



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**WALESKA YANA LAZARETTI**

**Expressão de *clpB* em resposta a estresse causado por choque térmico e  
antibióticos em *Acinetobacter baumannii***

**Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão**

**CASCAVEL - PR**

**2018**

**WALESKA YANA LAZARETTI**

**Expressão de *clpB* em resposta a estresse causado por choque térmico e antibióticos em *Acinetobacter baumannii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

**Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão**

**CASCADEL - PR**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Sistema de Bibliotecas - UNIOESTE)

L459e	<p>Lazaretti, Waleska Yana. Expressão de <i>clpB</i> em resposta a estresse causado por choque térmico e antibióticos em <i>Acinetobacter baumannii</i> / Waleska Yana Lazaretti.— Cascavel (PR), 2018. 44 f.: il.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2018, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Inclui Bibliografia</p> <p>1. ClpB. 2. Resposta ao estresse. 3. Antibióticos. 4. Proteínas de choque térmico. 5. Multirresistência. I. Simão, Rita de Cássia Garcia. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título</p> <p style="text-align: right;">CDD 615.1</p>
-------	---

Rosângela A. A. Silva – CRB 9ª/1810

Dissertação revisada conforme as normas de redação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por Pricilla Záttera, graduada em Letras.

**WALESKA YANA LAZARETTI**

**Expressão de *clpB* em resposta a estresse causado por choque térmico e antibióticos em *Acinetobacter baumannii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

BANCA EXAMINADORA



**Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Orientadora



**Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná



**Profa. Dra. Ana Cláudia Paiva Alegre Maller**

Centro Universitário Fundação Assis Gurgacz

## WALESKA YANA LAZARETTI

### BIOGRAFIA RESUMIDA

Waleska Yana Lazaretti, natural de Seara, Santa Catarina, Brasil, nascida no dia 22 de outubro de 1987, formou-se no curso de Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel, em 2009. Possui Pós-Graduação em Gestão em Saúde Pública pela Universidade Estadual de Maringá, concluída em 2012. Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2016. Desenvolve dissertação junto à linha de Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pela professora Dra. Rita de Cássia Garcia Simão. Atualmente, é Farmacêutica da Secretaria Estadual de Saúde do Paraná e se encontra lotada na Décima Regional de Saúde, em Cascavel – Paraná.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por todos os aprendizados e dificuldades que surgiram ao longo desses dois anos que, ao seu modo, me fizeram alcançar este importante objetivo pessoal e profissional.

À professora Dra. Rita de Cássia Garcia Simão, pela orientação e dedicação empenhada, por ter paciência e pela disponibilidade nos inúmeros momentos de dúvidas. Pelos ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente, por sua ética, generosidade, amizade e acolhimento em seu laboratório.

Aos colegas de laboratório Débora, Larissa, Ana Cláudia, Charles, Letícia, Indianara e Juliana que sempre se mostraram dispostos a ajudar nos momentos de dúvidas e pela acolhida no laboratório de Bioquímica.

## **APRESENTAÇÃO**

Essa dissertação é apresentada em formato de monografia, composta de introdução, objetivos do trabalho, revisão bibliográfica, material e métodos, resultados, discussão e conclusão de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Trata-se de um trabalho cuja parte experimental foi executada no Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.



## Expressão de *clpB* em resposta a estresse causado por choque térmico e antibióticos em *Acinetobacter baumannii*

### Resumo

*Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) é um importante patógeno oportunista, Gram-negativo e responsável por infecções nosocomiais severas como pneumonias, septicemias, infecções urinárias e meningites. Cepas de *A. baumannii* têm sido identificadas de maneira endêmica e epidêmica nos hospitais, sendo verificada a ocorrência de cepas multirresistentes nesses ambientes, com importante habilidade de adaptação a mudanças seletivas e pressões ambientais. Ainda, a multirresistência a antibióticos vem sendo estudada continuamente, por se tratar de um problema de saúde pública global, resultando em falha na terapia, no prolongamento da internação hospitalar, no aumento das taxas de mortalidade e morbidade e na elevação dos custos financeiros do tratamento. Esse patógeno possui estratégias variadas envolvidas com a resistência aos antimicrobianos, porém, sabe-se que as bactérias apresentam habilidade de responder a condições desfavoráveis do meio em que se encontram por meio da rápida expressão de proteínas de choque térmico (HSP) e parecem também estar envolvidas com a resposta a estresse causado pela presença de antibióticos. Dentre as HSPs, está a ClpB, chaperone molecular dependente de ATP, pertencente à família HSP100 que está associada a diversas atividades celulares, com a capacidade notável para resgatar proteínas danificadas pelo estresse. O objetivo deste trabalho foi investigar o papel do gene *clpB* em resposta a estresse gerado por choque térmico e antibióticos em células de uma cepa multirresistente de *A. baumannii* (RS4). Os testes realizados englobaram análise da estrutura do gene *clpB* com ferramentas de bioinformática e análise da expressão do mesmo gene por qRT-PCR em resposta à exposição a choque térmico e a concentrações subinibitórias dos seguintes antibióticos: ampicilina ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), amoxicilina+ sulbactam ( $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), cefepime ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sulfametoxazol + trimetoprima ( $120/8 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ) e meropenem ( $18 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os resultados apontados por análise de bioinformática sugerem uma conservação da estrutura global de ClpB dentro do gênero *Acinetobacter sp.* A análise dos resultados de qPCR evidenciou aumento transitório na indução do gene *clpB* nos diferentes tratamentos utilizados neste estudo e repressão do mRNA-*clpB* na presença de cefepime. Em adição, tanto na presença de ampicilina como de amoxicilina associada à sulbactam o aumento na síntese de mRNA-*clpB* foi em torno de 1,4 vezes superior após 20 min de incubação com os antibióticos do que na completa ausência dos antibióticos. Surpreendentemente, na presença de meropenem, a indução da expressão do mRNA-*clpB* foi mais que 30 vezes superior após 10 minutos de incubação com o antibiótico e mais que 8 vezes superior na presença de sulfametoxazol associado à trimetropina. Esses dados sugerem que *A. baumannii*, mediante estresse térmico e exposição a antibióticos, ajusta os níveis de transcrição do gene *clpB*, permitindo que a bactéria sobreviva a condições desfavoráveis do meio. Consequentemente, pode-se afirmar que a proteína codificada pelo gene *clpB* figura como importante fator de virulência em resposta a antibióticos neste patógeno.

**Palavras-chave:** ClpB; resposta ao estresse; antibióticos; proteínas de choque térmico; multirresistência.

## ***clpB* expression in response to stress caused by heat shock and antibiotics in *Acinetobacter baumannii***

### **Abstract**

*Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) is an important opportunistic, Gram-negative pathogen responsible for severe nosocomial infections such as pneumonia, septicemia, urinary tract infections and meningitis. Strains of *A. baumannii* have been identified in an endemic and epidemic manner in hospitals, being verified the occurrence of multiresistant strains in these environments, with important ability to adapt to selective changes and environmental pressures. Furthermore, multidrug resistance to antibiotics has been continuously studied because it is a global public health problem, resulting in failure of therapy, prolongation of hospitalization, increase of mortality and morbidity rates, and increase in the financial costs of treatment. This pathogen has varied strategies involved with antimicrobial resistance, but it is known that the bacteria are able to respond to unfavorable conditions in the medium through the rapid expression of heat shock proteins (HSP) and also appear to be involved with the stress response caused by the presence of antibiotics. Among the HSPs is ClpB, an ATP-dependent molecular chaperone belonging to the HSP100 family that is associated with several cellular activities, with the remarkable ability to rescue proteins damaged by stress. The objective of this work was to investigate the role of the *clpB* gene responsible for the coding of a heat shock protein through qPCR in response to stress generated by thermal shock and antibiotics in cells of a multidrug resistant strain of *A. baumannii* (RS4). Tests performed included analysis of the structure of the *clpB* gene with bioinformatics tools and analysis of the expression of the same gene by qRT-PCR in response to exposure to heat shock and subinhibitory concentrations of the following antibiotics: ampicillin ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), amoxicillin + sulbactam ( $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), cefepime ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sulfamethoxazole + trimethoprim ( $120/8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and meropenem ( $18 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). The analysis of the qPCR results showed a transient increase in the induction of the *clpB* gene in the different treatments used in this study and repression of *mRNA-clpB* in the presence of cefepime. In addition, in the presence of ampicillin and amoxicillin associated with sulbactam the increase in *mRNA-clpB* synthesis was around 1.4 times higher after 20 min of incubation with the antibiotics than in the complete absence of the antibiotics. Surprisingly, in the presence of meropenem the induction of *mRNA-clpB* expression was more than 30-fold higher after 10 minutes of incubation with the antibiotic and more than 8-fold higher in the presence of sulfamethoxazole associated with trimetropin. These data suggest that *A. baumannii* through thermal stress and antibiotic exposure, adjusts transcription levels of gene *clpB* allowing the bacterium to survive unfavorable conditions of the medium. Consequently, it can be stated that the protein encoded by the *clpB* gene is an important virulence factor in response to antibiotics in this pathogen.

**Key words:** ClpB; stress response; antibiotics; heat shock proteins; multidrug resistance;

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 Objetivos Gerais.....	15
2.2 Objetivos Específicos .....	15
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
3.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	16
3.2 Mecanismo de ação dos antibióticos .....	21
3.2.1 $\beta$ -lactâmicos .....	21
3.2.2 Inibidores de $\beta$ -lactamases .....	23
3.3 Resposta ao choque térmico e antibióticos em bactérias .....	23
3.4 A regulação do choque térmico em bactérias .....	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 Meios e condições .....	27
4.2 Análise e expressão do gene <i>clpB</i> exposto a antibióticos e choque térmico ...	27
4.2.1 Extração de RNA total e síntese de cDNAs .....	27
4.2.2 Amplificação do alvo a partir de cDNA.....	29
4.3 Obtenção das sequências gênicas .....	29
4.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR) .....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
5.1 Expressão quantitativa do gene <i>clpB</i> de <i>A. baumannii</i> em resposta ao choque térmico e diferentes antibióticos.....	32
5.2 Análise das sequências gênicas de <i>clpB</i> através de ferramentas de Bioinformática .....	41
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>42</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>43</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Oligonucleotídeos utilizados para o método de qPCR .....	<b>29</b>
Tabela 2 Quantificação de RNA por espectrofotômetro a 260 nm, após extração com Trizol LS (Invitrogen®) .....	<b>32</b>
Tabela 3 Quantificação de cDNA por espectrofotômetro a 260 nm .....	<b>34</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Biologia de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	19
Figura 2 Estrutura química dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	22
Figura 3 Estrutura química dos inibidores de $\beta$ -lactamases.....	23
Figura 4 Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos da extração de RNA obtidos a partir de diferentes tratamentos térmicos e exposição a antibióticos da cepa multirresistente <i>Acinetobacter baumannii</i> RS4 .....	33
Figura 5 Expressão gênica relativa do gene <i>clpB</i> de <i>A. baumannii</i> (cepa RS4) através de qPCR durante o choque térmico a 45°C em diferentes tempos (0, 10 e 20 minutos).....	35
Figura 6 Diferentes antibióticos induzem transitoriamente a expressão do gene <i>clpB</i> de <i>A. baumannii</i> .....	38
Figura 7 Repressão do gene <i>clpB</i> de <i>A. baumannii</i> (cepa RS4) frente a adição do antibiótico cefepime por meio de qPCR a 37°C em diferentes tempos (0, 10, 20 e 30 minutos).....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg – micrograma

µL – microlitro

ATP – Adenosina trifosfato

ATCC - American Type Culture Collection

ACB – Complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*

cDNA – DNA complementar sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro

DEPC – dicarbonato de dietila

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DO<sub>260nm</sub> – densidade óptica a 260 nanômetros

DO<sub>280nm</sub> - densidade óptica a 280 nanômetros

DTT – ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiamino teracético

HSP – proteína de choque térmico

LB – Lúria-Bertani

LPS - Lipopolissacarídeos

Milli-Q – água deionizada

mL – mililitro

MOPS – ácido 3-N-morfolino-propanosulfônico

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

qPCR - PCR quantitativa em tempo real

RNA – ácido ribonucleico

RNase – ribonuclease

rRNA – RNA ribossômico

TBE – tampão tris/borato/EDTA

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo

## 1 INTRODUÇÃO

*Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) é a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas em pacientes hospitalizados. Trata-se de um importante patógeno oportunista em humanos e responsável por diversos tipos de infecções, como pneumonias, septicemias, infecções urinárias e meningites. As atuais estimativas preveem aproximadamente um milhão de infecções por *A. baumannii* em todo o mundo, sendo que aproximadamente 50% são ocasionadas por cepas multirresistentes com taxa de mortalidade próxima aos 20%.

Esse patógeno possui estratégias variadas envolvidas com a resistência aos antimicrobianos, porém, pouco se sabe quanto aos mecanismos moleculares que permitem que *A. baumannii* resista aos estresses ambientais como antibióticos e produtos químicos para desinfecção do ambiente hospitalar. Sabe-se que as bactérias possuem a habilidade de responder a condições desfavoráveis do meio em que se encontram por meio da rápida expressão de proteínas de choque térmico (HSP) que estão envolvidas com a resposta a estresse causado pela presença de antibióticos.

Em virtude disso, as proteínas induzidas quando as células bacterianas são expostas a antibacterianos podem afetar a susceptibilidade do organismo hospedeiro para esses agentes e, assim, contribuir para a virulência e a patogenicidade bacteriana. Em adição a isso, a multirresistência a antibióticos vem sendo estudada continuamente por se tratar de um problema de saúde pública global que acarreta falha da terapia, prolongamento da internação hospitalar, aumento das taxas de mortalidade e morbidade e elevação dos custos financeiros do tratamento.

O melhor entendimento dos mecanismos de resistência a antibióticos, a identificação de novas biomoléculas que podem figurar como alvos para desenvolvimento de novos antimicrobianos, associadas às práticas adequadas no controle de infecção, são estratégias fundamentais para minimizar indicadores negativos de infecção hospitalar e contribuir para o melhor manejo do paciente nas instituições de saúde.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho objetiva investigar conservações e alterações estruturais na sequência do gene *clpB* isolada da cepa ATCC19606 de *Acinetobacter baumannii*, que codifica para uma proteína de choque térmico de 100 KDa (homóloga a HSP100 eucariótica) com ferramentas de bioinformática, e avaliar o papel da proteína em resposta a estresse gerado por choque térmico e antibióticos em células de *A. baumannii*.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Extrair RNA total da cepa RS4 de *A. baumannii* pré-incubada por diferentes tempos (0, 10, 20 e 30 min) de choque térmico a 45°C e choque térmico extremo a 50 °C;
2. Extrair RNA da cepa RS4 incubada na presença de concentrações subinibitórias dos diferentes antibióticos: ampicilina (30 µg/mL<sup>-1</sup>), amoxicilina+ sulbactam (12 µg/mL<sup>-1</sup>), cefepime (30 µg/mL<sup>-1</sup>), sulfametoxazol + trimetoprima (120/8 µg/mL<sup>-1</sup>) e meropenem (18 µg/mL<sup>-1</sup>);
3. Preparar os respectivos cDNAs com Transcriptase Reversa e random primers para uso em qPCR;
4. Desenhar os oligonucleotídeos para ensaios de qPCR com o fluoróforo SYBR green;
5. Desenvolver os protocolos de análise de expressão gênica por qPCR;
6. Avaliar a expressão do gene *clpB* por qPCR na presença de choque térmico e de antibióticos que pertencem ao grupo dos carbapenêmicos, cefalosporinas e β-lactâmicos nas cepas ATCC 19606 e RS4 de *A. baumannii*;
- 7- Comparar os dados obtidos nas análises por qPCR com dados prévios do laboratório obtidos por “Western Blot”;
- 8- Analisar as sequências gênicas de *clpB* de diferentes bactérias e suas proteínas preditas com ferramentas de bioinformática.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) é uma bactéria Gram-negativa, caracterizada como cocobacilos não fermentadores de glicose, oxidase negativa, aeróbios estritos, não móveis e pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB), gênero *Acinetobacter spp* e família Moraxellaceae (TEIXEIRA, 2013). O complexo ACB inclui três espécies de maior relevância clínica: *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* e uma espécie ambiental, *A. calcoaceticus*, frequentemente isolada de amostras de solo e água (GERNER-SMIDT et al., 1991; PELEG et al., 2008).

*A. baumannii* é a espécie mais constantemente isolada de amostras clínicas em pacientes hospitalizados (HOWARD et al., 2012). É responsável por diversos tipos de infecções como pneumonias, septicemias, infecções urinárias e meningites, especialmente em pacientes imunocomprometidos, sendo considerado um emergente patógeno oportunista em humanos (SMITH et al., 2007; PELEG et al., 2008). As atuais estimativas preveem aproximadamente um milhão de infecções por *A. baumannii* em todo o mundo, sendo que aproximadamente 50% são ocasionadas por cepas multirresistentes com taxa de mortalidade próxima aos 20% (GEBHARDT et al., 2015).

Inúmeros estudos descrevem os fatores de risco para a colonização e infecção por *A. baumannii*. Pacientes imunocomprometidos e os submetidos à terapia antimicrobiana de amplo espectro são importantes fatores de risco a serem analisados (FALAGAS et al., 2007). Esse patógeno traz à tona uma problemática devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade, particularmente em unidades de tratamento intensivo (UTI) (DIJKSHOORN et al., 2007). Estudos relatam que, em geral, a mortalidade de pacientes com infecções atribuíveis a *A. baumannii* variou de 7,8% a 23% nas enfermarias e de 10% a 43% em UTI (FALAGAS et al., 2006; KEMPF; ROLAIN, 2012).

A infecção por estirpes multirresistentes de *A. baumannii* está relacionada a múltiplos fatores de risco que abrangem a contaminação de superfícies e equipamentos, contato com os profissionais de saúde transitoriamente colonizados, exposição prévia a antibióticos de amplo espectro, utilização de catéteres, outros procedimentos invasivos e alta permanência na UTI (LIN; LAN, 2014).

Apesar da crescente prevalência de infecções com cepas de *A. baumannii* multirresistentes, pouco se sabe quanto aos mecanismos moleculares que permitem que *A. baumannii* resista aos estresses ambientais como antibióticos e produtos químicos para desinfecção do ambiente hospitalar (GEBHARDT et al., 2015).

Ressalta-se também a ameaça clínica representada por essa bactéria em possuir grande versatilidade metabólica e adaptabilidade ambiental, juntamente com uma notável capacidade de desenvolver resistência contra a maioria dos antibióticos comumente utilizados na prática clínica (FERNÁNDEZ-REYES et al., 2009).

A importância de *A. baumannii* tem aumentado de forma gradual, sendo classificado como um dos seis patógenos multirresistentes de maior importância a nível hospitalar e responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade entre pacientes (QURESHI et al., 2015). A incidência clínica tem crescido, particularmente, durante a última década (KEMPF; ROLAIN, 2012), devido à sua capacidade em adquirir resistência a múltiplas classes de antibióticos, o que conduziu a uma redução nas opções terapêuticas utilizadas (QURESHI et al., 2015).

A resistência aos antibióticos acontece quando o fármaco deixa de ter capacidade de provocar a morte da população bacteriana ou de controlar o seu crescimento. Esse fenômeno de perda de capacidade pode ocorrer quando uma bactéria possui ou adquire características fenotípicas e genotípicas específicas, como mecanismos de resistências naturais ou adquiridos, deixando, assim, de ser suscetível a determinado antibiótico ou agente quimioterapêutico, sendo que, muitas vezes, a perda de suscetibilidade ocorre devido ao uso incorreto e/ou excessivo da terapêutica antimicrobiana (NIKAIDO, 2010; MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017).

As bactérias podem ser resistentes a determinado antibiótico, de forma natural ou por meio da aquisição de resistência. A resistência natural ou intrínseca é resultado de características estruturais e funcionais e pode ser específica para determinada bactéria. Por sua vez, a resistência adquirida pode ser desenvolvida por meio de mutações espontâneas em genes cromossomais ou da aquisição de novo material genético por transferência genética horizontal, por meio de plasmídeos ou transposons (BLAIR et al., 2015).

A rápida emergência de cepas multirresistentes de *A. baumannii* em hospitais tem ocorrido de maneira endêmica e destaca a capacidade desse organismo em se ajustar a mudanças seletivas e pressões ambientais (HOWARD et al., 2012).

Essas bactérias possuem a característica de adquirir, por transferência horizontal, genes de virulência e resistência aos antimicrobianos, o que acaba permitindo habilidades como resistência ao tratamento e formação de biofilmes. Além disso, possuem a habilidade de persistir, por longos períodos, em superfícies e equipamentos hospitalares, propiciando a ocorrência frequente de surtos hospitalares (LEE et. al., 2008; ZARRILLI et. al., 2013).

As infecções por cepas de *A. baumannii* multirresistentes ocasionam alta mortalidade, sendo que esse patógeno tem sido alvo de inúmeras pesquisas visando ao entendimento de condições clínicas e epidemiológicas associadas às infecções e também para a identificação dos determinantes genéticos responsáveis pela resistência aos antimicrobianos (MATARUCO, 2015; GEISINGER; ISBERG, 2015). A propagação da multirresistência em *A. baumannii* é feita principalmente por meio de conjugação de plasmídeos, aquisição de transposons ou mobilização de íntegrons para obter o conjunto de genes que codificam a resistência a várias famílias de antimicrobianos (LIN; LAN 2014).

No gênero *Acinetobacter spp.*, a resistência aos carbapenêmicos está relacionada à produção de oxacilinas codificadas pelos genes das linhagens blaOXA23, blaOXA-24, blaOXA-51 e blaOXA-58,  $\beta$ -lactamases da classe D - OXA-carbapenemases e, menos frequentemente, à produção de  $\beta$ -lactamases da classe B - metalo- $\beta$ -lactamases – MBL (Poirel et al., 2008). Essa resistência também pode ser reforçada pela perda de proteínas na membrana externa, o que modifica a permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, o transporte de substâncias para o interior da célula (CARVALHO et al., 2009; KRÖGER et al., 2016).

Esse microrganismo possui estratégias distintas envolvidas com a resistência aos antimicrobianos (Figura 1) e que podem ter origem intrínseca ou adquirida e são mediados por diversos fatores como produção de  $\beta$ -lactamases, redução da permeabilidade da membrana externa, perda de porinas, alterações nos sítios de ligação dos antibióticos, hiperexpressão de proteínas, mudanças no sítio de ligação das estruturas alvo e produção de enzimas inativantes de antimicrobianos (GIAMARELLOU et al., 2008; LIN; LAN 2014; MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017).

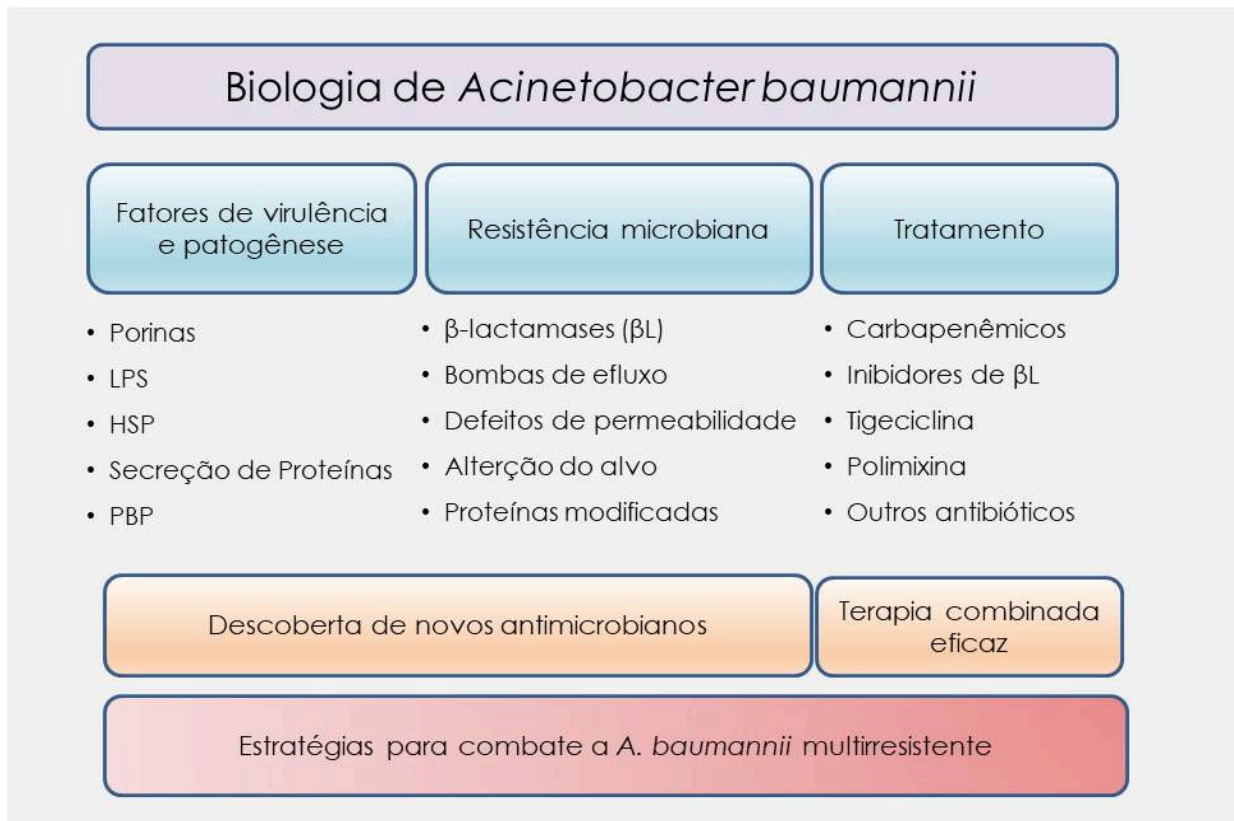


Figura 1 Biologia de *Acinetobacter baumannii*: Estudos dos fatores de virulência, patogênese, resistência antimicrobiana, opções de tratamento para combater infecções por *A. baumannii* multirresistentes. LPS: lipopolissacarídeo; HSP: Heat Shock Protein; PBP: Proteínas ligantes de Penicilina; Fonte: Adaptado de LEE, et al., 2017.

Porinas são proteínas de membrana externa associadas à modulação da permeabilidade celular. OmpA é uma das porinas mais abundantes na membrana externa. Em *A. baumannii*, OmpA é o fator de virulência muito bem caracterizado com uma variedade de propriedades biológicas interessantes identificadas em sistemas *in vitro* e também desempenha papel importante na aderência e na invasão de células epiteliais por meio da interação com a fibronectina (SMITH et al., 2007; MCCONNELL et al., 2013).

Um estudo mostrou que os lipopolissacarídeos capsulares (LPS) estão envolvidos na resistência antimicrobiana de *A. baumannii*. As cepas mutantes deficientes em LPS têm menor resistência intrínseca a antibióticos peptídicos. Além disso, a presença de antibióticos induz a hiperprodução de LPS, aumentando a resistência à morte e a virulência da cepa (GEISINGER; ISBERG, 2015).

Fármacos beta-lactâmicos são uma opção terapêutica importante no tratamento de infecções por *A. baumannii*. Dentre eles destacam-se os

carbapenêmicos (Meropenem e Imipenem), antibióticos de amplo espectro de ação e muito utilizados na prática clínica. Porém, estudos recentes têm mostrado que 30% de isolados clínicos de *A. baumannii* em UTI são estirpes resistentes a, pelo menos, três classes de antibióticos, incluindo fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenêmicos (KEMPF; ROLAIN, 2012).

Frente ao panorama clínico atual e devido às opções terapêuticas estarem extremamente limitadas pela resistência antimicrobiana, poucas opções efetivas estão disponíveis para o tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos, sendo que o antibiótico de escolha em infecções pela bactéria está condicionado ao uso de Polimixina B e Polimixina E (colistina). Entretanto, essas drogas são consideradas nefrotóxicas e já existem relatos demonstrando o surgimento de *A. baumannii* pan-resistente a esses fármacos (CAI et al., 2012; KEMPF; ROLAIN, 2012; LIN; LAN, 2014).

Estudos demonstram que a melhor abordagem terapêutica em casos de resistência moderada a carbapenêmicos envolve a terapia combinada de fármacos como imipenem e aminoglicosídeos, imipenem/sulbactam e a combinação de imipenem e colistina/tobramicina/rifampicina/tigeciclina em casos de alto nível de resistência a carbapenêmicos (MONTERO et al., 2004; VIEIRA; PICOLI, 2016; LIN; LAN, 2014).

Em resumo, constata-se que cepas bacterianas resistentes representam uma ameaça global para a saúde pública, pois limitam a eficácia das drogas atuais, causam falhas no tratamento, aumentam o risco de complicações e conseqüentemente aumentam as taxas de mortalidade. Em adição, a reduzida susceptibilidade a antibióticos e os escassos estudos sobre novos compostos antibacterianos transformaram as doenças infecciosas em uma grande ameaça para a saúde do ser humano (VRANAKIS et al., 2014).

Uma das limitações no combate às cepas multirresistentes de *A. baumannii* é o baixo número de estudos na compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à patogênese desta estirpe (GEBHARDT et al., 2015). A incidência de infecções por *A. baumannii* têm aumentado substancialmente nos últimos anos, sendo que diversos hospitais nos quais as infecções por cepas multirresistentes eram eventos incomuns ou associados a surtos esporádicos, atualmente já se apresentam em níveis endêmicos (FALAGAS et al., 2008; LIN; LAN 2014).

Dessa forma, o desenvolvimento e a introdução de novas opções terapêuticas eficazes contra *A. baumannii* multirresistentes e pan-resistentes e também a implementação de estratégias de controle de infecção podem contribuir para o real controle das infecções causadas por esse microrganismo (FALAGAS; RAFAILIDIS, 2007), tendo em vista a extraordinária capacidade adaptativa desta bactéria face à pressão seletiva do meio e a rápida emergência em nível mundial de estirpes de *A. baumannii* resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos (KEMPF; ROLAIN, 2012).

## **3.2 Mecanismo de ação de antibióticos**

### **3.2.1 $\beta$ -lactâmicos**

Todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos interferem na síntese do peptidoglicano, principal componente da parede celular bacteriana e responsável pela sua integridade (RANG et al., 2016). A parede celular bacteriana é responsável pela manutenção da forma bacteriana, prevenindo a lise celular e também é responsável pela virulência da célula bacteriana (VRANAKIS et al., 2014). O fármaco penetra na bactéria por meio das porinas presentes na membrana externa da parede celular bacteriana, onde ligam-se as proteínas ligantes de penicilina (PBP), inibindo a enzima de transpeptidação que faz a ligação cruzada das cadeias peptídicas conectadas ao esqueleto do peptidoglicano. O evento bactericida final é a inativação de um inibidor das enzimas autolíticas na parede celular, levando à lise da bactéria (RANG et al., 2016).

Conforme a estrutura química, os  $\beta$ -lactâmicos são divididos principalmente em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (Figura 2). As bactérias utilizam três estratégias principais para se proteger contra os  $\beta$ -lactâmicos: alteração nas PBPs o que reduz a afinidade dos  $\beta$ -lactâmicos, bombas de efluxo que removem o antibiótico do espaço periplásmico bacteriano e produção de  $\beta$ -lactamases, ou seja, enzimas que hidrolizam o anel dos  $\beta$ -lactâmicos, sendo este último a principal causa de resistência em várias bactérias Gram-negativas (BLAIR et al., 2015; MASTER et al., 2013).

A resistência aos antibióticos com ação na parede celular, particularmente  $\beta$ -lactâmicos, é uma questão amplamente discutida. Muitos estudos apontam preocupação com o grupo de agentes patogênicos denominados ESKAPE:

*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp* (BOUCHER, et al., 2009; LLACA-DIAZ, et al., 2012).

Um estudo revelou aumento contínuo das taxas de resistência do grupo ESKAPE frente aos  $\beta$ -lactâmicos sugerindo a necessidade de monitoramento dessas cepas multirresistentes e a pesquisa de novos alvos terapêuticos (MASTER et al., 2013).

Particularmente, *A. baumannii* adquiriu resistência à maioria dos antibióticos em todo o mundo, sendo que a disponibilidade de antibióticos efetivos para tratamento é cada vez mais escassa devido a mecanismos mais versáteis e robustos (TIWARI, et al., 2012). Isso pode ser entendido ao analisar as taxas de resistência aos carbapenêmicos, que foi de apenas 2% no início dos anos 90, aumentou para 71% na última década e em estudos recentes apresentou taxas superiores a 90% (VIEIRA; PICOLI, 2016). Portanto, as infecções por *A. baumannii* estão se tornando cada vez mais difíceis de erradicar devido ao alto nível de resistência como resultado de mecanismos intrínsecos e adquiridos (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017).

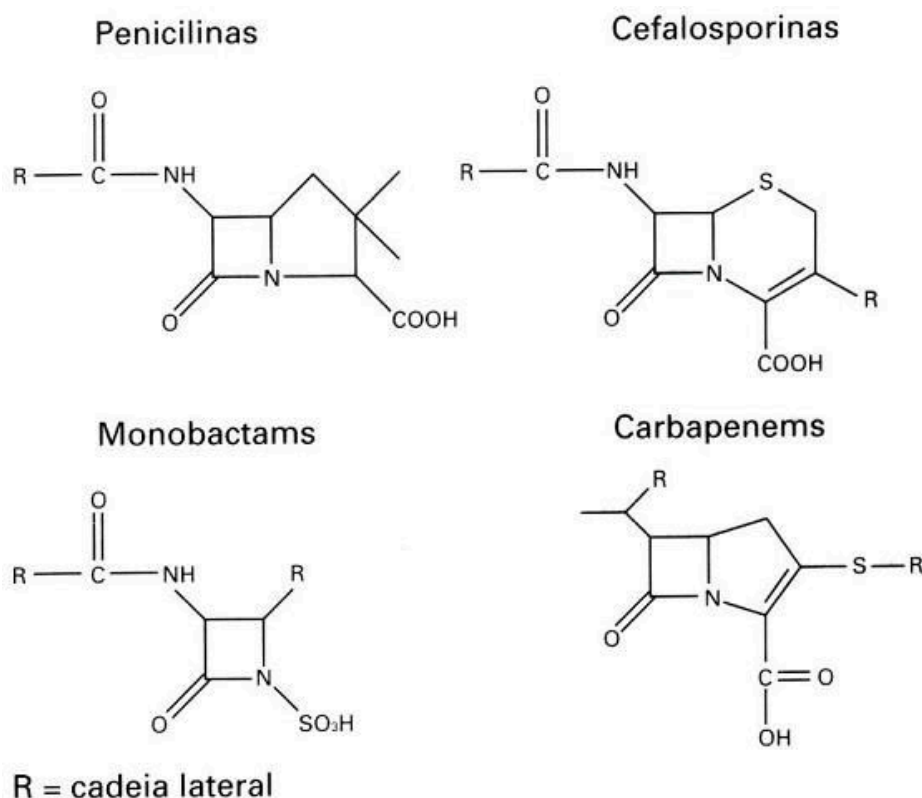


Figura 2 Estrutura química dos antibióticos beta-lactâmicos (Adaptado de Williams, 1999).

### 3.2.2 Inibidores de $\beta$ -lactamases

Os inibidores de  $\beta$ -lactamases são antimicrobianos estruturalmente semelhantes às penicilinas, retendo a ligação amida do grupo beta-lactâmico, mas possuem uma cadeia lateral modificada (Figura 3). Tais aspectos estruturais permitem aos inibidores ligarem-se irreversivelmente às  $\beta$ -lactamases como substratos suicidas, mantendo-as inativas. A combinação de um agente  $\beta$ -lactâmico e um inibidor de  $\beta$ -lactamase tem mostrado ser uma boa opção de tratamento, já que o inibidor inativará a ação da enzima permitindo que as penicilinas, as quais são eficientes e bem toleradas, continuem a tratar as mais variadas infecções (WILLIAMS, 1999).

Os três inibidores de  $\beta$ -lactamase mais frequentemente usados na clínica médica são sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico, porém, com os atuais mecanismos de resistência, esses fármacos tornaram-se incapazes de inativar a maioria das  $\beta$ -lactamases expressas por isolados clínicos multirresistentes (PAPP-WALLACE; BONOMO, 2016).

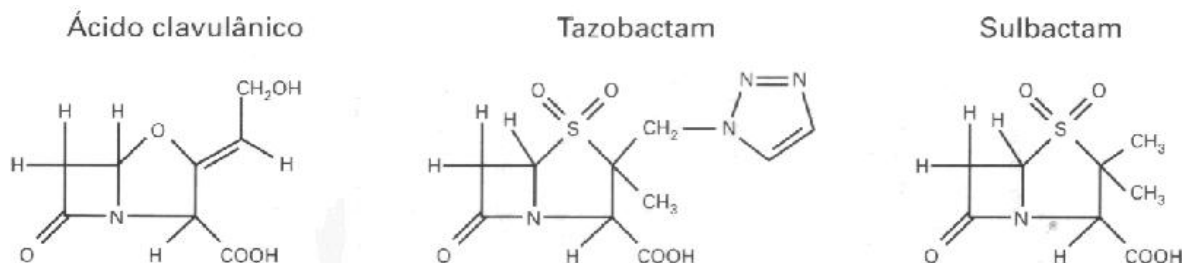


Figura 3 Estrutura química dos inibidores de  $\beta$ -lactamase (Adaptado de WILLIAMS, 1999).

### 3.3 A resposta ao choque térmico e a antibióticos em bactérias

As bactérias, assim como todos os seres vivos, possuem a habilidade de responder a condições desfavoráveis do meio em que se encontram como: exposição a agentes tóxicos, alterações no pH, agentes físicos, limitação de nutrientes ou aumento de temperatura, promovendo a rápida expressão de proteínas altamente conservadas, denominadas de proteínas choque térmico (HSPs). Assim, a indução de HSPs é uma estratégia importante para a sobrevivência dos seres vivos



em condições hostis, porque previne e reduz os danos produzidos para as células (YAMAGUCHI et al., 2003; GOMES; SIMÃO, 2009).

Classicamente, sabe-se que em bactérias, durante o choque térmico, as HSPs são induzidas e diminuem o acúmulo de proteínas desenoveladas e desnaturadas. Proteínas dessa classe são chaperones, proteases e proteínas regulatórias. A maioria das HSPs são classificadas como chaperones moleculares ou proteases dependentes de ATP. As chaperones facilitam o dobramento adequado de polipeptídeos sintetizados e ajudam proteínas que foram danificadas pelo aumento de temperatura a recuperar uma conformação biologicamente ativa, ao passo que as proteases degradam proteínas deformadas que não podem ser resgatadas pela ação das chaperones (ELLIS; HARTL, 1996; GROSS, 1996). Esse mecanismo garante que os problemas criados pelas condições de estresse sejam reduzidos e os agregados proteicos, que podem ser tóxicos para as células, não se formem (RODRIGUES; RODRIGUES, 2017).

As chaperones moleculares interagem com diversos substratos proteicos para auxiliar na obtenção da conformação tridimensional adequada, auxiliando na recuperação celular após o estresse, reparando proteínas defeituosas ou promovendo sua degradação (SILVEIRA, 2009).

Em bactérias, as principais chaperones incluem os sistemas DnaK/DnaJ, GroEL/GroES, ClpB e as proteases ClpXP e ClpAP (CARDOSO et al., 2010; GOMES; SIMÃO, 2009; WONG; HOURY, 2004).

Os genes de choque térmico possibilitam que células enfrentem os efeitos tóxicos não só às altas temperaturas, mas também a fatores desfavoráveis como a exposição a metais pesados, estresse oxidativo e presença de antibióticos. Em virtude disso, as proteínas induzidas quando as células bacterianas são expostas a antibacterianos podem afetar a susceptibilidade dos organismos para esses agentes e assim contribuir para a elucidação dos mecanismos de resistência ainda desconhecidos (CARDOSO et al., 2010; GOMES; SIMÃO, 2009).

Além disso, outras condições de estresse que evoluíram como parte da própria defesa do hospedeiro como mudanças súbitas na temperatura e pH podem causar danos celulares significativos em questão de segundos a minutos, afetando simultaneamente a estrutura e a estabilidade de muitas proteínas (VOTH; JAKOB, 2017).

A evolução da resposta específica e adaptativa é crucial para a sobrevivência em ambientes hostis. As vias de resposta ao choque térmico, estresse oxidativo e estresse químico são amplamente conservados e possuem conexões quando se trata de mecanismos regulatórios. Após a exposição ao fator estressante, uma via de sinalização, conhecida como resposta ao choque térmico, é ativada, levando a um aumento marcante na expressão de genes que codificam fatores de transcrição conhecidos como fatores Sigma alternativos, além das já mencionadas chaperones moleculares e proteases (CLAUSS-LENDZIAN, et al., 2018).

Algumas das proteínas de choque térmico são descritas como fatores de virulência porque atuam facilitando a adaptação para a infecção no hospedeiro, enquanto que outras afetam a patogênese indiretamente, por meio do aumento da resistência bacteriana (GOPHNA et al., 2003). Algumas bactérias expressam proteínas de choque térmico na superfície externa da célula, as quais podem participar dos processos de adesão celular, uma importante etapa da infecção bacteriana (GOMES; SIMÃO, 2009).

Em *Escherichia coli* (*E. coli*), a expressão de ClpA não é afetada pelo estresse, enquanto a expressão de ClpB e ClpX é induzida por choque térmico (FREES et al., 2004). Dentre as HSPs, está a *ClpB*, chaperone molecular dependente de ATP, que pertence à família HSP100 e está associada a diversas atividades celulares possuindo a capacidade notável para resgatar proteínas danificadas pelo estresse (LEE et al., 2003). A família Clp ATPase é caracterizada por um segmento conservado de cerca de 220 aminoácidos, normalmente definido como o domínio AAA, o qual contém vários motivos também conservados, incluindo os necessários para a ligação e a hidrólise de ATP (NEUWALD et al., 1999).

Estudos apontam que a inativação de proteínas da família *Clp* em *S. aureus* tornou a bactéria avirulenta, enfatizando o papel central dessa proteína para a patogenicidade bacteriana (FREES et al., 2014).

Nos últimos anos, vários estudos apontaram uma ligação entre as proteínas da família *Clp* e a resistência a antibióticos, tendo em vista que essas proteases e chaperonas têm papel importante nos processos de manutenção geral do metabolismo da célula, virulência e resistência aos antimicrobianos (FREES et al., 2014).

### 3.4 A regulação do choque térmico em bactérias

A regulação da resposta ao choque térmico começou a ser estudada em *E. coli* no ano de 1975. A partir disso, iniciou-se uma investigação em outras espécies bacterianas, sendo que dois tipos de reguladores foram identificados até o momento: fatores sigma alternativos e os repressores da transcrição (SCHUMANN, 2016).

Na regulação positiva, são utilizados fatores sigma alternativos, que induzem a transcrição dos genes de choque térmico a altas temperaturas, enquanto que na regulação negativa atuam repressores que inibem a expressão desses genes em temperaturas fisiológicas e são inativados pelo calor, permitindo a expressão aumentada dos genes de choque térmico a altas temperaturas (GOMES; SIMÃO, 2009).

O fator sigma liga-se reversivelmente à RNA polimerase (HELMANN; CHAMBERLIN, 1988) conferindo especificidade no reconhecimento da região promotora. A RNA polimerase interage com o fator sigma formando a holoenzima, capaz de reconhecer o promotor do gene e iniciar a transcrição dos genes de choque térmico. Após a iniciação da transcrição, o fator sigma é liberado e a cadeia de RNA é sintetizada (TRAVERS; BURGESS, 1969; GOMES; SIMÃO, 2009). O término da transcrição ocorre pela interação da RNA polimerase com estruturas terminadoras de RNA ou fatores de terminação específicos (VON HIPPEL et al., 1969; AVEDISSIAN, 1996).

A identificação do gene *rpoH*, que codifica o fator sigma 32 ( $\sigma^{32}$ ) em *E. coli*, serviu de base para os estudos da função e regulação da resposta ao choque térmico em bactérias (AVEDISSIAN, 1996). Foram descritos três mecanismos de controle dos níveis de  $\sigma^{32}$ : regulação da tradução, regulação da estabilidade e regulação da atividade do fator. O aumento nos níveis de  $\sigma^{32}$  durante o choque térmico é resultado do aumento de sua síntese atrelado à sua estabilidade (YURA et al., 1993). Em temperaturas fisiológicas os níveis de  $\sigma^{32}$  são mantidos baixos, devido à meia-vida curta do fator, aproximadamente 1 minuto, enquanto que durante um aumento súbito na temperatura o  $\sigma^{32}$  é estabilizado durante 4 ou 5 minutos, permitindo seu rápido acúmulo. Outros estudos demonstraram que ocorre aumento na tradução desse fator, devido ao aumento na estabilidade do mRNA do  $\sigma^{32}$ . O aumento nos níveis e da atividade da proteína  $\sigma^{32}$  são os responsáveis pela rápida indução das demais proteínas de choque térmico (YURA et al., 1993; AVEDISSIAN, 1996; GOMES; SIMÃO, 2009).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Meios e condições de cultura

As culturas estoque de *A. baumannii* (cepa RS4) foram inoculadas em meio líquido Luria-Bertani - LB (Bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5) a 37 °C em agitação (120 rpm) por 16 horas até atingirem a densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) de 0,1 em espectrofotômetro. Posteriormente, a cultura foi diluída em meio LB líquido, incubadas a 37°C sob agitação para a obtenção cultura em fase exponencial ( $DO_{600nm}$  0,4 – 0,6). Este ponto foi considerado o tempo 0 (zero) para todos os experimentos.

Os testes realizados com as culturas de *A. baumannii* (cepa RS4) foram: exposição a choque térmico a 45 °C, choque térmico extremo de 50 °C e adição de diferentes antibióticos a 37 °C. Os antibióticos utilizados foram ampicilina ( $30 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ), amoxicilina+ sulbactam ( $8/12 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ), cefepime ( $30 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ), meropenem ( $18 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) e sulfametoxazol + trimetoprima ( $120/8 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ).

### 4.2 Análise de expressão do gene *clpB* exposto a antibióticos e choque térmico

#### 4.2.1 Extração de RNA total e síntese de cDNAs

Para iniciar a caracterização funcional do gene *clpB* frente a antibióticos, a cultura de *A. baumannii* (cepa RS4) foi crescida a 37 °C em meio de cultivo LB até atingir fase exponencial de crescimento ( $DO_{600nm}$  0,4 – 0,6), momento em que foi retirada a primeira alíquota (tempo 0) e, em seguida, o antibiótico teste foi adicionado. Após, a cultura foi novamente incubada sob agitação para retirada de alíquotas, cada uma com 15 mL nos tempos 10, 20 e 30 minutos. Posteriormente, as 4 alíquotas foram centrifugadas a 4°C, 12.000 x g por 10 minutos e os precipitados foram lisados em 1 mL de Trizol LS (Invitrogen®) e incubados a 25 °C por 10 minutos. Após, a esta mistura foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (PA), agitado vigorosamente e incubados a 25°C por 3 minutos. As misturas foram centrifugadas a 4°C, 12.000 x g por 15 minutos; a fase aquosa foi coletada e os RNAs precipitados com 500 $\mu\text{L}$  de isopropanol e incubados a 25 °C por 10 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados a 4°C, 12.000 x g por 10 minutos e os precipitados lavados em etanol 75%. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4°C, 12.000 x g por 5

minutos e o sobrenadante descartado. Os precipitados foram secos a 25°C por 10 minutos e solubilizados em 50µL de água Milli-Q tratada com DEPC e armazenados a -80 °C.

Para avaliar a expressão do gene *clpB* após o choque térmico, o inóculo foi submetido a temperaturas de 45 °C e 50 °C nos mesmos tempos de incubação de 0, 10, 20 e 30 minutos. Para iniciar a caracterização funcional do gene *clpB* frente a estresse causado por choque térmico, a cultura de *A. baumannii* (cepa RS4) foi crescida a 37°C em meio de cultivo LB até atingir a densidade óptica (DO<sub>600nm</sub> 0,4 – 0,6), momento em que foi retirada a primeira alíquota (tempo 0). Após, a cultura foi incubada a 45°C sob agitação para retirada de alíquotas nos tempos 10, 20 e 30 minutos. O mesmo processo descrito acima foi realizado para o teste a 50°C de choque térmico extremo. Para a extração do RNA foi utilizado o reagente Trizol LS (Invitrogen®) como descrito anteriormente.

Todas as amostras de RNA foram tratadas com 2U de DNase I (Thermo Fischer Scientific®) usando tampão próprio da enzima e foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A DNase foi inativada adicionando 1µL de EDTA 25mM e incubando-os a 65°C por 10 minutos.

Os RNAs livres de contaminação foram utilizados nas reações de transcrição reversa com o Kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fischer Scientific®). Para a primeira etapa de desnaturação foram usados 3 µg do RNA total, 50 ng dos oligonucleotídeos randômicos em uma reação total de 20µL, a qual foi incubada a 65°C por 5 minutos e resfriada a 4°C por 1 minuto. A transcrição reversa foi realizada acrescentando ao RNA 8µL do tampão cDNA Synthesis Buffer 5X, 4 µL de uma mistura de dNTPs 25mM, 1 µL de DTT 100mM, 20 U de RNase Out (Invitrogen®) e 32U de SuperScrip III Reverse Transcriptase (Thermo Fischer Scientific®) para um volume final de reação de 40µL que foram incubadas a 25 °C por 10 minutos. A síntese dos cDNAs foi realizada a 50°C por 50 minutos e as reações foram terminadas inativando a transcriptase reversa a 85°C por 5 minutos. Para remover o restante do molde dos RNAs foi adicionado 1µL de RNase H (Invitrogen®) incubando as reações a 37°C por 20 minutos. A verificação da eficiência na síntese dos cDNAs foi realizada mediante quantificação por espectrofotometria. Posteriormente, a integridade do cDNA recém-sintetizado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X a 100 V por

40 minutos. As amostras obtidas de cDNA foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o seu processamento nas etapas subsequentes (item 2.2.).

#### 4.2.2 Amplificação do alvo a partir de cDNA

Para verificar a capacidade de amplificação do alvo a partir de cDNA foi realizada uma reação de PCR convencional, usando  $1\mu\text{L}$  de cDNA,  $2\mu\text{L}$  do tampão PCR buffer 10X,  $0,6\mu\text{L}$  de cloreto de magnésio 50mM,  $2\mu\text{L}$  de dNTP 25mM,  $1\mu\text{L}$  do primer *clpB*-Ab-F,  $1\mu\text{L}$  do primer *clpB*-Ab-R (Tabela 3),  $0,5\mu\text{L}$  de Taq DNA Polymerase 5 U/ $\mu\text{L}$  e água Milli-Q tratada com DEPC, para um volume final de reação de  $20\mu\text{L}$ . A reação foi realizada com 30 ciclos, cada um com 15 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$ , 15 segundos a  $55^{\circ}\text{C}$  e 30 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$ . O resultado do PCR foi observado em gel de agarose 1,5%, tampão TBE 1X a 100 V por 40 minutos.

O perfil de expressão gênica foi avaliado por ensaios de qPCR usando-se o Kit SYBR Select Master Mix (Life Technologies®) conforme instruções do fabricante em termociclador convencional (Eppendorf®).

#### 4.3 Obtenção das sequências gênicas

A expressão relativa do gene *clpB* foi avaliada por PCR quantitativo – qPCR usando os oligonucleotídeos complementares às sequências conservadas do gene *clpB*, *clpB*-Ab-F e *clpB*-Ab-R nas reações. Os oligonucleotídeos (Tabela 1) foram desenhados com base na sequência nucleotídica obtida para o gene *clpB* de *A. baumannii*, cepa ATCC 19606. Os ensaios foram realizados usando o gene *rRNA16S* de *A. baumannii* como controle endógeno (SHARMA et al., 2014). Os amplicons obtidos para o gene controle (*rRNA16S*) e para o gene alvo (*clpB*) apresentaram 200 nucleotídeos.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para o método de qPCR

Oligonucleotídeo	Sequência (5' → 3')
16SRNAr-Ab-F	CAG CTC GTG TCG TGA GAT GT
16SRNAr-Ab-R	CGT AAG GGC CAT GAT GAC TT
<i>clpB</i> -Ab-F	GTG CCG TAG GTG TAA CTC GA
<i>clpB</i> -Ab-R	AAG ACC TGA ATG GTA CGG CG

#### 4.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real foi realizada em um termociclador StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems) e as reações de amplificação foram realizadas em placas de 48 poços. A avaliação da expressão relativa do gene *clpB* foi realizada com o kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific®), conforme orientações do fabricante. Em cada poço da placa de qPCR foram adicionados 5 µL do reagente SYBR Green, 1 µL primer *clpB-Ab-F* (10 pmol/µL), 1 µL primer *clpB-Ab-R* (10 pmol/µL), 1 µL de cDNA (1 µg/µL) e água Milli-Q tratada com DEPC, para um volume final de reação de 10 µL para as amostras 0, 10, 20 e 30 para todos os tratamentos (choque térmico e adição de antibióticos). Nas amostras contendo o controle endógeno da reação foram adicionados 5 µL do reagente SYBR Green (2x), 1 µL primer *16SRNAr-Ab-F* (10 pmol/µL), 1 µL primer *16SRNAr-Ab-R* (10 pmol/µL), 1 µL de cDNA (1 µg/µL) e água Milli-Q tratada com DEPC, para um volume final de reação de 10 µL.

O gene de referência com expressão constitutiva utilizado para normalizar as quantidades do gene alvo foi o oligonucleotídeo *rRNA16S* (controle endógeno) e como calibrador foi utilizado o Tempo 0 (T0) em todos os testes, sendo esta a amostra utilizada como base para os resultados de expressão comparativa (BUSTIN et al., 2009).

Todas as reações de qPCR foram realizadas em um ciclo de 50 °C por 2 minutos, seguida de 2 minutos a 95°C. A seguir foram realizados 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C (desnaturação) e 1 minuto a 60 °C (anelamento e extensão). Durante cada ciclo, o acúmulo do produto de PCR foi detectado pelo monitoramento do aumento da fluorescência do corante SYBR-green ligado à dupla fita do DNA.

A análise dos resultados de qPCR foi determinada considerando os parâmetros pré-definidos como padrão (default) do Software StepOne Applied Biosystems. O parâmetro baseline (ciclos iniciais da PCR, nos quais há pequena alteração no sinal fluorescente) foi fixado a partir do ciclo 3 para todos os experimentos. A meta de chegada (threshold) de cada tratamento (choque térmico e adição de diferentes antibióticos) foi ajustada no ponto médio da fase exponencial para cada curva de dissociação. O método de análise escolhido foi o ensaio de quantificação relativa, tendo em vista que é utilizado para analisar alterações na expressão gênica em uma determinada amostra relativa à outra amostra de

referência (amostra controle não tratada – T0) (BUSTIN et al., 2009). O nível de expressão gênica relativa foi calculado a partir de um grupo de três replicatas para cada tratamento, a eficiência da reação foi determinada em 100% com um intervalo de confiança de 95%.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Expressão quantitativa do gene *clpB* de *A. baumannii* em resposta ao choque térmico e diferentes antibióticos

Com o objetivo de avaliar a expressão quantitativa do gene *clpB* de *A. baumannii* em resposta a diferentes antibióticos, o RNA total das células bacterianas foi isolado. A concentração e pureza do RNA total extraído com Trizol LS (Invitrogen®) foi estimada a  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  em espectrofotômetro e encontram-se descritos na Tabela 2. A integridade do RNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose para RNA (1,5%) em tampão MOPS 1 X a 90 V por 1 hora, conforme pode ser verificado na Figura 4.

Tabela 2 Quantificação de RNA por espectrofotômetro a 260nm, após extração com Trizol LS (Invitrogen®).

<b>Amostra</b>	<b>RNA (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>
T <sub>0</sub> 45 °C	1,08
T <sub>10</sub> 45 °C	1,12
T <sub>20</sub> 45 °C	1,40
T <sub>30</sub> 45 °C	1,08
T <sub>0</sub> Meropenem	1,56
T <sub>10</sub> Meropenem	1,28
T <sub>20</sub> Meropenem	1,20
T <sub>30</sub> Meropenem	2,36
T <sub>0</sub> Cefepime	1,00
T <sub>10</sub> Cefepime	0,16
T <sub>20</sub> Cefepime	0,96
T <sub>30</sub> Cefepime	0,76
T <sub>0</sub> Sulfametoxazol + Trimetoprima	1,40
T <sub>10</sub> Sulfametoxazol + Trimetoprima	0,68
T <sub>20</sub> Sulfametoxazol + Trimetoprima	1,56
T <sub>30</sub> Sulfametoxazol + Trimetoprima	1,40
T <sub>0</sub> Ampicilina	0,44
T <sub>10</sub> Ampicilina	0,60
T <sub>20</sub> Ampicilina	1,00
T <sub>30</sub> Ampicilina	1,28
T <sub>0</sub> Amoxicilina+Sulbactam	0,18
T <sub>10</sub> Amoxicilina+Sulbactam	0,36
T <sub>20</sub> Amoxicilina+Sulbactam	0,22
T <sub>30</sub> Amoxicilina+Sulbactam	0,26

A verificação da eficiência na síntese dos cDNAs foi realizada mediante quantificação por espectrofotometria e está detalhado na Tabela 3.

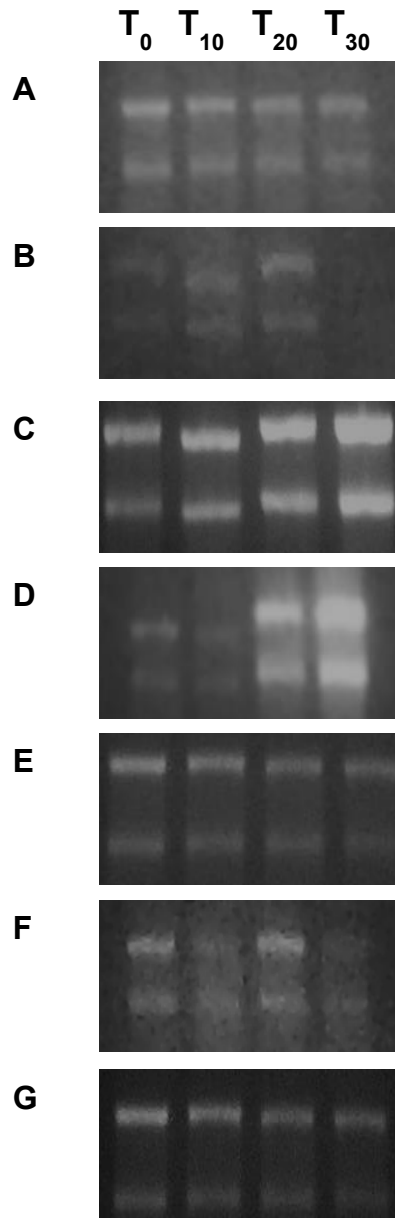


Figura 4 Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos da extração de RNA obtidos a partir de diferentes tratamentos térmicos e exposição a antibióticos da cepa multirresistente *Acinetobacter baumannii* RS4. (A) choque térmico a 45 °C, (B) choque térmico a 50 °C, (C) Meropenem, (D) cefepime, (E) Sulfametoxazol + Trimetoprima, (F) Ampicilina, (G) Amoxicilina + Sulbactam. (T<sub>0</sub>) tempo zero, (T<sub>10</sub>) tempo 10 minutos, (T<sub>20</sub>) tempo 20 minutos e (T<sub>30</sub>) tempo 30 minutos.

Tabela 3 Quantificação de cDNA por espectrofotômetro a 260nm

<b>Amostra</b>	<b>cDNA (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>
T <sub>0</sub> 45 °C	6,95
T <sub>10</sub> 45 °C	6,00
T <sub>20</sub> 45 °C	6,40
T <sub>30</sub> 45 °C	5,95
T <sub>0</sub> Meropenem	6,15
T <sub>10</sub> Meropenem	5,85
T <sub>20</sub> Meropenem	6,10
T <sub>30</sub> Meropenem	9,15
T <sub>0</sub> Cefepime	6,55
T <sub>10</sub> Cefepime	7,70
T <sub>20</sub> Cefepime	6,35
T <sub>30</sub> Cefepime	6,45
T <sub>0</sub> Sulfametoxazol + Trimetoprima	7,80
T <sub>10</sub> Sulfametoxazol + Trimetoprima	6,00
T <sub>20</sub> Sulfametoxazol + Trimetoprima	5,05
T <sub>30</sub> Sulfametoxazol + Trimetoprima	5,30
T <sub>0</sub> Ampicilina	6,30
T <sub>10</sub> Ampicilina	5,75
T <sub>20</sub> Ampicilina	5,70
T <sub>30</sub> Ampicilina	7,00
T <sub>0</sub> Amoxicilina+Sulbactam	5,55
T <sub>10</sub> Amoxicilina+Sulbactam	5,00
T <sub>20</sub> Amoxicilina+Sulbactam	6,05
T <sub>30</sub> Amoxicilina+Sulbactam	4,70

Amostras de cDNAs obtidas nos diferentes tratamentos foram submetidas a ensaios de qPCR como descrito na parte relativa a Material e Métodos. A análise dos resultados de qPCR com amostras de choque térmico a 45 °C (Figura 5) evidenciou que ocorre um aumento transitório na indução do gene *clpB* com níveis máximos detectados em 10 min a 45 °C, começando a diminuir depois disso. Este perfil de expressão gênica sugere que *A. baumannii*, mediante um estresse térmico, ajusta os níveis de transcrição do gene *clpB*, permitindo que a bactéria sobreviva a essa condição hostil do meio.

Estudos investigando a indução da proteína ClpB de *A. baumannii* (cepa RS4), mostraram que ocorre indução de maneira crescente em temperaturas mais elevadas de choque térmico. Os níveis da proteína aumentam cerca de 4 vezes quando submetidas a 10 minutos de choque térmico a 45°C e quase 10 vezes quando submetida a choque térmico extremo de 50 °C (SANTOS, et al., 2015).

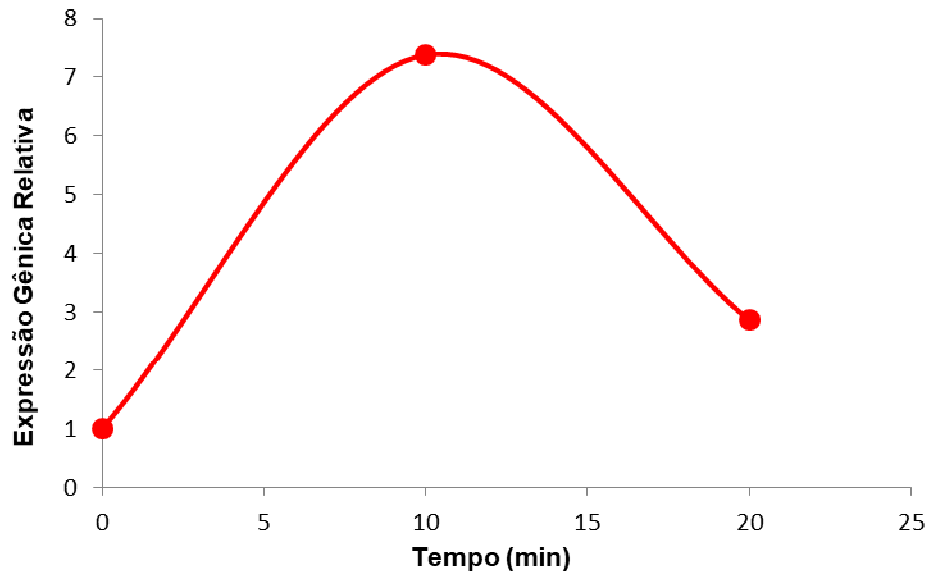


Figura 5 Expressão gênica relativa do gene *clpB* de *A. baumannii* (cepa RS4) por meio de qPCR durante o choque térmico a 45°C em diferentes tempos (0, 10 e 20 minutos).

SIMÃO et al. (2005) investigaram o papel da proteína ClpB na resposta ao choque térmico em *Caulobacter crescentus* (*C. crescentus*) e mostraram que ela está envolvida na termotolerância e na resposta ao choque térmico. O estudo identificou que as células que não possuem *clpB* (mutante nulo) são mais suscetíveis à exposição ao choque térmico e à alta concentração de etanol, além de incapazes de adquirir termotolerância. Além disso, a proteína ClpB está envolvida na renaturação do fator  $\sigma^{70}$  durante o desligamento da resposta a choque térmico, o que favorece uma competição entre os fatores de transcrição  $\sigma^{32}$  (específico de choque térmico) e o  $\sigma^{70}$  pela ligação ao core da RNA Polimerase.

Experimentos realizados a partir de qPCR mostraram que, na estirpe selvagem de *Enterococcus faecalis*, houve aumento na expressão dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE* e *clpP* quando as células foram submetidas ao choque térmico a 48°C (DE OLIVEIRA et al., 2011).

A importância da ClpB na aquisição de termotolerância também foi demonstrada em estudos realizados com diferentes microrganismos, tais como: *Staphylococcus aureus* (FREES et al., 2004), *Listeria monocytogenes* (CHASTANET et al., 2004) e *C. crescentus* (SIMÃO et al., 2005).

A caracterização e as funções da ClpB têm mostrado que essa proteína apresenta importante papel na virulência, facilitando a adaptação para a infecção no

hospedeiro e afetando a patogênese indiretamente, por meio do aumento da resistência bacteriana (GOPHNA et al., 2003).

A expressão do gene *clpB* foi averiguada ainda frente a diferentes antibióticos por qPCR. A análise dos resultados de qPCR (Figura 6) evidenciou que ocorre aumento transitório na indução do gene *clpB* para os antibióticos ampicilina ( $30 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ), amoxicilina+ sulbactam ( $8/12 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ), meropenem ( $18 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ) e sulfametoxazol + trimetoprima ( $120/8 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ). Na presença tanto de ampicilina como de amoxicilina associada à sulbactam, o aumento na síntese de *mRNA-clpB* foi em torno de 1,4 vezes superior após 20 minutos de incubação com os antibióticos do que a produzida na completa ausência. Surpreendentemente, na presença de meropenem, a indução da expressão do *mRNA-clpB* foi mais que 30 vezes superior após 10 minutos de incubação com o antibiótico e mais que 8 vezes superior na presença de sulfametoxazol associado à trimetropina. Esse perfil de expressão gênica sugere que *A. baumannii*, mediante estresse causado pela adição de antibióticos, ajusta os níveis de transcrição do gene *clpB*, permitindo que a bactéria sobreviva a essa condição inóspita propiciada pelos compostos químicos.

Evidências experimentais suportam a hipótese de que *A. baumannii* induz a expressão de proteínas de choque térmico para diminuir os prejuízos causados pelo estresse provocado por antibióticos ou mesmo para promover o enovelamento de proteínas que participam do processo de resistência aos diferentes antibióticos testados (CARDOSO et al., 2010).

ClpB foi descrita como um fator essencial para adquirir termotolerância e para a virulência de várias bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (FREES et al., 2004). Verificou-se em *A. baumannii* (ATCC 19606) que células pré-tratadas durante 30 minutos a temperaturas de  $45^{\circ}\text{C}$  provou ser mais termotolerante e resistente ao aminoglicosídeo estreptomicina do que bactérias pré-tratadas a temperaturas fisiológicas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Além disso, os níveis da proteína de choque térmico DnaK, aumentaram mais de quatro vezes após uma hora de exposição a uma concentração sub-inibitória de estreptomicina e os níveis de GroEL duplicaram (CARDOSO et al., 2010). A incubação de uma estirpe multirresistente de *A. baumannii* RS4 na presença de diferentes antibióticos resultou num aumento significativo na produção do mRNA a partir do gene *dnaK* bem como da proteína codificada por ele (CARDOSO et al., 2010; GOMES et al., 2009).

Outro estudo verificou que a exposição de *Streptococcus pyogenes* na presença do antibiótico penicilina durante uma hora induziu o aumento de 12 proteínas associadas à biossíntese de ácidos graxos, via de fosfato de pentose, glicólise e respostas relacionadas ao estresse nas cepas de tipo selvagem, sendo que essas proteínas estavam relacionadas a fatores de virulência e de resistência aos antibióticos (CHAUSSEE et al., 2006).

Um trabalho mais recente mostrou que ocorre uma regulação positiva dos genes que codificam proteínas de choque térmico, como *groES*, *groEL*, *dnaK*, *clpB*, após exposição à mistura de carvacrol/cinamaldeído. A expressão de *clpB* aumentou significativamente após 30 min de exposição à mistura de carvacrol/cinamaldeído e persistiu ao longo do tempo, devido aos efeitos biológicos desse composto. De fato, ClpB colabora com o sistema HSP 70 na desagregação de proteínas mal enoveladas, um processo crucial para a sobrevivência bacteriana em condições de estresse. Esses resultados apontam para o desenvolvimento de estratégias de defesa da bactéria em resposta a condições de estresse ambiental, como para os compostos químicos utilizados (MONTAGU et al., 2016).

Ainda neste contexto, Liu et al., 2012 estudaram o perfil proteômico de uma cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* sob condições de estresse induzidas por imipenem, comparadas com a cepa controle sem estresse e verificaram a expressão diferencial de várias proteínas, entre elas proteínas com função conhecida de resistência ao imipenem (L1 MBL), proteínas de choque térmico como *DnaK* e *ClpB* e proteínas relacionadas ao metabolismo que podem alterar processos catabólicos bacterianos. Esses resultados sugerem que a expressão de genes relacionados com a resistência ao imipenem é induzida pela presença do antibiótico.

Estudos com isolados clínicos de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos detectaram 23 proteínas diferencialmente expressas (19 superexpressas e 4 reguladas negativamente). As proteínas reguladas positivamente foram diretamente ou indiretamente associadas à resistência ao carbapenem. Tais proteínas eram  $\beta$ -lactamases (*AmpC*, *OXA-51*), enzimas implicadas no metabolismo e proteínas ribossomais (Tiwari et al., 2012).

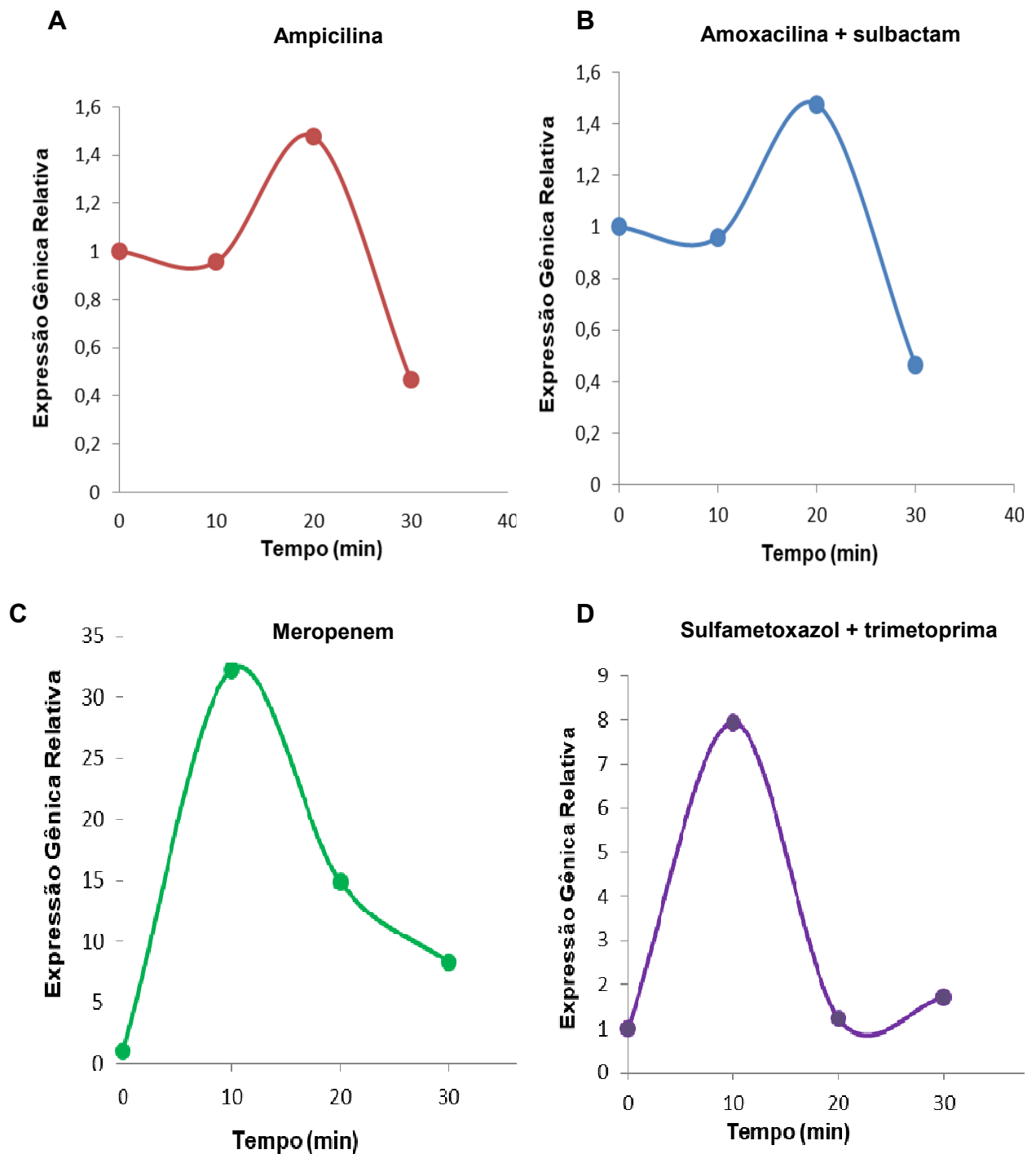


Figura 6 Diferentes antibióticos induzem transitoriamente a expressão do gene *clpB* de *A. baumannii*. Células bacterianas (cepa RS4) foram submetidas à incubação com concentrações subinibitórias de diferentes antibióticos a 37°C em diferentes tempos (0, 10, 20 e 30 minutos) e a variação em nível de mRNA avaliada por qPCR. Um aumento transitório na expressão de *clpB* foi observado durante a exposição aos antibióticos Ampicilina (A), Amoxicilina + sulbactam (B) com níveis máximos detectados entre 10 e 20 minutos. Na presença dos antibióticos Meropenem (C) e Sulfametoxazol + trimetoprima (D), a indução do gene *clpB* foi identificada nos 10 minutos iniciais, diminuindo na sequência.

É importante salientar que a maioria das proteínas diferencialmente expressas não são apenas uma resposta colateral de uma célula estressada. Um fenótipo resistente é uma reprogramação controlada inata da expressão do genoma de bactérias adaptando-se a um novo ambiente, em vez de uma simples superexpressão protéica. Todos os mecanismos de resposta das bactérias visam a um único alvo, a sobrevivência em condições hostis, como aumento de temperatura do meio ou combate aos antibióticos (VRANAKIS et al., 2014).

Os antibióticos aceleram o processo natural de evolução e isso torna imperativo o reajuste simultâneo de vários procedimentos metabólicos, impactando na fisiologia celular bacteriana. Os estudos de expressão de genes frente às condições inóspitas do meio podem contribuir para a compreensão das redes metabólicas e seus efeitos sobre a resistência aos antibióticos e, assim, contribuir para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (VRANAKIS et al., 2014).

A expressão gênica relativa de *clpB* frente ao antibiótico cefepime foi regulada de forma negativa, uma vez que o mRNA de *clpB* decaiu drasticamente (Figura 7).

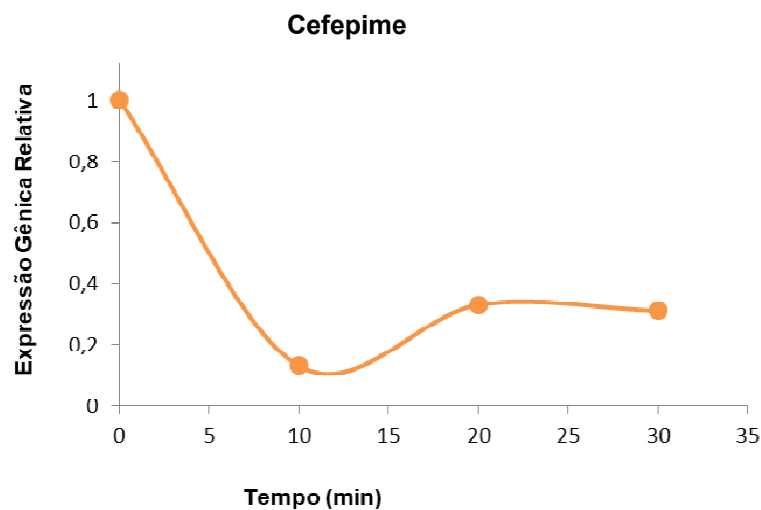


Figura 7 Repressão do gene *clpB* de *A. baumannii* (cepa RS4) frente a adição do antibiótico cefepime por meio de qPCR a 37°C em diferentes tempos (0, 10, 20 e 30 minutos).

Os mecanismos bioquímicos que levam ao aumento (Figura 6) ou à diminuição do gene *clpB* na presença de antibióticos (Figura 7) ainda não foram identificados. Porém, como o gene *clpB* foi induzido na presença de todos os outros antibióticos testados neste estudo (ampicilina, amoxicilina + sulbactam, meropenem e sulfametoxazol + trimetoprima) pode-se sugerir que o gene em questão possui um papel primordial na resposta ao estresse causado por antimicrobianos, fato este que é reforçado pelo estudo de SANTOS, et al., (2015) em que foi verificado que células



de *A. baumannii* (cepa RS4) tratadas com ampicilina + subactam e meropenem apresentaram evidente aumento na expressão da proteína ClpB.

Tendo em vista que a estirpe estudada nesse trabalho (RS4) é multirresistente a todos os antibióticos testados, podemos sugerir que o aumento na indução do gene *clpB* pode desempenhar papel significativo na resposta ao estresse causado pelos antimicrobianos e também como ferramenta adicional na pesquisa dos mecanismos de resistência associados.

Outro estudo demonstrou que os genes de virulência e resistência de *A. baumannii* parecem ser corregulados em resposta ao estresse ambiental e antibiótico. Foram identificadas 17 proteínas reguladoras, sugerindo que as cepas que possuem maior resistência aos antibióticos podem possuir simultaneamente propriedades de virulência melhoradas (GEBHARDT et al., 2015; KROGUER et al., 2016).

Dados experimentais mostraram que, após exposição de *E. faecalis* a um novo revestimento de superfície antimicrobiana de amplo espectro (AGXX®) durante 12, 24 e 60 minutos, levou a indução dos genes que codificam GroEL, GroES, ClpB, ClpP, ClpE (CLAUSS-LENDZIAN, et al., 2018).

Os antibióticos propiciam a morte celular por meio de uma variedade de mecanismos e as cepas que abrigam deleções de reguladores transcricionais específicos exibem maior sensibilidade aos antibióticos. Portanto, sugere-se que esses reguladores também podem controlar os genes necessários em resposta ao estresse ou para a alteração da permeabilidade celular, uma propriedade que pode afetar a sensibilidade tanto aos peptídeos antimicrobianos quanto aos antibióticos. A seleção para maior sobrevivência durante o estresse ambiental, como compostos químicos, antimicrobianos e saneantes, por exemplo, selecionam inadvertidamente cepas com fenótipo de hipervirulência e, de fato, cepas multirresistentes no contexto clínico (GEISINGER; ISBERG, 2015).

As mudanças no ambiente intra ou extracelular podem ser desencadeadas por uma variedade de sinais, incluindo danos ao DNA, resposta ao estresse térmico, osmótico e oxidativo, dentre outras injúrias. Esses sinais são interpretados e desencadeiam uma apropriada resposta biológica, coordenados por eventos que envolvem uma série de alterações conformacionais, multimerização e mudanças na localização de proteínas. Todos esses parâmetros estão sujeitos à regulação pelas HSP, que constitui um mecanismo fundamental de proteção celular. Portanto, o aprofundamento dos conhecimentos acerca dessas proteínas é

essencial para que, além de utilizá-las como marcador inicial de injúrias, seja possível compreender melhor os mecanismos de defesa exercidos pelas células em diferentes condições adversas, como o uso de antimicrobianos e choque térmico.

## **5.2 Análise das sequências gênicas de *clpB* por meio de ferramentas de Bioinformática**

A análise da sequência nucleotídica do gene *clpB* de *A. baumannii* (ATCC 19606) com a ferramenta “Conserved Domains” do NCBI mostrou que a proteína predita corresponde a uma chaperone do tipo ClpB, dependente de ATP, característica do grupo das bactérias. Essa proteína pertence à família AAA, ou seja, ATPases associadas com várias atividades celulares. De fato, essa chaperone molecular possui um papel para desagregar proteínas aglomeradas e mal enoveladas durante o estresse (MARCHLER-BAUER et al., 2016).

A sequência da ClpB predita nesse trabalho também foi averiguada frente a sequência de outros microrganismos com genomas completos com a ferramenta “Blast Microbial Genomes”. Quando 100% dos aminoácidos que constituem a proteína foram considerados para a análise, verificou-se 99% de identidade de ClpB de *A. baumannii* (ATCC19606) com a de *A. baumannii* cepa AB030, 91% com *Acinetobacter pittii* (cepa PHEA-2) e 78% com a *Acinetobacter soil* (cepa GFJ2), sugerindo uma conservação da estrutura global de ClpB dentro do gênero *Acinetobacter sp.*

## 6 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi evidenciado aumento transitório na indução do mRNA *clpB* de *A. baumannii* nos diferentes tratamentos com antibióticos comumente usados para tratamentos de infecções causadas pela bactéria. Os dados mostraram, de maneira consistente, que a bactéria ajusta os níveis de transcrição do gene *clpB*, permitindo que sobreviva a condições desfavoráveis impostas pela presença de antibióticos em condições subinibitórias. Em conclusão, pode-se afirmar que a proteína ClpB figura como importante fator de virulência em resposta a antibióticos no patógeno nosocomial *A. baumannii*.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

*A. baumannii* é um importante patógeno que vem se tornando endêmico nos hospitais devido à sua genética versátil e sua capacidade notável para tolerar ambientes hostis por meio de fatores de resistência e virulência. Elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos vem sendo descritas, demonstrando a dificuldade do tratamento dos pacientes com infecções causadas por este microrganismo nos últimos dez anos. A limitação da escolha terapêutica tornou evidente o desafio dos profissionais da área da saúde no manejo de pacientes infectados com esse microrganismo. Medidas para evitar a resistência bacteriana, como o uso racional dos antibióticos, prevenção de infecções bacterianas, controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, por exemplo, são essenciais. Além disso, o conhecimento combinado dos fatores de virulência e mecanismo de resistência pode fornecer estratégias possíveis para combater a disseminação da resistência antimicrobiana, por meio do controle rigoroso de infecção e, sobretudo, para direcionar o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas.

## 8 REFERÊNCIAS

AUSUBEL, F. M.; R, BRENT.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York. John Wiley & Sons, 1996.

AVEDISSIAN, M. **Regulação dos genes groES e groEI em Caulobacter crescentus**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 1996.

BLAIR, J. M., WEBBER, M. A., BAYLAY, A. J., OGBOLU, D. O., PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BOUCHER, H.W., TALBOT, G.H., BRADLEY, J.S., EDWARDS, J.E., GILBERT, D., RICE, L.B., SCHELD, M., SPELLBERG, B., BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**. v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, 55(4), 611-622, 2009.

CAI, Y.; CHAI, D.; WANG, R.; LIANG, B.; BAI, N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1607-1615, 2012.

CARDOSO, K.; GANDRA, R.F.; WISNIEWSKI, E. S.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K.; FELIPACH-NETO, V.; SIMAO, R.C.G. DnaK and GroEL are induced in response to antibiotic and heat shock in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 1061-1068, 2010.

CARVALHO, K. R.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. A.; PEIRANO, G.; DOS SANTOS, L. C. G.; PEREIRA, M. J. F.; ASENSI, M. D. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla OXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International journal of antimicrobial agents**, v. 34, n. 1, p. 25-28, 2009.

CAUDURO, L. L. N. **Mortalidade bruta e atribuível às infecções hospitalares causadas pela bactéria *Acinetobacter baumannii* resistente a antimicrobianos carbapenêmicos: uma revisão sistemática e metanálise de estudos observacionais**. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2015.

CHASTANET, A.; DERRE, I.; NAIR, S.; MSADEK, T. ClpB, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 4, p. 1165-1174, 2004.

CHAUSSEE, M. A., MCDOWELL, E. J., RIECK, L.D., CALLEGARI, E. A., CHAUSSEE, M. S. Proteomic analysis of a penicillin-tolerant rgg mutant strain of

*Streptococcus pyogenes*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 752-759, 2006.

CLAUSS-LENDZIAN, E., VAISHAMPAYAN, A., DE JONG, A., LANDAU, U., MEYER, C., KOK, J., GROHMANN, E. Stress response of a clinical *Enterococcus faecalis* isolate subjected to a novel antimicrobial surface coating. **Microbiological Research**, v. 207, p. 53-64, 2018.

DE OLIVEIRA, N. E. M.; ABRANCHES, J.; GACA, A. O.; LAPORT, M. S.; DAMASO, C. R.; DE FREIRE BASTOS, M. D. C.; LEMOS, J.A.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. *clpB*, a class III heat-shock gene regulated by CtsR, is involved in thermotolerance and virulence of *Enterococcus faecalis*. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 656-665, 2011.

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

ELLIS, R. J.; HARTL, F. U. Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 1, p. 20-26, 1996.

FALAGAS, M. E.; KARVELI, E. A.; KELESIDIS, I.; KELESIDIS, T. Community-acquired *Acinetobacter* infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, n. 12, p. 857-868, 2007.

FALAGAS, M. E.; BLIZIOTIS, I. A.; SIEMPOS, I. I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. **Critical Care**, v. 10, n. 2, p. R48, 2006.

FALAGAS, M. E.; RAFAILIDIS, P. I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. **Critical care**, v. 11, n. 3, p. 134, 2007.

FERNÁNDEZ-REYES, M.; RODRÍGUEZ-FALCÓN, M.; CHIVA, C.; PACHÓN, J.; ANDREU, D.; RIVAS, L. The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1632-1645, 2009.

FREES, D.; CHASTANET, A.; QAZI, S.; SØRENSEN, K.; HILL, P.; MSADEK, T.; INGMER, H. Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Molecular microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1445-1462, 2004.

FREES, D., GERTH, U., INGMER, H. Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 2, p. 142-149, 2014.

GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.

GERNER-SMIDT, P.; TJERNBERG, I.; URSING, J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 277-282, 1991.

GEBHARDT, M. J.; GALLAGHER, L. A.; JACOBSON, R. K.; USACHEVA, E. A.; PETERSON, L. R.; ZURAWSKI, D. V.; SHUMAN, H. A. Joint transcriptional control of virulence and resistance to antibiotic and environmental stress in *Acinetobacter baumannii*. **MBio**, v. 6, n. 6, p. e01660-15, 2015.

GEISINGER, E.; ISBERG, R. R. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS pathogens**, v.11, n. 2, p. e1004691, 2015.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K. (2008). *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?. **International journal of antimicrobial agents**, v. 32, n. 2, p. 106-119, 2008.

GOMES, S.L.; SIMAO, R.C.G. (2009). **Stress response: heat. In Encyclopedia of Microbiology**, pp. 464–474. M. Schaechter Oxford: Elsevier Academic Press. 2009.

GOPHNA, U.; RON, E. Z. Virulence and the heat shock response. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 7, p. 453-461, 2003.

GROSS, C. A. Function and regulation of the heat shock proteins. **Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology**, v. 1, p. 1382-1416, 1996.

HELMANN, J. D.; CHAMBERLIN M. J. DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is controlled by an alternative sigma factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 18, p. 6422-6424, 1987.

HOWARD, A.; O'DONOGHUR, M.; FEENEY, A.; SLEATOR, R. D. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243-250, 2012.

KEMPF, M.; ROLAIN, J. M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 2, p. 105-114, 2012.

KRÖGER, C.; KARY, S. C.; SCHAUER, K.; CAMERON, A. D. Genetic Regulation of Virulence and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Genes**, v. 8, n. 1, p. 12, 2016.

LLACA-DIAZ, J. M., MENDOZA-OLAZARAN, S., CAMACHO-ORTIZ, A., FLORES, S., GARZA-GONZALEZ, E. One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. **Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 475-481, 2012.

LEE, S.; SOWA, M. E.; WATANABE, Y. H.; SIGLER, P. B.; CHIU, W.; YOSHIDA, M.; TSAI, F. T. The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 229-240, 2003.

LEE, H. W.; KOH, Y.M.; KIM, J.; LEE, J.C.; SEOL, S.Y.; CHO, D.T. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 49-54, 2008.

LEE, C. R.; LEE, J. H.; PARK, M.; PARK, K. S.; BAE, I. K.; KIM, Y. B.; CHA, C. J.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 55, 2017.

LESK, A. **Introdução a Bioinformática**. Porto Alegre. Artmed, 2008.

LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World Journal of Clinical Cases**, v. 2, n. 12, p. 787, 2014.

LIU, W., ZOU, D., WANG, X., LI, X., ZHU, L., YIN, Z., YANG, Z., WEI, X., HAN, L., WANG, Y., SHAO, C., WANG, S., HE, X., LIU, D., LIU, F., WANG, J., HUANG, L., YUAN, J. Proteomic analysis of clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia* with bla NDM-1, bla L1 and bla L2  $\beta$ -lactamase genes under imipenem treatment. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 8, p. 4024-4033, 2012.

LIU, F.; ZHU, Y.; YI, Y.; LU, N.; ZHU, B.; HU, Y. Comparative genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates reveals extensive genomic variation and diverse antibiotic resistance determinants. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1163, 2014.

LOB, S. H.; HOBAN, D. J.; SAHM, D. F.; BADAL, R. E. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 47, n. 4, p. 317-323, 2016.

MCCONNELL, M. J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 2, p. 130-155, 2013.

MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antibiotic resistance. **Medicine**, v. 45, n. 10, p. 622-628, 2017.

MARCHLER-BAUER, BO, Y., HAN, L., HE, J., LANCZYCKI, C.J., LU, S., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M.K., GEER, R.C., GONZALES, N.R., GWADZ, M., HURWITZ, D. I., LU, F., MARCHLER, G. H., SONG, J., THANKI, N., WANG, Z., YAMASHITA, R. A., ZHANG, D., ZHENG, C., GEER, L., BRYANT, S. H. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D200-D203, 2016.

MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. *Acinetobacter* multirresistente-um desafio para a saúde pública. **Scientia Medica**, v. 23, n. 1, p. 56-62, 2013.



MARQUES, M.V. **Biologia Molecular e Genética Bacteriana**. São Paulo. SBG, 2012.

MASTER, R. N., DEANE, J., OPIELA, C., SAHM, D.F. Recent trends in resistance to cell envelope-active antibacterial agents among key bacterial pathogens. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, n. 1, p. 1-7, 2013.

MATARUCO, M. M. **Perfil de suscetibilidade, genes de resistência aos aminoglicosídeos e similaridade genética em amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas em um Hospital Terciário**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2015.

MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N. Oxacilinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 6, p. 391-405, 2013.

MONTAGU, A.; JOLY-GUILLOU, M. L.; ROSSINES, E.; CAYON, J.; KEMPF, M.; SAULNIER, P. Stress Conditions Induced by Carvacrol and Cinnamaldehyde on *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 2016.

MONTERO, A.; ARIZA, J.; CORBELLA, X.; DOMÉNECH, A.; CABELLOS, C.; AYATS, J.; TUBAU, F.; GUDIOL, F. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 1085-1091, 2004.

NEUWALD, A.F.; ARAVIND, L.; SPOUNGE, J.L.; KOONIN, E.V. AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome Research**, v. 9, n. 1, p. 27-43, 1999.

NGUYEN, C. T.; PARK, S. S.; RHEE, D. K. Stress responses in *Streptococcus* species and their effects on the host. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 741-749, 2015.

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 119-146, 2009.

PAPP-WALLACE, K. M.; BONOMO, R. A. New  $\beta$ -lactamase inhibitors in the clinic. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 2, p. 441-464, 2016.

PATON, R.; MILES, R. S.; HOOD, J.; AMYES, S. G. B. ARI 1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 2, n. 2, p. 81-87, 1993.

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

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 826-836, 2006.

QURESHI, Z. A., HITTLE, L. E., O'HARA, J. A., RIVERA, J. I., SYED, A., SHIELDS, R. K., PASCULLE, A.W., ERNST, R.K., DOI, Y. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1295-1303, 2015.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8ª edlçã. Rio de Janeiro. Elsevier, 2016.

ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; SANTÉ, M. I.; SANTANA, J. L.; OTERO, D. M.; LEÓN, C. F.; VÁZQUEZ, G. J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1354-1357, 2010.

RODRIGUES, J.L., RODRIGUES, L.R. Potential Applications of the *Escherichia coli* Heat Shock Response in Synthetic Biology. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p.186-198, 2017.

SANTOS, N. D. Q. Bacterial resistance in the context of hospital infection. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 13, n. SPE, p. 64-70, 2004.

SANTOS, E. L.; CORRÊA, J. M.; LOTH, E. A.; GANDRA, R. F.; SIMÃO, R.C. G. **ClpB é induzida em resposta a estresse causado por choque térmico e antibióticos na bactéria patogênica *Acinetobacter baumannii***. I Encontro Anual de Iniciação científica, tecnológica e informação. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHARMA, R.; ARYA, S.; PATIL, S. D.; SHARMA, A.; JAIN, P. K.; NAVANI, N. K.; PATHANIA, R. Identification of novel regulatory small RNAs in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93833, 2014.

SILVEIRA, G. L. L. **Identificação de proteínas com expressão induzida por choque térmico em *Herbaspirillum seropedicae***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SIMÃO, R. C.; SUSIN, M. F.; ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; GOMES, S. L. Cells lacking ClpB display a prolonged shutoff phase of the heat shock response in *Caulobacter crescentus*. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 2, p. 592-603, 2005.

SMITH, M.G.; GIANOULIS, T.A.; PUKATZKI, S.; MEKALANOS, J.J.; ORNSTON, L.N.; GERSTEINS, M.; SNYDER, M. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. **Genes & development**, v. 21, n. 5, p. 601-614, 2007.

SMITH, S. G.; MAHON, V.; LAMBERT, M. A.; FAGAN, R. P.. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. **FEMS microbiology letters**, v. 273, n. 1, p. 1-11, 2007.

SCHUMANN, W. Regulation of bacterial heat shock stimulons. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 6, p. 959-968, 2016.

TRAVERS, A. A.; BURGESS, R. R. Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. **Nature**, v. 222, n. 5193, p. 537-540, 1969.

TEIXEIRA, A. B. **Avaliação de método de identificação molecular e distribuição das espécies do complexo Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii em dois hospitais de Porto Alegre**. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, 2013.

TIWARI, V., VASHISTT, J., KAPIL, A., MOGANTY, R. R. Comparative proteomics of inner membrane fraction from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with a reference strain. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39451, 2012.

VIEIRA, P. B.; PICOLI, S. U. *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 151-156, 2016.

VON HIPPEL, P. H.; BEAR, D. G.; MORGAN, W. D.; MCSWIGGEN, J. A. Protein-nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. **Annual review of biochemistry**, v. 53, n. 1, p. 389-446, 1984.

VOTH, W.; JAKOB, U. Stress-Activated Chaperones: A First Line of Defense. **Trends in Biochemical Sciences**, 2017.

VRANAKIS, I., GONIOTAKIS, I., PSAROULAKI, A., SANDALAKIS, V., TSELENTIS, Y., GEVAERT, K., TSIOTIS, G. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. **Journal of proteomics**, 97, p. 88-99, 2014

WILLIAMS, J. D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. **International journal of antimicrobial agents**, v. 12, p. S3-S7, 1999.

WONG, P.; HOURY, W. A. Chaperone networks in bacteria: analysis of protein homeostasis in minimal cells. **Journal of structural biology**, v. 146, n. 1, p. 79-89, 2004.

YAMAGUCHI, Y.; TOMOYASU, T.; TAKAYA, A.; MORIOKA, M.; YAMAMOTO, T. Effects of disruption of heat shock genes on susceptibility of *Escherichia coli* to fluoroquinolones. **BMC microbiology**, v. 3, n. 1, p. 16, 2003.

YURA, T.; NAGAI, H.; MORI, H. Regulation of the heat-shock response in bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 321-350, 1993.

ZARRILLI, R.; POURNARAS, S.; GIANNOULI, M.; TSAKRIS, A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **International journal of antimicrobial agents**, v. 41, n. 1, p. 11-19, 2013.