiretamente com mais 4,95 milhões (MURRAY, 2022). A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou um relatório em 2022 com dados de 2020 sobre a situação da resistência aos antimicrobianos ao redor do mundo. Segundo esses dados, 8% dos isolados clínicos associados à sepse apresentaram resistência aos carbapenêmicos, uma classe de antimicrobianos utilizados como último recurso no tratamento. Entre aqueles associados às infecções do trato urinário (ITUs) (infecções bacterianas mais frequentes em humanos), alguns se mostraram resistentes aos antimicrobianos de primeira linha (ampicilina e co-trimoxazol) e segunda linha (fluoroquinolonas) (Global antimicrobial resistance and use surveillance system - GLASS report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.).

Esse preocupante cenário da resistência aos antimicrobianos foi significativamente agravado durante a pandemia de Coronavírus, quando houve um aumento significativo do uso de antimicrobianos. Entre as razões para esse aumento está o desconhecimento da doença e similaridade dos sintomas com outras doenças, como a pneumonia bacteriana, levando à prescrição de antimicrobianos mesmo sem confirmação de coinfeção bacteriana (HUTTNER, 2020). Em paralelo, a necessidade de ventilação mecânica em muitos casos também contribuiu para o aumento exacerbado de uso de antimicrobianos. Um estudo recente na Itália relatou um aumento no número de óbitos por sepse (de 4,9% em 2008, para 12,9% em 2022), em decorrência da disseminação de resistência aos antimicrobianos em razão da pandemia do SARS-CoV-2 (FEDELI, 2024). No Brasil, um estudo comparando a quantidade de isolados clínicos bacterianos, no período de 2019 a 2022, também destacou o aumento de estirpes resistentes entre os casos de infecções (ROCHA, 2023). Nesse mesmo estudo, foram observadas variações no consumo de antimicrobianos por pacientes hospitalizados tendendo para uma maior taxa de consumo durante a pandemia, fato que possivelmente contribuiu para a seleção de estirpes resistentes (ROCHA, 2023).

Além de constituir um problema de saúde pública, a resistência aos antimicrobianos (RAM) também gera um problema econômico, como descrito no relatório "Drug-resistant infections: a threat to our economic future" publicado pelo Grupo Banco Mundial em 2017. Pelas simulações, no melhor cenário, as perdas mundiais anuais associadas à RAM ultrapassarão 1 trilhão de dólares (R\$ 5 trilhões) a partir de 2030, e, atingirão 2 trilhões de dólares (R\$ 10 trilhões) em 2050. No pior cenário, os valores serão triplicados. Diferentemente

de crises financeiras comuns, os impactos possivelmente gerados pelo aumento de infecções provocadas por patógenos resistentes aos antimicrobianos causariam danos prolongados e mais desafiadores, além de déficits persistentes na produção econômica mundial (World Bank. 2017. “Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future.” Washington, DC: World Bank. License: Creative Commons Attribution CC BY 3.0 IGO).

Alguns patógenos representam uma ameaça maior do que outros devido a sua incidência na população humana e à quantidade de isolados clínicos resistentes. Por essa razão, em 2024, a OMS atualizou a lista de bactérias consideradas prioritárias para estudo e para desenvolvimento de novas alternativas de tratamento. Dentro dessa lista, foram elencados níveis de prioridade: crítica, alta e mediana (WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024).

No grupo de prioridade crítica estão as Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos, Enterobacterales resistentes a cefalosporina de terceira geração, *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos e *Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina. Enterobacterales é uma ordem de bactérias Gram-negativas, amplamente distribuídas na natureza e que podem ter potencial patogênico. Uma espécie que merece destaque nesse grupo é a *Escherichia coli*. Essa bactéria, de acordo com uma estimativa feita com dados de 2019, foi o patógeno responsável por mais mortes relacionadas a infecções causadas por isolados resistentes aos antimicrobianos naquele ano (MURRAY, 2022). Além disso, na Europa, é a causa mais frequente de bacteremia e infecções no trato urinário (European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019); já na Austrália, foi a bactéria Gram-negativa mais encontrada em culturas de sangue e urina (Australian Commission on Safety and Quality in Health Care - ACSQHC. AURA 2019: third Australian report on antimicrobial use and resistance in human health. Sydney: ACSQHC; 2019).

*Escherichia coli* tem relevância na saúde pública por ser uma bactéria capaz de causar diversos tipos de infecções em humanos e animais (aves e mamíferos), mas também é um dos principais microrganismos presentes na microbiota intestinal dos mesmos (POIREL, 2018). Essa espécie tem uma elevada capacidade de adquirir genes de RAM, principalmente por transferência genética horizontal. Esses genes podem estar associados à resistência às cefalosporinas, aos carbapenêmicos, aos aminoglicosídeos, às quinolonas e às polimixinas (POIREL, 2018). A resistência às cefalosporinas gera uma grande preocupação porque, devido

à sua ação de amplo espectro, é a classe de antimicrobianos mais comumente prescrita ao redor do mundo (BASSETTI, 2013). Em razão do seu impacto na saúde pública, essa bactéria foi escolhida como objeto de estudo para este trabalho.

### 1.1. *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, baciliforme, anaeróbica facultativa e não esporulante, presente na microbiota humana, de aves e mamíferos (BERG, 1996; GORDON; COWLING, 2003). Apesar de fazer parte da microbiota residente do ser humano, por vezes essa bactéria pode se apresentar patogênica, podendo gerar infecções intestinais, no trato urinário (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004) e causar meningite em neonatos (European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019). Já foram descritos alguns patótipos dessa espécie, dentre eles: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusa aderente (DAEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada com a meningite (MNEC) e *E. coli* extraintestinal (ExPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998; RUSSO; JOHNSON, 2000).

Os casos mais comuns de infecção relacionada a *E. coli* acometem o trato urinário e são chamadas de Infecções do Trato Urinário - ITU (FLORES-MIRELES, 2015). As ITUs podem ser classificadas como uretrite (uretra), cistite (bexiga), ureterite (ureter) ou pielonefrite se evoluírem para os rins. Além disso, infecções assintomáticas, chamadas de bacteriúrias, também podem acontecer (HEILBERG; SCHOR, 2003). As UPECs não são os únicos patógenos responsáveis por ITUs, mas de acordo com os dados epidemiológicos, são os principais responsáveis pelos casos complicados e mais simples da doença (FLORES-MIRELES, 2015).

Um trabalho realizado no Brasil analisou uroculturas de pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde - UBS e detectou crescimento de *E. coli* em 61,4% das culturas positivas (NATÁRIO, 2023). Outro trabalho, também no Brasil, analisou isolados coletados no Hospital Universitário de Recife e identificou que 27% das culturas positivas apresentaram bactérias resistentes à ciprofloxacina, sendo que a mais prevalente foi *E. coli* (LIMA, 2022). Em outra análise de uroculturas clínicas, *E. coli* foi a espécie mais presente, tendo sido identificada em 70% das amostras de urocultura positiva (MORAIS, 2021). Um levantamento

bibliográfico feito entre 2014 e 2020 dos dados clínicos de diversos estados brasileiros constatou que o microrganismo isolado na maioria dos casos foi *E. coli*.

UPECs apresentam elevados níveis de RAM, principalmente aos antimicrobianos utilizados como primeira linha de tratamento, como o beta-lactâmico ampicilina. Para este antimicrobiano, mais de 55% dos isolados apresentaram resistência (OLIVEIRA, 2021). Um estudo do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados clínicos de *E. coli* demonstrou um elevado número de colônias resistentes; 46,2% dos isolados apresentou resistência à ampicilina, 26% às fluoroquinolonas e ao sulfametoxazol+trimetoprim, 9,4% à cefalexina, 6,5% à cefuroxima e 0,6% à nitrofurantoína; 14,7% dos isolados foram classificadas como multirresistentes (GALVÃO, 2023). Esses dados reforçam a importância de *E. coli* no cenário da saúde pública e mostram o potencial para adquirir resistência.

## 1.2. RESISTÊNCIA E TOLERÂNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A exposição aos antimicrobianos causa uma pressão seletiva que favorece o crescimento de linhagens bacterianas resistentes. O aumento da prevalência de bactérias resistentes aos antimicrobianos está associado, entre outros fatores, ao uso inadequado desses medicamentos, muitas vezes devido à prescrição de antimicrobiano sem um antibiograma prévio, ao uso sem prescrição e à interrupção precoce do tratamento (MENÉNDEZ FRAGA, 2008). Um estudo feito em Ribeirão Preto (SP) mostrou que quase 80% dos pacientes não tiveram seus tratamentos guiados pelo antibiograma. A maior parte dos tratamentos é realizada pelo uso empírico de antimicrobianos de amplo espectro. Em poucas ocasiões, o tratamento é direcionado. A solicitação de antibiogramas é realizada apenas após falha terapêutica e não para o direcionamento do tratamento (PEREIRA, L., 2022). Um estudo feito na Espanha avaliou a incidência de erros de medicação nas unidades neonatais, ou seja, o uso incorreto de medicamentos que causa ou pode causar dano ao paciente. Foi relatado que mais da metade dos erros foram relacionados a medicações, mais frequentemente antimicrobianos. O antimicrobiano prescrito com mais erros no intervalo de administração foi a Gentamicina (ESQUÉ RUIZ, 2016). Outro fator problemático é a venda de antimicrobianos sem prescrição médica, uma prática recorrente em diversos países e que contribui para o uso incorreto dos antimicrobianos, além de aumentar a prevalência de bactérias resistentes (VERSPORTEN, 2014).

A RAM pode ser classificada de 3 formas: intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca se refere a características estruturais e/ou funcionais da bactéria que não

permitem que determinado antimicrobiano atinja seu alvo celular, como por exemplo: os antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos têm sua ação na parede celular das bactérias, contudo, bactérias como o *Mycoplasma spp*, que não possuem parede celular, são naturalmente resistentes a essa classe de antimicrobianos (ABUSHAHEEN, 2020). Na resistência adquirida, a transferência horizontal de genes caracteriza uma fonte importante de obtenção de mecanismos promotores de resistência, conferindo-lhes estratégias como: capacidade de modificar a estrutura de enzimas, impedindo a ligação de antimicrobianos à sítios específicos; inativar moléculas que servem como marcadores para os antimicrobianos e alterar a permeabilidade de membrana reduzindo o influxo e ativação de transportadores que aumentam o efluxo de compostos tóxicos, incluindo antimicrobianos (ABUSHAHEEN, 2020). A resistência adquirida também se dá pelo acúmulo de mutações que podem ocasionar um fenótipo resistente (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). A resistência adaptativa (RA), por sua vez, pode ser definida como mecanismo de sobrevivência à ação dos antimicrobianos obtida por meio da alteração da expressão gênica e/ou proteica de forma temporária (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). Os dois primeiros tipos de resistência (intrínseca e adquirida) são bem documentados na literatura, contudo a RA ainda é pouco explorada.

É importante ressaltar que não são apenas os microrganismos chamados de resistentes que podem sobreviver na presença de antimicrobianos. Existem também os chamados persistentes e os tolerantes. Os microrganismos persistentes representam subpopulações com a habilidade de sobreviver em ambientes contendo antimicrobianos por períodos prolongados, mesmo após a erradicação da maior parte da população. Essa capacidade de sobrevivência não é transmitida durante o processo de replicação (BRAUNER, 2016). Os microrganismos tolerantes, por sua vez, são populações que conseguem sobreviver na presença de antimicrobianos, mas não são capazes de se replicar. Ou seja, o ponto de diferenciação entre a resistência e a tolerância é a capacidade da bactéria se replicar em casos de resistência e sobreviver em caso de tolerância (KESTER; FORTUNE, 2014). Alguns autores também defendem que essa diferença está associada ao aumento na concentração inibitória mínima (CIM) nos organismos resistentes, já nos tolerantes e nos persistentes a elevação da CIM não acontece. A CIM é a menor concentração de antimicrobiano necessária para inibir o crescimento bacteriano (KESTER; FORTUNE, 2014). Todavia, o conceito de tolerância só pode ser aplicado para antimicrobianos bactericidas, capazes de matar bactérias, e não bacteriostáticos, capazes de inibir o crescimento (KESTER; FORTUNE, 2014).

O mecanismo de tolerância mais conhecido e identificado nos estudos é a redução da atividade metabólica da bactéria, acarretando em um crescimento mais lento e até mesmo atingindo estado de dormência. Essa redução do metabolismo pode ter como gatilhos diversos fatores estressantes, tais como: estresse oxidativo, escassez de nutrientes e a presença do antimicrobiano. Essa alteração pode também desencadear outras respostas protetivas, como o aumento da produção de bombas de efluxo, que ajudam a diminuir a concentração de antimicrobianos no interior da célula (BRAUNER, 2016).

### 1.3. RESISTÊNCIA ADAPTATIVA

Dentre as classes de resistência citadas anteriormente, a adaptativa é a que apresenta menos mecanismos descritos na literatura (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). Diferentemente dos outros dois tipos de resistência, a adaptativa é dependente da concentração de antimicrobiano, resultando em um fenótipo instável (SUAREZ; MARTINY, 2021). Uma das formas de RA é chamada de latente, sendo caracterizada pela mudança na expressão de alguns genes no momento da antimicrobianoterapia, o que resulta na resistência. Esse conjunto de genes é chamado de resistoma latente (PALMER; CHAIT; KISHONY, 2018).

Essa forma de resistência é descrita desde o século passado. Stickler induziu a resistência de *Proteus mirabilis* ao antisséptico Clorexidina. Os resultados demonstraram que ao inocular isolados clínicos desse microrganismo em meios com concentrações subinibitórias (CSI) do antisséptico, o valor da concentração inibitória mínima aumentou (STICKLER, 1974). Alguns anos depois, Nicas e Hancock testaram a suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* à polimixina B em meios com condições diferentes, colocando um dos grupos com déficit de íons magnésio e perceberam que as bactérias submetidas a essa condição tornavam-se 70 a 700 vezes mais resistentes ao antimicrobiano testado. Contudo, ao cultivar novamente em um meio com magnésio elas voltavam à suscetibilidade anterior, mostrando assim, uma possível associação a RA (NICAS; HANCOCK, 1980).

Na década de 90, Gould e colaboradores testaram o efeito antimicrobiano após o tratamento com ciprofloxacina pura e combinada com gentamicina em isolados clínicos de espécies Gram-negativas e Gram-positivas. Nesses testes observou-se uma redução na sensibilidade aos futuros tratamentos com antimicrobiano depois de previamente utilizado, e essa mudança era dependente da concentração utilizada na primeira exposição (GOULD; MILNE; JASON, 1990). No ano seguinte, esse mesmo grupo de pesquisadores fez um estudo similar, mas dessa vez usando gentamicina e ciprofloxacina e também observaram uma redução

da morte bacteriana no segundo tratamento. Essa redução foi associada com a RA (GOULD, 1991).

Também nessa década, Daikos e colaboradores induziram RA em *P. aeruginosa* para aminoglicosídeos expondo essa bactéria em CSI e inibitórias do medicamento. Foi observada resistência nos dois casos e a mesma se manteve enquanto o antimicrobiano estava presente no meio. Para reverter a resistência foram necessárias várias horas de incubação da bactéria na ausência do medicamento. A partir das observações, foi concluído que a exposição à concentrações contínuas de aminoglicosídeos pode não ser a terapia mais adequada e eficaz, sendo melhor optar por uma dose inicial maior e doses menores intervaladas (DAIKOS, 1990). Barclay e colaboradores testaram a RA a gentamicina usando doses únicas em um modelo *in vitro* dinâmico que mimetiza a farmacocinética *in vivo*. Nesse caso, eles testaram diferentes concentrações e foram realizando o decaimento após um período de horas, observando assim uma maior taxa de resistência nas bactérias que foram expostas à elevadas concentrações iniciais. Os autores também perceberam que a volta da suscetibilidade ocorreu em menos de 48 horas de experimento, fato esse que pode ser associado com as baixas concentrações de gentamicina nesse período (BARCLAY; BEGG; CHAMBERS, 1992).

Mais um estudo realizado com *P. aeruginosa* avaliou a RA e observou possíveis mudanças metabólicas: a redução da força próton-motriz e/ou uma mudança nas proteínas de membrana (KARLOWSKY, 1996). A partir desse momento, os estudos passaram a buscar os mecanismos envolvidos nessa resistência. Hostacká e Karelová observaram a redução na hidrofobicidade na superfície celular de *S. dysenteriae* tipo 1 depois da exposição a CSI de aminoglicosídeos (HOSTACKÁ; KARELOVÁ, 1997). Hocquet e colaboradores investigaram a importância da bomba de efluxo MexXY-OprM para a RA de *P. aeruginosa* aos aminoglicosídeos, demonstrando que durante a exposição ao meio com o antimicrobiano a bactéria aumenta rapidamente a expressão do transportador MexXY de maneira dose-dependente à concentração de antimicrobiano (HOCQUET, 2003).

Como uma forma de aprofundar a busca pelos mecanismos de resistência, os pesquisadores passaram a fazer análises utilizando abordagens ômicas. Skindersoe e colaboradores verificaram alterações na expressão de genes de *P. aeruginosa* quando exposta a concentrações não inibitórias de azitromicina, ceftazidima e ciprofloxacina (SKINDERSOE, 2008). Suzuki e seu grupo avaliaram que a RA é consequência de várias alterações, incluindo: genoma, transcritos e metabolismo. Nesse estudo eles identificaram a mudança na expressão de genes que podem impactar na resistência e, com isso, sugeriram que pode ser possível prever a

resistência pelo nível de expressão de alguns poucos genes (SUZUKI; HORINOUCI; FURUSAWA, 2014).

Em 2017, Yen e Papin sugeriram que a exposição prévia de uma bactéria a um determinado antimicrobiano pode influenciar o desenvolvimento de resistência quando ela é posteriormente exposta a outro antimicrobiano diferente. Em alguns casos, a adaptação a um segundo medicamento pode restaurar parcial ou totalmente a sensibilidade à primeira medicação. Com isso, os dois pesquisadores concluíram que é importante considerar a quais medicamentos uma população bacteriana pode ter sido previamente exposta, ao escolher um novo antimicrobiano para terapêutica (YEN; PAPIN, 2017).

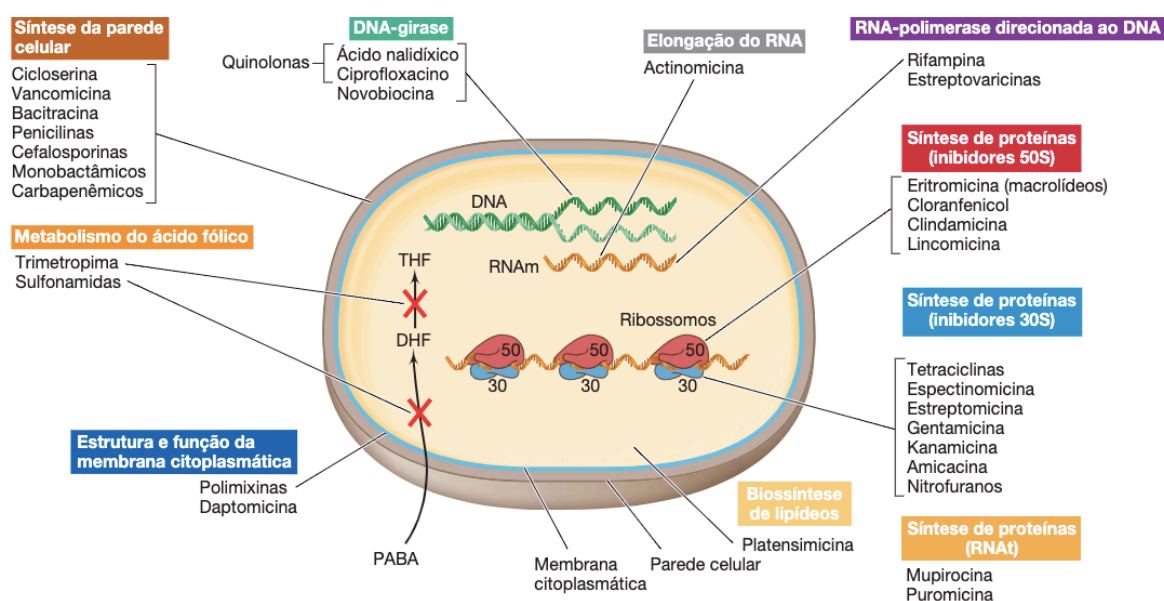
Utilizando análises genômicas, Palmer e colaboradores identificaram genes que são considerados "nonoptimally expressed genes", que são genes nos quais a expressão não ocorre otimamente de maneira mais eficaz, e uma mudança de expressão deles pode conferir resistência a determinado antimicrobiano. Foi observado que esses genes estavam envolvidos em estratégias de resistência diversas (PALMER; CHAIT; KISHONY, 2018). Suarez e equipe investigaram genes crípticos, que são genes desconhecidos capazes de conferir RAM em *E. coli*. Do total de genes identificados, os conhecidos correspondiam a 13%, enquanto os crípticos, também chamados de não classificados, somavam os outros 87%. Esses genes estão associados com proteínas de membrana, resposta ao estresse/proteínas reparadoras de DNA, transportadores, entre outros (SUAREZ; MARTINY, 2021). Mesmo com os estudos apresentados, ainda existem dúvidas sobre os mecanismos associados à RA.

Recentemente, Ortiz e colaboradores avaliaram como CSI de Ampicilina afetam os fatores de virulência de uma *E. coli* MDR (multi-drug resistant - ou resistentes à múltiplas drogas) e identificaram um aumento na expressão de fatores como: capacidade de transformação, motilidade e produção de biofilme (ORTIZ, 2025). Poucos meses depois, esse mesmo grupo publicou um estudo utilizando CSI de Oxacilina em uma estirpe de *A. baumannii* produtora de oxacilinase. Assim como no primeiro estudo, eles perceberam alterações nos fatores de virulência depois da exposição ao antimicrobiano em CSI (GUERRERO-LÓPEZ; ORTIZ, 2025).

#### 1.4. ANTIMICROBIANOS: MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os agentes antimicrobianos podem possuir atividade anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-parasitária, anti-viral e anti-blástica (BROOKS, 2004; RUSSELL, 2004). O seu mecanismo de ação pode resultar em morte microbiana, os chamados microbiocidas, ou em inibição do crescimento, os microbiostáticos (WALSH, 2003). Esses agentes podem ser agrupados em classes: aminoglicosídeos, beta lactâmicos, cloranfenicol, macrolídeos, metronidazol, quinolônicos, rimfamincinas, sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim. Os principais alvos nas células bacterianas para ação dos antimicrobianos são: síntese da parede celular, integridade da membrana celular, síntese proteica, atividade anti metabólica e síntese e integridade de ácidos nucleicos (TALARO, CHESS, 2008; MADIGAN, MARTINKO, 2006; WRIGHT, 2010). A Figura 1 ilustra alguns dos alvos dos principais agentes antibacterianos.

**Figura 1 - Alvos celulares dos principais agentes antibacterianos**



Fonte: MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. Traduzido por: Alice Freitas Versiani *et al.* 14ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2016.

Os agentes são classificados de acordo com suas estruturas-alvo na célula bacteriana. THF, tetra-hidrofolato; DHF, di-hidrofolato; RNAm, RNA mensageiro.

Para cada alvo dos antimicrobianos, os microrganismos podem apresentar mecanismos que permitem manter a sua sobrevivência. Alguns dos mecanismos de RAM já conhecidos são: redução da permeabilidade; transporte ativo através das bombas de efluxo; alteração,

modificação ou proteção das regiões-alvo; inativação ou modificação do composto e ativação de rota alternativa para desviar da ação do fármaco (DARBY, 2024). No Quadro 1, adaptado de Darby, são citados alguns exemplos de classes de antimicrobianos com seus respectivos mecanismos de ação e os mecanismos utilizados pelas bactérias para sobreviverem a essas pressões.

**Quadro 1 - Exemplos de Classes de Antimicrobianos: Mecanismos de Ação e Mecanismos de Resistência correspondente**

Classes de Antimicrobiano	Mecanismo de Ação	Mecanismo de Resistência
Aminoglicosídeos	Interagem com a subunidade 30S do rRNA 16S causando falha na leitura, ou proteínas truncadas e morte celular; pode ligar-se a membrana externa, gerando poros para aumentar a acumulação	Enzimas que modificam os aminoglicosídeos, como acetiltransferases; metilase do ribossomo 16S; mutações no gene do rRNA 16S; diminuição do influxo e/ou aumento do efluxo
$\beta$ -lactâmicos	Atingem a reticulação do peptidoglicano inibindo proteínas de ligação à penicilina, que reticulam a cadeia peptídica na parede celular, levando à lise da célula	Produção de $\beta$ -lactamases; modificação do sítio de ligação das proteínas; redução da permeabilidade e aumento do efluxo
Fenicóis	Inibem tradução ligando-se ao sítio A da subunidade 50S, inibindo a síntese de proteínas	Mutações na subunidade 50S do rRNA 23S; inativação enzimática por acetiltransferases e efluxo
Macrolídeos	Inibem tradução de proteínas atingindo a subunidade 50S, causando cadeias de peptídeos truncados	Metiltransferases de rRNA que metilam o rRNA 23S; mutações no ribossomo; efluxo, macrolídeos fosfotransferases e esterases; proteção ribossomal por proteínas do cassete F de ligação a ATP

Fonte: Darby EM, Trampani E, Siasat P, Gaya MS, Alav I, Webber MA, Blair JMA. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol.* 2023 May;21(5):280-295. doi: 10.1038/s41579-022-00820-y. Epub 2022 Nov 21. Erratum in: *Nat Rev Microbiol.* 2024 Apr;22(4):255. doi: 10.1038/s41579-024-01014-4. PMID: 36411397 (adaptada).

#### 1.4.1. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos de amplo espectro que atuam inibindo a síntese proteica, levando à morte celular, sendo, portanto, considerados bactericidas. Eles começaram a ser introduzidos na rotina clínica em 1944, com a estreptomicina, e foram

amplamente utilizados até a década de 1980, na qual surgiram opções menos tóxicas e com a cobertura mais ampla (KRAUSE, 2016). Os aminoglicosídeos atravessam a membrana celular através de porinas, então são transportados através da membrana citoplasmática por um mecanismo dependente de energia e ligam-se à subunidade 30S do ribossomo. Esse mecanismo é dependente de oxigênio, sendo assim, eles são ineficazes em microrganismos anaeróbicos e em ambientes com baixa concentração de oxigênio (PEREIRA, N., 2022).

Os aminoglicosídeos podem ser usados sozinhos ou combinados com outros antimicrobianos, tanto na terapia empírica quanto na definitiva. No caso da terapia empírica para sepse grave, pode ser utilizada a combinação de aminoglicosídeos e beta-lactâmicos (KRAUSE, 2016). Devido a rápida eliminação dos aminoglicosídeos pelo trato urinário, eles são regularmente indicados para o tratamento de infecções nessa região (KRAUSE, 2016). Eles também apresentam uma menor taxa de mortalidade no tratamento de infecções causadas por microrganismos MDR, como demonstrado no estudo de Gonzales-Padilla, que testou a Gentamicina no tratamento de sepse causada por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenênicos e colistina (GONZALEZ-PADILLA, 2015).

A Gentamicina é um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos, descoberto em 1963 (WEINSTEIN, 1963). Ela pode ser utilizada em diversos casos, como septicemia bacteriana, meningite, infecções do trato urinário, infecções do trato gastrointestinal e infecções de tecidos moles. Um estudo feito no Rio Grande do Norte analisou os problemas relacionados a medicamentos (PRM) antimicrobianos em unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal e identificou a Gentamicina como o antimicrobiano mais prescrito. Além disso, identificaram que um pouco mais de 80% dos PRM estão relacionados à efetividade do tratamento, sendo a principal causa a escolha da dose, principalmente dos aminoglicosídeos (NUNES, 2017). O estudo feito na Espanha feito por Esqué Ruiz e já citado anteriormente, também apresenta dados semelhantes, mostrando erros no intervalo de administração da Gentamicina (ESQUÉ RUIZ, 2016). Esses erros no intervalo podem ser tanto para um período abaixo quanto para um período acima do estabelecido. No caso dos intervalos acima do limite, a CIM pode ser insuficiente para o tratamento, favorecendo a falha terapêutica, assim como a resistência bacteriana (NUNES, 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

Devido à magnitude das consequências da resistência aos antimicrobianos (RAM), a Organização Mundial de Saúde publicou em 2015 um Plano de Ação Global, convocando todos os países membros a adotarem medidas estratégicas para controle da situação. Os 5 objetivos estratégicos do plano são: melhorar a conscientização e compreensão da RAM; reforçar o conhecimento através da vigilância e da investigação; reduzir a incidência de infecções; otimizar o uso dos agentes antimicrobianos; e desenvolver o caso econômico para investimento sustentável (WHA68.7 e WHA72.5).

No Brasil, foi publicado em 2019 o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR) pelo Ministério da Saúde, com colaboração de outros órgãos e entidades da Administração Pública. Dentre os objetivos principais, pode ser citado: aprimorar e ampliar o conhecimento sobre a RAM por meio da realização de estudos científicos. Uma forma de cumprir com esse objetivo é fomentar pesquisas para preencher lacunas de conhecimento sobre a resistência aos antimicrobianos.

Considerando as formas de resistência, a RA é a que apresenta mais lacunas a serem preenchidas e este trabalho objetiva responder algumas dessas perguntas utilizando como objeto de estudo uma espécie de grande relevância clínica, *Escherichia coli*. Entender as estratégias metabólicas que permitem que os isolados clínicos se adaptem à presença de antimicrobianos é o primeiro passo para a formulação e o desenvolvimento de novas estratégias capazes de controlar a disseminação de bactérias resistentes. Além disso, estudos mostram que além da capacidade de se adaptar à pressão de seleção promovida pelo antimicrobiano, alguns fatores de virulência têm a sua expressão aumentada, podendo resultar em estirpes mais virulentas. Por isso, é necessário compreender como bactérias expostas à CSI de antimicrobiano modulam o seu metabolismo para sobreviver ao antimicrobiano.

Além disso, a exposição a essas CSI faz parte do cotidiano da população de forma silenciosa muitas das vezes. Um relatório denominado "Environmental Dimensions of Antimicrobial Resistance: Summary for Policymakers" do Programa das Nações Unidas para Meio Ambiente (PNUMA), publicado em 2022, alerta para um cenário preocupante: antimicrobianos estão sendo lançados no ambiente ainda como substâncias ativas por meio de esgotos. Apesar das águas residuais serem tratadas, em muitos países esse tratamento não é suficiente para barrar tanto as substâncias ativas quanto às próprias bactérias expostas a essas substâncias. Esse relatório também aborda outra problemática: o uso de pesticidas com propriedades antimicrobianas que também acabam contaminando as plantações, o que traz

implicações para a saúde pública. Esses resíduos que contaminam as plantações também podem impactar diretamente as bactérias da microbiota residente dos indivíduos quando esses alimentos são consumidos. É importante enxergar a RAM como um problema que exige uma visão holística e deve ser tratado de forma multidisciplinar, seguindo a proposta da “Uma Só Saúde” ou “One Health”.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta associada à resistência adaptativa aos antimicrobianos de linhagens de *Escherichia coli* uropatogênicas.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Induzir a resistência adaptativa em linhagens de *E. coli* pela exposição à gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina e polimixina B;
- ❖ Determinar curva de crescimento dos isolados após a indução da resistência adaptativa;
- ❖ Determinar a capacidade de produção de biofilme e de sobrevivência em concentrações antimicrobianas inibitórias pelas linhagens com resistência adaptativa;
- ❖ Analisar e comparar a expressão de proteínas das bactérias expostas e não expostas ao tratamento com os antimicrobianos;
- ❖ Identificar as vias potencialmente relacionadas com a resistência adaptativa.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. SELEÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS

A partir do banco do Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos, foram selecionados isolados clínicos de *Escherichia coli* com perfil de susceptibilidade antimicrobiana. Esses isolados foram testados novamente quanto à sensibilidade aos antimicrobianos de interesse e o isolado identificado como UPEC90 foi selecionado para o estudo. Além do isolado clínico, foram utilizadas 2 linhagens de *E. coli* referências como uropatógenos: CFT073 (NCBI: txid199310) proveniente de paciente com pielonefrite e a J96, obtida a partir da urocultura de um pacientes com urosepse (NZ\_ALIN00000000.2). Os três isolados foram mantidos armazenados em Meio Luria Bertani (LB) contendo 25% de glicerol a -80°C como estoque geral e em LB contendo 25% de glicerol a -20°C como estoque de uso.

O perfil de resistência da UPEC90 aos antimicrobianos foi determinado com base nas CIMs, esses resultados foram gentilmente fornecidas pelo Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB) utilizando os seguintes fármacos: Ácido Nalidíxico, Amicacina, Ampicilina, Amoxicilina/Ácido Clavulânico,  $\beta$ -lactamase de espectro estendido, Cefalotina, Cefepima, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Ertapenem, Gentamicina, Meropenem, Nitrofurantoína, Norfloxacin, Piperacilina/Tazobactam e Trimetoprim/Sulfametoxazol.

### 4.2. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos da UPEC90, da CFT073 e da J96 foram confirmados testando o crescimento dos isolados em concentrações inibitórias dos antimicrobianos escolhidos para este trabalho: Polimixina B, Cloranfenicol, Gentamicina e Tetraciclina.

**Quadro 2 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos antimicrobianos de acordo com os bancos americano (CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute) e brasileiro (BRCAS - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)**

Antimicrobiano	CIM/CLSI	CIM/BRCAS
Polimixina B	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$
Cloranfenicol	$\leq 8 \mu\text{g/mL}$	$\leq 8 \mu\text{g/mL}$
Gentamicina	$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$
Tetraciclina	$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	-

Fonte: elaborado pela autora.

Primeiro, foi realizado o pré-inóculo bacteriano em tubos contendo 5 mL de LB (Kasvi) em estufa à 37°C. Após 18 horas, 100µL desta cultura foram transferidos para tubos contendo LB suplementado com o antimicrobiano na concentração inibitória previamente descrita e esses tubos retornaram para a estufa à 37°C. Para este trabalho, foi utilizado como parâmetro a tabela CLSI (*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.) devido à disponibilidade de dados para os quatro antimicrobianos de interesse. Depois de 18 horas, o crescimento bacteriano foi avaliado e comparado com meio LB sem inóculo utilizando-se espectrofotometria (leitura a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ).

#### 4.3. INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA ADAPTATIVA

A indução de RA foi realizada por meio de cultivo bacteriano em LB com CSI de antimicrobiano, usando como base o protocolo descrito por Stickler (1974). Todas as estirpes foram cultivadas em concentrações antimicrobianas crescentes, de 0,1 µg/mL, até ultrapassarem a Concentração Inibitória Mínima - CIM dos antimicrobianos: Gentamicina (CIM = 4 µg/mL), Cloranfenicol (CIM = 0,4 µg/mL) e Polimixina B (CIM = 2 µg/mL), a fim de se obter culturas adaptadas ao crescimento na presença de antimicrobianos em CSI. O primeiro teste foi feito com a Gentamicina. Como a concentração inibitória desse antimicrobiano é 4 µg/mL (Valor padrão: CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial*

*Susceptibility Testing*. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.), as concentrações testadas variam de 0,1 µg/mL a 4,0 µg/mL.

Após 18 horas de incubação à 37°C, o crescimento bacteriano foi determinado por meio da medida da densidade óptica (DO<sub>600nm</sub>). Os valores de absorvância observados foram utilizados para calcular o volume de inóculo contendo a concentração de 10<sup>6</sup> bactérias em LB com a primeira concentração de antimicrobiano (0,1 µg/mL). Esse procedimento foi repetido para todas as concentrações de antimicrobiano. As culturas que apresentaram crescimento positivo foram congeladas com glicerol 25% a -20°C para testes futuros.

Esse mesmo teste foi repetido para Cloranfenicol, com as concentrações variando de 0,1 µg/mL a 0,4 µg/mL, e para Polimixina B, variando de 0,1 µg/mL a 2,0 µg/mL.

#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS

##### 4.4.1. Curva de crescimento

O pré-inóculo bacteriano a 37°C em LB contendo antimicrobiano na concentração determinada pela indução de resistência (item 4.3), foi utilizado para determinação de curva de crescimento em placa de 96 poços. O inóculo nas placas foram organizados utilizando-se triplicata técnica para cada condição e um controle branco (CB - sem inóculo bacteriano). Assim, foram estudadas 31 diferentes condições de bactérias e antimicrobianos e o CB.

Na placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio LB nas concentrações de antimicrobianos previamente estabelecidas para cada bactéria. Depois, foi medida a densidade óptica (DO<sub>600nm</sub>) dos tubos com os pré-inóculos e calculada de forma a serem inoculados 100µL de cultura bacteriana na densidade de 0,3 na placa de 96 poços.

A placa foi incubada a 37 °C no equipamento de leitura de microplacas (Spectra Max M3), onde foram realizadas leituras de absorvância em DO<sub>600nm</sub> e a cada 30 minutos, por 24 horas, com agitação entre as leituras.

##### 4.4.2. Tempo de geração

O tempo de geração foi calculado seguindo a seguinte fórmula (HUDSON, 2022):

$$G = \frac{t}{n} \quad n = 3.3 \log \frac{C_f}{C_i}$$

Na fórmula da esquerda, G é o tempo de geração, t é o intervalo de tempo, n é o número de gerações que é calculado pela fórmula da direita. Para essa segunda fórmula, C<sub>f</sub> é a concentração de bactéria no final do intervalo e C<sub>i</sub> é a concentração no início do intervalo.

Foi escolhido o tempo de 510 minutos (8,5 h) na curva de crescimento por corresponder ao final da fase log na curva de crescimento entre todas as culturas analisadas (Figuras 1-8).

#### 4.4.3. Determinação da sobrevivência bacteriana após incubação em concentração inibitória de antimicrobiano

As bactérias foram inoculadas em LB, contendo a concentração de antimicrobiano correspondente, por 18 horas à 37 °C. Após esse período foram transferidos 100 µL do pré-inóculo para um novo tubo de LB sem antimicrobiano. Esse novo inóculo foi colocado para crescer sob agitação à 37 °C. A absorbância ( $DO_{600nm}$ ) da cultura foi monitorada até atingir o valor de 0,5. A seguir, o antimicrobiano foi adicionado em concentração inibitória à cultura bacteriana, que foi incubada por 1 hora à 37°C. Após incubação, 100µL foram utilizados para obter uma diluição seriada de  $10^{-4}$ . Um volume de 100µL de cada suspensão foi inoculado em LB ágar por “spread-plate”. As placas foram mantidas à 37 °C por 18 horas para contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs) presentes em cada placa.

#### 4.4.4. Ensaio de produção de biofilme

As bactérias inoculadas em LB, com a concentração de antimicrobiano correspondente, por 18 horas à 37 °C, foram semeadas em placas de 96 poços após ajuste da DO, entre 0,1-0,15 em 200 µL de LB com antimicrobianos (em suas respectivas concentrações). As placas foram incubadas à 37°C por 48h, para descarte do meio e adição de 200 µL de LB, e uma nova incubação a 37°C por 48h.

Ao final dos 5 dias, o meio presente nos poços foi descartado e foram adicionados 200 µL de solução salina para lavar a placa. Após a lavagem, foram adicionados 200 µL de metanol durante 15 minutos. Após secagem total da placa, foram adicionados 200 µL do corante cristal violeta. Depois de 5 minutos, a placa foi lavada com água corrente indireta para retirar o excesso do corante. Após secagem, foram adicionados 200 µL de ácido acético glacial. A densidade óptica da suspensão foi aferida por meio de leitura de 9 pontos no espectrofotômetro em  $DO_{600nm}$ .

#### 4.4.5. Ensaio de motilidade

O pré-inóculo realizado em caldo LB com antimicrobiano na concentração determinada anteriormente (item 4.3), foi utilizado para incubação em LB ágar 0,5% por meio de agulha. Os tubos foram incubados em estufa à 37°C e o crescimento foi monitorado após 24 h e 48 h. A

presença de crescimento difuso indica motilidade positiva. Por outro lado, o crescimento bacteriano limitado ao inóculo em agulha indica motilidade negativa.

#### 4.4.6. Análises estatísticas da caracterização

Para análise estatística e elaboração dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0.1. O primeiro teste feito foi o de normalidade, Shapiro-Wilk ( $p = 0,05$ ), e com base nos resultados foi selecionado o teste para dados paramétricos, Análise de Variância Unidirecional - ANOVA ( $p = 0,05$ ), ou não-paramétricos, Kruskal-Wallis ( $p = 0,05$ ). Para identificar os grupos que diferiram do controle (culturas S/A) foi aplicado o teste de Dunnett ( $p = 0,05$ ). Esse teste *post hoc* foi escolhido pois faz a comparação de todos os grupos com o controle buscando diferenças estatísticas significativas. Dessa forma, o poder do teste é maior que o de testes que comparam todos os grupos entre si por reduzir o número de testes (LEE, S. e LEE, D., 2020).

### 4.5. ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR ABORDAGEM PROTEÔMICA

#### 4.5.1. Preparo dos isolados bacterianos para extração de proteínas

As bactérias foram incubadas em 5 mL de meio LB, com a concentração de antimicrobiano correspondente, por 18 horas à 37 °C. Após o cultivo do pré-inóculo, 1 mL de cada cultura foi transferida para tubos cônicos contendo 40 mL de LB adicionado com o antimicrobiano correspondente e incubadas à 37 °C por 6,5 h. Para as análises proteômicas, foram utilizados os 40 mL de cultura em  $DO_{600nm}$  0,6.

Após incubação, as culturas foram submetidas à centrifugação de 12.000 g por 3 min a 4 °C. As células recuperadas foram lavadas por duas vezes com tampão PBS gelado e após as lavagens, foram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C.

#### 4.5.2. Extração de Proteínas

As amostras foram transferidas para um eppendorf e foram adicionados 250  $\mu$ L de Glass Beads 0,1 mm e 750  $\mu$ L de Solução Tampão SDS (Tris-HCl pH 7,9 + DTT 2 mM + IP Roche 1 comp/10 mL + SDS 4%). A amostra foi mantida em gelo o tempo todo desde o descongelamento. O material foi levado para o aparelho *bead beater* (BioSpec Mini-Beadbeater) onde foram submetidas à 5 ciclos de agitação por 1 min com pausas de 2 min

no gelo entre cada ciclo. Após a lise das células, a amostra foi centrifugada por 15 min a 14.000 G e o sobrenadante transferido para um novo tubo que foi mantido a -20 °C.

#### 4.5.3. Quantificação e Gel de Poliacrilamida

A quantificação das proteínas solúveis foi realizada utilizando o sistema Qubit<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific), de acordo com protocolo do fabricante. As leituras foram obtidas após diluição dos extratos em água na proporção 1:50. Foi preparada a solução de trabalho do Qubit diluindo o reagente de proteína no tampão na proporção de 1:200. Foram adicionados 190 µL da solução de trabalho em cada tubo e 10 µL de amostras e controles em seus respectivos tubos. Após agitação em vórtex por 2-3 segundos, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos e depois submetidos à leitura no aparelho Qubit<sup>™</sup> 4 Fluorometer. Após determinação da concentração, 30 µg de cada extrato proteico foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes). Para isso, as amostras diluídas em 3 volumes de tampão de amostra Laemmli 4x (Tris-HCl 0,25 M, SDS 8%, Glicerol 20%, DTT 0,1 M, azul de bromofenol 0,01%) (Laemmli, 1970) e aquecimento a 95 °C por 10 min. Após isso, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE, com malha concentradora de 5% e separadora gradiente de 8% a 18% , submetidas a uma corrente de 25 A constante. Depois de aproximadamente 1 hora, o gel foi retirado da cuba e corado com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,5%, diluído em 40% metanol, 20% de ácido acético R por 1 hora. Em seguida, o gel foi descorado por 16h em solução descorante contendo 40% metanol, 20% de ácido acético.

#### 4.5.4. Purificação e Digestão

Para a análise por espectrometria de massas, foi utilizado o protocolo de digestão e remoção do SDS foi seguido de acordo com o padrão e otimizações do filter-aided sample preparation (FASP) (J. R. Wiśniewski, 2017; Jacek R. Wiśniewski, 2018; Jacek R. Wiśniewski, Zougman, Nagaraj, & Mann, 2009). Para isso, 110 µg de extrato proteico foram adicionados 300 µL de Solução Tampão (Ureia 8M + TEAB 0,02M) filtrada. Esse material é misturado no vórtex entre 15 e 20 segundos.

Em um novo eppendorf é adicionado um filtro Microcon (30 kDa NMWCO, Merck) e depois são pipetados 160 µL da solução com amostra. Esse novo eppendorf é centrifugado por 10 min, 1.000 g. Depois são adicionados os 160 µL restantes e novamente submetidos à

centrifugação por 15 minutos 8.000 g. O líquido recuperado é descartado e as proteínas retidas no filtro.

À mistura de proteínas, são adicionados 200  $\mu$ L do Tampão Ureia + TEAB e o tubo com filtro é novamente submetido à centrifugação por 15 minutos 8.000 g. Esse processo é repetido duas vezes. Após, Iodocetamida (IAA) é adicionada em 1 mL de Tampão Ureia 0,05M formando o Tampão de Digestão. Um volume de 100  $\mu$ L dessa solução é adicionada às amostras que foram mantidas em termomixer por 1 min a 21 °C com rotação de 600 rpm. Depois a rotação é desligada e a amostra permanece incubada por 20 min no escuro. Uma nova etapa de centrifugação é realizada por 10 min 10.000 g e o volume que passa pelo filtro é descartado. O extrato proteico é lavado com 200  $\mu$ L de Tampão Ureia + TEAB, centrifugados por 10 min 10.000 g e descartado o volume que passa pelo filtro.

Foram realizadas quatro lavagens com adicionados 200  $\mu$ L do Tampão DT (TEAB 0,02M pH = 7,9) em cada amostra, depois centrifugado por 10 min 10.000 g e descartado o volume no fundo do eppendorf. Depois o filtro é retirado e acondicionado em um tubo novo. São adicionados 80  $\mu$ L da Solução Tampão DT + Tripsina (1:50) em cada amostra. Então, o tubo é vedado com parafilme e incubado por 18 horas à 37 °C em termomixer. No final das 18 horas é adicionada TFA e a solução final desse ácido deve ser de 0,5%.

#### 4.5.5. Dessalinização e Quantificação

São preparadas colunas StageTips de C18 de acordo com Rappsilber (Rappsilber *et al.*, 2007). Essas microcolunas foram construídas em ponteiras de 200  $\mu$ L low-binding (Axygen) usando seis discos de C18 extraídos com agulhas de gauge 16 de membranas para SPE de C18 (Empore™). Depois é adicionado metanol e o eppendorf submetido à centrifugação 300 g por 2 min para lavar a coluna. Foram realizados 3 ciclos de lavagem da coluna utilizando Acetonitrila 100% (ACN) + Ácido Fórmico 0,1%. Então, são repetidos mais 3 ciclos de lavagem com H<sub>2</sub>O + Ácido Fórmico 0,1%, por centrifugação à 500 g por 5 minutos. Com isso, finaliza-se a lavagem da coluna e a amostra pode ser adicionada. A adição da amostra na coluna é realizada em 2 etapas, adicionando 120  $\mu$ L de amostra por vez e centrifugando a 300 G por 7 minutos. Com a coluna acondicionada em um novo tubo, foram realizados 3 ciclos de lavagem com água e centrifugação à 500 g por 5 min. Então, a coluna é transferida para um eppendorf de eluição. Nele, são adicionados 80  $\mu$ L do Tampão de Eluição 50% (ACN + Ácido Fórmico) e centrifugado (300 , 4 min). Depois são adicionados mais 100  $\mu$ L do Tampão de Eluição 70% (ACN + Ácido Fórmico) e também centrifugado (300 , 4 min). Por fim, a coluna é

retirada e a solução contendo peptídeos foi submetida à secagem em um sistema Speedvac SC100 (Savant). Depois a amostra é ressuspensa em 20  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico e quantificada utilizando o sistema Qubit, conforme descrito anteriormente no item 4.5.3, porém na diluição de 2  $\mu\text{L}$  de amostra para 198  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho.

#### 4.5.6. LC-MS/MS

As análises por LC-MS/MS foram realizadas em Nano-UHPLC (Ultra high performance liquid chromatography) Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific™) acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (espectrômetro de massa iontrap-orbitrap híbrido, ThermoFisher Scientific™). Foram utilizadas pré-colunas (100  $\mu\text{m} \times 3 \text{ cm}$ ) de partículas esféricas de sílica de 5  $\mu\text{m}$  (Reprosil-Pur 120 Å pore C18) (Dr. Maich, Ammerbuch, Germany) e coluna analítica (75  $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$ ) com resinas C18 de 3  $\mu\text{m}$  Reprosil-Pur 120 Å pore size (Dr. Maich, Ammerbuch, Germany). As fases móveis utilizadas foram: solvente A (0,1 % ácido fórmico) e B (100 % acetonitrila, 0,1 % ácido fórmico) em fluxo constante de 0,250  $\mu\text{L}/\text{min}$ . O espectrômetro de massas foi configurado para aquisição DDA (data-dependent acquisition), de forma que os 15 íons mais intensos foram submetidos a fragmentação por HCD (Higher collisional energy dissociation), com janela de isolamento de 2,0  $m/z$  e energia de colisão normalizada de 35. A resolução utilizada foi de 120.000 FWHM e 15.000 FWHM para o MS1 e MS2, respectivamente.

#### 4.5.7. Análise de dados e estatística

Para analisar os dados *raw* gerados, foi utilizado o programa MetaMorpheus (Solntsev *et al.*, 2018) que utiliza uma versão modificada do Morpheus (Wenger e Coon, 2013) para identificação de peptídeos, e para quantificação label-free usa o Flash-LFQ (Milikin, Solntsev, Shortreed, e Smith, 2018). Depois foi feita a normalização dos dados através da transformação  $\log_{10}$ . Foi então aplicado o Método Padrão do MetaboAnalyst para imputar valores ausentes, seguido do cálculo da mediana e transformação  $\log_{10}$ . Com esse valores, foi realizado o Teste T, com significância de 0,05, para cada uma das amostras. Paralelamente, foi feita uma segunda análise estatística para comparação e confirmação dos dados. Na segunda análise também foi aplicado o Método Padrão do MetaboAnalyst para imputar valores ausentes, seguido do cálculo da mediana e transformação  $\log_{10}$ , adicionando a escala de Pareto para diminuir a influência de variáveis com grande variância. Depois também foi realizado o Teste T, com significância de 0,05, para cada uma das amostras. Ambos os testes chegaram aos mesmos valores.

Para analisar as funções de cada proteínas e as vias metabólicas foram utilizados dois bancos de dados, o UniProt Knowledgebase (UniProtKB; <https://www.uniprot.org/>) e o KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <https://www.kegg.jp/>).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA ADAPTATIVA

O perfil de susceptibilidade das linhagens bacterianas testadas apontou que todos não eram suscetíveis à Tetraciclina, o que inviabilizou a continuidade desse antimicrobiano no estudo. As três linhagens mostraram susceptibilidade ao Cloranfenicol e à Polimixina B. Para a Gentamicina, apenas a UPEC90 apresentou susceptibilidade.

**Quadro 3 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos exibido por linhagens de *Escherichia coli* uropatogênicas**

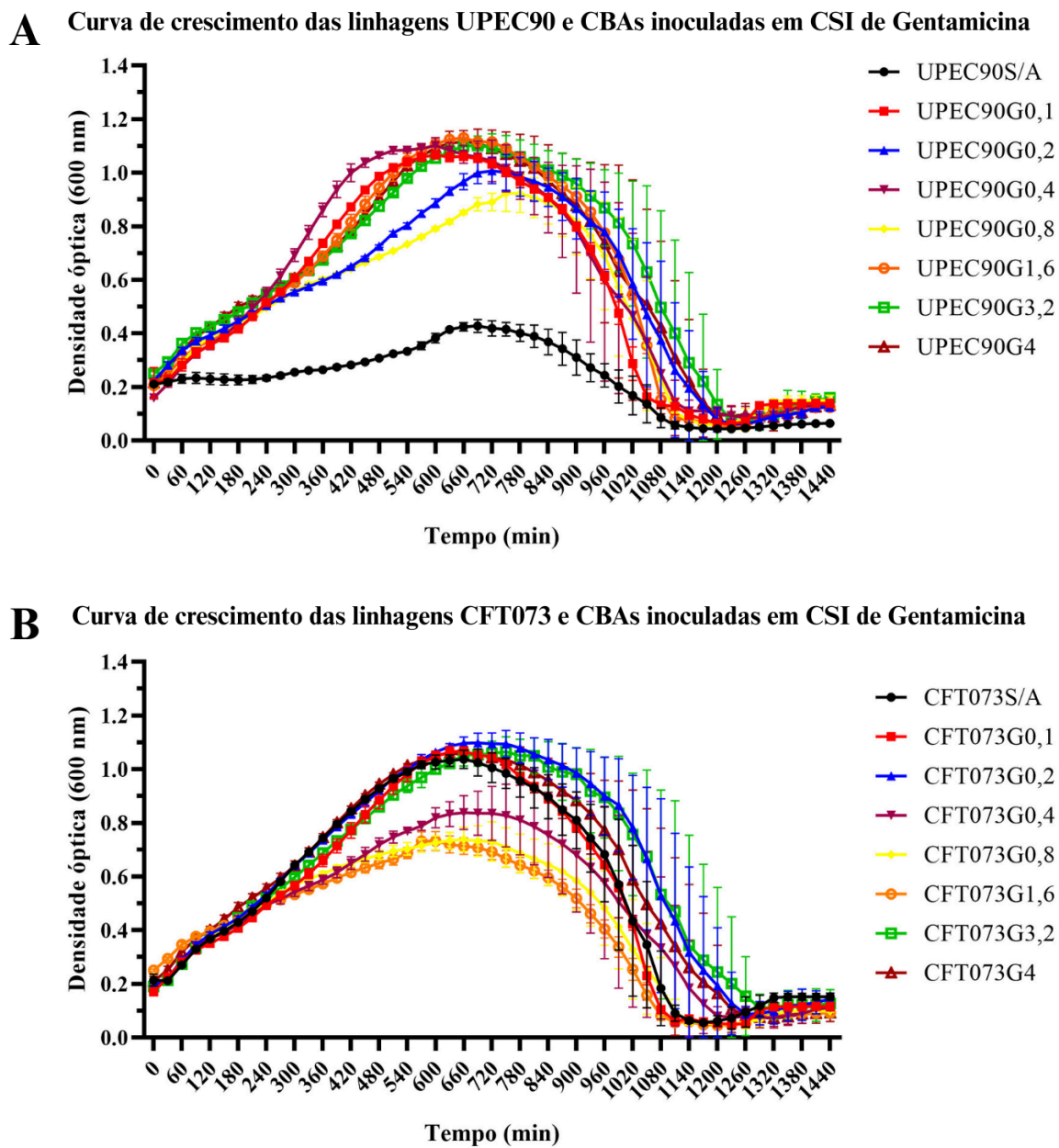
	Cloranfenicol [8µg/mL]	Polimixina B [2µg/mL]	Tetraciclina [4µg/mL]	Gentamicina [4µg/mL]
UPEC90	sensível	sensível	resistente	sensível
CFT073	sensível	sensível	resistente	resistente
J96	sensível	sensível	resistente	resistente

Fonte: elaborado pela autora.

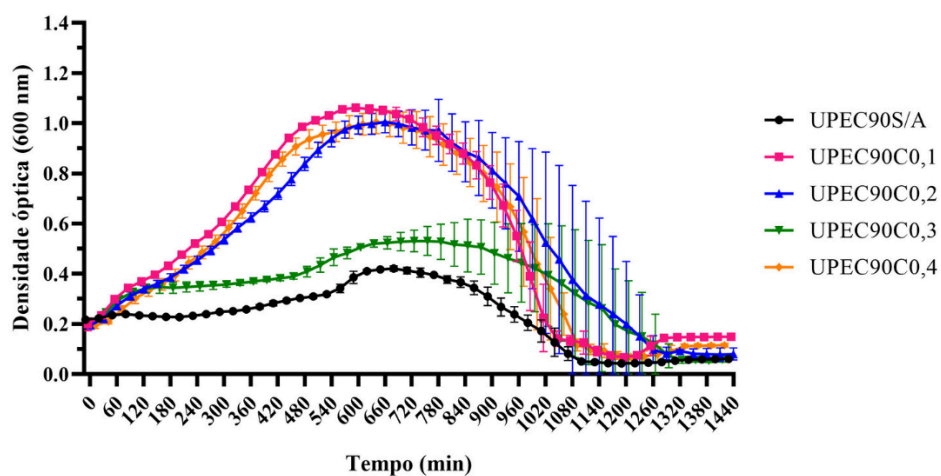
Apesar de apresentar sensibilidade em Polimixina B, não foi possível dar continuidade aos ensaios de indução de resistência com UPEC90, pois a linhagem não apresentou crescimento nas CSI neste antimicrobiano. O crescimento das culturas em CSI de Cloranfenicol foi observado até a concentração de 0,4 µg/mL, limitando a continuidade do uso deste antimicrobiano no trabalho. Outra exceção no estudo foi a CFT073 que, mesmo apresentando resistência à Gentamicina, passou pelo processo de indução para permitir futuras comparações entre a indução em organismos sensíveis e resistentes.

Após o estabelecimento das culturas bacterianas adaptadas às CSI, o tempo de geração de cada uma delas foi estabelecido a partir da curva de crescimento (Figura 2) e comparado ao da linhagem não adaptada, cultivada sem antimicrobianos (Tabela 1 e Figuras 3-9). A partir dos cultivos nas diferentes concentrações de antimicrobianos, foram obtidas 40 culturas em CSI. Dentre essas, 14 apresentaram viabilidade em concentrações de até 4,0 µg/mL de Gentamicina; 12 em concentrações de até 0,4 µg/mL de cloranfenicol; e 14 mantiveram-se viáveis em concentrações de até 2,0µg/mL de polimixina B.

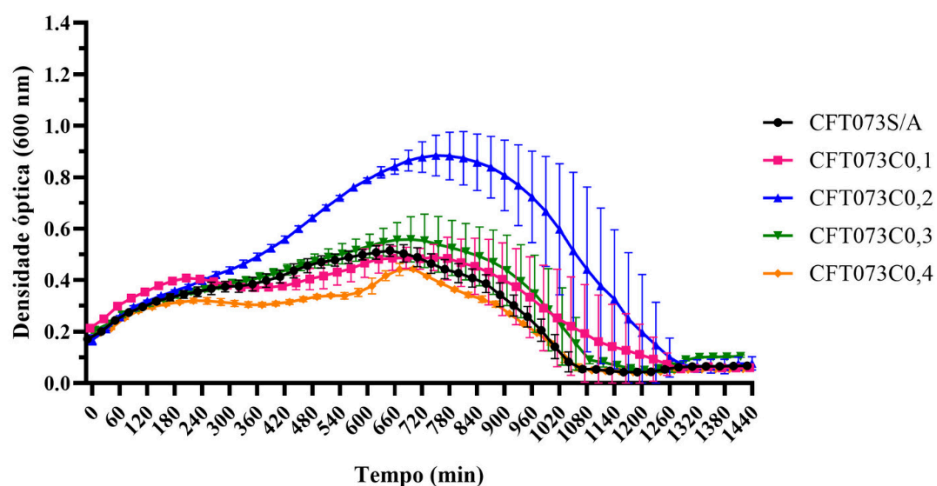
Figura 2 - Curvas de crescimento de culturas de *Escherichia coli* adaptadas às CSI em cultivo em meio LB contendo os antimicrobianos Gentamicina, Cloranfenicol ou Polimixina B



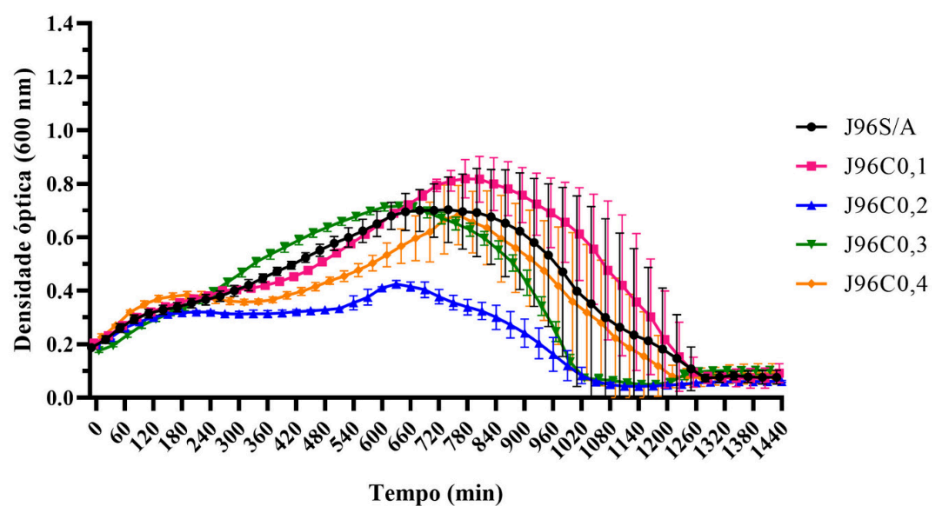
**C** Curva de crescimento das linhagens UPEC90 e CBAs inoculadas em CSI de Cloranfenicol



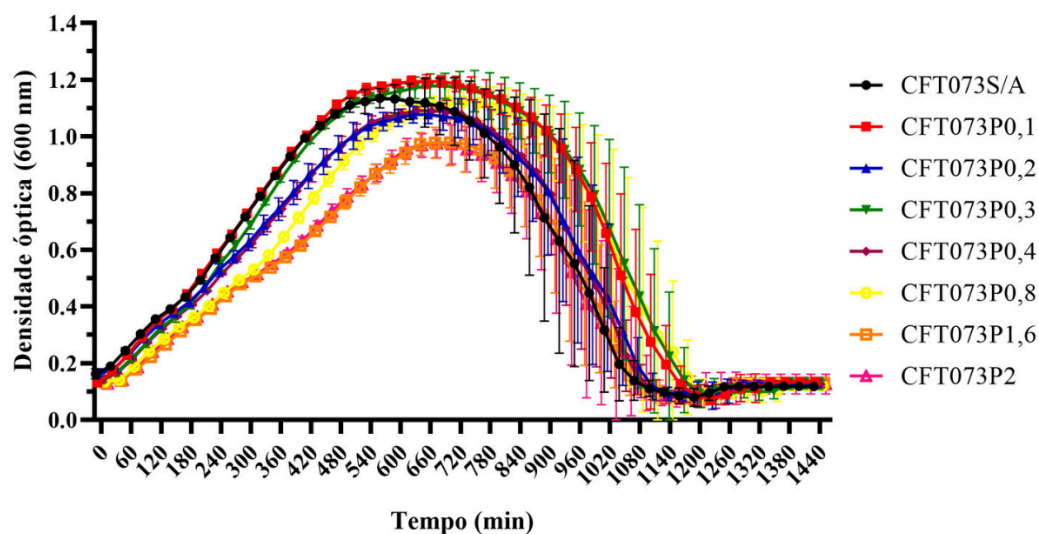
**D** Curva de crescimento das linhagens CFT073 e CBAs inoculadas em CSI de Cloranfenicol



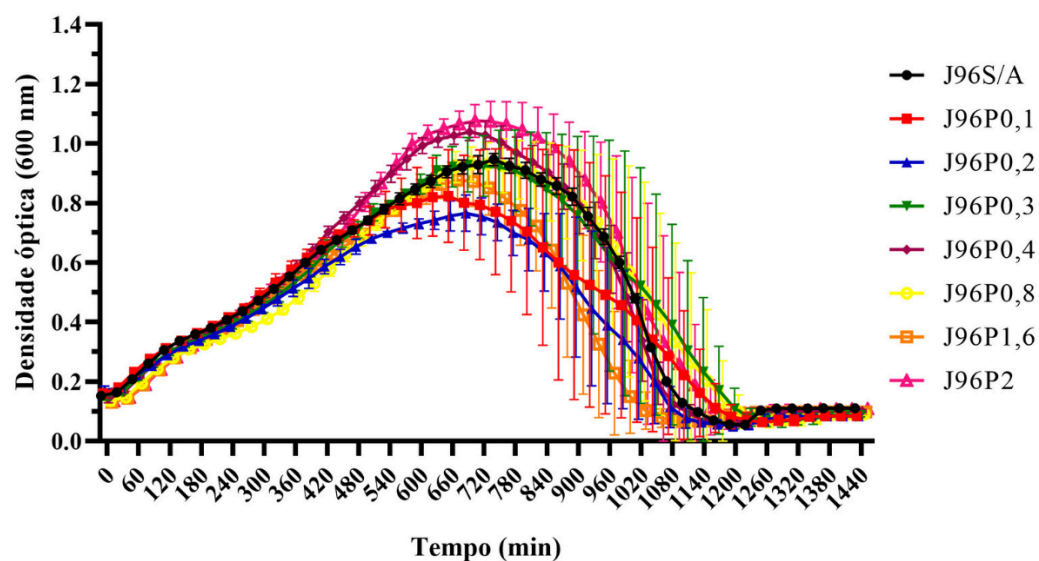
**E** Curva de crescimento das linhagens J96 e CBAs inoculadas em CSI de Cloranfenicol



### F Curva de crescimento das linhagens CFT073 e CBAs inoculadas em CSI de Polimixina B



### G Curva de crescimento das linhagens J96 e CBAs inoculadas em CSI de Polimixina B



Fonte: elaborada pela autora.

A UPEC90 foi testada em Gentamicina (A) e Cloranfenicol (C); a CFT073 foi testada em Gentamicina (B), Cloranfenicol (D) e Polimixina B (F); a J96 foi testada em Cloranfenicol (E) e Polimixina B (G). Eixo Y: Densidade Óptica em 600nm. Eixo X: tempo de incubação à 37°C.

**Tabela 1 - Tempo de geração apresentado pelas linhagens de *Escherichia coli* cultivadas em LB contendo concentrações crescentes de antimicrobianos e em LB sem antimicrobianos**

Antimicrobiano	Culturas	Concentração	Tempo de geração (min)	Valor de p	Resumo de p
Gentamicina	UPEC90S/A	S/A	822		
	UPEC90G0,1	0,1 µg/mL	286	< 0,0001	****
	UPEC90G0,2	0,2 µg/mL	284	< 0,0001	****
	UPEC90G0,4	0,4 µg/mL	272	< 0,0001	****
	UPEC90G0,8	0,8 µg/mL	236	< 0,0001	****
	UPEC90G1,6	1,6 µg/mL	219	< 0,0001	****
	UPEC90G3,2	3,2 µg/mL	281	< 0,0001	****
	UPEC90G4	4,0 µg/mL	228	< 0,0001	****
	CFT073S/A	S/A	230		
	CFT073G0,1	0,1 µg/mL	186	0,0633	ns
	CFT073G0,2	0,2 µg/mL	226	0,3599	ns
	CFT073G0,4	0,4 µg/mL	238	0,6753	ns
	CFT073G0,8	0,8 µg/mL	209	0,0023	**
	CFT073G1,6	1,6 µg/mL	250	< 0,0001	****
	CFT073G3,2	3,2 µg/mL	266	0,9239	ns
	CFT073G4	4,0 µg/mL	232	0,992	ns
Cloranfenicol	UPEC90S/A	S/A	1000		
	UPEC90C0,1	0,1 µg/mL	481	< 0,0001	****
	UPEC90C0,2	0,2 µg/mL	532	< 0,0001	****
	UPEC90C0,3	0,3 µg/mL	608	< 0,0001	****
	UPEC90C0,4	0,4 µg/mL	683	< 0,0001	****
	CFT073S/A	S/A	219		
	CFT073C0,1	0,1 µg/mL	223	0,0022	**
	CFT073C0,2	0,2 µg/mL	253	0,0868	ns
	CFT073C0,3	0,3 µg/mL	316	0,4282	ns
	CFT073C0,4	0,4 µg/mL	270	0,0002	***
	J96S/A	S/A	235		

	J96C0,1	0,1 µg/mL	352	0,1044	ns
	J96C0,2	0,2 µg/mL	411	< 0,0001	****
	J96C0,3	0,3 µg/mL	359	0,0701	ns
	J96C0,4	0,4 µg/mL	513	< 0,0001	****
	CFT073S/A	S/A	185		
	CFT073P0,1	0,1 µg/mL	164	0,0219	*
	CFT073P0,2	0,2 µg/mL	195	0,4971	ns
	CFT073P0,3	0,3 µg/mL	174	0,385	ns
	CFT073P0,4	0,4 µg/mL	180	0,9212	ns
	CFT073P0,8	0,8 µg/mL	181	0,9688	ns
	CFT073P1,6	1,6 µg/mL	194	0,6406	ns
	CFT073P2	2,0 µg/mL	190	0,9603	ns
Polimixina B	J96S/A	S/A	225		
	J96P0,1	0,1 µg/mL	233	> 0,9999	ns
	J96P0,2	0,2 µg/mL	259	> 0,9999	ns
	J96P0,3	0,3 µg/mL	221	> 0,9999	ns
	J96P0,4	0,4 µg/mL	199	0,8332	ns
	J96P0,8	0,8 µg/mL	212	> 0,9999	ns
	J96P1,6	1,6 µg/mL	205	> 0,9999	ns
	J96P2	2,0 µg/mL	192	0,2286	ns

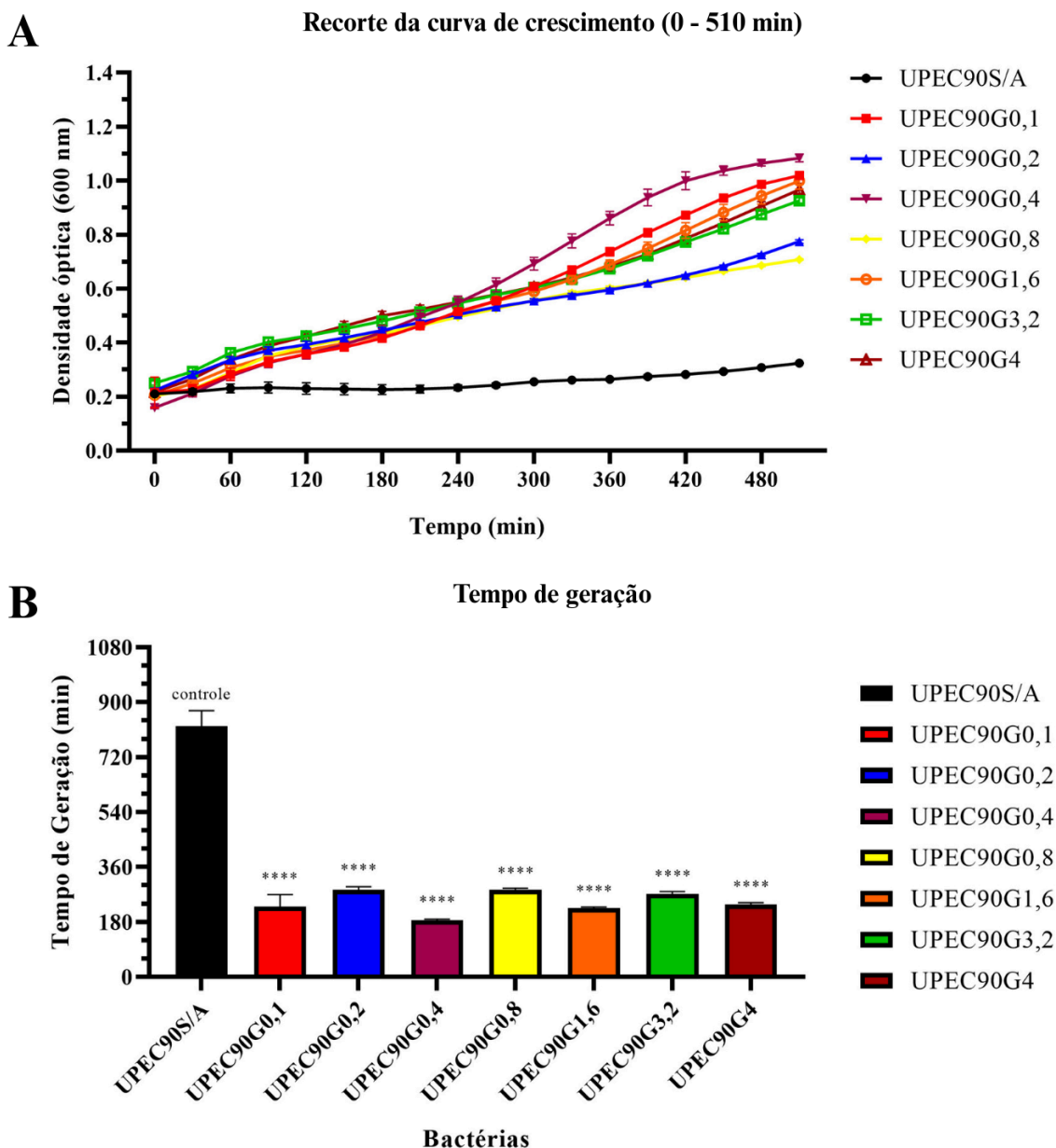
Fonte: elaborada pela autora.

Ns: não significativo ( $p > 0,05$ ). S/A: cultivo sem adição de antimicrobiano. \*: significante ( $p \leq 0,05$ ). \*\*: muito significante ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\*: altamente significante ( $p \leq 0,001$ ). \*\*\*\*: altamente significante ( $p \leq 0,0001$ ).

Notavelmente, dentre as culturas adaptadas (CBA) obtidas a partir da UPEC90, 8 apresentaram menor tempo de geração do que a cultura não adaptada à presença de antimicrobianos (UPEC90S/A). Na curva de crescimento (Figura 3A), foi possível perceber uma diferença de padrão de crescimento entre a S/A (que não passou de uma  $DO_{600nm}$  de 0,5 mesmo após 8 horas) e as CBAs que, em sua maioria, passaram de  $DO_{600nm}$  0,5 e atingindo densidade óptica de 1,0. Pelo cálculo do Tempo de Geração houve diferença estatística significativa entre o crescimento da S/A e das culturas dela derivadas. Ao compararmos o crescimento das CBAs com UPEC90S/A, observamos que as CBAs levaram menos da metade

do tempo para crescer e se multiplicar, sugerindo um possível mecanismo de adaptação que adotaram após a indução de resistência aos antimicrobianos testados (Figura 3).

**Figura 3 - Tempo de geração (g) da *Escherichia coli* UPEC90 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Gentamicina (0,1 µg/mL - 4,0 µg/mL)**

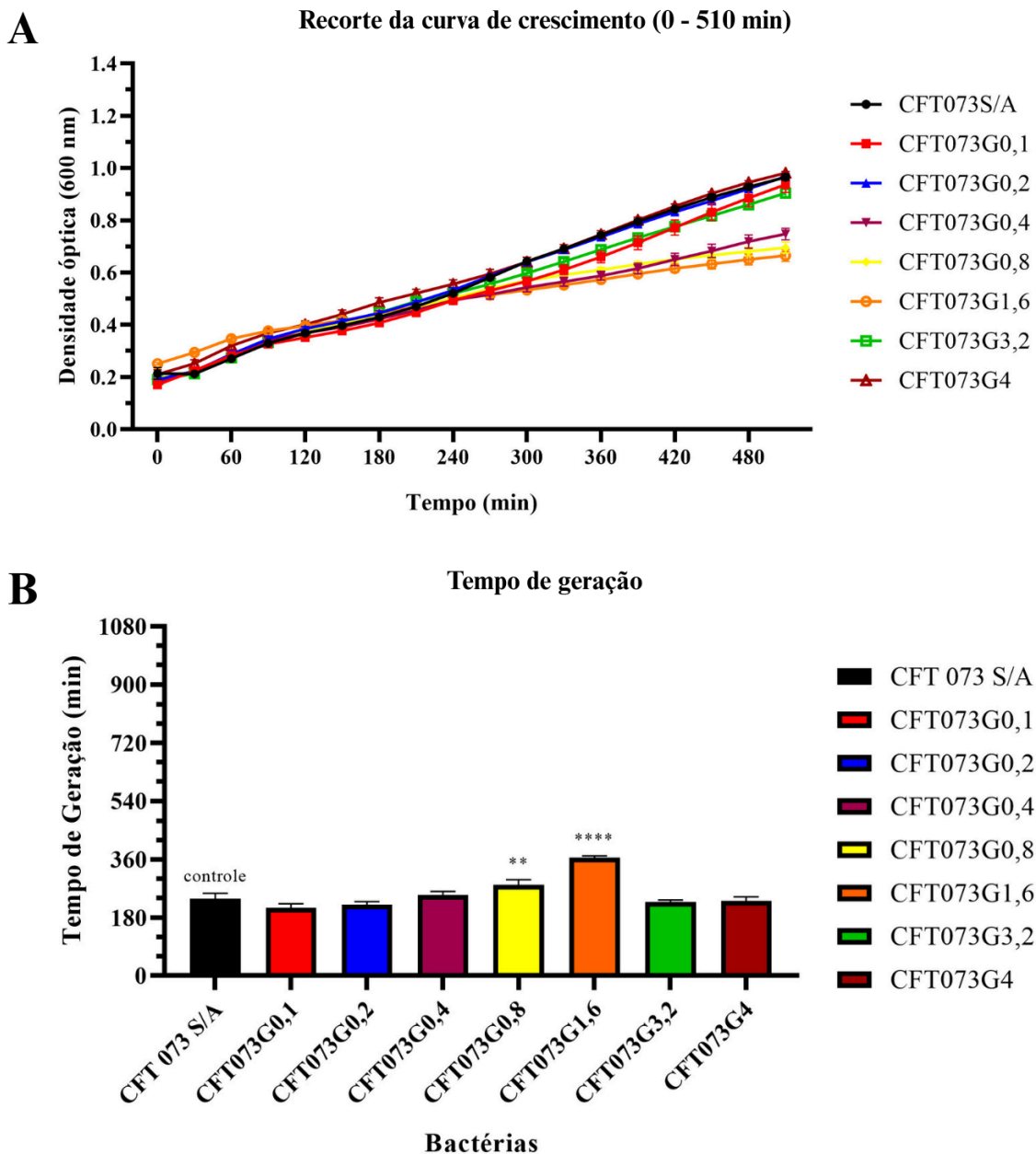


UPEC90G0,4: CBA à 0,4 µg/mL de Gentamicina; UPEC90G0,8: CBA à 0,8 µg/mL de Gentamicina; UPEC90G1,6: CBA à 1,6 µg/mL de Gentamicina; UPEC90G3,2: CBA à 3,2 µg/mL de Gentamicina; UPEC90G4: CBA à 4,0 µg/mL de Gentamicina.

Diferentemente da UPEC90, a curva de crescimento da CFT073 no cultivo em LB com Gentamicina não apresenta padrões claramente distintos, observação corroborada pelo Tempo de Geração (Figura 4).

As CBAs que mostraram diferença no padrão de crescimento apresentaram aumento no tempo de geração (em cultivo em LB com 0,8 µg/mL e 1,6 µg/mL de Gentamicina), quando comparadas à linhagem original. Este comportamento para CFT073 era esperado com esse antimicrobiano, porque a sua resistência à Gentamicina foi apontada ainda no início do processo de indução (Figura 4).

Figura 4 - Tempo de geração (g) da *Escherichia coli* CFT073 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Gentamicina (0,1 µg/mL - 4,0 µg/mL)

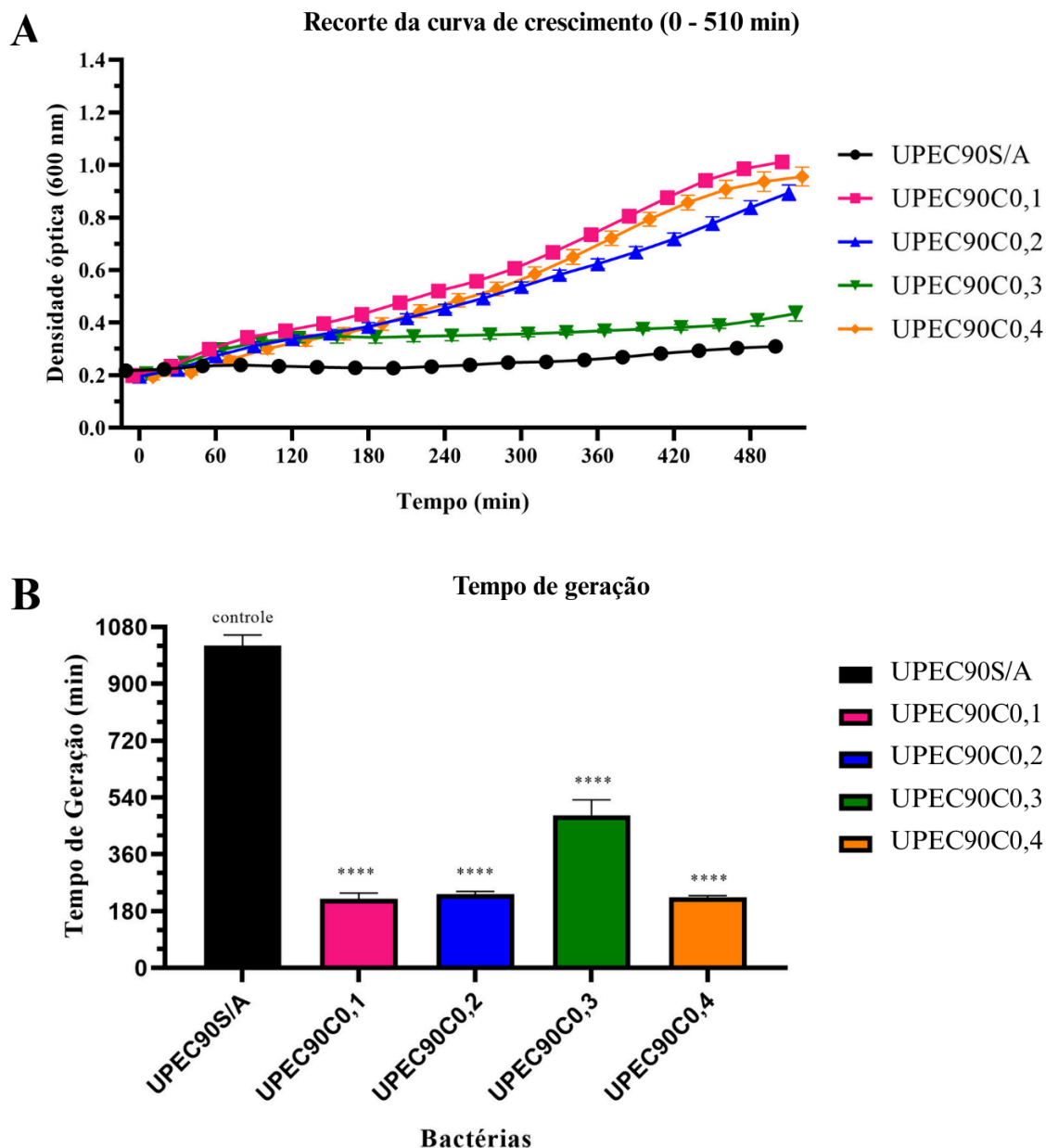


Fonte: elaborada pela autora.

(A) Recorte da curva de crescimento da CFT073 até 510 minutos (8,5 h). (B) Comparação do Tempo de Geração entre a CFT073S/A (barra preta) e as culturas adaptadas (CBAs) às CSI de Gentamicina. Os asteriscos acima das barras representam um valor de  $p < 0,05$ . CFT073S/A: CFT073 original com cultivo sem Gentamicina; CFT073G0,1: CBA à 0,1 µg/mL de Gentamicina; CFT073G0,2: CBA à 0,2 µg/mL de Gentamicina; CFT073G0,4: CBA à 0,4 µg/mL de Gentamicina; CFT073G0,8: CBA à 0,8 µg/mL de Gentamicina; CFT073G1,6: CBA à 1,6 µg/mL de Gentamicina; CFT073G3,2: CBA à 3,2 µg/mL de Gentamicina; CFT073G4: CBA à 4,0 µg/mL de Gentamicina.

Na presença de Cloranfenicol, UPEC90 também apresentou dois padrões de crescimento. Analisando-se somente a curva de crescimento, não fica claro se houve uma diferença estatística entre o crescimento das CBAs e da cultura S/A. Mas ao calcular o Tempo de Geração e analisar esses dados de forma comparativa, é possível afirmar que o crescimento da S/A foi mais lento. Esse resultado foi compatível com o obtido para essa mesma bactéria na Gentamicina, reforçando a hipótese de uma mudança no metabolismo após o contato com as CSI dos antimicrobianos, resultando em um crescimento exacerbado (Figura 5).

**Figura 5 - Tempo de geração (g) da *Escherichia coli* UPEC90 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Cloranfenicol (0,1 µg/mL - 0,4 µg/mL)**

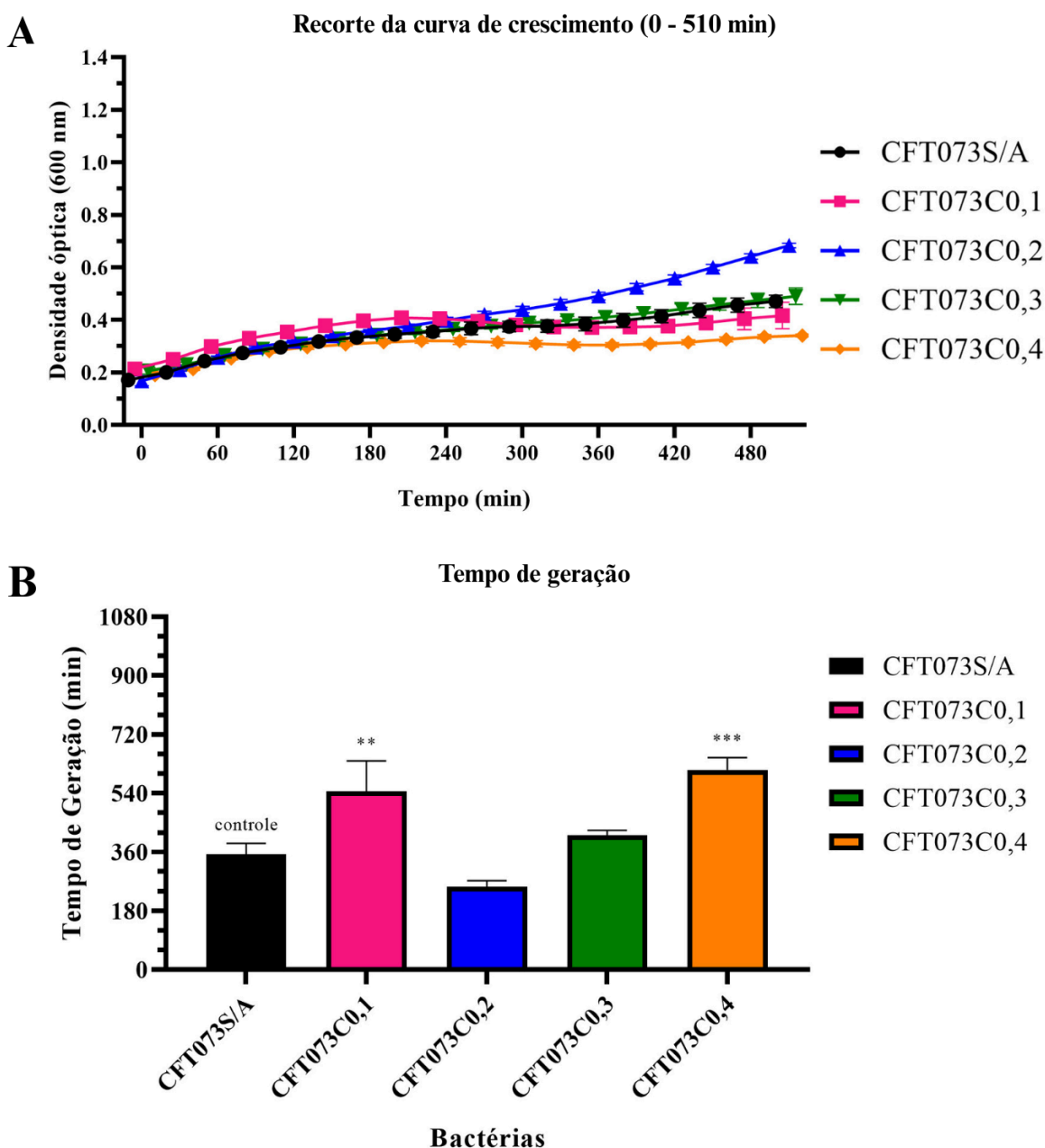


Fonte: elaborada pela autora.

(A) Recorte da curva de crescimento da UPEC90 até 510 minutos (8,5 h). (B) Comparação do Tempo de Geração entre a UPEC90S/A (barra preta) e as culturas adaptadas (CBAs) às CSI de Cloranfenicol. Os asteriscos acima das barras representam um valor de  $p < 0,05$ . UPEC90S/A: UPEC90 original com cultivo sem Cloranfenicol; UPEC90C0,1: CBA à 0,1 µg/mL de Cloranfenicol; UPEC90C0,2: CBA à 0,2 µg/mL de Cloranfenicol; UPEC90C0,3: CBA à 0,3 µg/mL de Cloranfenicol; UPEC90C0,4: CBA à 0,4 µg/mL de Cloranfenicol.

Na curva de crescimento da CFT073 incubada em LB com Cloranfenicol, assim como observado na incubação em Gentamicina, não é possível distinguir o padrão de crescimento entre as culturas cultivadas nas diferentes concentrações de antimicrobianos. Os dados do Tempo de Geração mostraram que metade das culturas adaptadas apresentou alguma diferença significativa comparado ao crescimento da S/A. CFT073C0,1 e CFT073C0,4 tiveram um crescimento ligeiramente mais lento (Figura 6).

**Figura 6 - Tempo de geração (g) da *Escherichia coli* CFT073 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Cloranfenicol (0,1 µg/mL - 0,4 µg/mL)**

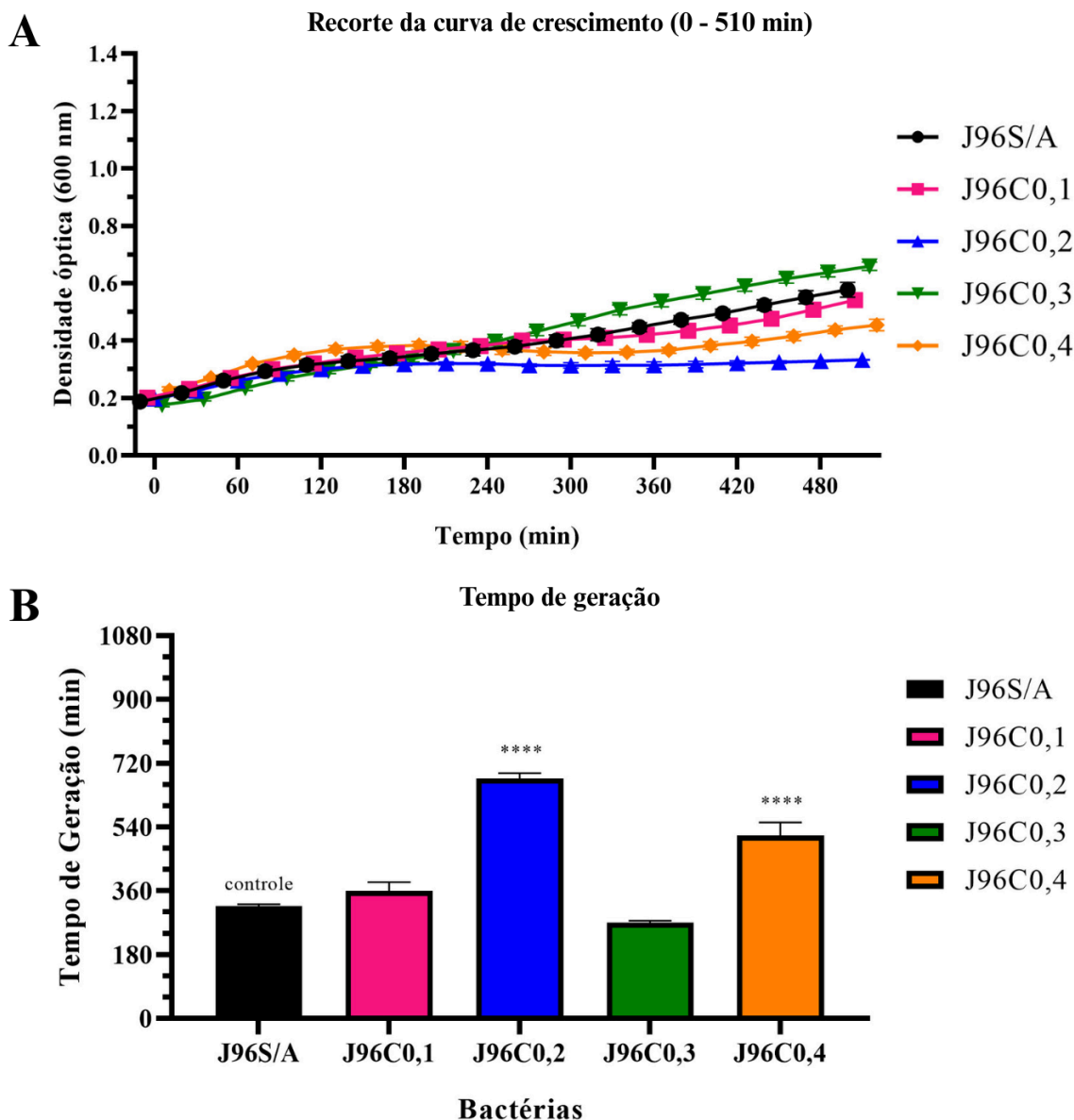


Fonte: elaborada pela autora.

(A) Recorte da curva de crescimento da CFT073 até 510 minutos (8,5 h). (B) Comparação do Tempo de Geração entre a CFT073S/A (barra preta) e as culturas adaptadas (CBAs) às CSI de Cloranfenicol. Os asteriscos acima das barras representam um valor de  $p < 0,05$ . CFT073S/A: CFT073 original com cultivo sem Cloranfenicol; CFT073C0,1: CBA à 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de Cloranfenicol; CFT073C0,2: CBA à 0,2  $\mu\text{g/mL}$  de Cloranfenicol; CFT073C0,3: CBA à 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de Cloranfenicol; CFT073C0,4: CBA à 0,4  $\mu\text{g/mL}$  de Cloranfenicol.

A cultura S/A da linhagem J96 apresentou crescimento pouco divergente ao observado para suas CBAs. Contudo, o tempo de geração de duas CBAs, J96C0,2 e J96C0,4, apresentaram valores maiores quando comparadas ao de S/A e as demais CBAs (Figura 7).

**Figura 7 - Tempo de geração (g) da *Escherichia coli* J96 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Cloranfenicol (0,1 µg/mL - 0,4 µg/mL)**



Fonte: elaborada pela autora.

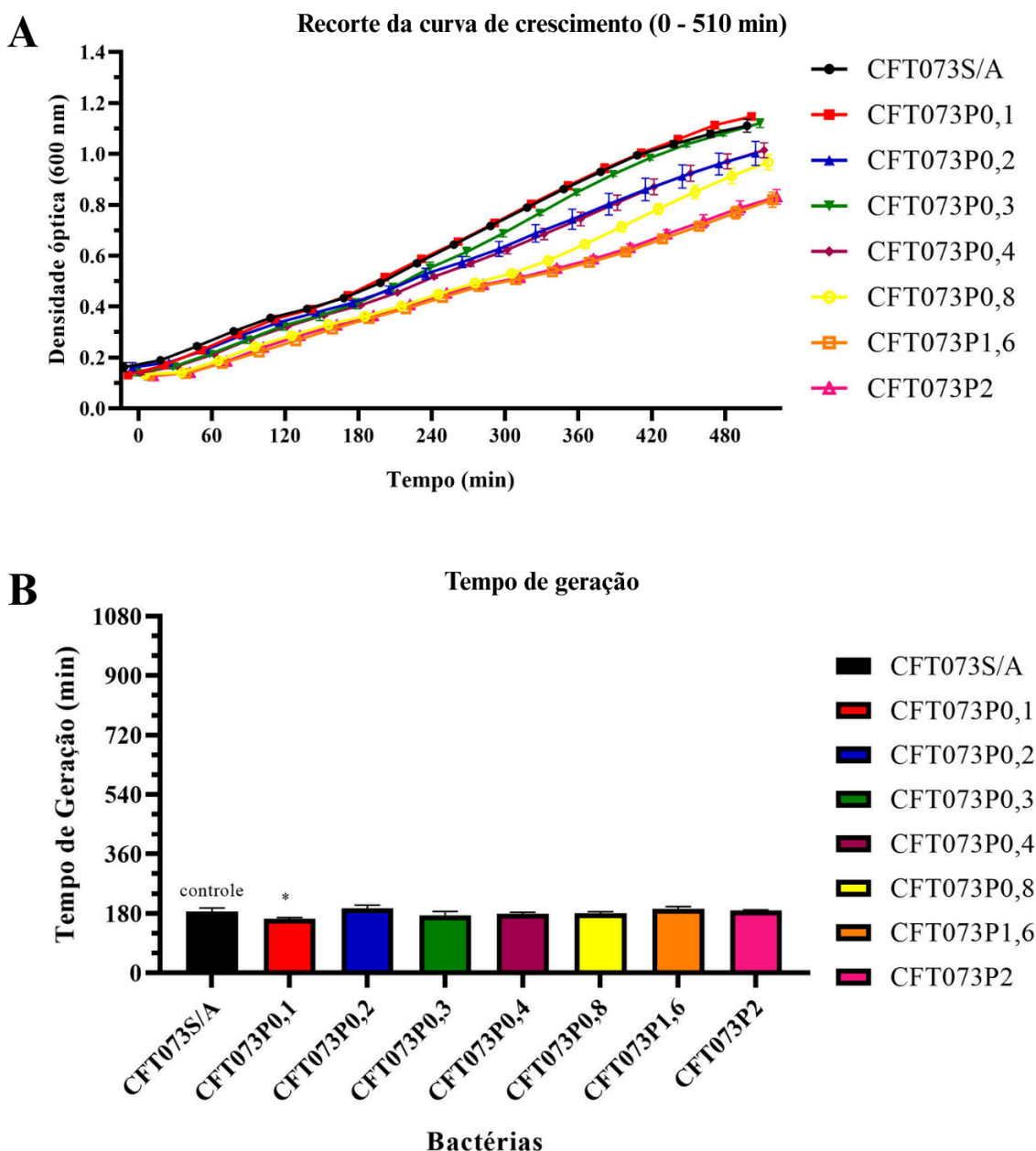
(A) Recorte da curva de crescimento da J96 até 510 minutos (8,5 h). (B) Comparação do Tempo de Geração entre a J96S/A (barra preta) e as culturas adaptadas (CBAs) às CSI de Cloranfenicol. Os asteriscos acima das barras representam um valor de  $p < 0,05$ . J96S/A: J96 original com cultivo sem Cloranfenicol; J96C0,1: CBA à 0,1 µg/mL de Cloranfenicol; J96C0,2: CBA à 0,2 µg/mL de Cloranfenicol; J96C0,3: CBA à 0,3 µg/mL de Cloranfenicol; J96C0,4: CBA à 0,4 µg/mL de Cloranfenicol.

A indução da resistência de todas as linhagens, UPEC90, CFT073 e J96, em Cloranfenicol não atingiu a CIM desse antimicrobiano devido à limitação de crescimento nas

incubação em LB com concentrações de Cloranfenicol acima de 0,4  $\mu\text{g/mL}$ . Por esta razão, a caracterização destas CBAs não foi continuada.

A curva de crescimento de CFT073 em CSI de Polimixina B seguiu um padrão semelhante daquele apresentado nos outros 2 antimicrobianos. No Tempo de Geração é possível distinguir uma ligeira diferenciação em uma cultura adaptada, a CFT073 Poli B 0,1, que teve um menor tempo do que a cultura S/A (Figura 8).

**Figura 8 - Tempo de geração (g) da *Escherichia coli* CFT073 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Polimixina B (0,1  $\mu\text{g/mL}$  - 2,0  $\mu\text{g/mL}$ )**

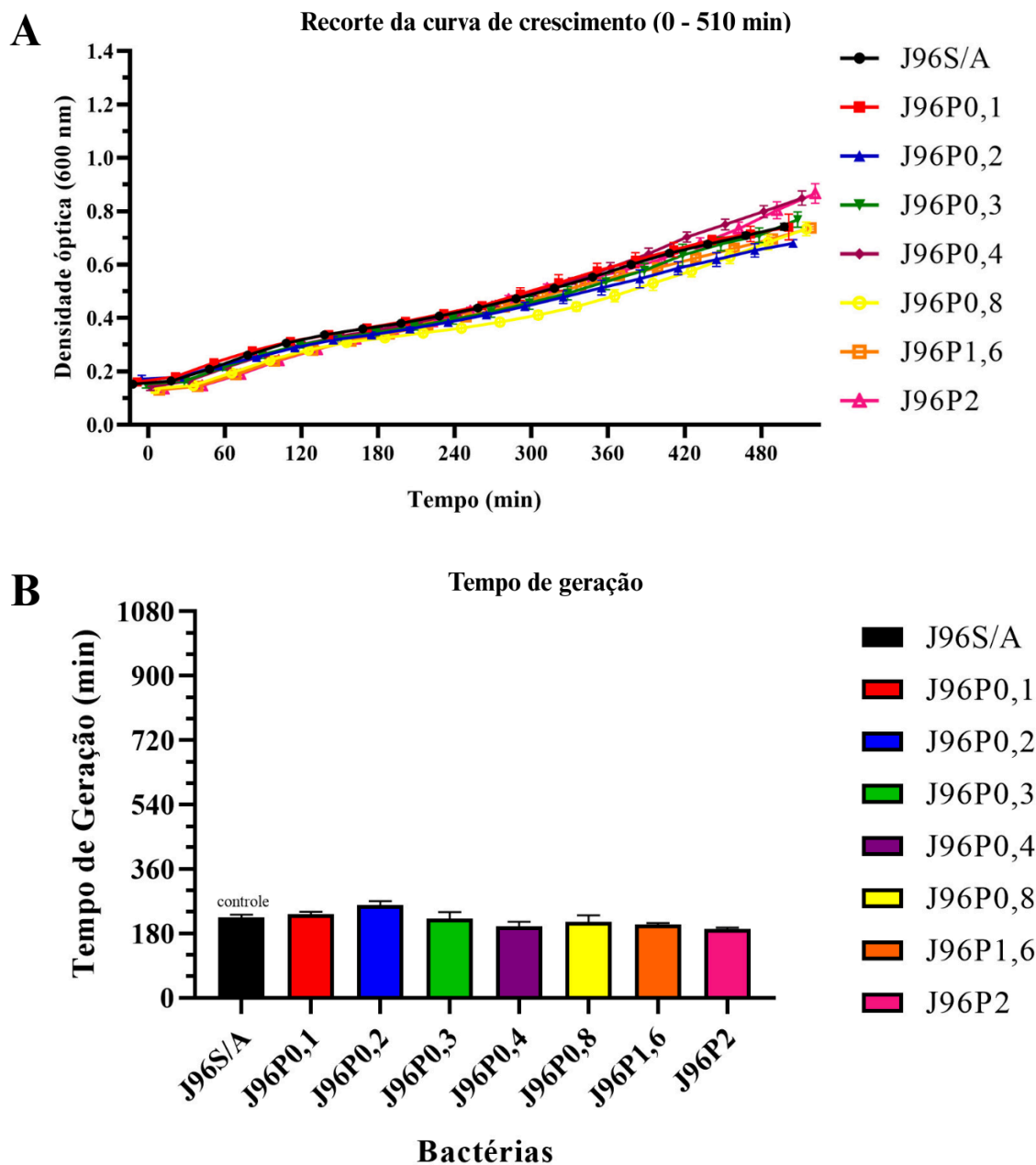


Fonte: elaborada pela autora.

(A) Recorte da curva de crescimento da CFT073 até 510 minutos (8,5 h). (B) Comparação do Tempo de Geração entre a CFT073S/A (barra preta) e as culturas adaptadas (CBAs) às CSI de Polimixina B. Os asteriscos acima das barras representam um valor de  $p < 0,05$ . CFT073S/A: CFT073 original com cultivo sem Polimixina B; CFT073P0,1: CBA à 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de Polimixina B; CFT073P0,2: CBA à 0,2  $\mu\text{g/mL}$  de Polimixina B; CFT073P0,3: CBA à 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de Polimixina B; CFT073P0,4: CBA à 0,4  $\mu\text{g/mL}$  de Polimixina B; CFT073P0,8: CBA à 0,8  $\mu\text{g/mL}$  de Polimixina B; CFT073P1,6: CBA à 1,6  $\mu\text{g/mL}$  de Polimixina B; CFT073P2: CBA à 2,0  $\mu\text{g/mL}$  de Polimixina B.

A curva de crescimento da J96 incubada em LB com Polimixina B apresentou um padrão semelhante entre todas as culturas analisadas e, inclusive, não foi identificada diferença significativa de crescimento delas por meio da comparação do Tempo de Geração (Figura 9).

**Figura 9 - Tempo de geração (g) da *Escherichia coli* J96 e de suas culturas adaptadas à exposição de concentrações crescentes de Polimixina B (0,1 µg/mL - 2,0 µg/mL)**



Fonte: elaborada pela autora.

(A) Recorte da curva de crescimento da J96 até 510 minutos (8,5 h). (B) Comparação do Tempo de Geração entre a J96S/A (barra preta) e as culturas adaptadas (CBAs) às CSI de Polimixina B. Os asteriscos acima das barras representam um valor de  $p < 0,05$ . J96S/A: J96 original com cultivo sem Polimixina B; J96P0,1: CBA à 0,1 µg/mL de Polimixina B; J96P0,2: CBA à 0,2 µg/mL de Polimixina B; J96P0,3: CBA à 0,3 µg/mL de Polimixina B; J96P0,4: CBA à 0,4 µg/mL de Polimixina B; J96P0,8: CBA à 0,8 µg/mL de Polimixina B; J96P1,6: CBA à 1,6 µg/mL de Polimixina B; J96P2: CBA à 2,0 µg/mL de Polimixina B.

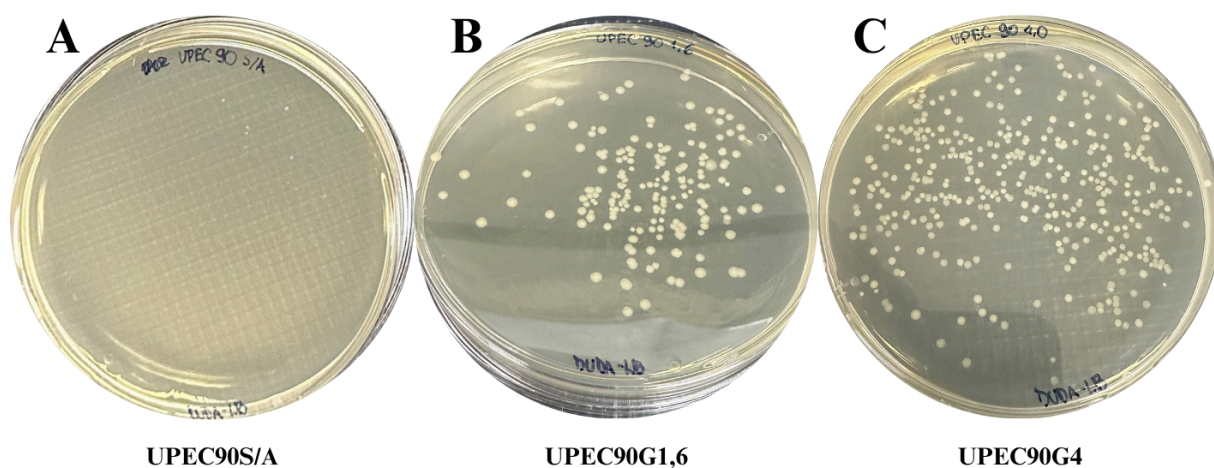
Apesar das linhagens CFT073 e J96 apresentarem crescimento em cultivo com Polimixina B em sua CIM, a linhagem UPEC90 não apresentou crescimento em cultivo neste antimicrobiano. Por essa razão, a caracterização de CBAs cultivadas em Polimixinas não foi continuada. É importante ressaltar que as linhagens apresentaram comportamentos semelhantes mesmo expostas a antimicrobianos diferentes. As CBAs da UPEC90 apresentaram valores de DO mais altos do que a cultura não exposta a antimicrobianos (UPEC90S/A) (Figuras 3 e 5). Esse comportamento diverge dos achados de Mathieu *et al*, visto que o crescimento da *E. coli* tratada com doses subinibitórias de ampicilina alcançou DOs mais baixas do que o controle não tratado (MATHIEU, 2016). Similarmente, os achados de Heß e Gallert demonstraram que as colônias de *E. coli*, na presença de concentrações ambientais de antimicrobianos, obtiveram uma taxa de crescimento e uma DO menores (HEß e GALLERT, 2016). Os resultados da CFT073 (Figuras 4, 6 e 8) e da J96 (Figuras 7 e 9) não apresentaram diferenças estatísticas significativas, salvo poucas exceções, nas quais as culturas adaptadas seguiram o padrão de menor crescimento.

## 5.2. DETERMINAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS ADAPTADAS (CBAs) ÀS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS

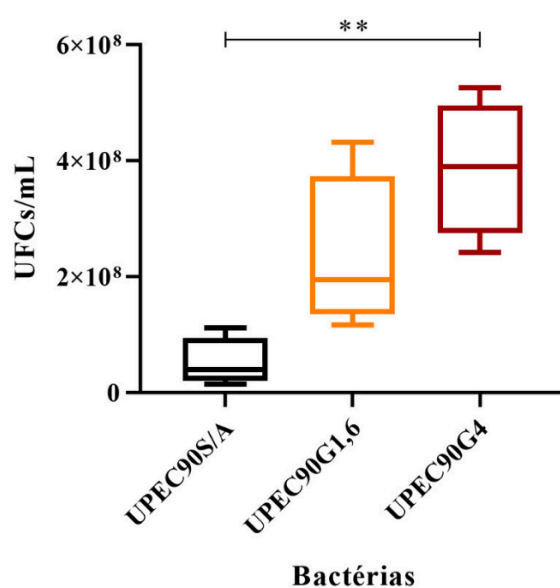
Para determinar a sobrevivência bacteriana após a aquisição de RA, três CBAs obtidas a partir de UPEC90 foram selecionadas: UPEC90G1,6 (adaptada a 1,6 µg/mL de Gentamicina) e UPEC90G4 (adaptada a 4,0 µg/mL de Gentamicina). A seleção destas culturas ocorreu em razão das diferenças significativas observadas no tempo de geração (*g*) em relação à cultura S/A (Figura 3).

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) recuperadas após o cultivo da UPEC90S/A, UPEC90G1,6 e UPEC90G4, mostrou que a viabilidade da cultura S/A foi bastante comprometida pela sua exposição ao CIM de Gentamicina (Figura 10), indicando a sensibilidade da linhagem em concentrações inibitórias deste antimicrobiano. Por outro lado, o número de UFCs recuperadas após a incubação das CBAs foi cerca de 10 vezes maior do que o da cultura S/A, sendo significativamente maior para a UPEC90G4 (Figura 10 e Tabela 2). Estes dados indicam que a aquisição de RA pode ser de caráter permanente à linhagem. Além disso, foi possível observar que as colônias recuperadas a partir da incubação das duas culturas adaptadas em CIM do antimicrobiano foram maiores em diâmetro do que aquelas recuperadas a partir da incubação da S/A (Figura 10).

**Figura 10 - Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) obtidas após exposição das linhagens de *Escherichia coli* UPEC90S/A e CBAs UPEC90G1,6 e UPEC90G4 à concentração inibitória de Gentamicina 4,0 µg/mL por 60 minutos**



**D** **Determinação da sobrevivência das linhagens UPEC90 e CBAs à concentrações inibitórias de antimicrobianos**



Fonte: elaborada pela autora.

Cada cultura foi incubada em meio de cultura LB com CIM de gentamicina (4,0 µg/mL) por 1 hora. Após incubação, as amostras foram diluídas em  $10^{-6}$  e inoculadas em meio LB ágar sem gentamicina. (A) UPEC90: foram observadas em média 51 UFCs por placa. (B) CBA UPEC90G1,6 (adaptada a 1,6 µg/mL de Gentamicina): contabilizando em média 234 UFCs por placa. (C) CBA UPEC90G4 (adaptada a 4,0 µg/mL de Gentamicina): foram observadas em média 387 UFCs por placa. (D) Determinação da sobrevivência da cultura controle UPEC90S/A (sem RA) (preto), CBA UPEC90G1,6 (laranja) e CBA UPEC90G4 (vermelho); os asterisco (\*\*) representam a diferença estatística significativa entre a UPEC90S/A e a UPEC90G4 ( $p \leq 0,01$ ).

**Tabela 2 - Contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) em 1mL de meio LB após incubação de 1 hora em 4 µg/mL de Gentamicina**

	UPEC90S/A	UPEC90G1,6	UPEC90G4
1	1,11E+08	4,32E+08	4,03E+08
2	4,10E+07	1,16E+08	3,77E+08
3	3,80E+07	1,92E+08	5,26E+08
4	1,40E+07	1,97E+08	2,41E+08
Média	5,10E+07	2,34E+08	3,87E+08
Desvio Padrão	4,18E+07	1,37E+08	1,17E+08

Fonte: elaborada pela autora.

UPEC90S/A: Linhagem de *Escherichia coli* não submetida à indução de RA.

UPEC90G1,6: Linhagem de *Escherichia coli* resultante da adaptação de UPEC90 à 1,6 µg/mL de Gentamicina.

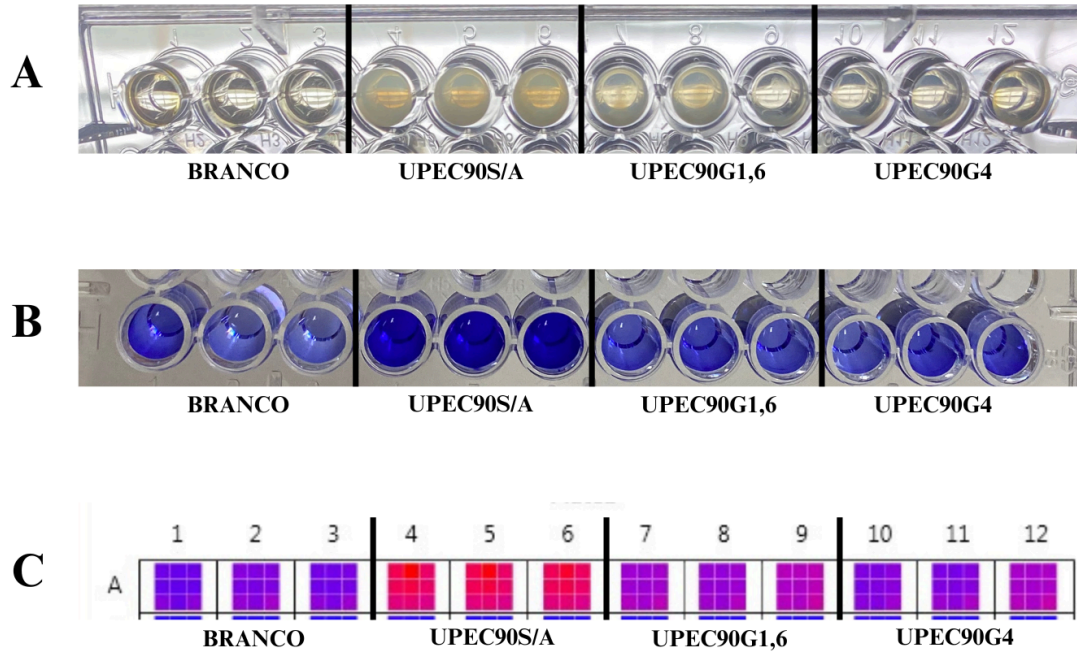
UPEC90G4: Linhagem de *Escherichia coli* resultante da adaptação de UPEC90 à 4 µg/mL de Gentamicina.

### 5.3. PRODUÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO

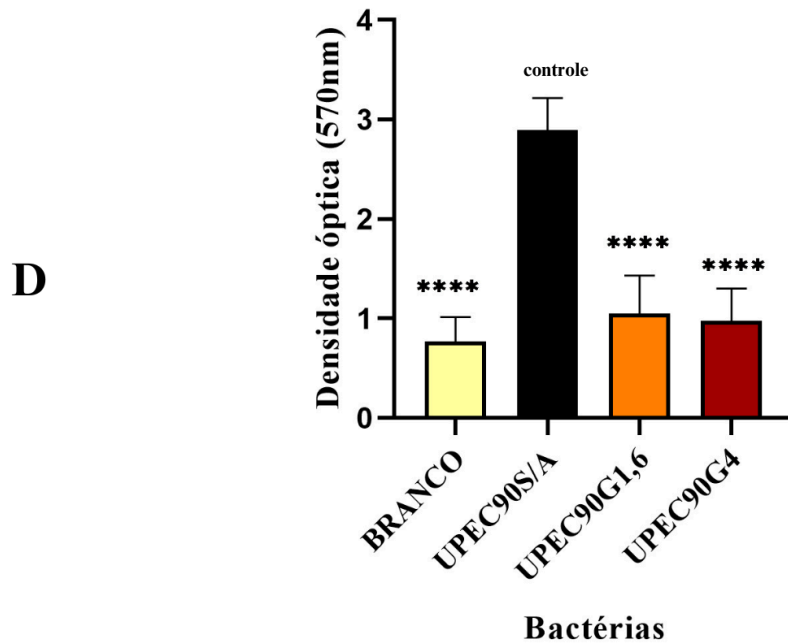
No ensaio de biofilme também foi possível observar diferenças de produção de biofilme entre as mesmas duas CBAs e a S/A. Enquanto a cultura S/A apresentou biofilme forte, as CBAs UPEC90G1,6 e UPEC90G4, apresentaram menor biomassa no biofilme aderido (Figura 11). Esse comportamento também foi observado por Wojnicz e Tichaczek-Goska ao comparar a produção de biofilme de culturas de *E. coli* sem tratamento de antimicrobiano e culturas submetidas a CSI de ciprofloxacino, amicacina e colistina. A amicacina, também da classe dos aminoglicosídeos, foi considerada como a mais efetiva na erradicação do biofilme, reduzindo a DO para 25% do valor da amostra controle (WOJNICZ e TICHACZEK-GOSKA, 2013). Assim como neste estudo, a exposição prévia ao antimicrobiano demonstrou relação direta com a queda da biomassa no biofilme, sendo quantificada através de uma menor densidade óptica.

Estes dados podem sugerir que as culturas adaptadas apresentam estratégias de sobrevivência em superfícies abióticas diferentes da S/A. Enquanto as culturas adaptadas possivelmente adotaram um crescimento acelerado (Figura 3), a cultura S/A tem um crescimento mais lento e uma significativa produção de biofilme, garantindo o aumento de sua população em superfícies abióticas (Figura 11).

**Figura 11 - Quantificação de biomassa de *Escherichia coli* aderida em superfície de poliestireno após 5 dias de incubação à 37°C**



**Ensaio de formação de biofilme de 5 dias com linhagens de UPEC90S/A e CBAs UPEC90G1,6 e UPEC90G4**



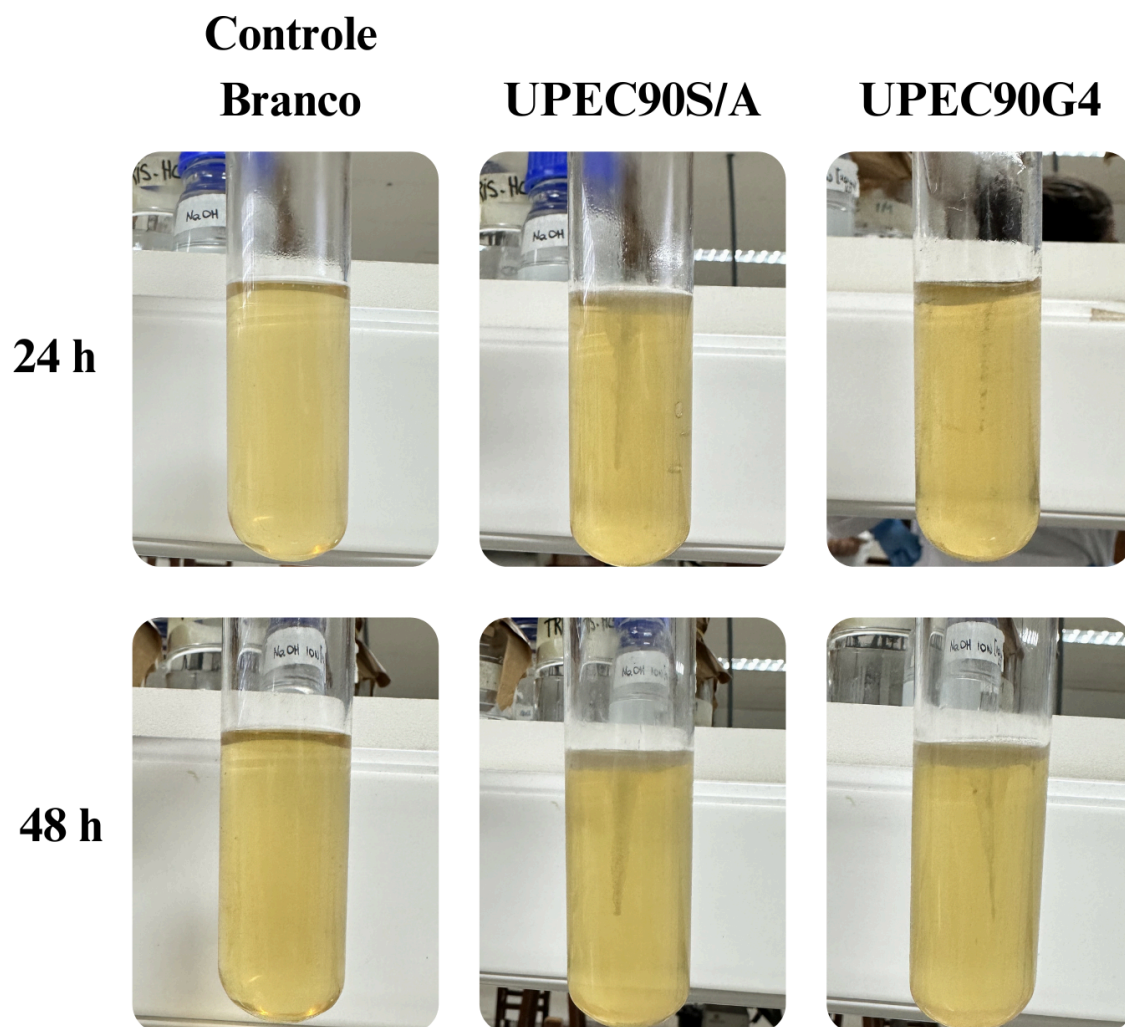
Fonte: elaborada pela autora.

(A) Placa de 96 poços após 5 dias de incubação da cultura de *Escherichia coli* UPEC90S/A e das CBA à 37°C. (B) Placa após coloração com Cristal Violeta da biomassa bacteriana aderida à superfície. (C) Imagem gerada pelo espectrofotômetro após leitura de 9 pontos em cada poço da placa de 96. (D) Gráfico comparando o valor médio das densidades ópticas em  $DO_{600nm}$  das culturas bacterianas que passaram pela adaptação com antimicrobiano e do cultivo selvagem. Os asteriscos (\*\*\*) representam diferença estatística significativa quando comparados ao controle ( $p \leq 0,0001$ ).

#### 5.4. ENSAIO DE MOTILIDADE

Ao analisar o crescimento em meio semi-sólido (LB ágar 0,5%) foi observado que a cultura UPEC90S/A e a CBA UPEC90G4 não possuem motilidade. A área de crescimento de ambos os inóculos correspondeu exatamente ao espaço onde a agulha de inóculo foi inserida, demonstrando apenas crescimento estático, sem motilidade (Figura 12). No trabalho de Wojnicz e Tichaczek-Goska, na maioria dos casos, não foi identificada diferença na motilidade entre culturas expostas à CSI de antimicrobianos e culturas não expostas, mas algumas células isoladas de biofilmes de 72 h tratadas com CSI perderam a motilidade (WOJNICZ e TICHACZEK-GOSKA, 2013).

**Figura 12 - Ensaio de motilidade em meio LB (ágar 0,5%) das linhagens de *Escherichia coli* UPEC90S/A e CBA UPEC90G4, avaliado após 24 h e 48 h de incubação à 37°C**



Fonte: elaborada pela autora.

## 5.5. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA CULTURA S/A E ADAPTADA

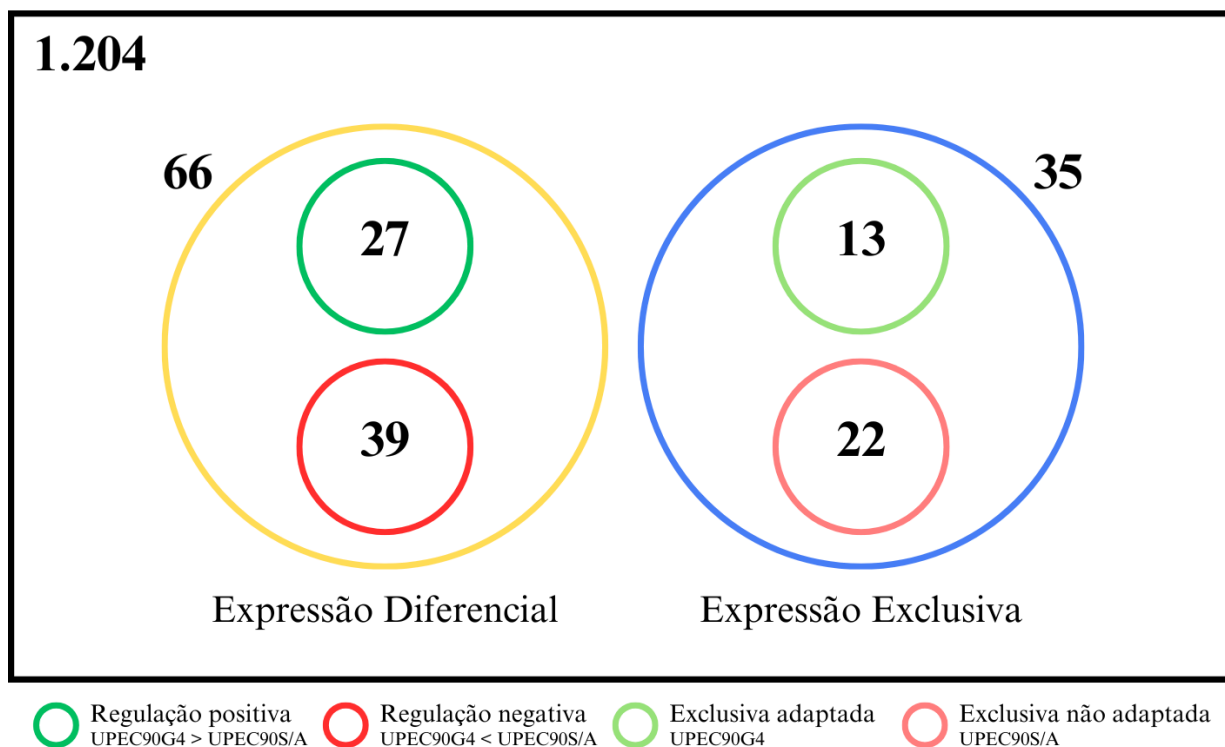
### 5.5.1. Extração de proteínas

A visualização do gel de poliacrilamida resultante da eletroforese (Apêndice A) permitiu identificar bandas bem definidas (Apêndice) demonstrando a qualidade do extrato proteico para análise proteômica.

### 5.5.2 Perfil diferencial de expressão de proteínas

Pela análise LC-MS/MS foram identificadas 1.204 proteínas no total. Contudo, após a normalização dos dados e análise estatística (Teste T) para identificar aquelas que apresentaram expressão diferencial, esse número foi reduzido para 5%, totalizando 66 proteínas. Adicionalmente, foi realizada a prospecção de proteínas com expressão exclusiva em apenas uma das condições testadas. A análise estatística (como Teste T menor que 0,05) possibilitou identificar 66 proteínas diferencialmente expressas de forma significativa entre as condições avaliadas. 27 dessas mostraram-se mais expressas na CBA UPEC90G4 do que na S/A, representando aproximadamente 40% do montante. O restante das proteínas (correspondente aos outros 60%) exibiu expressão diminuída na CBA em relação à S/A. Entre as detectadas em apenas uma condição, 22 proteínas estavam presentes apenas na cultura UPEC90S/A e 13 somente na CBA UPEC90G4. No total, foram elencadas 101 proteínas com a expressão diferencial entre uma condição e a outra (Figura 13). Essas proteínas participam de diversas vias metabólicas do metabolismo central, como: Ciclo de Krebs, Glicólise/Gliconeogênese, Fosforilação Oxidativa, Via das Pentoses Fosfato, entre outras. Contudo, algumas proteínas não puderam ser classificadas quanto às vias por falta de informação nos bancos de dados utilizados, KEGG e UniProt (Quadro 4-8).

**Figura 13 - Proteínas identificadas pela análise LC-MS/MS e selecionadas estatisticamente (Teste T) para análises**



Fonte: elaborada pela autora.

**Quadro 4 - Proteínas associadas ao metabolismo que apresentaram expressão diferencial (teste T < 0,05) entre a linhagem de *Escherichia coli* UPEC90S/A e CBA UPEC90G4**

1. Metabolismo				
Nº de acesso	Nome da Proteína	Gene	Classe	Regulação
P0AEB2	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA	<i>dacA</i>	Biossíntese de peptidoglicano	Positiva
P0A6L4	N-acetylneuraminate lyase	<i>nanA</i>	Biossíntese e metabolismo de glicanos	Negativa
P08200	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	<i>icd</i>	Ciclo de Krebs	Negativa
P69054	Succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit	<i>sdhC</i>	Ciclo de Krebs	"Exclusiva" S/A
P0A836	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	<i>sucC</i>	Ciclo de Krebs	Negativa
P25516	Aconitate hydratase A	<i>acnA</i>	Ciclo de Krebs	Negativa

P0A9M0	Lon protease	<i>lon</i>	Degradação de proteínas	Positiva
P11868	Propionate kinase	<i>tdcD</i>	Fermentação	Negativa
P0ABB4	ATP synthase subunit beta	<i>atpD</i>	Fosforilação oxidativa	Positiva
P0AEL0	Formate dehydrogenase, cytochrome b556(fdo) subunit	<i>fdoI</i>	Fosforilação oxidativa	"Exclusiva" S/A
P0AFD4	NADH-quinone oxidoreductase subunit H; AltName: Full=NADH dehydrogenase I subunit H;	<i>nuoH</i>	Fosforilação oxidativa	Negativa
P0A9B2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	<i>gapA</i>	Glicólise / Gliconeogênese	Positiva
P22259	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	<i>pckA</i>	Glicólise / Gliconeogênese	Negativa
P0A796	ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1	<i>pfkA</i>	Glicólise / Gliconeogênese	Positiva
P23538	Phosphoenolpyruvate synthase	<i>ppsA</i>	Glicólise / Gliconeogênese	Negativa
P0A9I1	Citrate lyase subunit beta	<i>citE</i>	Metabolismo anaeróbico	Negativa
P42632	PFL-like enzyme TdcE; AltName: Full=Keto-acid formate acetyltransferase	<i>tdcE</i>	Metabolismo anaeróbico	Negativa
P0A825	Serine hydroxymethyltransferase	<i>glyA</i>	Metabolismo de aminoácidos	Positiva
P22634	Glutamate racemase	<i>murI</i>	Metabolismo de aminoácidos	"Exclusiva" adaptada
P0AAV4	5-oxoprolinase subunit B	<i>pxpB</i>	Metabolismo de aminoácidos	Negativa
P75745	5-oxoprolinase subunit C	<i>pxpC</i>	Metabolismo de aminoácidos	"Exclusiva" adaptada
P21170	Biosynthetic arginine decarboxylase	<i>speA</i>	Metabolismo de aminoácidos	Positiva
P0AGF6	L-threonine dehydratase catabolic TdcB	<i>tdcB</i>	Metabolismo de aminoácidos	Negativa
P0A853	Tryptophanase	<i>tnaA</i>	Metabolismo de aminoácidos	"Exclusiva" S/A
P26646	Probable acrylyl-CoA reductase AcuI	<i>acuI</i>	Metabolismo de carboidratos	Negativa
P0A6T3	Galactokinase	<i>galk</i>	Metabolismo de carboidratos	Negativa
P24175	Phosphomannomutase	<i>manB</i>	Metabolismo de carboidratos	"Exclusiva" S/A
P0A8A4	Phosphoenolpyruvate synthase regulatory protein	<i>ppsR</i>	Metabolismo de carboidratos	"Exclusiva" S/A

P05707	Sorbitol-6-phosphate 2-dehydrogenase	<i>srlD</i>	Metabolismo de carboidratos	"Exclusiva" S/A
P0A8G3	Uronate isomerase	<i>uxaC</i>	Metabolismo de carboidratos	Negativa
P46130	Putative acyl-CoA thioester hydrolase YbhC	<i>ybhC</i>	Metabolismo de carboidratos	Positiva
P77667	Iron-sulfur cluster assembly protein SufA	<i>sufA</i>	Metabolismo de cofatores e vitaminas	Positiva
P0AC13	Dihydropteroate synthase	<i>folP</i>	Metabolismo de cofatores e vitaminas	"Exclusiva" S/A
P23893	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	<i>hemL</i>	Metabolismo de cofatores e vitaminas	Negativa
P0AFI7	Pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	<i>pdxH</i>	Metabolismo de cofatores e vitaminas	Positiva
P77150	Pyridoxal kinase PdxY	<i>pdxY</i>	Metabolismo de cofatores e vitaminas	"Exclusiva" adaptada
P61714	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	<i>ribE</i>	Metabolismo de cofatores e vitaminas	Negativa
P25534	2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase	<i>ubiH</i>	Metabolismo de cofatores e vitaminas	"Exclusiva" S/A
Q46868	Ubiquinone biosynthesis accessory factor UbiK	<i>ubiK</i>	Metabolismo de cofatores e vitaminas	Negativa
P0A9H7	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	<i>cfa</i>	Metabolismo de lipídeos	Positiva
P0A6Q3	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	<i>fabA</i>	Metabolismo de lipídeos	Negativa
P0A6F3	Glycerol kinase	<i>glpK</i>	Metabolismo de lipídeos	Negativa
P25524	Cytosine deaminase	<i>codA</i>	Metabolismo de nucleotídeos	"Exclusiva" adaptada
P60546	Guanylate kinase	<i>gmk</i>	Metabolismo de nucleotídeos	Positiva
P0A9M5	Xanthine-guanine phosphoribosyltransferase	<i>gpt</i>	Metabolismo de nucleotídeos	Positiva
P0A7E5	CTP synthase	<i>pyrG</i>	Metabolismo de nucleotídeos	Negativa
P32709	Protein NrfD	<i>nrfD</i>	Metabolismo do nitrogênio	"Exclusiva" adaptada
P33937	Periplasmic nitrate reductase	<i>napA</i>	Metabolismo do nitrogênio	Positiva

P08201	Nitrite reductase (NADH) large subunit	<i>nirB</i>	Metabolismo do nitrogênio	Positiva
P19930	Hydrogenase 1 maturation protease	<i>hyaD</i>	Peptidases e inibidores	Negativa
P76002	Inhibitor of g-type lysozyme	<i>pliG</i>	Peptidases e inibidores	Negativa
P0A6K6	Phosphopentomutase	<i>deoB</i>	Via das pentoses fosfato	Negativa
P00350	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	<i>gnd</i>	Via das pentoses fosfato	Positiva
P0A867	Transaldolase A	<i>talA</i>	Via das pentoses fosfato	Negativa

Fonte: elaborado pela autora.

A diferença de expressão (positiva ou negativa) refere-se à comparação linhagem com RA/linhagem sensível à Gentamicina (CBA UPEC90G4/ UPEC90S/A). “Exclusiva”: foi observada apenas em uma das condições.

As vias identificadas estão associadas ao metabolismo, majoritariamente, mas também foram distinguidas vias associadas ao processamento de informações genéticas, ambientais e aos processos celulares (Quadros 4-8). Em termos gerais, o perfil de expressão proteica indica uma diminuição no catabolismo de carboidratos da CBA UPEC90G4, bem como uma redução de atividade das vias convencionais de energia (Ciclo de Krebs e Fosforilação Oxidativa), sugerindo que a bactéria altera seu metabolismo energético quando submetida às CSI de gentamicina.

Seis enzimas de reações catabólicas relacionadas ao metabolismo de carboidratos apresentaram redução de expressão em CBA UPEC90G4: Acrilil-CoA redutase (gene: *acuI*), Galactoquinase (gene: *galK*), Fosfomanomutase (*manB*), Proteína reguladora da sintase de fosfoenolpiruvato (gene: *ppsR*), Sorbitol-6-fosfato-2-desidrogenase (gene: *srID*) e Isomerase de uronato (gene: *uxaC*). Todas essas proteínas estão associadas à reações que são fontes alternativas de carboidratos.

Ao se analisar as vias da Glicólise e da Gliconeogênese, foram identificadas quatro proteínas diferencialmente expressas: duas com regulação positiva e duas com regulação negativa. Entre aquelas mais expressas na cultura adaptada estão: (i) Isoenzima 1 da 6-fosfofrutoquinase dependente de ATP (gene: *pfkA*) que participa do início da Glicólise, catalisando a fosforilação da D-frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato com uso de ATP; e a (ii) Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase A (gene: *gapA*), que catalisa a fosforilação oxidativa do gliceraldeído 3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato, e também o caminho inverso, participando tanto da Glicólise quanto da Gliconeogênese. Entre as proteínas que apresentaram-se com expressão reduzida em CBA UPEC90G4 estão: (i) Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (gene:

*pckA*) envolvida exclusivamente na Gliconeogênese, catalisando a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato; e a (ii) Fosfoenolpiruvato sintase (gene: *ppsA*), responsável por catalisar a fosforilação do piruvato em fosfoenolpiruvato, também associada com a Gliconeogênese. Dessa forma, sugere-se que a bactéria adaptada prioriza a glicólise, em detrimento da gliconeogênese.

Foram identificadas quatro proteínas que atuam diretamente no Ciclo de Krebs e todas estão com a expressão baixa na CBA UPEC90G4: Isocitrato desidrogenase (gene: *icd*), responsável por catalisar a descarboxilação oxidativa do isocitrato em 2-oxoglutarato e dióxido de carbono com a redução concomitante de  $\text{NADP}^+$ , além de ser é um dos pontos de controle do ciclo, sendo uma etapa limitante na velocidade dele (ALABDULADHEM, 2022); Succinato Desidrogenase (gene: *sdhC*), especificamente a subunidade do citocromo b556 que ancora a proteína à membrana celular; a subunidade beta da Succinato-CoA ligase (gene: *sucC*), responsável por conferir especificidade de nucleotídeo à enzima e se liga ao substrato succinato; e a Aconitato hidratase A (gene: *acnA*), que catalisa e isomerização reversível do citrato em isocitrato via cis-aconitato. Como essa via representa o início do metabolismo aeróbico da célula, a redução de sua expressão pode indicar uma diminuição da atividade de metabolismo aeróbio na bactéria adaptada.

A presença de três enzimas com expressão elevada em CBA UPEC90G4: proteína *nrfD* (gene: *nfrD*), nitrito redutase (gene: *nirB*) e nitrato redutase periplasmática (gene: *napA*), sugere que a bactéria está utilizando a via do nitrogênio em condições anaeróbicas. Já foi descrito em *E. coli* a redução de nitrato em nitrito, pela nitrato redutase, e posterior redução do nitrito à amônio pela nitrito redutase, acumulando o amônio no meio de forma progressiva (TISO, 2015). Esse processo pode ser realizado por meio de dois sistemas diferentes: Nap/Nrf, atuando no periplasma em concentrações mais baixas de nitrato, e Nar/Nir, produzindo amônio no citoplasma quando a disponibilidade do nitrato é alta (WANG e GUNSALUS, 2000). Wang *et al* analisaram o papel das duas nitrito redutases, *nir* e *nrf*, e observaram que *nir* é necessária para a assimilação de nitrato e nitrito, ademais, em condições que favorecem a expressão de *nrf*, o amônio produzido pode fornecer o nitrogênio assimilatório necessário para o crescimento (WANG, 2019). Quando o nitrato está em abundância a bactéria consegue utilizá-lo para a oxidação de NADH e para a produção de ATP, mas à medida que a concentração dele torna-se limitante, a nitrito redutase *nir* pode usar o nitrito resultante para a amonificação fermentativa, combinando a respiração anaeróbica e fermentação de forma a otimizar o metabolismo energético (WANG, 2019). Esse mecanismo é vantajoso para a célula em comparação com a

fermentação clássica, possibilitando melhor crescimento, além de promover o equilíbrio redox. Com base no exposto, é possível que a CBA UPEC90G4 esteja adotando essa estratégia, assim ela consegue escapar da gentamicina, que é dependente de oxigênio, e crescer mais rapidamente do que através da fermentação.

Foram identificadas proteínas que participam da Fosforilação Oxidativa, duas com regulação negativa: Formato desidrogenase subunidade do citocromo b556 (gene: *fdoI*) e NADH-quinona oxidoredutase subunidade H (gene: *nuoH*); e uma com regulação positiva: ATP sintase subunidade beta (gene: *atpD*). A Formato desidrogenase permite o uso do formato como principal doador de elétrons durante a respiração aeróbica. A NADH-quinona oxidoredutase transporta elétrons do NADH para quinonas na cadeia respiratória. A ATP sintase, única regulada positivamente dentre as três, produz ATP a partir de ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana.

Três proteínas associadas à Via das Pentoses Fosfatos diferencialmente expressas foram identificadas: 6-fosfogluconato desidrogenase descarboxilante (gene: *gnd*), fosfopentomutase (gene: *deoB*) e transaldolase A (gene: *talA*), das quais apenas a primeira apresentou uma expressão superior na cultura adaptada. A 6-fosfogluconato desidrogenase catalisa a descarboxilação oxidativa do 6-fosfogluconato em ribulose 5-fosfato e CO<sub>2</sub>. A fosfopentomutase catalisa a conversão de desoxirribose 1-fosfato em desoxirribose 5-fosfato e ribose 1-fosfato em ribose 5-fosfato. Por fim, a transaldolase A está envolvida no equilíbrio dos metabólitos na via.

A Protease Lon (gene: *lon*) foi encontrada com a expressão aumentada em CBA UPEC90G4. Essa proteína faz a mediação da degradação seletiva de proteínas mutantes e anormais. Nesse contexto, a referida protease desempenha papel fundamental, uma vez que o efeito da gentamicina é interferir na produção de proteínas funcionais devido à sua ação no ribossomo (CHAVES, 2023). A Lon é necessária para a homeostase celular e a sobrevivência a danos no DNA e alterações de desenvolvimento induzidas por estresse.

**Quadro 5 - Proteínas associadas ao processamento da informação genética que apresentaram expressão diferencial (teste T < 0,05) entre a linhagem de *Escherichia coli* UPEC90S/A e CBA UPEC90G4**

<b>2. Processamento da Informação Genética</b>				
<b>Nº de acesso</b>	<b>Nome da Proteína</b>	<b>Gene</b>	<b>Classe</b>	<b>Regulação</b>
P75782	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase F	<i>rlmF</i>	Biogênese ribossômica	"Exclusiva" S/A
P0A8N0	Macrodomain Ter protein	<i>matP</i>	Processamento de informação genética	"Exclusiva" S/A
P09980	ATP-dependent DNA helicase Rep	<i>rep</i>	Replicação	"Exclusiva" adaptada
P0A8X0	Dual-action ribosomal maturation protein DarP	<i>darP</i>	Tradução	Negativa
P0A8N3	Lysyl-tRNA ligase	<i>lysS</i>	Tradução	Positiva
P0A7M9	Large ribosomal subunit protein bL31	<i>rpmE</i>	Tradução	Positiva
P0A7S3	Small ribosomal subunit protein uS12	<i>rpsL</i>	Tradução	Positiva
P0A7S9	Small ribosomal subunit protein	<i>rpsM</i>	Tradução	Positiva
P45531	Protein TusC	<i>tusC</i>	Transcrição	"Exclusiva" adaptada
Q57261	tRNA pseudouridine synthase	<i>truD</i>	Transcrição	Positiva

Fonte: elaborado pela autora.

A diferença de expressão (positiva ou negativa) refere-se à comparação linhagem com RA/linhagem sensível à Gentamicina (CBA UPEC90G4/ UPEC90S/A). "Exclusiva": foi observada apenas em uma das condições.

Dentre as proteínas identificadas relacionadas ao processamento da informação genética, foram destacadas: a Proteína de maturação ribossômica de dupla ação darP (gene: *darP*) e a Proteína da subunidade ribossômica pequena uS12 (gene: *rpsL*). A primeira, que apresentou expressão diminuída em CBA UPEC90G4, integra uma rede de fatores de biogênese da subunidade ribossômica 50S que se monta ao longo da interface 30S-50S, impedindo a formação de estruturas incorretas de rRNA 23S. A segunda está envolvida na precisão da tradução e está com a expressão aumentada. A proteína da subunidade ribossômica pequena (gene: *rpsM*) também foi encontrada com a expressão aumentada nas colônias de *E. coli* tratadas com CSI de ampicilina no estudo de Mathieu *et al.* Essa proteína é responsável por

controlar a expressão de um operon que codifica quatro proteínas ribossômicas e a subunidade alfa da RNA polimerase (MATHIEU, 2016).

**Quadro 6 - Proteínas associadas ao processamento da informação ambiental que apresentaram expressão diferencial (teste  $T < 0,05$ ) a linhagem de *Escherichia coli* UPEC90S/A e CBA UPEC90G4**

<b>3. Processamento da Informação Ambiental</b>				
<b>Nº de acesso</b>	<b>Nome da Proteína</b>	<b>Gene</b>	<b>Classe</b>	<b>Regulação</b>
P0ACK2	Putative aga operon transcriptional repressor	<i>agaR</i>	Fatores de transcrição	"Exclusiva" adaptada
P0ACN4	HTH-type transcriptional repressor AllR	<i>allR</i>	Fatores de transcrição	Negativa
P0A9F1	Transcriptional regulator MntR	<i>mntR</i>	Fatores de transcrição	"Exclusiva" adaptada
P07604	HTH-type transcriptional regulatory protein TyrR	<i>tyrR</i>	Fatores de transcrição	Negativa
P14375	Transcriptional regulatory protein ZraR	<i>zraR</i>	Fatores de transcrição	"Exclusiva" S/A
P13445	RNA polymerase sigma factor RpoS	<i>rpoS</i>	Regulador transcricional	Positiva

Fonte: elaborado pela autora.

A diferença de expressão (positiva ou negativa) refere-se à comparação linhagem com RA/linhagem sensível à Gentamicina (CBA UPEC90G4/ UPEC90S/A). "Exclusiva": foi observada apenas em uma das condições.

Foram identificados cinco fatores de transcrição que apresentaram expressão diferencial: dois deles tiveram sua expressão aumentada em CBA UPEC90G4 e os outros três diminuídos em relação à UPEC90S/A. O Possível repressor transcricional do operon aga (gene: *agaR*), atuando no transporte e metabolismo de N-acetilgalactosamina, e o Regulador transcricional *mntR* (gene: *mntR*), que reprime o *mntH* e o *mntS* e ativa o *mntP* na presença de manganês, estão regulados positivamente. Os três fatores restantes estão regulados negativamente. O Repressor transcricional do tipo HTH *allR* (gene: *allR*) é um repressor dos operons de utilização de alantoína e glioxilato. A Proteína reguladora transcricional tipo HTH *tyrR* (gene: *tyrR*) atua em múltiplos processos, incluindo: regular vários genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese ou transporte de fenilalanina, tirosina e triptofano; modular a expressão de pelo menos oito unidades de transcrição não ligadas e regular o gene *tyrP*. A

Proteína reguladora transcricional *zraR* (gene: *zraR*) faz parte de uma via de sinalização que gera uma resposta ao estresse do envelope, sendo importante para a integridade da membrana e contribuindo para a resistência aos antimicrobianos que tentam comprometê-la (ROME, 2018). Cabe ressaltar que o mecanismo de ação da gentamicina, antimicrobiano utilizado neste estudo, é ligar-se ao rRNA 16S na subunidade ribossômica 30S, perturbando a tradução do mRNA (CHAVES, 2023); o seu alvo celular não ser a membrana é consistente com a observação de que, mesmo sob pressão do antimicrobiano, a cultura adaptada não apresenta aumento de expressão da via *zraR*.

O fator sigma da RNA polimerase (gene: *rpoS*), que apresentou expressão elevada em CBA UPEC90G4, é o principal regulador transcricional da fase estacionária do crescimento e da resposta geral ao estresse, controlando, positivamente ou negativamente, a expressão de centenas de genes envolvidos em diversos grupos funcionais como fatores regulatórios, sistemas de transporte, proteínas intrínsecas da membrana, enzimas metabólicas e gerenciamento do estresse. Em estudo conduzido por Weber *et al*, foi sugerido que essa proteína, em uma situação de estresse, pode alterar significativamente o tráfego da membrana, aumentando a resistência contra compostos tóxicos através da indução de bombas de efluxo. Os autores observaram que esse fator sigma está associado a alterações no metabolismo energético, favorecendo uma mudança da respiração oxidativa para um metabolismo energético respiratório mais fermentativo ou anaeróbico, corroborando os achados deste estudo, uma vez que ele está regulado positivamente na cultura adaptada (WEBER, 2005). No mesmo estudo, foram descritos alguns genes regulados por esse fator sigma, sendo quatro deles associados com proteínas que foram identificadas no presente trabalho: Alfa glutamato descarboxilase (gene: *gadA*), antiporte glutamato/gama-aminobutirato (gene: *gadC*), quinase lipídica (gene: *yegS*) e carboximetilenobutenolidase putativa (gene: *ysgA*). Todas essas quatro proteínas estão sendo reguladas negativamente na linhagem adaptada. Um trabalho feito por Jung e colaboradores também mostrou uma relação desse fator sigma com a expressão da Isocitrato desidrogenase (gene: *icd*), proteína previamente mencionada devido à sua relevância no Ciclo de Krebs. Foi observado que fator *rpoS* age como um regulador negativo da expressão do gene *icd* durante a fase estacionária (JUNG, 2006). Na presente análise, na mesma condição, foi identificada a Isocitrato desidrogenase com uma expressão diminuída enquanto o fator sigma *rpoS* apresentava expressão elevada, em concordância com a correlação proposta por Jung.

**Quadro 7 - Proteínas associadas aos processos celulares que apresentaram expressão diferencial (teste T < 0,05) entre a linhagem de *Escherichia coli* UPEC90S/A e CBA UPEC90G4**

<b>4. Processos Celulares</b>				
<b>Nº de acesso</b>	<b>Nome da Proteína</b>	<b>Gene</b>	<b>Classe</b>	<b>Regulação</b>
P11557	Cell division protein DamX	<i>damX</i>	Divisão Celular	Negativa
P26648	Cell division protein FtsP	<i>ftsP</i>	Divisão Celular	"Exclusiva" S/A
P77202	Thiol:disulfide interchange protein DsbG	<i>dsbG</i>	Dobramento	Negativa
P30748	Molybdopterin synthase sulfur carrier subunit	<i>moaD</i>	Dobramento	"Exclusiva" S/A
P0A9H1	G/U mismatch-specific DNA glycosylase	<i>mug</i>	Dobramento	"Exclusiva" S/A
P77689	Iron-sulfur cluster assembly protein SufD	<i>sufD</i>	Dobramento	"Exclusiva" S/A
P0ABZ6	Chaperone SurA	<i>surA</i>	Dobramento	Positiva
P68767	Cytosol aminopeptidase	<i>pepA</i>	Dobramento	Positiva
P31473	Regulatory ATPase RavA	<i>ravA</i>	Estresse	Positiva
P30870	Bifunctional glutamine synthetase adenylyltransferase/adenylyl-removing enzyme	<i>glnE</i>	Estresse e detoxificação	Negativa
P75824	NADH oxidoreductase HCR	<i>hcr</i>	Estresse e detoxificação	"Exclusiva" S/A
P77783	Probable dimethyl sulfoxide reductase chain YnfF	<i>ynfF</i>	Estresse e detoxificação	Negativa
P0AGB6	ECF RNA polymerase sigma-E factor	<i>rpoE</i>	Estresse e detoxificação	Negativa
P63284	Chaperone protein ClpB	<i>clpB</i>	Estresse por calor	Negativa
P64448	Uncharacterized protein YnbE	<i>ynbE</i>	Estrutura de membrana	"Exclusiva" S/A
P04949	Flagellin	<i>fliC</i>	Motilidade	Negativa
P69908	Glutamate decarboxylase alpha	<i>gadA</i>	Resistência à ácidos	Negativa
P63235	Glutamate/gamma-aminobutyrate antiporter	<i>gadC</i>	Resistência à ácidos	Negativa
P60061	Arginine/agmatine antiporter	<i>adiC</i>	Transporte	"Exclusiva" adaptada

P0AB24	Iron uptake system component EfeO	<i>efeO</i>	Transporte	"Exclusiva" S/A
P0AEQ6	Glutamine transport system permease protein GlnP	<i>glnP</i>	Transporte	"Exclusiva" adaptada
P75957	Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LolD	<i>lolD</i>	Transporte	Negativa
P28635	D-methionine-binding lipoprotein MetQ	<i>metQ</i>	Transporte	Negativa
P63386	Intermembrane phospholipid transport system ATP-binding protein MlaF	<i>mfaF</i>	Transporte	Positiva
P77338	Mechanosensitive channel MscK	<i>mscK</i>	Transporte	Positiva
P05706	PTS system glucitol/sorbitol-specific EIIA component	<i>srlB</i>	Transporte	"Exclusiva" S/A
P56580	PTS system glucitol/sorbitol-specific EIIB component	<i>srlE</i>	Transporte	"Exclusiva" S/A

Fonte: elaborado pela autora.

A diferença de expressão (positiva ou negativa) refere-se à comparação linhagem com RA/linhagem sensível à Gentamicina (CBA UPEC90G4/ UPEC90S/A). "Exclusiva": foi observada apenas em uma das condições.

O Fator sigma-E da RNA polimerase ECF (gene: *rpoE*) que apresentou regulação negativa em CBA UPEC90G4. Esse fator possui a função de controlar a resposta ao estresse de membrana, respondendo ao estresse proteico periplásmico, ao aumento dos níveis de lipopolissacarídeos bem como ao choque térmico.

As proteínas Alfa glutamato descarboxilase (gene: *gadA*), antiporte glutamato/gama-aminobutirato (gene: *gadC*) foram descritas no estudo de Weber *et al* tendo os genes regulados pelo fator sigma da RNA polimerase (gene: *rpoS*). Tanto o gene da Alfa glutamato descarboxilase quanto o do antiporte glutamato/gama-aminobutirato são associados com resistência à ácidos (WEBER, 2005). Neste estudo, ambas as proteínas foram identificadas com a expressão diminuída na cultura adaptada.

A Flagelina (gene: *fliC*), proteína responsável pela formação dos filamentos do flagelo bacteriano, foi identificada com a expressão diminuída em CBA UPEC90G4. Apesar da diferença de expressão, o ensaio de motilidade demonstrou que a UPEC90 original e a derivada adaptada não apresentaram movimento flagelar ativo (Figura 12). Portanto, a diminuição da expressão dessa proteína pode indicar que o metabolismo é deslocado para reduzir o gasto energético com motilidade em condições de RA à gentamicina.

Associada ao metabolismo do nitrogênio, a Proteína Permease do Sistema de Transporte de Glutamina (gene: *glnP*) faz parte do grupo de proteínas envolvidas na assimilação de amônio extracelular (VAN HEESWIJK, 2013) e apresentou aumento de expressão na linhagem adaptada. Sugere-se que a célula está importando nitrogênio do meio extracelular para provável síntese de aminoácidos e ácidos nucleicos. São necessários estudos adicionais para comprovar essas evidências. Ainda associada à glutamina, foi identificada a Enzima bifuncional glutamina sintetase adenililtransferase/removedora de adenilil (gene: *glnE*) com a expressão diminuída em CBA UPEC90G4. Essa enzima está envolvida na regulação da glutamina sintetase que age no processo de assimilação de amônia. Assim, quando os níveis de nitrogênio celular estão elevados, a adenililtransferase inativa a glutamina sintetase, reduzindo a sua atividade. Por outro lado, quando os níveis estão baixos, a adenililtransferase aumenta a atividade da glutamina sintetase (JAGGI, 1997). Ao diminuir a expressão dessa enzima, a bactéria limita a regulação da glutamina sintetase.

A ATPase regulatória *ravA* (gene: *ravA*), que apresenta maior expressão na CBA UPEC90G4, geralmente está associada a outra proteína denominada fator de von Willebrand tipo A, constituindo o *operon* *ravA-viaA*. Esse *operon* é essencial para a ação dos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos sob condições anaeróbicas, e está envolvido na regulação da membrana celular. Essas proteínas interagem com o complexo de transporte de elétrons da fumarato redutase e modulam esse complexo, apresentando atividade similar à de chaperonas. Foi demonstrado previamente que essas proteínas são essenciais para a ação dos aminoglicosídeos nas condições respiratórias com fumarato (EL KHOURY, 2023). Estudos demonstraram que o nível de susceptibilidade antimicrobiana varia dependendo da natureza da cadeia respiratória empregada por *E. coli* para crescimento, concluindo que esse operon *ravA-viaA* pode facilitar a captação de aminoglicosídeos através da membrana em estados celulares de baixa energia, como com o fumarato, mas tem um efeito dispensável em condições de alta conservação de energia, isto é, na presença de nitrato ou oxigênio. Esse efeito sensibilizador está associado ao aumento da captação de gentamicina de maneira dependente da força próton-motriz (FELIX, 2022; EL KHOURY, 2023; BHANDARI, 2023).

**Quadro 8 - Proteínas sem vias identificadas que apresentaram expressão diferencial (teste T < 0,05) entre a linhagem de *Escherichia coli* UPEC90S/A e CBA UPEC90G4**

<b>5. Proteínas que não apresentam identificação de via metabólica</b>				
<b>Nº de acesso</b>	<b>Nome da Proteína</b>	<b>Gene</b>	<b>Classe</b>	<b>Regulação</b>
P76502	Phosphohistidine phosphatase SixA	<i>sixA</i>	não identificada	"Exclusiva" adaptada
P31433	AsmA family protein YicH	<i>yicH</i>	não identificada	"Exclusiva" adaptada
P76407	Lipid kinase YegS	<i>yegS</i>	não identificada	"Exclusiva" S/A
P56262	Putative carboxymethylenebutenolidase	<i>ysgA</i>	não identificada	"Exclusiva" S/A

Fonte: elaborado pela autora.

A diferença de expressão (positiva ou negativa) refere-se à comparação linhagem com RA/linhagem sensível à Gentamicina (CBA UPEC90G4/ UPEC90S/A). "Exclusiva": foi observada apenas em uma das condições.

Algumas proteínas foram identificadas, mas não foram associadas às respectivas vias por falta de informação nos bancos de dados acessados. No trabalho de Weber *et al* a quinase lipídica (gene: *yegS*) e a carboximetilenobutenolidase putativa (gene: *ysgA*) demonstraram ter os seus genes regulados pelo Fator sigma da RNA polimerase (gene: *rpoS*) (WEBER, 2005). A quinase lipídica apresenta função conhecida apenas *in vitro*, fosforilando fosfatidilglicerol, mas o substrato *in vivo* é desconhecido. A carboximetil enobutenolidase putativa também possui função desconhecida. Ambas foram identificadas com a expressão diminuída em CBA UPEC90G4.

Em conjunto, esses resultados indicam que houve alterações no perfil de expressão de proteínas após a aquisição de RA à Gentamicina pela linhagem UPEC90. Ao se adaptar à presença de Gentamicina, a CBA direcionou o metabolismo para vias anaeróbicas promovendo crescimento e sobrevivência à ação do antimicrobiano, por meio da utilização da via do nitrogênio. Além de favorecer o crescimento da bactéria, o redirecionamento para vias anaeróbicas também compromete a ação da Gentamicina, que é dependente de oxigênio. Paralelamente, a linhagem com RA passou a expressar proteínas envolvidas na degradação de proteínas truncadas, mitigando o dano celular causado pela ação do antimicrobiano.

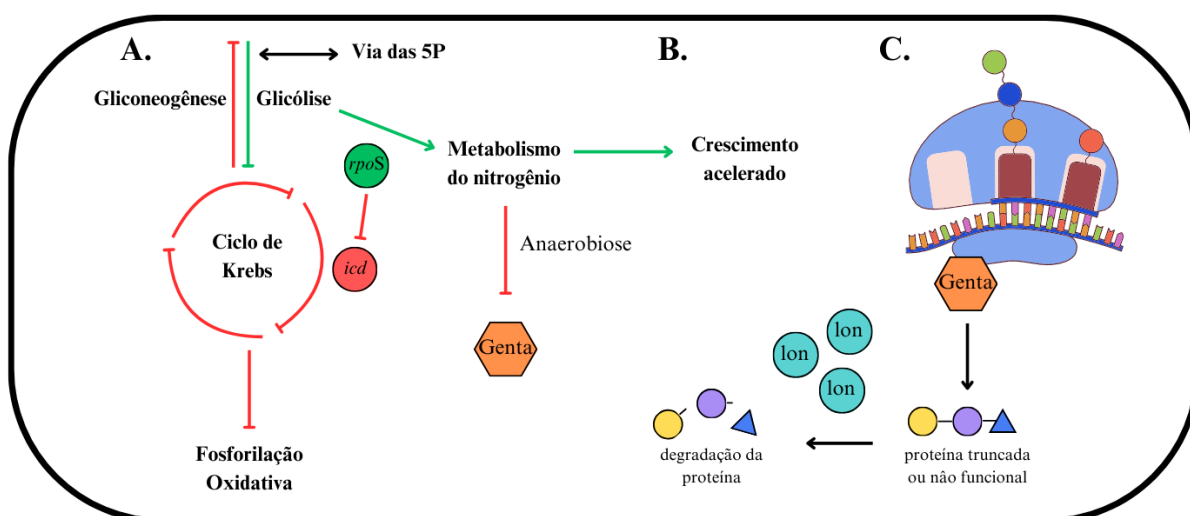
## 6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos demonstraram que a linhagem de *E. coli* uropatogênica UPEC90 adquiriu RA ao ser exposta à CSI de Gentamicina, alterando o seu metabolismo de forma expressiva. Como resultado dessa alteração, ela consegue crescer na presença do antimicrobiano em sua CIM, indicando que ela adquiriu resistência. Além disso, ao adquirir RA, a CBA UPEC90G4 apresentou menor tempo de geração do que a UPEC90S/A.

O aumento da proliferação celular, a redução da produção de biofilme e utilização de metabolismo anaeróbico são alterações fisiológicas possivelmente associadas à RA à Gentamicina. Paralelamente, a expressão elevada da Protease Lon também pode estar associada à RA da linhagem uma vez que essa enzima medeia a degradação de proteínas truncadas ou mutadas que possivelmente são produzidas em razão ao mecanismo de ação da Gentamicina (ligação à subunidade 30S do rRNA 16S no ribossomo bacteriano e interferência na síntese proteica).

Assim, sugere-se que a bactéria portadora de RA adota três alternativas simultâneas para sobreviver à Gentamicina: crescimento acelerado, inativação do antimicrobiano pela anaerobiose e degradação das proteínas alteradas ou disfuncionais. Conjuntamente, essas estratégias capacitam a bactéria a crescer em Concentrações Inibitórias de Gentamicina. A figura a seguir ilustra os mecanismos associados à RA identificados no presente trabalho (Figura 14).

**Figura 14 - Possíveis mecanismos de resistência adaptativa da *Escherichia coli* UPEC90G4 à Gentamicina**



Fonte: elaborada pela autora.

Setas vermelhas indicam vias metabólicas associadas a proteínas com regulação negativa, enquanto setas verdes representam vias com regulação positiva. Os traços em “T” indicam eventos de inibição, e as setas contínuas indicam as vias metabólicas ativas. (A) O primeiro mecanismo de resistência ocorre por meio da inibição da respiração aeróbica, com a mudança para uma via anaeróbica alternativa, especificamente o metabolismo do nitrogênio. Essa adaptação, além de permitir o crescimento acelerado da bactéria, compromete a ação da gentamicina, cuja atividade antimicrobiana é dependente de oxigênio. (B) O crescimento acelerado contribui para a sobrevivência bacteriana e foi evidenciado pela análise do tempo de geração (Figura 2). (C) O aumento da expressão da protease Lon favorece a degradação de proteínas truncadas ou não funcionais, sintetizadas em decorrência da ação da gentamicina.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Foram identificadas algumas vias que demonstram como a bactéria pode estar alterando o seu metabolismo para sobreviver e crescer na presença do antimicrobiano. Com essas vias, é possível traçar novos experimentos para confirmar as hipóteses levantadas por este trabalho:

- Avaliação do efeito do acúmulo de amônia no meio no metabolismo de Nitrogênio;
- Caracterização da expressão da estrutura flagelar na linhagem UPEC90 e em sua derivada portadora de RA;
- Análise dos genomas das duas culturas (UPEC90 e CBA UPEC90G4) identificando se existem alterações genômica e gênicas associadas à RA;
- Realização de microscopias de varredura e de transmissão para avaliar se houveram alterações estruturais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSHAHEEN, M. A. et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. v. 66, n. 6, p. 100971, 1 jun. 2020.

ALABDULADHEM, T.O., BORDONI, B. Physiology, Krebs Cycle. [Updated 2022 Nov 23]. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556032/>

BARCLAY, M. L.; BEGG, E. J.; CHAMBERS, S. T. Adaptive resistance following single doses of gentamicin in a dynamic in vitro model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 9, p. 1951–1957, set. 1992.

BASSETTI, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 22, 28 ago. 2013.

BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 430–435, 1 nov. 1996.

BHANDARI, V. et al. The RavA-ViaA chaperone complex modulates bacterial persistence through its association with the fumarate reductase enzyme. **J Biol Chem**. 2023 Oct;299(10):105199. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105199. Epub 2023 Sep 3. PMID: 37660904; PMCID: PMC10585395.

BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 320–330, maio 2016.

CHAVES, B. J., TADI P. Gentamicina. [Atualizado em 10 de abril de 2023]. Em: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; janeiro de 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557550/>

DAIKOS, G. L. et al. Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics from first-exposure down-regulation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 2, p. 414–420, ago. 1990.

DARBY E. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nat Rev Microbiol.** 2023 May;21(5):280-295. doi: 10.1038/s41579-022-00820-y. Epub 2022 Nov 21. Erratum in: *Nat Rev Microbiol.* 2024 Apr;22(4):255. doi: 10.1038/s41579-024-01014-4. PMID: 36411397.

EL KHOURY, J.Y. et al. Bioenergetic State of *Escherichia coli* Controls Aminoglycoside Susceptibility. **mBio.** 2023 Feb 28;14(1):e0330222. doi: 10.1128/mbio.03302-22. Epub 2023 Jan 10. PMID: 36625597; PMCID: PMC9973319.

ESQUÉ RUIZ, M.T., MORETONES SUÑOL, M.G., RODRÍGUEZ MIGUÉLEZ, J.M., SÁNCHEZ ORTIZ, E., IZCO URROZ, M., DE LAMO CAMINO, M., FIGUERAS ALOY, J. Los errores de tratamiento en una unidad neonatal, uno de los principales acontecimientos adversos [Medication errors in a neonatal unit: One of the main adverse events]. **An Pediatr (Barc).** 2016 Apr;84(4):211-7. Spanish. doi: 10.1016/j.anpedi.2015.09.009. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26520488.

FEDELI, U. et al. Sepsis-related mortality: long-term trends in Northeastern Italy, including pandemic years. **Infectious Diseases (London, England)**, p. 1–8, 12 abr. 2024.

FELIX, J. et al. The AAA+ ATPase RavA and its binding partner ViaA modulate *E. coli* aminoglycoside sensitivity through interaction with the inner membrane. **Nat Commun.** 2022 Sep 20;13(1):5502. doi: 10.1038/s41467-022-32992-9. PMID: 36127320; PMCID: PMC9489729.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, out. 2012.

FLORES-MIRELES, A. L. *et al.* Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269–284, maio 2015.

GALVÃO, V. S. *et al.* PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE ESCHERICHIA COLI E KLEBSIELLA PNEUMONIAE IDENTIFICADOS EM INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, XXIII Congresso Brasileiro de Infectologia. v. 27, p. 103209, 1 out. 2023.

GONZALEZ-PADILLA M, TORRE-CISNEROS J, RIVERA-ESPINAR F, PONTES-MORENO A, LÓPEZ-CERERO L, PASCUAL A, NATERA C, RODRÍGUEZ M, SALCEDO I, RODRÍGUEZ-LÓPEZ F, RIVERO A, RODRÍGUEZ-BAÑO J. Gentamicin therapy for sepsis due to carbapenem-resistant and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**. 2015 Mar;70(3):905-13. doi: 10.1093/jac/dku432. Epub 2014 Oct 25. PMID: 25344809.

GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology (Reading, England)**, v. 149, n. Pt 12, p. 3575–3586, dez. 2003.

GOULD, I. M. *et al.* Ionic binding, adaptive resistance and post-antibiotic effect of netilmicin and ciprofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 27, n. 6, p. 741–748, 1 jun. 1991.

GOULD, I. M.; MILNE, K.; JASON, C. Concentration-dependent bacterial killing, adaptive resistance and post-antibiotic effect of ciprofloxacin alone and in combination with gentamicin. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 16, n. 12, p. 621–628, 1990.

GUERRERO-LÓPEZ F, ORTIZ Y, *et al.* Subinhibitory Concentrations of Oxacillin Alter Motility, Biofilm Production, and Transformation Capability of the Oxacillinase-Producing *Acinetobacter baumannii*. **Curr Microbiol**. 2025 Oct 17;82(12):562. doi: 10.1007/s00284-025-04542-1. PMID: 41102373.

HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário: ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, p. 109–116, jan. 2003.

HESS, S., GALLERT, C. Growth Behavior of *E. coli*, *Enterococcus* and *Staphylococcus* Species in the Presence and Absence of Sub-inhibitory Antibiotic Concentrations: Consequences for Interpretation of Culture-Based Data. **Microb Ecol** 72, 898–908 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0788-7>

HOCQUET, D. *et al.* MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1371–1375, abr. 2003.

HOSTACKÁ, A.; KARELOVÁ, E. Hydrophobicity and outer membrane proteins of *Shigella dysenteriae* type 1 after treatment with subinhibitory concentrations of aminoglycosides. **Folia Microbiologica**, v. 42, n. 6, p. 565–568, 1997.

HUTTNER, B. D. *et al.* COVID-19: don't neglect antimicrobial stewardship principles! **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 7, p. 808–810, jul. 2020.

JAGGI, R., VAN HEESWIJK, W.C., WESTERHOFF, H.V., OLLIS, D.L., VASUDEVAN, S.G. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **EMBO J.** 1997 Sep 15;16(18):5562-71. doi: 10.1093/emboj/16.18.5562. PMID: 9312015; PMCID: PMC1170188.

JUNG, I.L., KIM, S.K., KIM, I.G. The RpoS-mediated regulation of isocitrate dehydrogenase gene expression in *Escherichia coli*. **Curr Microbiol.** 2006 Jan;52(1):21-6. doi: 10.1007/s00284-005-8006-8. Epub 2005 Dec 13. PMID: 16362493.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.

KARLOWSKY, J. A. *et al.* In vitro characterization of aminoglycoside adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 6, p. 1387–1393, jun. 1996.

KESTER, J. C.; FORTUNE, S. M. Persists and beyond: Mechanisms of phenotypic drug

resistance and drug tolerance in bacteria. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 2, p. 91–101, mar. 2014.

KRAUSE, K.M., SERIO, A.W., KANE, T.R., CONNOLLY, L.E. Aminoglycosides: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2016 Jun 1;6(6):a027029. doi: 10.1101/cshperspect.a027029. PMID: 27252397; PMCID: PMC4888811.

LEE, S.; LEE, D.K. What is the proper way to apply the multiple comparison test? **Korean J Anesthesiol**. 2018 Oct;71(5):353-360. doi: 10.4097/kja.d.18.00242. Epub 2018 Aug 28. Erratum in: *Korean J Anesthesiol*. 2020 Dec;73(6):572. doi: 10.4097/kja.d.18.00242.e1. PMID: 30157585; PMCID: PMC6193594.

LIMA, D. C. DA S. *et al*. Prevalência de microrganismos resistentes a ciprofloxacino isolados em infecções do trato urinário em Hospital Universitário de Recife/PE. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e10411830588–e10411830588, 11 jun. 2022.

MATHIEU, A.; FLEURIER, S.; FRÉNOY, A.; DAIROU, J.; BREDECHE, MF.; SANCHEZ-VIZUETE, P.; SONG, X.; MATIC, I. Discovery and Function of a General Core Hormetic Stress Response in *E. coli* Induced by Sublethal Concentrations of Antibiotics. **Cell Reports**, 17, 46-57, September 27, 2016. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.09.001.

MENÉNDEZ FRAGA, M. D. *et al*. Errores en el uso de antimicrobianos: la epidemia silenciosa para la seguridad de pacientes. **Rev. esp. quimioter**, p. 194–197, 2008.

MORAIS, A. F. P. DE *et al*. Resistência bacteriana em ITU comunitárias: importância da análise periódica da urocultura para tratamento adequado: IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE PERIÓDICA DAS UROCULTURAS PARA O TRATAMENTO ADEQUADO. **Manuscripta Medica**, v. 4, p. 20–30, 30 dez. 2021.

MURRAY, C. J. L. *et al*. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 12 fev. 2022.

NATÁRIO, I. M. VAN DER H. *et al*. Determinação De Uropatógenos Resistentes À

Fosfomicina Isolados De Pacientes Atendidos Em 34 Unidades Básicas De Saúde (Ubs) E Comparação Dos Métodos Para Detecção De Resistência À Fosfomicina. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, XXIII Congresso Brasileiro de Infectologia. v. 27, p. 103145, 1 out. 2023.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, jan. 1998.

NICAS, T. I.; HANCOCK, R. E. Outer membrane protein H1 of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in adaptive and mutational resistance to ethylenediaminetetraacetate, polymyxin B, and gentamicin. **Journal of Bacteriology**, v. 143, n. 2, p. 872–878, ago. 1980.

NUNES, B. M.; XAVIER, T. C.; MARTINS, R. R. Problemas relacionados a medicamentos antimicrobianos em unidade de terapia intensiva neonatal. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** 29 (3). Jul-Sep 2017. DOI: <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20170040>.

OLIVEIRA, M. S. *et al.* Principais bactérias encontradas em uroculturas de pacientes com Infecções do Trato Urinário (ITU) e seu perfil de resistência frente aos antimicrobianos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e5310716161–e5310716161, 13 jun. 2021.

ORTIZ Y. *et al.* Exacerbation of virulence of multi-drug resistant *Escherichia coli* O104:H4 by subinhibitory concentrations of ampicillin. **Res Microbiol.** 2025 Mar-Jun;176(3-4):104266. doi: 10.1016/j.resmic.2025.104266. Epub 2025 Jan 8. PMID: 39793844.

PALMER, A. C.; CHAIT, R.; KISHONY, R. Nonoptimal Gene Expression Creates Latent Potential for Antibiotic Resistance. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 11, p. 2669–2684, nov. 2018.

PEREIRA, L. B. *et al.* Consumo de antimicrobianos em um hospital de alta complexidade: padrão de utilização em diferentes enfermarias. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e12011225573, 19 jan. 2022.

PEREIRA, N. R. 6. Aminoglicosídeos, tetraciclínas, glicilciclínas e cloranfenicol. Manual da

APFH sobre Antimicrobianos. APOIO INSTITUCIONAL: APOIO CIENTÍFICO, p. 38, 2022.

POIREL, L. *et al.* Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, jul. 2018.

ROCHA, V. DE F. D. *et al.* The impact of COVID-19 on microbiological profile and antibiotic consumption in ICU: a retrospective study in an infectious disease hospital in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 103705, 5 dez. 2023.

ROME, K. *et al.* The Two-Component System ZraPSR Is a Novel ESR that Contributes to Intrinsic Antibiotic Tolerance in Escherichia coli. **J Mol Biol.** 2018 Dec 7;430(24):4971-4985. doi: 10.1016/j.jmb.2018.10.021. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30389436.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753–1754, maio 2000.

SKINDERSOE, M. E. *et al.* Effects of Antibiotics on Quorum Sensing in Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3648–3663, out. 2008.

STICKLER, D. J. Chlorhexidine resistance in Proteus mirabilis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 27, n. 4, p. 284–287, abr. 1974.

SUAREZ, S. A.; MARTINY, A. C. Gene Amplification Uncovers Large Previously Unrecognized Cryptic Antibiotic Resistance Potential in E. coli. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, p. e00289-21, 10 nov. 2021.

SUZUKI, S.; HORINOUCI, T.; FURUSAWA, C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. **Nature Communications**, v. 5, p. 5792, 17 dez. 2014.

TISO, M; SCHECHTER, A.N. Nitrate Reduction to Nitrite, Nitric Oxide and Ammonia by Gut Bacteria under Physiological Conditions. **PLOS ONE** 10(5): e0127490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127490>, 6 de maio de 2015.

VAN HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; BOOGERD, F.C. Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2013 Dec;77(4):628-95. doi: 10.1128/MMBR.00025-13. PMID: 24296575; PMCID: PMC3973380.

VERSPORTEN, A. *et al.* Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 381–387, 1 maio 2014.

WANG H, GUNSALUS RP. The *nrfA* and *nirB* nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite. **J Bacteriol.** 2000 Oct;182(20):5813-22. doi: 10.1128/JB.182.20.5813-5822.2000. PMID: 11004182; PMCID: PMC94705.

WANG X, TAMIEV D, ALAGURAJAN J, DISPIRITO AA, PHILLIPS GJ, HARGROVE MS. The role of the NADH-dependent nitrite reductase, Nir, from *Escherichia coli* in fermentative ammonification. **Arch Microbiol.** 2019 May;201(4):519-530. doi: 10.1007/s00203-018-1590-3. Epub 2018 Nov 7. PMID: 30406295.

WEBER, H. *et al.* Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. **J Bacteriol.** 2005 Mar;187(5):1591-603. doi: 10.1128/JB.187.5.1591-1603.2005. PMID: 15716429; PMCID: PMC1063999.

WEINSTEIN, M.J., LUEDEMANN, G.M., ODEN, E.M., WAGMAN, G.H., ROSSELET, J.P., MARQUEZ, J.A., CONIGLIO, C.T., CHARNEY, W., HERZOG, H.L., BLACK, J. Gentamicin, a new antibiotic complex from micromonospora. **J Med Chem.** 1963 Jul;6:463-4. doi: 10.1021/jm00340a034. PMID: 14184912.

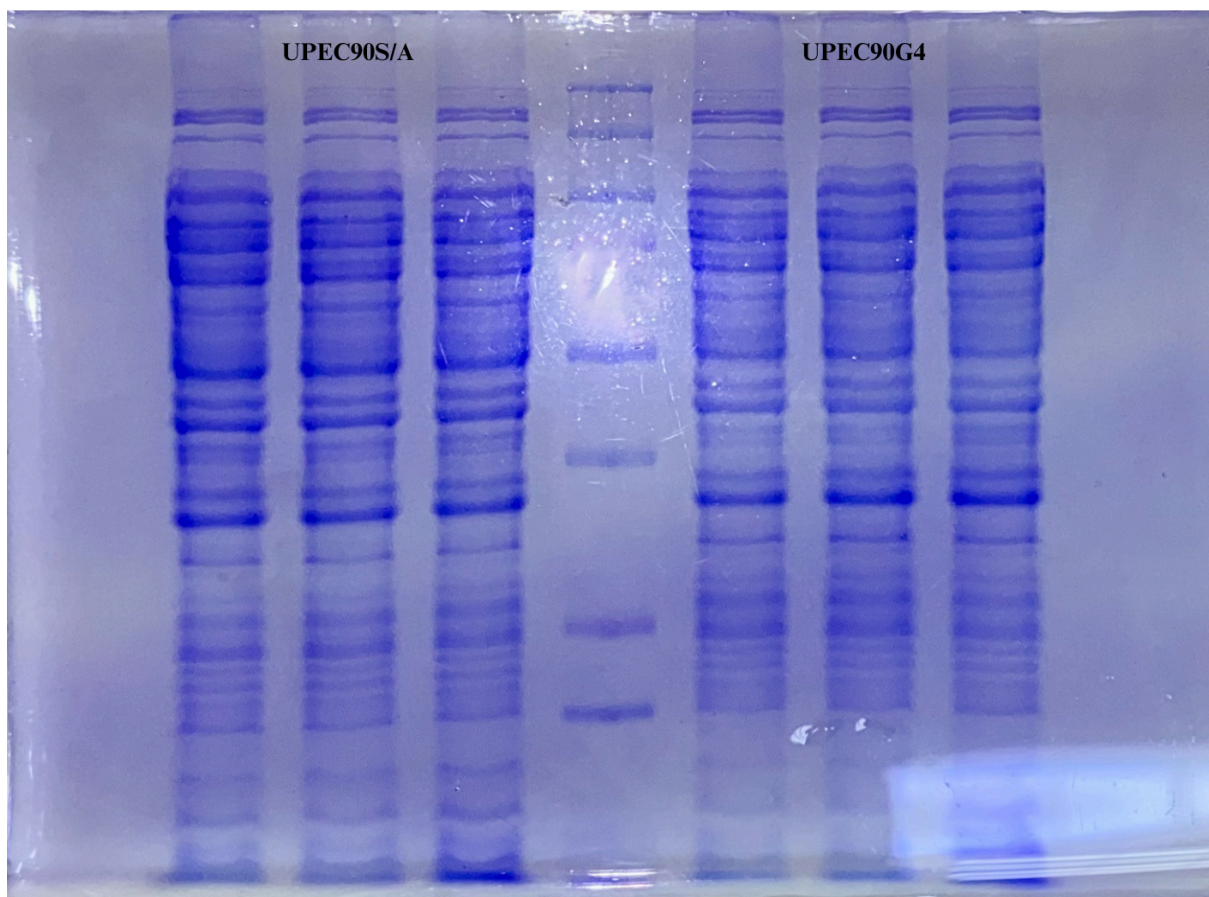
WOJNICZ, D.; TICHACZEK-GOSKA, D. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. **Brazilian Journal of**

**Microbiology** 44 (1), 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000100037>

YEN, P.; PAPIN, J. A. History of antibiotic adaptation influences microbial evolutionary dynamics during subsequent treatment. **PLoS Biology**, v. 15, n. 8, p. e2001586, 8 ago. 2017.

## 9. APÊNDICE A - GEL APÓS EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

**Figura Suplementar 1 - Gel de poliacrilamida contendo a triplicata do extrato proteico de UPEC90S/A (esquerda) e da CBA UPEC90G4 (direita)**



Fonte: elaborada pela autora.