

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LUÍS GUSTAVO LARANJEIRO ALVES

**Vias de sinalização e de regulação das beta-lactamases de
*Chromobacterium violaceum***

Ribeirão Preto - SP, Brasil
2023

LUÍS GUSTAVO LARANJEIRO ALVES

**Vias de sinalização e de regulação das beta-lactamases de
*Chromobacterium violaceum***

Versão original

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Ribeirão Preto - SP
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Luís Gustavo Laranjeiro

Vias de sinalização e de regulação das beta-lactamases de *Chromobacterium violaceum*. Ribeirão Preto, 2023.

p.: 127; il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: da Silva Neto, José Freire.

1. *Chromobacterium violaceum*. 2. Antibióticos beta-lactâmicos. 3. Enzimas beta-lactamases. 4. Resistência a antibióticos. 5. Fatores de transcrição. 6. Vias de sinalização.

Nome: ALVES, Luís Gustavo Laranjeiro

Título: Vias de sinalização e de regulação das beta-lactamases de *Chromobacterium violaceum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Avaliado em: __ / __ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



DECLARAÇÃO

O Projeto de Pesquisa intitulado “*Vias de sinalização e de regulação das beta-lactamases de Chromobacterium violaceum*”, sob a responsabilidade do Professor José Freire da Silva Neto e do aluno Luís Gustavo Laranjeiro Alves, tem por objetivo desvendar as vias de sinalização e potenciais fatores de transcrição envolvidos na expressão induzível das beta-lactamases AmpC e CphA de *Chromobacterium violaceum*, buscando isolar mutantes com expressão constitutivamente elevada destas enzimas.

Por não satisfazer à condição de estudo experimental envolvendo animais pertencentes ao *filo Chordata* e *subfilo Vertebrado*, conforme diretriz do CONCEA - Lei nº 11.794 de 08/10/2008, declaramos que NÃO COMPETE à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP emitir parecer acerca dos aspectos éticos relacionados a projetos de pesquisa dessa natureza.

Ribeirão Preto, 26 de agosto de 2022

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes
Coordenador da CEUA-FMRP-USP

Dedico este trabalho a você, familiar ou amigo, que contribuiu muito em minha caminhada. Principalmente minha mãe que mesmo nos momentos mais difíceis de sua vida sempre esteve ao meu lado me apoiando. Sem você eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Freire da Silva Neto, por me acolher em seu laboratório e a confiança ao aceitar me orientar no mestrado, pela grande oportunidade de aprendizado, ensinamentos e compreensão durante este período.

À minha supervisora de BEPE Dr^a. Isabel da Silva Henriques que me aceitou prontamente para um período de intercâmbio em seu laboratório a fim de compartilharmos técnicas e conhecimentos que permitiram a melhoria significativa deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório Maristela P. Mello, Bianca B. Batista, Juliano Novak, Maria Fernanda C. Pereira, Vinícius M. de Lima, Júlia A. Alves, Kelly C. M. Barroso, Raquel S. Freire, Renato E. R. S. Santos, Juliana H. Batista, Sérgio P. L. Neto, Graziela Garcia e Carol S. Panosso, pela convivência diária, celebrações e todos os momentos compartilhados, além da grande troca de conhecimentos e ensinamentos. Em especial a Dr^a. Maristela P. Mello por auxiliar na orientação e por colaborar neste trabalho, aos aprendizados trocados e disposição no dia a dia na bancada que foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

À técnica do laboratório, Cláudia R. M. Faggion, e aos estudantes de apoio técnico, Lorrany T. de França, Leonardo Ladário e Maria E. Lessa, por todo suporte técnico e companhia nesses anos.

Aos professores Dr. Dario S. Zamboni, Dr^a. Maria Cristina R. A. Barreira, Dr. Paulo S. R. Coelho e Dr^a. Angela K. Cruz por disponibilizarem seus espaços físicos ou equipamentos e reagentes.

Às professoras Dr^a. Eliana G. Stehling, Dr^a. Ilana L. B. C. Camargo e Dr^a. Maria E. Guazzaroni por participarem da minha banca de qualificação e auxiliarem com sugestões que garantiram a melhoria do presente trabalho.

À técnica Sandra M. Oliveira Thomaz por todo carinho e amizade durante toda esta jornada, além de sempre permitir o uso de equipamentos e reagentes do laboratório que é responsável.

Pela ajuda prestada pelo serviço de esterilização, representado pelas técnicas Maria Helena da S. Martins e Joana S. de Souza.

Às secretárias Gabriela B. Zamoner, Lúcia H. P. Raphael e Camila Fabris pela competência, atenção e suporte em todos os processos necessários.

Aos familiares e amigos Andressa Cruz, Guilherme Coimbra, Relber Gonçalves, Luiz Falconi, Mariana Dares, Anna Chacur e tantos outros que sempre torceram por mim, por estarem ao meu lado em todos os momentos e tornarem meus dias mais alegres. E em especial aos meus pais, Regiane e Luís Cláudio, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e me incentivarem durante todos esses anos. E principalmente a minha mãe, grande mulher e lutadora, que mesmo nos momentos mais difíceis e de grande sofrimento, conseguiu manter a graça e a vontade de viver inabalável diante aos desafios diários, um exemplo de vida e superação.

Aos amigos de departamento Patrícia Kellen, Gabriela Yamazaki, Nayla Pitangui e Matheus Gonçalves e de BEPE Isabel Silva, Inês Alçada, Inês Costa e Catarina Coelho pela torcida e amizade.

AGRADECIMENTOS PELO APOIO FINANCEIRO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro ao longo da realização desta pesquisa e a concessão da bolsa de mestrado (Processo 2021/01911-3) e BEPE (Processo 2022/07135-8).

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela infraestrutura para a realização de minha pesquisa.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (FAEPA) pelo auxílio financeiro destinado ao Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio institucional ao Programa de Pós-Graduação e ao Departamento.

“Nada é permanente, exceto a mudança.”
Heráclito

RESUMO

Alves, Luís Gustavo Laranjeiro. **Vias de sinalização e de regulação das beta-lactamases de *Chromobacterium violaceum***. 2023. 127 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Um dos maiores problemas de saúde pública é o aumento da resistência a antibióticos em bactérias patogênicas. Em todo o mundo, há uma alta prevalência de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos mediada por enzimas beta-lactamases. Por produzir duas beta-lactamases cromossômicas, AmpC e CphA, a bactéria oportunista ambiental *Chromobacterium violaceum* é intrinsecamente resistente a vários antibióticos beta-lactâmicos. No entanto, pouco se sabe sobre as vias de sinalização e regulação destas enzimas nesta bactéria. Neste estudo, isolamos mutantes espontâneos resistentes ao antibiótico ceftazidima para elucidar como essas beta-lactamases são reguladas. Por antibiograma, confirmamos a resistência a vários outros beta-lactâmicos em 13 destes mutantes espontâneos. Em 12 deles, ocorreu a hiperexpressão dos genes *ampC* e *cphA*, conforme verificado por ensaios de beta-galactosidase. O sequenciamento de DNA dos três genes parálogos da amidase AmpD de *C. violaceum*, uma enzima envolvida na reciclagem do peptidoglicano, revelou mutações de diferentes tipos em AmpD1 (CV_0566) na maioria dos mutantes espontâneos, mas não em AmpD2 ou AmpD3. Mutantes nulos simples e combinados dos genes das três amidases foram obtidos. A hiperexpressão de ambas as beta-lactamases e a aumentada resistência aos beta-lactâmicos foram verificadas apenas nos mutantes com deleção de *ampD1*. Quando introduzido nos mutantes nulos ou espontâneos de *ampD1*, o gene *ampD1* reverteu os fenótipos destes mutantes. A amidase AmpD1 de *C. violaceum* possui arquitetura única entre as amidases bacterianas com presença de um domínio N-terminal de acetiltransferase. Três mutantes espontâneos foram escolhidos para sequenciamento completo do genoma (WGS). Os resultados revelaram mutações nos genes CV_1820 (RNAse E), CV_2060 (RseB, regulador negativo de sigma E) e CV_3538 (IspG, enzima de síntese de isoprenóides), sugerindo novas vias potencialmente envolvidas na resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. A mutação identificada por WGS na região intergênica do fator de transcrição CV_1922, na verdade, revelou-se um artefato decorrente da excisão do gene CV_1923, uma das cinco cópias de transposases encontradas em

C. violaceum. Como alternativa, um ensaio de *pull-down* de afinidade ao DNA permitiu isolar diferentes proteínas que podem ser candidatos a reguladores transcricionais de ambas beta-lactamases. Em conclusão, nossos dados indicam que a ocorrência de mutações no gene da amidase AmpD1 é um mecanismo comum que leva a hiperexpressão das beta-lactamases AmpC e CphA e a alta resistência de *C. violaceum* a vários antibióticos beta-lactâmicos.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*. Antibióticos beta-lactâmicos. Enzimas beta-lactamases. Resistência a antibióticos. Fatores de transcrição. Vias de sinalização.

ABSTRACT

Alves, Luís Gustavo Laranjeiro. **Signaling and regulatory pathways of beta-lactamases in *Chromobacterium violaceum***. 2023. 127 p. Dissertation (Master in Cellular and Molecular Biology), Ribeirão Preto Medical School, **University** of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

One of the biggest public health problems is the increase in antibiotic resistance in pathogenic bacteria. Worldwide, there is a high prevalence of resistance to beta-lactam antibiotics mediated by beta-lactamases enzymes. By producing two chromosomal beta-lactamases, AmpC and CphA, the environmental opportunistic bacterium *Chromobacterium violaceum* is intrinsically resistant to several beta-lactam antibiotics. However, little is known about the signaling and regulation pathways of these enzymes in this bacterium. In this study, we isolated spontaneous mutants resistant to the antibiotic ceftazidime to elucidate how these beta-lactamases are regulated. By antibiogram, we confirmed resistance to several other beta-lactams in 13 of these spontaneous mutants. In 12 of them, there was overexpression of the *ampC* and *cphA* genes, as verified by beta-galactosidase assays. DNA sequencing of the three paralogous genes of the *C. violaceum* AmpD amidase, an enzyme involved in peptidoglycan recycling, revealed mutations of different types in AmpD1 (CV_0566) in most spontaneous mutants, but not in AmpD2 or AmpD3. Single and combined null mutants of the three-amidase genes were obtained. Overexpression of both beta-lactamases and increased resistance to beta-lactams were observed only in mutants with *ampD1* deletion. When introduced into *ampD1* null or spontaneous mutants, the *ampD1* gene rescued the phenotypes of these mutants. The AmpD1 amidase from *C. violaceum* has a unique architecture among bacterial amidases with the presence of an N-terminal acetyltransferase domain. Three spontaneous mutants were chosen for whole genome sequencing (WGS). The results revealed mutations in the genes CV_1820 (RNAse E), CV_2060 (RseB, a negative regulator of sigma E) and CV_3538 (IspG, isoprenoid synthesis enzyme), suggesting new pathways potentially involved in resistance to beta-lactam antibiotics. The mutation identified by WGS in the intergenic region of the CV_1922 transcription factor actually turned out to be an artifact resulting from the excision of the CV_1923 gene, one of the five copies of transposases found in *C. violaceum*. Alternatively, a DNA affinity pull-down assay allowed us to isolate different proteins that could be candidates for transcriptional regulators of both beta-

lactamases. In conclusion, our data indicate that the occurrence of mutations in the AmpD1 amidase is a common mechanism that leads to the overexpression of the beta-lactamases AmpC and CphA and the high resistance of *C. violaceum* to several beta-lactam antibiotics.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*. Beta-lactam antibiotics. Beta-lactamase enzymes. Antibiotic resistance. Transcription factors. Signaling pathways.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos e alvos de ação dos antibióticos	25
Figura 2. Estrutura química do núcleo funcional das principais famílias de beta-lactâmicos	26
Figura 3. Síntese de lipídio II, o precursor do PGN	29
Figura 4. Etapas de polimerização e reticulação do PGN	30
Figura 5. Interação dos beta-lactâmicos com PBPs	31
Figura 6. Mecanismos de resistência a antibióticos beta-lactâmicos	35
Figura 7. Regulação de beta-lactamases por AmpR	38
Figura 8. Regulação de beta-lactamases pelo sistema de dois componentes BlrAB	39
Figura 9. <i>Chromobacterium violaceum</i>	41
Figura 10. Representação do teste de antagonismo	50
Figura 11. Representação do Teste de Hodge Modificado	51
Figura 12. Esquema para obtenção de mutantes nulos	58
Figura 13. Esquema para obtenção de mutantes de inserção	59
Figura 14. Teste de interação entre antibióticos indutores fracos ou fortes de beta-lactamases	70
Figura 15. Perfil de resistência de SMs a beta-lactâmicos	73
Figura 16. Mutantes espontâneos têm aptidão semelhante a linhagem selvagem .	74
Figura 17. Ensaio de atividade de beta-galactosidase dos promotores de <i>ampC</i> e <i>cphA</i>	76
Figura 18. Organização genômica, arquitetura e alinhamento das amidases de <i>C. violaceum</i>	77
Figura 19. Alinhamento de AmpD e mutações encontradas em AmpD1 de <i>C. violaceum</i>	79
Figura 20. Confirmação das linhagens mutantes nulo dos genes <i>ampD</i>	81
Figura 21. Efeito da deleção de <i>ampDs</i> no crescimento e sobrevivência celular .	82
Figura 22. Efeito da deleção de <i>ampDs</i> em biofilme, produção de violaceína e motilidade	83
Figura 23. Ensaio de disco-difusão dos mutantes nulos das amidases	85
Figura 24. Ensaio de disco-difusão dos mutantes complementados com <i>ampD1</i> ..	86

Figura 25. Produção de metalo-carbapenemase ativa em linhagens com mutação em <i>ampD1</i>	88
Figura 26. A deleção de <i>ampD1</i> eleva a expressão das beta-lactamases em <i>C. violaceum</i>	89
Figura 27. Sequenciamento completo do genoma (WGS) de isolados SM	91
Figura 28. O gene CV_1922 (GntR) não mostrou papel na resistência aos beta-lactâmicos	93
Figura 29. Purificação e EMSA de CV_1922 (GntR)	94
Figura 30. Verificação de transposases	95
Figura 31. O gene <i>rpoE</i> tem expressão aumentada no mutante SM2	97
Figura 32. Avaliação da aptidão e da expressão de beta-lactamases em novos mutantes espontâneos	99
Figura 33. Análise das proteínas eluídas no <i>pull-down</i> com DNA do promotor de <i>ampC</i> e <i>cphA</i>	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens utilizadas neste estudo	44
Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste estudo	45
Tabela 3. Descrição das concentrações de antibióticos usadas no cultivo geral ...	47
Tabela 4. Discos impregnados com antibióticos beta-lactâmicos utilizados no antibiograma	49
Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	54
Tabela 6. CIM de CAZ para a linhagem selvagem e mutantes espontâneos de <i>C. violaceum</i>	72
Tabela 7. Mutações encontradas no gene CV_0566 (<i>ampD1</i>) das linhagens SM ..	78
Tabela 8. Determinação de CIM da linhagem selvagem, mutantes e complementadas	87
Tabela 9. Mutações encontradas nos isolados SM em comparação com linhagem selvagem	91
Tabela 10. Valores de CIM para CAZ de novos mutantes espontâneos	98
Tabela Suplementar 1. Perfil de resistência dos mutantes espontâneos determinado por ensaio de disco-difusão	125
Tabela Suplementar 2. Perfil de resistência dos mutantes nulos das amidases por ensaio de disco-difusão	125
Tabela Suplementar 3. Ensaio de disco-difusão de linhagens complementados com <i>ampD1</i>	125
Tabela Suplementar 4. Mutações encontradas na linhagem selvagem em comparação com o genoma de referência	126
Tabela Suplementar 5. Perfil de resistência do mutante de inserção em CV_1922 determinado por ensaio de disco-difusão	127
Tabela Suplementar 6. Perfil de resistência dos novos mutantes espontâneos por ensaio de difusão em disco	127

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-APA	ácido 6-aminopenicilânico
AmpC	beta-lactamase de amplo espectro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	albumina de soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CAMHB	Caldo Mueller Hinton cátion ajustado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CphA	metalo-beta-lactamase tipo 2
dH ₂ O	água destilada
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO _{600 nm}	densidade óptica de 600 nanômetros
DO _{575 nm}	densidade óptica de 575 nanômetros
DO _{420 nm}	densidade óptica de 420 nanômetros
FW	primer forward
gDNA	DNA genômico
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani (meio de cultura)
LPS	lipopolissacarídeo
MCS	<i>Multiple Cloning Sites</i>
MH	Mueller Hinton (meio de cultura)
mRNA	RNA mensageiro
ON	<i>overnight</i> (durante a noite)
ONPG	<i>ortho-Nitrophenyl-β-galactoside</i>
PBS	tampão fosfato-salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pfam	<i>Protein Families Database</i>
PGN	peptideoglicano
qPCR	PCR em tempo real
RNA	ácido ribonucleico
RPM	rotações por minuto

RT-qPCR	PCR em tempo real com transcrição reversa
RV	primer reverse
SDS	dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
S.E.	solução estoque
S.T.	solução de trabalho
TBE	tampão Tris-borate-EDTA
UFC	unidade formadora de colônia
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> (Sequenciamento Completo do Genoma)
WT	<i>wild type</i> (tipo selvagem)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
Ω	ohm
Δ	mutante nulo (delta)
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
$\text{ng}/\mu\text{L}$	nanograma por microlitro
μF	microfarad
μM	micromolar
μL	microlitro
μg	micrograma
$\mu\text{g}/\text{mL}$	micrograma por mililitro
μm	micrômetro
mA	miliampere
mg	miligrama
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mM	milimolar
M	molar
L	litro
pb	pares de bases
Kb	quilobase
kDa	quilodalton
V	volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Um panorama geral sobre antibióticos	23
1.1.1 Antibióticos beta-lactâmicos.....	25
1.2 Peptidoglicano e inibição de sua síntese por beta-lactâmicos	27
1.3 Resistência a antibióticos, um problema de saúde pública global	32
1.3.1 Mecanismos de resistência a beta-lactâmicos	34
1.4 Regulação de genes de beta-lactamases	36
1.5 <i>Chromobacterium violaceum</i>	40
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Linhagens e plasmídeos	44
3.2 Meios de cultura e condições de cultivo	46
3.3 Ensaio de prospecção de mutantes espontâneos	47
3.4 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	48
3.4.1 Método de diluição em ágar	48
3.4.2 Ensaio de disco-difusão	49
3.4.3 Teste de antagonismo.....	50
3.4.4 Teste de Hodge Modificado	51
3.4.5 Teste de sinergia com disco de EDTA	51
3.4.6 Método de inativação de carbapenêmico modificado (mCIM) e método de inativação EDTA-carbapenêmico (eCIM)	52
3.5 Técnicas de clonagem e biologia molecular	52
3.5.1 Reações de PCR e eletroforese em gel de agarose	52
3.5.2 Clonagem	56
3.5.3 Obtenção de mutantes nulos por dupla recombinação homóloga	57
3.5.4 Obtenção de mutantes de inserção por recombinação homóloga simples	58
3.5.5 Sequenciamento de DNA.....	59
3.5.6 Extração de DNA total e sequenciamento completo do genoma (WGS)	60
3.6 Análise da expressão gênica diferencial	60
3.6.1 Ensaio de atividade de beta-galactosidase	61
3.6.2 Extração de RNA total.....	61
3.6.3 RT-qPCR	62
3.7 Análises fenotípicas	63
3.7.1 Ensaio de curva de crescimento	63

3.7.2 Ensaio de viabilidade	63
3.7.3 Ensaio de biofilme.....	64
3.7.4 Ensaio de violaceína	64
3.7.5 Ensaio de motilidade (<i>swimming</i>).....	64
3.8 Ensaio de ligação de fator de transcrição ao DNA	65
3.8.1 Purificação de proteínas	65
3.8.2 Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA).....	66
3.9 Ensaio de <i>pull-down</i> de afinidade ao DNA	67
4 RESULTADOS	69
4.1 Isolamento de mutantes espontâneos resistentes a beta-lactâmicos devido a expressão elevada de beta-lactamases	69
4.1.1 Os mutantes espontâneos isolados em CAZ são resistentes a vários antibióticos beta-lactâmicos sem perda de aptidão	71
4.1.2 A maioria dos mutantes espontâneos hiperexpressam as beta-lactamases <i>ampC</i> e <i>cphA</i>	75
4.2 A maioria dos mutantes espontâneos tem mutação em <i>ampD1</i>.....	76
4.3 Análise de mutantes nulos dos genes das três amidases parálogas revela o papel preponderante de AmpD1	80
4.3.1 Ausência de AmpD1 impacta sobrevivência e ausência das três AmpDs afeta crescimento	80
4.3.2 Ausência de AmpD1 ou das três AmpDs afeta biofilme, violaceína e motilidade..	82
4.3.3 Mutação em <i>ampD1</i> , mas não em <i>ampD2</i> ou <i>ampD3</i> , aumenta resistência a beta-lactâmicos.....	84
4.3.4 Mutação em <i>ampD1</i> , mas não em <i>ampD2</i> ou <i>ampD3</i> , leva a hiperexpressão das beta-lactamases <i>ampC</i> e <i>cphA</i>	88
4.4 Sequenciamento do genoma completo de mutantes espontâneos selecionados	90
4.4.1 Variantes com mutação na região intergênica do regulador CV_1922 são um artefato decorrente da ausência da transposase CV_1923.....	92
4.4.2 O mutante SM2 tem expressão aumentada de sigma E	96
4.5 Novos mutantes espontâneos e mais questionamentos quanto a resistência a beta-lactâmicos em <i>C. violaceum</i>	97
4.6 Proteínas com potencial ligação aos promotores de <i>ampC</i> e <i>cphA</i> capturadas por ensaio de <i>pull-down</i>	100
5 DISCUSSÃO	102
6 CONCLUSÃO.....	110
REFERÊNCIAS	111
APÊNDICE	125

1 INTRODUÇÃO

1.1 Um panorama geral sobre antibióticos

O uso de antibióticos foi um marco na medicina moderna, permitindo uma vida mais longa e saudável. Desde a descoberta e o início de sua utilização, enfermidades que antes assombravam a humanidade puderam ser tratadas e curadas com apenas algumas doses desses fármacos, o que mostra o quanto eles contribuíram para o controle de inúmeras doenças infecciosas bacterianas. Antes disso, diferentes produtos naturais eram utilizados empiricamente no tratamento de uma gama de infecções. Estes antigos ensinamentos etnobiológicos podem ser encontrados em manuscritos, como o papiro de Eber, datado de 1550 a.C., considerado o documento médico mais antigo preservado atualmente, o qual recomenda o uso de cataplasmas com pão mofado e solo como tratamento (PAGÁN, 2011; HUTCHINGS *et al.*, 2019).

Uma descoberta seminal na história dos antibióticos foi feita por Alexander Fleming em 1928. Ele notou que em uma de suas placas de cultura houve o crescimento fortuito de um fungo *Penicillium sp.*, o qual liberava no meio uma substância que inibia o crescimento das colônias de *Staphylococcus aureus* ao seu redor. Fleming demonstrou que o filtrado desta cultura de fungo, o qual ele chamou de penicilina, tinha ação inibitória contra várias outras bactérias e propôs seu uso no tratamento de infecções bacterianas (FLEMING, 1929). A partir dos trabalhos de Howard Florey e Ernst Chain foi possível produzir a penicilina em escala industrial de forma mais otimizada e isolá-la para uso terapêutico, garantindo o Prêmio Nobel de Medicina em 1945 aos três pesquisadores. Este acontecimento consolidou o início da era dos antibióticos (AMINOV, 2010; BLAIR *et al.*, 2015; BUSH & BRADFORD, 2016).

Diversos micro-organismos produzem compostos bioativos de grande interesse industrial, biotecnológico, médico e farmacológico, o que demonstra o quão importante se faz, em nossa sociedade, o estudo destes produtos naturais. Grande parte dos antibióticos usados atualmente foram descobertos na "era de ouro" dos antibióticos (entre 1940 e 1960), sendo muitos identificados e isolados de fungos e actinobactérias. Estes micro-organismos se destacam pela grande variedade produzida de antibióticos, os quais funcionam, em um contexto ecológico, como agentes de competição intermicrobiana (DAVIES & DAVIES, 2010; AMINOV, 2010; LEWIS, 2013).

Antimicrobianos, incluindo os antibióticos, são substâncias naturais, semissintéticas e sintéticas que agem sobre micro-organismos inibindo o seu crescimento (microbiostático), ou causando a sua destruição (microbicida). Os antibióticos podem ser classificados com base em três características principais: quanto ao seu espectro de atividade (estreito ou amplo), mecanismo de ação (bacteriostático ou bactericida) e classe química (estrutura da molécula). Um espectro estreito é considerado quando a substância tem ação em um grupo pequeno de bactérias, como é o caso da penicilina G, das sulfonamidas e da eritromicina. Já os antibióticos de espectro amplo são aqueles que agem em diversos tipos de bactérias, como as tetraciclínas e o cloranfenicol (BRUNTON *et al.* 2012; RANG & DALE, 2016).

Os mecanismos de ação dos antibióticos são bem diversificados, envolvendo a inibição seletiva de processos essenciais por ação em alvos específicos da célula bacteriana (BRUNTON *et al.* 2012; RANG & DALE, 2016) (Figura 1). A inibição da formação da parede celular por ação principalmente dos beta-lactâmicos, mas também por glicopeptídeos, como a vancomicina, é um dos mecanismos mais efetivos. Sem a parede celular que oferece estabilidade osmótica, a célula bacteriana sofre lise. A inibição da síntese de proteínas (tradução) é realizada por cloranfenicol, aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclínas, muitos dos quais são antibióticos bacteriostáticos. Esses antibióticos inibem a tradução por ligarem à subunidade 30S do ribossomo, como os aminoglicosídeos e as tetraciclínas, ou por ligarem à subunidade 50S, como os macrolídeos, as estreptograminas, as oxazolidinonas e o cloranfenicol (Figura 1). Há também mecanismos de inibição da replicação do DNA, realizada por quinolonas e fluoroquinolonas e inibição da transcrição do DNA em RNA, por ação das rifamicinas. A injúria da membrana plasmática é outra forma de ação dos antibióticos, que é realizada pela polimixina B e colistina, ambos polipeptídeos. Temos ainda a inibição da síntese de metabólitos essenciais, como o ácido fólico, que é realizada pelas sulfonamidas e trimetoprima (Figura 1) (MORAR & WRIGHT, 2010; BRUNTON *et al.*, 2012; LEWIS, 2013; RANG & DALE, 2016).

O uso de antibióticos combinados pode ser feito em diferentes contextos. Por exemplo, para obter um efeito sinérgico pode-se utilizar trimetoprima e sulfametoxazol que agem em enzimas diferentes na mesma via metabólica, ou o uso da amoxicilina com ácido clavulânico que inibem, respectivamente, a síntese da parede celular e beta-lactamases. Os antibióticos também podem ser combinados para reduzir a gravidade ou incidência dos efeitos adversos do uso desses medicamentos, prevenir

o desenvolvimento de resistência ou ampliar o espectro de ação como ocorre no tratamento de infecções mistas e no tratamento inicial das infecções graves (COURVALIN *et al.*, 2010; HUTCHINGS *et al.*, 2019).

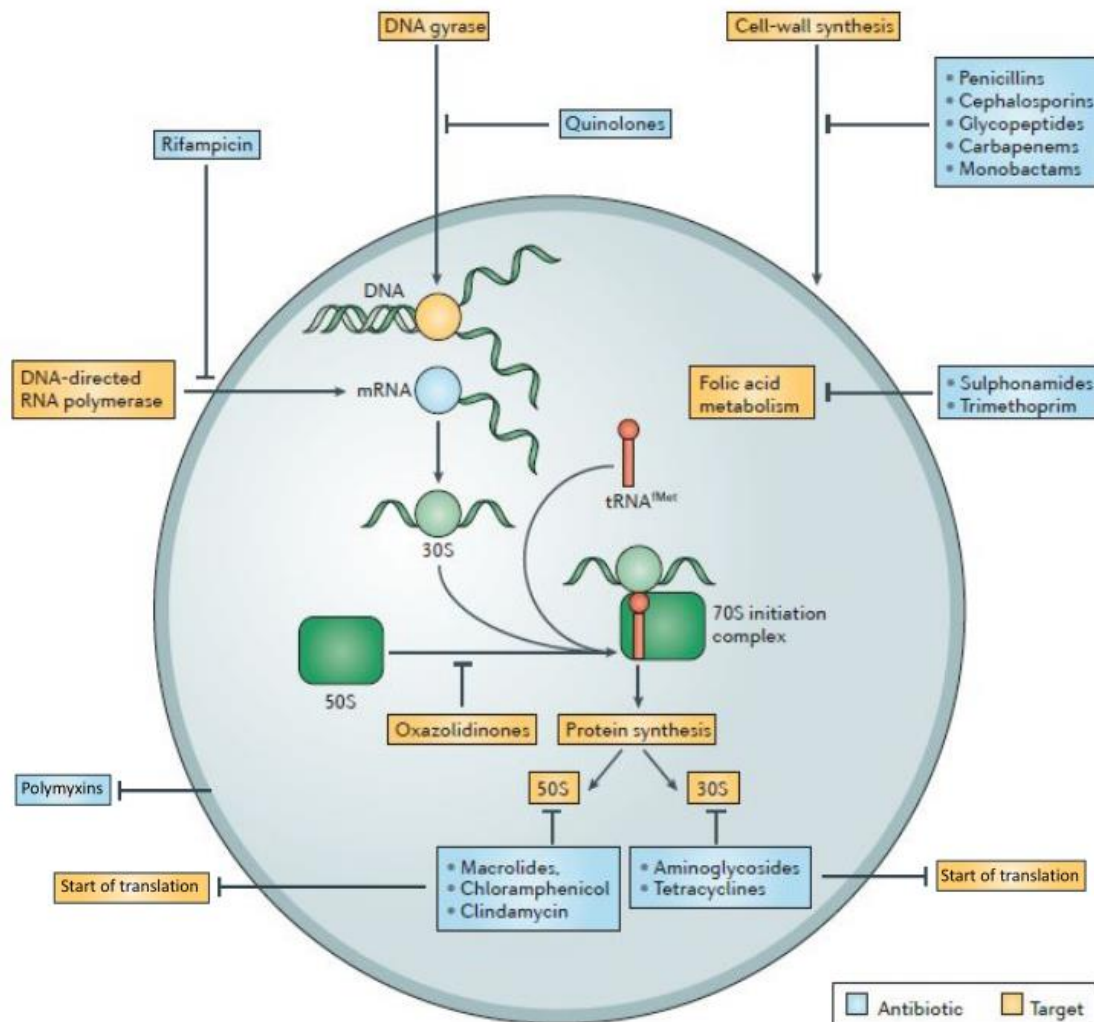


Figura 1. Mecanismos e alvos de ação dos antibióticos. As principais classes de antibióticos e seus alvos de ação estão indicados. Os antibióticos atuam inibindo processos essenciais na célula bacteriana, como: síntese da parede celular, replicação do DNA, transcrição do RNA, tradução das proteínas, integridade da membrana plasmática e síntese de metabólitos essenciais. Fonte: adaptado de LEWIS, 2013.

1.1.1 Antibióticos beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos representam a classe de antibióticos mais numerosa e utilizada na atualidade. Os membros deste grupo possuem em comum no seu núcleo estrutural o anel beta-lactâmico que confere a eles sua atividade bactericida. Ainda em sua estrutura, é notável a presença de diferentes cadeias laterais, as quais definem suas propriedades farmacológicas e seu espectro de ação (Figura 2). Com

base em sua estrutura química, os beta-lactâmicos são classificados como penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (Figura 2A), sendo os mecanismos de ação comuns a todos, mas cada grupo com algumas particularidades específicas (LUENGO, 1999; ANVISA, 2007; BUSH & BRADFORD, 2016; RANG & DALE, 2016; BUSH, 2018; LIMA *et al.*, 2020).

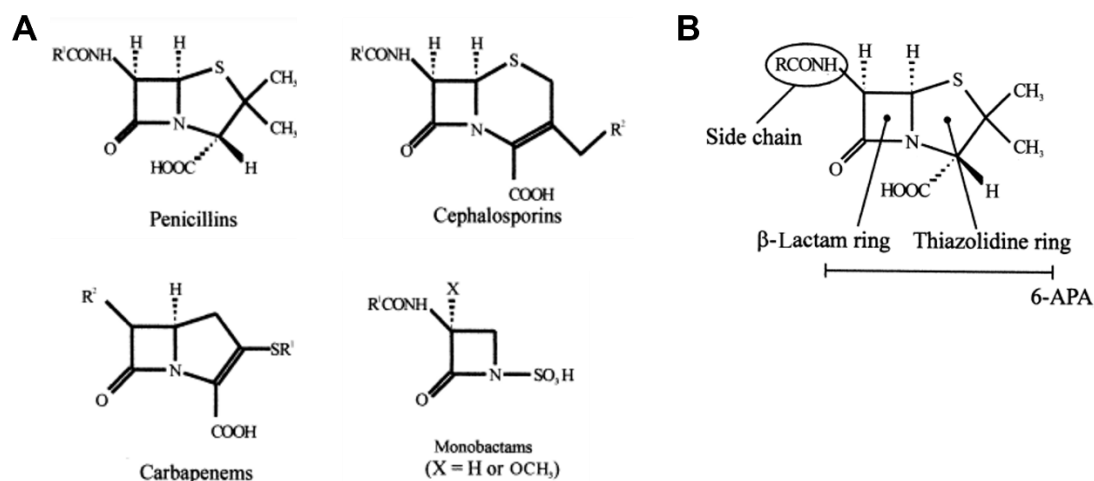


Figura 2. Estrutura química do núcleo funcional das principais famílias de beta-lactâmicos. O anel beta-lactâmico confere atividade microbicida ao antibiótico e as singularidades de cada fármaco resultam de sua cadeia lateral. **(A)** As principais subfamílias de beta-lactâmicos são penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. **(B)** Estrutura do intermediário biossintético das penicilinas, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Fonte: adaptado de LUENGO, 1999.

A benzilpenicilina (penicilina G) foi a primeira representante do grupo dos beta-lactâmicos e com seu estudo foi possível isolar seu intermediário biossintético, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), composto químico este que forma o núcleo fundamental das moléculas do grupo das penicilinas (Figura 2B) (LUENGO, 1999). Esta descoberta permitiu o desenvolvimento das penicilinas semissintéticas por modificação de cadeias laterais e preservação do núcleo formador 6-APA. Com isto, foi possível obter derivados isentos das dificuldades que limitavam o uso clínico inicial da penicilina G, isto é, o aprimoramento das vias de administração, espectro e tempo de ação em relação às penicilinas naturais, além de uma melhora na estabilidade da substância (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988; PUTAROV, 2011). Por exemplo, a amoxicilina, um antibiótico semissintético, teve adição de oxigênio na cadeia lateral a fim de evitar sua inativação no estômago. Com o passar do tempo, essa descoberta também foi projetada nas outras classes de beta-lactâmicos, levando ao desenvolvimento de novas gerações de beta-lactâmicos (ZANINI *et al.*, 1994; CHOPRA *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2020).

De acordo com o painel de consumo de antimicrobianos produzido pela Rede Europeia de Vigilância do Consumo de Antimicrobianos (ESAC-Net) e o Relatório Epidemiológico Anual de 2021, a média de consumo de antibióticos beta-lactâmicos da União Europeia (UE) e do Espaço Económico Europeu (EEE) juntos, em 2021, equivale a um total de aproximadamente 70 toneladas por ano, uma média de 7,9 doses diárias definidas por 1000 habitantes por dia (DDD/1000 hab/dia) (ECDC, 2023). Apesar de os beta-lactâmicos terem um amplo índice terapêutico e serem considerados seguros mesmo em altas doses, é importante destacar que concentrações supratrapêuticas são frequentemente usadas em ambientes de terapia intensiva e o risco de toxicidade acaba sendo maior, como neurotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade (PAYNE *et al.*, 2017; BOSCHUNG-PASQUIER *et al.*, 2020; MANGALORE *et al.*, 2023). Ainda, por serem hidrofílicos, antibióticos dessa classe são primariamente eliminados pelos rins. Portanto, alterações fisiológicas podem ter efeitos significativos na farmacocinética dos beta-lactâmicos, afetando tanto a resposta ao tratamento quanto o risco do desenvolvimento de resistência no patógeno (PAYNE *et al.*, 2017; SAKR *et al.*, 2018; RUDD *et al.*, 2020; BARRETO *et al.*, 2021; MANGALORE *et al.*, 2023).

1.2 Peptideoglicano e inibição de sua síntese por beta-lactâmicos

As bactérias conseguem suportar a pressão osmótica intracelular em diferentes condições e manter seu formato característico devido a uma estrutura denominada parede celular. O principal componente da parede celular é o peptideoglicano (PGN) ou mureína, um heteropolissacarídeo formado por longas cadeias dos glicanos N-acetilglicosamina (GlcNAc, NAG) e ácido N-acetilmurâmico (MurNAc, NAM) unidos por uma ligação β -1,4-glicosídica, tendo o NAM uma haste de peptídeos ligada a ele. As fitas sacarídicas do PGN estão ligadas covalentemente de modo cruzado entre si através desses peptídeos, garantindo assim uma disposição reticulada, estável e rígida, que sustenta o envelope bacteriano (HÖLTJE, 1998; FISHER & MOBASHERY, 2014; FISHOVITZ *et al.*, 2015; BONOMO, 2017; DIK *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2020). Com base na estrutura do envelope celular as bactérias podem ser classificadas como Gram-positivas (monodérmicas), que apresentam uma membrana celular e espessas multicamadas sobrepostas de PGN; e Gram-negativas (didérmicas), que apresentam uma camada fina de PGN presente dentro de um espaço denominado de periplasma

entre duas membranas celulares, sendo a membrana externa composta por fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS) (DIK *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2020; COCHRANE & LOHANS, 2020). A fita sacarídica do PGN apresenta pouca variação, enquanto as hastes polipeptídicas são mais variáveis em composição e formas de ligação. Em bactérias Gram-negativas predomina o pentapeptídeo L-Ala- γ -D-Glu-meso-diaminopimelato-D-Ala-D-Ala, enquanto em bactérias Gram-positivas, o ácido meso-diaminopimélico (*mDAP*) pode ser substituído por uma lisina (L-Lys) (FISHER & MOBASHERY, 2014; DIK *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2020).

Embora seja uma estrutura que confere rigidez, a parede celular bacteriana é constantemente sintetizada e degradada, um processo complexo e coordenado de remodelamento que envolve inúmeras enzimas atuando em etapas no citoplasma e no periplasma. Durante o processo de degradação, os muropeptídeos (monômeros do PGN) produzidos são reciclados, o que garante à célula uma maior economia de energia e nutrientes. Estima-se que mais de 50% de todo PGN é reciclado. Além da economia gerada, esse remodelamento é uma estratégia que permite alterações no envelope bacteriano, permitindo assim definir locais para o reconhecimento de proteínas, inserção ou excisão de PGN, além de permitir uma resistência à degradação da lisozima, por exemplo (HÖLTJE, 1998; DIK *et al.*, 2018; COCHRANE & LOHANS, 2020).

A síntese do PGN bacteriano é um processo complexo que envolve múltiplas etapas (Figuras 3 e 4). No citosol ocorre a síntese da unidade estrutural de construção do PGN, o lipídio II (difosfato de undecaprenol, C55-P) que contém NAG-NAM-pentapeptídeo (Figura 3). Na primeira etapa, as enzimas MurABCDEF sintetizam UDP-MurNAc-pentapeptídeo (também chamado de nucleotídeo de Park). Após, *MraY* transloca essa estrutura para o lipídio I (fosfato de undecaprenol) e ocorre a perda de UDP (uridina difosfato). A enzima *MurG* atua adicionando GlcNAc ao C-4 de MurNAc, concluindo a estrutura do lipídio II. Por meio da flipase *MurJ* na membrana interna, o lipídio II é transferido ao periplasma para que ocorra a montagem do PGN por enzimas sintases de PGN com atividades de glicosiltransferases (polimerização) e transpeptidase (ligação peptídica) denominadas proteínas de ligação à penicilina (PBP) (Figura 3) (HÖLTJE, 1998; DIK *et al.*, 2018; COCHRANE & LOHANS, 2020).

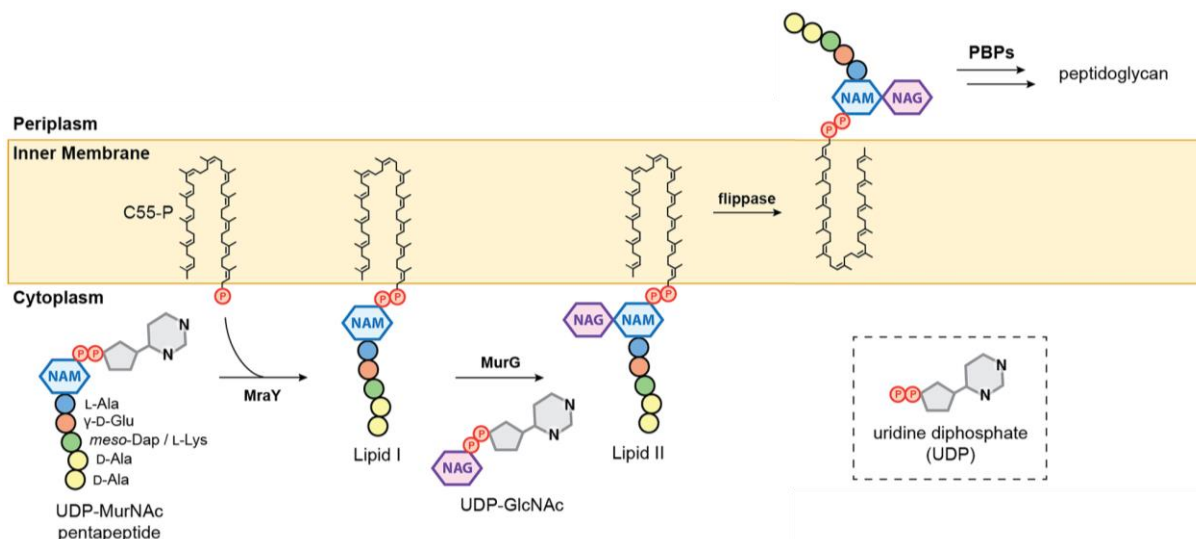


Figura 3. Síntese de lipídeo II, o precursor do PGN. A montagem do lipídeo II começa com a adição do nucleotídeo de Park (UDP-MurNAc-pentapeptídeo) em C55-P (fosfato de undecaprenol) através da atividade de MraY que libera a molécula sinalizadora UDP. Através da adição de GlcNAc por MurG, o lipídeo II está completo e segue para o periplasma através da flippase MurJ para sua incorporação no PGN por PBPs. Fonte: COCHRANE & LOHANS, 2020.

No periplasma, as PBPs com ação de transglicosilase (TG) permitem a ligação do muropeptídeo a fita crescente do PGN com a liberação de pirofosfato de undecaprenol. Isso torna possível a atividade de transpeptidases (TP) que ligam as cadeias peptídicas dessa nova fita de glicanos com outras (ligações 4-3 e 3-3) (Figura 4) (HÖLTJE, 1998; DIK *et al.*, 2018; COCHRANE & LOHANS, 2020). As PBPs são agrupadas como PBPs de alta massa molecular (HMM) e PBPs de baixa massa molecular (LMM) e divididas em 3 classes (A, B e C) com base em organização de domínios a atividade enzimática. As PBPs HMM da classe A são enzimas bifuncionais com domínios de transglicosilase e transpeptidase, como as enzimas PBP1a, PBP1b e PBP1c de *Escherichia coli*. As PBPs HMM da classe B são transpeptidases monofuncionais, que atuam no alongamento e septação do PGN, como PBP2 e PBP3 de *E. coli*. Essas enzimas reconhecem o motivo D-Ala-D-Ala do pentapeptídeo-MurNAc, realizam a liberação da D-Ala terminal (5º aminoácido) e ligam a D-Ala restante na porção amina de mDAP de outra haste, fazendo assim a ligação cruzada 4,3 (Figura 4). As PBPs LMM da classe C são enzimas que atuam mais no remodelamento do que na síntese do PGN. Das sete LMM PBPs de *E. coli*, algumas são D,D-carboxipeptidases (PBP5, PBP6a e PBP6b) que removem a D-Ala terminal dos muropeptídeos, enquanto outras são D,D-endopeptidases (PBP4 e PBP7) que clivam as pontes peptídicas, separando as fitas de glicanos do PGN maduro (Figura 4) (HÖLTJE, 1998; DIK *et al.*, 2018; COCHRANE & LOHANS, 2020).

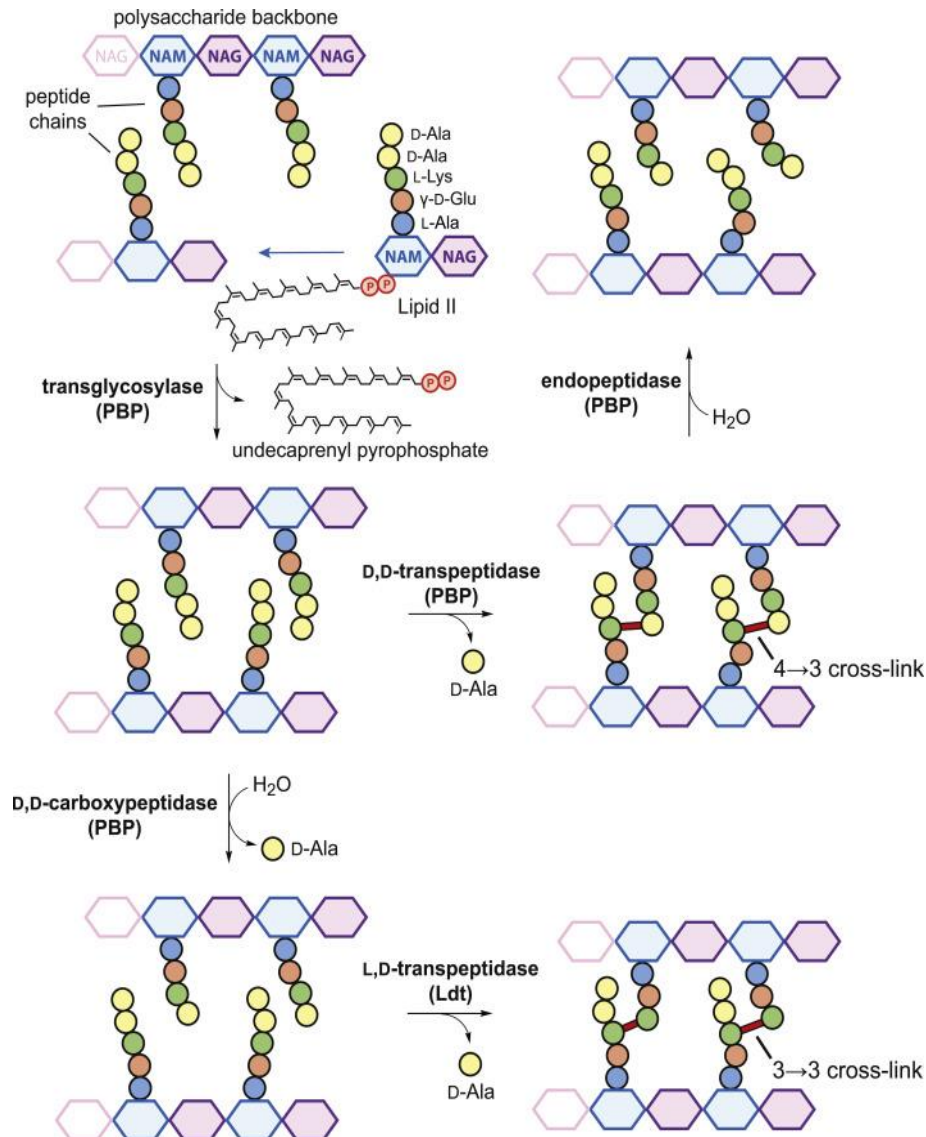


Figura 4. Etapas de polimerização e reticulação do PGN. As PBPs com atividade de transglicosilase incorporam o lipídio II a fita sacarídica crescente com a liberação da parte lipídica. A transpeptidação feita por PBPs conclui a reticulação do PGN por ligações cruzadas do tipo 4,3. Por outro lado, L,D-transpeptidases atuam nas ligações cruzadas 3,3. Endopeptidases atuam desassociando as fitas de glicanos com a clivagem da ligação peptídica. Fonte: COCHRANE & LOHANS, 2020.

Os antibióticos beta-lactâmicos, por outro lado, interferem na síntese do PGN. Conforme descrito anteriormente, a atividade bactericida desses fármacos decorre da presença do anel beta-lactâmico, uma amina cíclica que se assemelha em estrutura a D-Ala-D-Ala do pentapeptídeo, motivo pelo qual eles se ligam a um resíduo de serina do sítio ativo das enzimas PBPs, impedindo-as de realizar suas reações catalíticas no PGN (Figura 5). Em contraste com a acilação que ocorre em D-Ala-D-Ala, onde a formação do complexo enzima-substrato é transitória e ocorre a ligação dos muropeptídeos, a ligação entre um beta-lactâmico e uma PBP é estável, persistindo covalentemente ligadas a esses fármacos em um estado inativado (CARRASCO-

LÓPEZ *et al.*, 2011; BUSH & BRADFORD, 2016; BONOMO, 2017; DIK *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2020). Apesar de décadas de uso, ainda não são totalmente conhecidos os eventos entre a perda da capacidade catalítica de uma PBP essencial e o evento lítico.

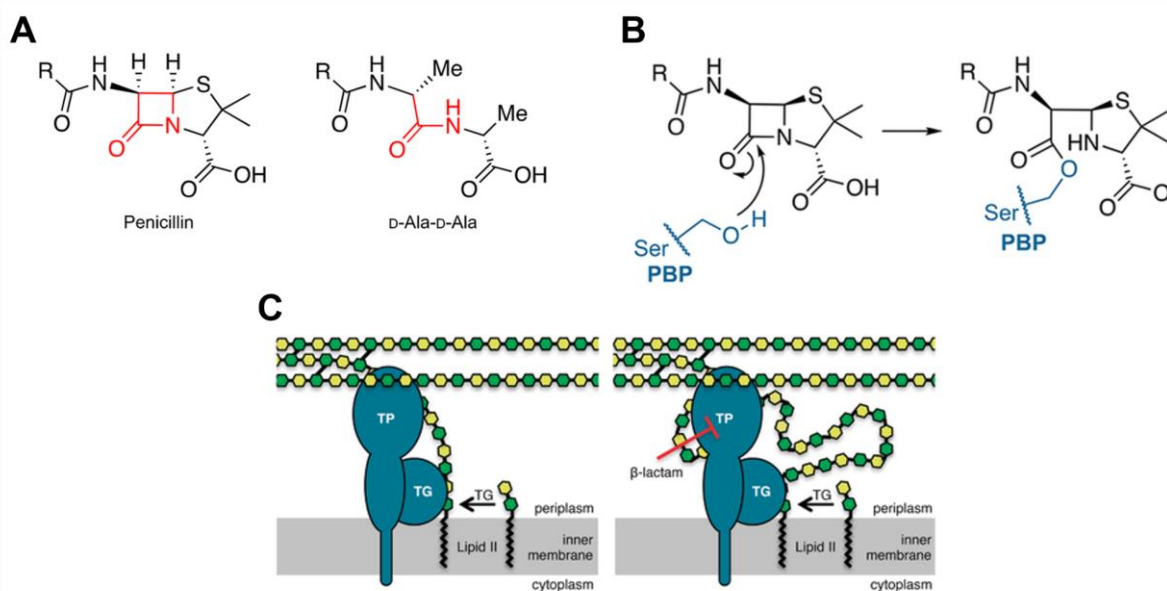


Figura 5. Interação dos beta-lactâmicos com PBPs. (A) A semelhança do anel beta-lactâmico com a ligação D-Ala-D-Ala permite (B) a ligação dos fármacos dessa classe no sítio ativo das PBPs, inativando sua atividade de transpeptidase (TP) e (C) impedindo a síntese da parede celular. Fonte: adaptado de Dik *et al.*, 2018.

A degradação do PGN é realizada por duas classes de enzimas muito importantes. As N-acetilmuramyl-L-alanina amidases zinco-dependentes (EC 3.5.1.28), presentes no periplasma, atuam clivando a ligação entre MurNAc e sua haste de peptídeos, como AmiABCD de *E. coli* e AmpDh2 de *Pseudomonas aeruginosa*. Essa atividade é importante não apenas na degradação, mas também no remodelamento do PGN. Por outro lado, as transglicosilases líticas, como Slt70 e MltG de *E. coli*, atuam clivando a ligação glicosídica entre os monômeros do PGN. Estas enzimas são importantes para a clivagem de longas cadeias de glicanos sem ligação cruzada que se formam na presença de beta-lactâmicos. O resultado dessa atividade é a criação de monômeros GlcNAc-1,6-anhMurNAc-peptídeos livres no periplasma bacteriano (HÖLTJE, 1998; GUÉRIN *et al.*, 2015; DIK *et al.*, 2018; TORRENS *et al.*, 2019; COCHRANE & LOHANS, 2020).

Em muitas bactérias Gram-negativas, esses monômeros são transportados ao citoplasma pela permease AmpG, uma proteína integral de membrana seletiva de GlcNAc-1,6-anhMurNAc (com ou sem a haste de peptídeos). Lá, eles servem de

substrato na via de reciclagem. NagZ é uma glucosaminidase citosólica que hidrolisa a ligação β -1,4-glicosídica entre GlcNAc e MurNAc-peptídeo, separando-os. Uma outra enzima amidase dependente de zinco, AmpD (EC 3.5.1.28), consegue clivar, de forma seletiva, a ligação entre 1,6-anhMurNAc e o grupamento L-peptídeo (PETROSINO *et al.*, 2002; HESEK *et al.*, 2009; CARRASCO-LÓPEZ *et al.*, 2011; PÉREZ-GALLEGO *et al.*, 2016). Dessa forma, os três componentes dos muropeptídeos são isolados e liberados no citosol para que sejam usados por diferentes enzimas que são orquestradas em um elegante processo de reciclagem. Os detalhes de cada etapa da via de reciclagem ainda não são bem compreendidos em todas as bactérias visto a gama de processos envolvidos em cada organismo e, portanto, mais estudos na área são importantes para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

1.3 Resistência a antibióticos, um problema de saúde pública global

A resistência bacteriana aos antibióticos foi descrita tão logo eles começaram a ser utilizados na década de 1940, sendo o processo acelerado após o início do uso de antibióticos na farmacologia clínica (STRACHAN & DAVIES, 2017). Em apenas 70 anos após a introdução dos antibióticos, estamos diante da possibilidade de um futuro sem antibióticos eficazes para diversos tipos de bactérias (ECDC, 2016). A resistência aos antibióticos ocorre quando as bactérias sobrepujam os antimicrobianos projetados contra elas, de forma que a progressão de resistência bacteriana aumenta conforme o número de classes de antibióticos às quais estejam resistentes. Em outras palavras, linhagens resistentes a um antimicrobiano em três ou mais categorias diferentes são denominadas multidroga resistente (MDR); aquelas extensivamente droga resistente (XDR) são resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos; e pan-droga resistente (PDR) são resistentes a quase todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente, ou resistentes a todos os antimicrobianos rotineiramente testados (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Atualmente, são limitadas as opções de antibióticos para o tratamento de infecções bacterianas multirresistentes, o que resulta em altas taxas de morbidade e mortalidade. Linhagens de bactérias resistentes a antibióticos, como os patógenos do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp.),

emergem e se disseminam como consequência da pressão seletiva exercida pelo uso dos antibióticos e pelos mecanismos de troca de material genético entre as bactérias, inclusive a partir de bactérias ambientais, que são consideradas potenciais reservatórios naturais de genes de resistência (POLZ *et al.*, 2013; XUE *et al.*, 2015). Isto torna difícil rastrear as origens de um gene de resistência a antibiótico, mesmo com as tecnologias atuais (ASHTON *et al.*, 2015).

Há uma diversidade de mecanismos de troca de genes de resistência a antibióticos ocorrendo dentro de grupos relacionados ou não de micro-organismos (POLZ *et al.*, 2013). A resistência a antibióticos pode ser intrínseca a uma espécie ou ser uma capacidade adquirida de forma plasmidial em uma transferência natural entre bactérias da mesma ou diferentes espécies ou, ainda, a partir de uma transformação bacteriana. Os genes de resistência quase sempre fazem parte do DNA de plasmídeos, embora também possam constituir o DNA cromossômico bacteriano ou ainda compor unidades móveis conhecidas como transposon e integrons (DAVIES & DAVIES, 2010; COX & WRIGHT, 2013).

Esta situação atual de resistência a antibióticos foi uma consequência das práticas irresponsáveis da utilização de agentes antimicrobianos, com uso na pecuária, prescrição médica equivocada e automedicação. A venda irregular sem receita de antibióticos em diversos países prejudica muito o tratamento das infecções devido ao aumento da resistência bacteriana (ANVISA, 2007). As decisões pessoais sobre a compra e uso de antibióticos pelas pessoas destes locais são regidas principalmente por razões culturais e econômicas (GARTIN *et al.*, 2010; STRACHAN & DAVIES, 2017). Devido à falta de novos agentes alternativos, o uso prudente continua sendo crucial no esforço de prevenção e controle da resistência, uma vez que se trata de um problema complexo que requer esforços conjuntos de diversos profissionais e da comunidade em geral (ANVISA, 2007; AMINOV, 2010; DAVIES & DAVIES, 2010; GARTIN *et al.*, 2010; STRACHAN & DAVIES, 2017). Também é importante a descoberta de novas classes de antibióticos e a modificação dos fármacos existentes (LEWIS, 2013).

Para se ter uma noção melhor da situação, em 2016, seis países da União Europeia relataram um aumento significativo no consumo de antibióticos, enquanto nenhum relatou a diminuição no consumo (ECDC, 2016). Segundo o relatório do ECDC de 2019, a cada ano, cerca de 33 mil pacientes morrem na UE/EEE de uma infecção causada por bactérias resistentes e a infecção devido a esses micro-

organismos resulta em pelo menos € 1,5 bi. de custos extras na saúde a cada ano. Mesmo após alguns anos, em 2021, este número já ultrapassa 35 mil mortes por ano, um total de infecções comparável aos de HIV/AIDs, tuberculose e gripe combinados (ECDC, 2023). Por outro lado, um estudo da OMS em 2018, revelou haver muitas discordâncias nas taxas de consumo de antibióticos entre os 65 países analisados em seu estudo, sendo 22,75% referente ao consumo destes no Brasil, a maior dentre os países americanos (OMS, 2018).

Em 2017, a OMS publicou a AWaRe, uma classificação de antibióticos que divide aqueles de Acesso, Vigilância e Reserva em relação aos maiores níveis de desenvolvimento de resistência e usos em último recurso. Esta classificação foi desenvolvida para auxiliar os programas de administração de antibióticos com métricas e indicadores globais para uso apropriado (OMS, 2019). Apesar disso, o uso crescente de antibióticos de reserva é uma consequência inevitável do aumento da prevalência de bactérias resistentes aos antimicrobianos, especialmente bactérias MDR (BENKÖ *et al.*, 2022).

1.3.1 Mecanismos de resistência a beta-lactâmicos

Para que um antibiótico consiga exercer seu papel, é preciso primeiro alcançar os alvos moleculares, e para isso, o fármaco precisa conseguir entrar na célula para só depois interagir com uma molécula-alvo de modo a desencadear a morte da bactéria. Nesse processo, o antibiótico pode ser neutralizado de várias formas, podendo sofrer a ação das bombas de efluxo, a inativação por enzimas capazes de modificá-lo ou degradá-lo, a incapacidade de atuar sobre seu alvo devido a alterações neste ou a superprodução de seu alvo (Figura 6) (COX & WRIGHT, 2013; BLAIR *et al.*, 2015). Para evitar a ação dos antibióticos, as bactérias normalmente fazem uso de mais de uma estratégia. Em relação aos mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, quatro mecanismos se destacam (Figura 6).

A redução da permeabilidade é o primeiro mecanismo de resistência e destacam-se as mutações ou alteração na expressão de porinas da membrana externa das bactérias Gram-negativas de modo a limitar a entrada dos antibióticos (DRAWZ e BONOMO, 2010; PAPP-WALLACE *et al.*, 2011; ANVISA, 2007). Em *P. aeruginosa*, a resistência ao imipenem, trimetoprima e de forma mais leve ao meropenem, está associada à perda da porina OprD (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011).

O segundo mecanismo corresponde às bombas de efluxo de drogas que bombeiam de modo ativo os antibióticos do meio intracelular para o extracelular. Estas bombas são parte do repertório de resistência adquirida ou intrínseca e são determinantes na resistência a múltiplas drogas em várias bactérias Gram-negativas, como em *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *E. coli* (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011; BONOMO, 2017). No caso dos antibióticos beta-lactâmicos, o terceiro mecanismo, a alteração do alvo de ação do antibiótico, é bastante importante e corresponde a mudanças nas PBPs, como ocorre com a proteína PBP2x de *Streptococcus pneumoniae* (SCHWEIZER *et al.*, 2014), ou aquisição de PBPs alternativas, como ocorre em linhagens de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Nestas linhagens, a aquisição do gene cromossômico *mecA* permite produzir uma PBP resistente aos beta-lactâmicos (PBP2a), mantendo assim a integridade da parede celular durante o crescimento, mesmo que outras transpeptidases essenciais sejam inativadas (ANVISA, 2007; SCHWEIZER *et al.*, 2014; BLAIR *et al.*, 2015; FISHOVITZ *et al.*, 2015).

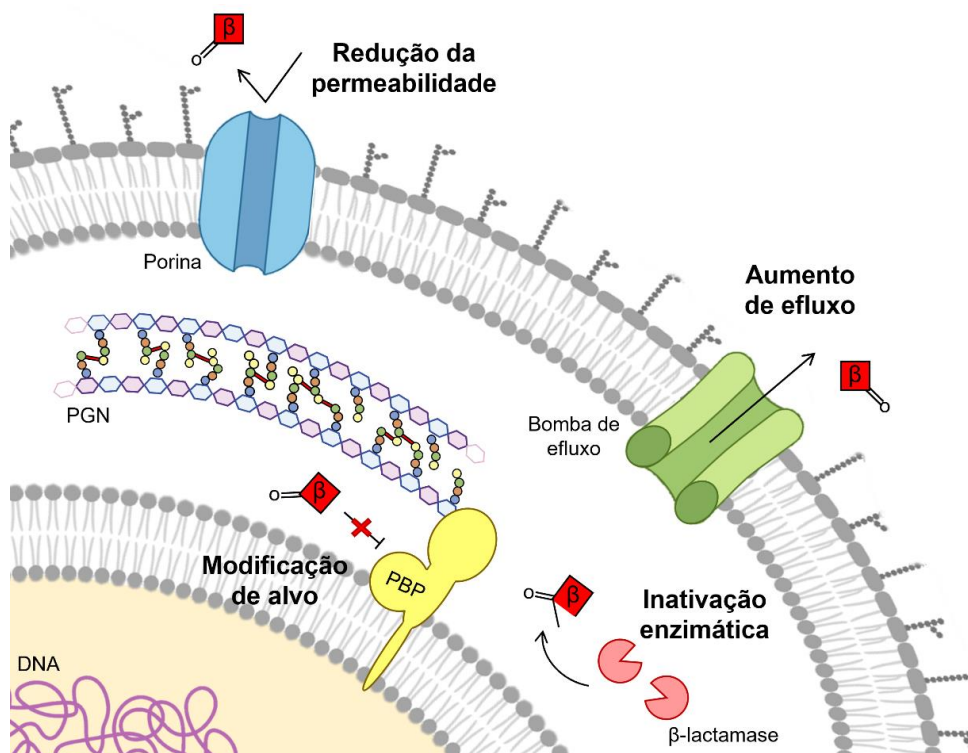


Figura 6. Mecanismos de resistência a antibióticos beta-lactâmicos. A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida por elementos móveis. Os principais mecanismos de resistência incluem redução da permeabilidade, aumento de efluxo, alteração do alvo de ação ou a destruição enzimática do antibiótico. Esquema do próprio autor, criado com inspiração em LEWIS, 2013.

Por último, a produção de enzimas beta-lactamases é o meio mais eficiente e comum das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas se tornarem resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos (Figura 6), uma vez que estas enzimas destroem a estrutura do anel beta-lactâmico, fazendo com que as transpeptidases não sejam inativadas pelo antibiótico (DRAWZ e BONOMO, 2010; MORAR & WRIGHT 2010; BONOMO, 2017; BUSH, 2018). As beta-lactamases são classificadas em 4 classes distintas (classes A, B, C e D), segundo a proposta de Ambler que as agrupa com base em similaridade de sequência e estrutural (AMBLER, 1980). Em 1995, uma segunda classificação foi criada e agrupa as beta-lactamases em grupos de 1 a 3 (esquema de Bush e Jacoby), levando em consideração o perfil de substrato e de inibição destas enzimas (BUSH *et al.*, 1995). De acordo com o mecanismo de catálise, essas enzimas atuam quebrando o anel beta-lactâmico por meio da utilização de íons zinco como cofator (classe B, grupo 3, metalo-beta-lactamase) ou usando um resíduo de serina conservado (classes A, C e D, grupos 1 e 2) (PHILIPPON *et al.*, 1998; BUSH & JACOBY, 2010; BONOMO, 2017; BUSH, 2018).

1.4 Regulação de genes de beta-lactamases

Conforme descrito por Dik e colaboradores em 2018, “um cuidadoso equilíbrio entre a síntese da parede celular por PBPs de HMM, remodelamento por PBPs de LMM e degradação por amidases e transglicosilases líticas (LTs) mantém a parede celular” (DIK *et al.*, 2018). A resistência a antibióticos beta-lactâmicos passa necessariamente pelos complexos mecanismos de reciclagem da parede celular. As beta-lactamases podem ser expressas de modo constitutivo ou terem sua expressão induzida, uma vez que as alterações nos níveis de produtos do metabolismo do PGN originados da ação de antibióticos beta-lactâmicos permitem detectar a presença desses antibióticos que levam à regulação de beta-lactamases (PHILIPPON *et al.*, 1998; GUÉRIN *et al.*, 2015; JUAN *et al.*, 2017; DIK *et al.*, 2018).

Em bactérias Gram-positivas, o modelo de sistema regulatório mais bem estudado é o sistema Bla de *S. aureus* que consiste na proteína de transdução de sinal BlaR, do repressor transcricional Blal e da beta-lactamase BlaZ (HAO *et al.*, 2012). Na presença de beta-lactâmicos, BlaR sofre auto clivagem e seu domínio citosólico cliva o repressor Blal, liberando a expressão do gene *blaZ* (ZHANG *et al.*, 2001; BIRCK *et al.*, 2004). Em bactérias Gram-negativas, muitos dos sistemas

regulatórios bem descritos estão envolvidos em regular a expressão de beta-lactamases cromossômicas intrínsecas das classes A, B, C e D presentes em bactérias Gram-negativas ambientais que atuam como patógenos oportunistas, como *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Aeromonas spp.* (JUAN *et al.*, 2017).

O caso mais bem caracterizado de beta-lactamase induzível é a AmpC, uma cefalosporinase classificada no grupo 1 e classe C, identificada como a primeira enzima capaz de degradar um beta-lactâmico (ABRAHAM e CHAIN, 1940). Hoje, já se sabe que AmpC confere resistência a diversas cefalosporinas, a maioria das penicilinas e a combinação de inibidor de beta-lactamase com beta-lactâmicos. No tratamento de infecções por patógenos que possuam esse gene, torna-se recomendado terapias com carbapenêmicos, apesar de algumas cepas com esse gene já terem desenvolvido resistência (JACOBY, 2009). Os genes que codificam beta-lactamases AmpC geralmente são intrínsecos e cromossômicos, embora eventualmente ocorra sua presença em plasmídeos adquiridos, permitindo que bactérias que antes não portavam *bla_{ampC}* passem a produzi-la, como ocorre com *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. É comum emergirem isolados clínicos resistentes a beta-lactâmicos por mutações em genes da via de regulação de *ampC*, como mutantes *ampD* que hiperexpressam AmpC (HWANG & KIM, 2015; PÉREZ-GALLEGO *et al.*, 2016; JUAN *et al.*, 2017).

A regulação da expressão do gene *ampC* em bactérias Gram-negativas é bastante intrincada e envolve um elegante mecanismo sensorial que consegue detectar antibióticos beta-lactâmicos por sua interferência no processo de reciclagem da parede celular. Este modelo, elaborado para *Enterobacteriaceae* e depois expandido para *P. aeruginosa*, é complexo e envolve diversos genes que codificam enzimas do metabolismo e da reciclagem do PGN (Figura 7) (JACOBY, 2009; JUAN *et al.*, 2017; TORRENS *et al.*, 2019). A inibição de PBPs por beta-lactâmicos gera o aumento de fitas sacarídicas não reticuladas aberrantes na parede celular, que sofrem ação de transglicosilases líticas como uma tentativa de correção e encurtamento dessas fitas com a liberação dos monômeros GlcNAc-1,6-anhMurNAc (com ou sem peptídeos), aumentando o *pool* dessas moléculas no periplasma (GUÉRIN *et al.*, 2015; JUAN *et al.*, 2017; DIK *et al.*, 2018; TORRENS *et al.*, 2019).

Ao serem transportados para o citosol por AmpG, e serem processados por NagZ, a quantidade de 1,6-anidro-MurNAc será alta. Concomitantemente, o metabolismo por AmpD está acontecendo, liberando a porção peptídica de 1,6-anidro-

MurNAc, com ou sem GlcNAc, para que possam entrar na via de reciclagem e serem reutilizados na síntese do PGN. O produto dessa via de reciclagem, UDP-MurNAc, atua como um ligante de repressão em AmpR, o fator transcricional da família LysR responsável pela regulação de *bla_{ampC}*, que inibe a expressão de AmpC. No entanto, com o aumento da concentração de 1,6-anidro-MurNAc no citosol, ocorre a saturação de AmpD, que por sua vez não consegue aumentar a produção de precursores do PGN (o mesmo ocorre em mutantes *ampD*). Essa situação permite uma competição entre 1,6-anidro-MurNAc e UDP-MurNAc pelo sítio de ligação de AmpR. É justamente este deslocamento de ligantes de repressão para indução que sinaliza uma mudança conformacional em AmpR para ativador transcricional, permitindo a transcrição de AmpC (Figura 7) (JACOBY, 2009; GUÉRIN *et al.*, 2015; HWANG & KIM, 2015; JUAN *et al.*, 2017; DIK *et al.*, 2018). Em *P. aeruginosa*, a expressão de AmpC também é regulada pelo sistema de dois componentes CreBC (MOYÁ *et al.*, 2009; ZAMORANO *et al.*, 2014; JUAN *et al.*, 2017).

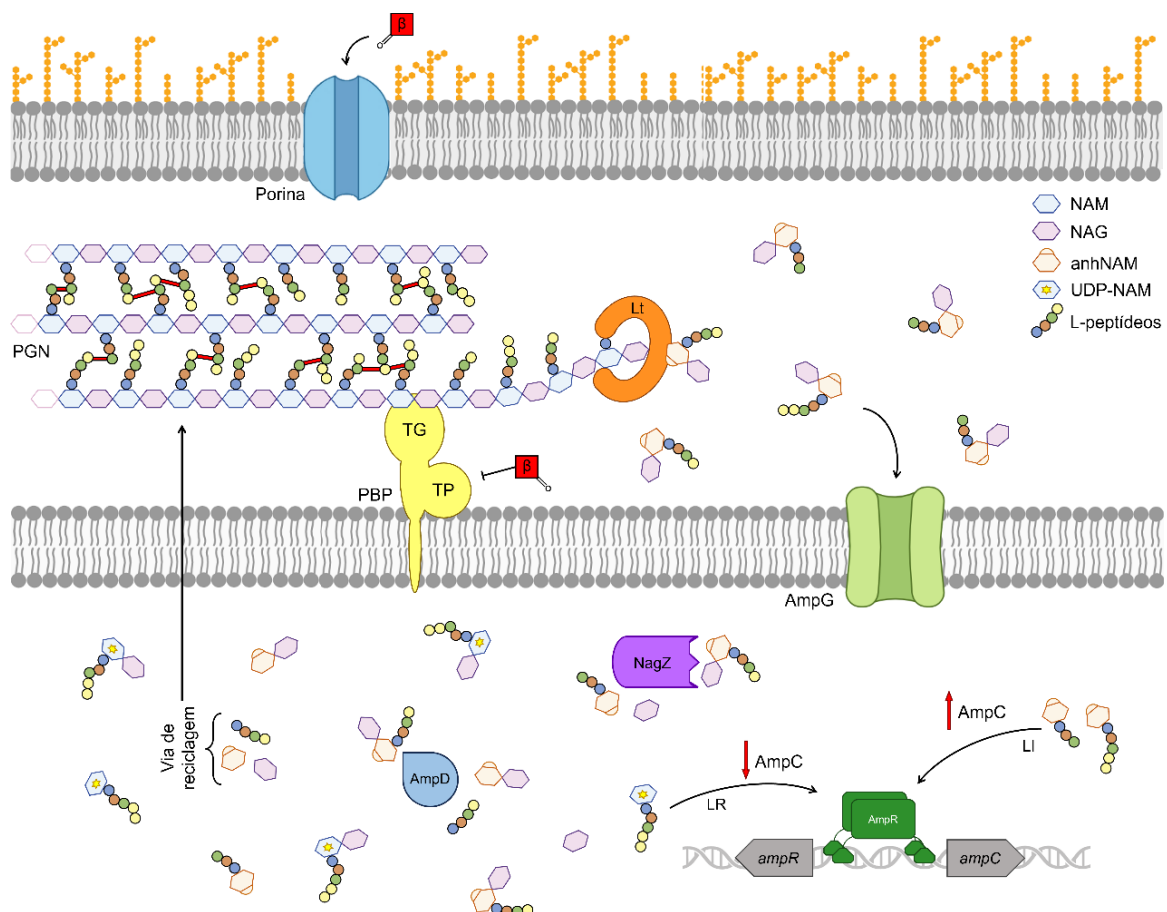


Figura 7. Regulação de beta-lactamases por AmpR. Esquema representativo da regulação de *bla_{ampC}* em *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa*. β - antibiótico beta-lactâmico, Lt - transglicosilase lítica, LR - ligante de repressão, LI - ligante de indução, TG - transglicosilase, TP - transpeptidase. Esquema

do próprio autor, criado com inspiração em JUAN *et al.*, 2017; DIK *et al.*, 2018; COCHRANE & LOHANS, 2020.

Outro exemplo bem estudado de beta-lactamases induzidas ocorre em bactérias do gênero *Aeromonas* (Figura 8). Nestas bactérias existem três beta-lactamases co-induzidas: a carbapenemase de classe B $bla_{CphA/Imi}$, a cefalosporinase de classe C bla_{Cep} e a penicilase de classe D bla_{Amp} . Ao contrário de outras bactérias Gram-negativas, em *Aeromonas* a expressão destas beta-lactamases não envolve o regulador AmpR, mas sim o sistema de dois componentes BlrAB (Blr, β -lactam resistance) que é similar ao sistema CreBC de *P. aeruginosa* e *E. coli*. Na presença de beta-lactâmicos indutores ocorre a autofosforilação de BlrB e transferência do fosfato para BlrA, o qual liga-se em sequências *cre/blr* (TTCAC) na região promotora dos genes das beta-lactamases, estimulando a expressão destes genes e aumentando a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (JACOBY, 2009; ZAMORANO *et al.*, 2014; JUAN *et al.*, 2017).

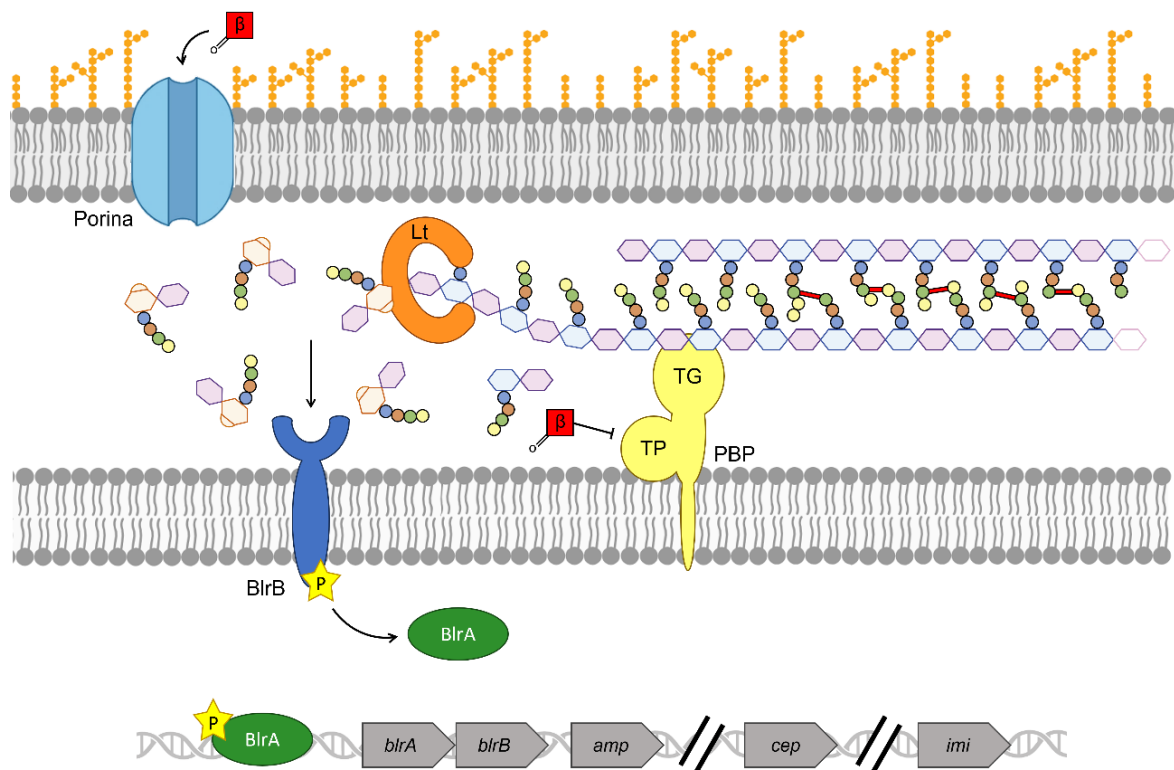


Figura 8. Regulação de beta-lactamases pelo sistema de dois componentes BlrAB. Esquema representativo da regulação de três genes *bla* em *Aeromonas* spp. β - antibiótico beta-lactâmico, P - fosfatos, TG - transglicosilase, TP - transpeptidase. Esquema do próprio autor, criado com inspiração em JUAN *et al.*, 2017; DIK *et al.*, 2018; COCHRANE & LOHANS, 2020.

1.5 *Chromobacterium violaceum*

Pertencente a classe β -proteobacteria e a ordem *Neisseriales*, *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, flagelada, saprófita de vida livre, normalmente encontrada no solo e água doce de ecossistemas de regiões tropicais e subtropicais de todo planeta (Figura 9) (HUNGRIA *et al.*, 2004; LIMA-BITTENCOURT *et al.*, 2007; BATISTA & DA SILVA NETO, 2017). No Brasil, foi primeiramente detectada em corpos de mananciais, incluindo a bacia do Rio Negro, e vem sendo utilizada como objeto de estudos no país desde o final da década de 70, após encontrada em uma estação de tratamento de água (CALDAS *et al.*, 1978; GUARIM, 1978). Descrita pela primeira vez em 1882 por Boisbaudran, foi por muito tempo a única integrante do gênero *Chromobacterium*, dentro da família *Chromobacteriaceae*. No entanto, mais recentemente foram propostas mais de uma dezena de novas espécies dentro do gênero, sendo muitas destas isoladas da rizosfera (BOISBAUDRAN, 1882; BATISTA & DA SILVA NETO, 2017).

Reconhecida como um patógeno oportunista ambiental, o primeiro caso de infecção por *C. violaceum* relatado em humanos ocorreu na Malásia no ano de 1927 (SNEATH *et al.*, 1953). Associada a diversas infecções em animais, incluindo seres humanos, possui como principal rota de infecção o contato de lesões com o solo e água contaminados (YANG & LI, 2011; MEHER-HOMJI *et al.*, 2017; ALISJAHBANA *et al.*, 2021; GOMEZ *et al.*, 2023). Embora sejam raros, os casos de infecção observados são caracterizados por dor abdominal, febre, lesões na pele, formação de abscesso com rápido curso clínico, acometendo diferentes órgãos como fígado, pulmões e baço, que culminam em sepse (YANG & LI, 2011; SWAIN *et al.*, 2014; BATISTA & DA SILVA NETO, 2017; PANT *et al.*, 2017).

A linhagem tipo ATCC 12472 de *C. violaceum* (isolada da água na Malásia) foi escolhida como objeto de estudo para o sequenciamento de seu genoma completo pelo Projeto Genoma Brasileiro (BRGene). Esse estudo revelou ampla diversidade de genes relacionados à adaptação deste micro-organismo ao seu variado estilo de vida, seja ele ambiental ou patogênico, dentro de um grande genoma de aproximadamente 4,8 Mb com 4.529 genes e um alto conteúdo G+C de 64,5% (BNGPC, 2003; HUNGRIA *et al.*, 2004). *C. violaceum* possui potencial para aplicações biotecnológicas, tais como produção de plásticos biodegradáveis (STEINBÜCHEL *et al.*, 1993), hidrólise de filmes plásticos (GOURSON *et al.*, 1999), biocontrole de pragas agrícolas e

despoluição em áreas de garimpo (DURÁN *et al.*, 2016). Outros isolados e espécies de *Chromobacterium* também produzem substâncias úteis para prevenção de transmissão de doenças por mosquitos hematófagos e no biocontrole de pragas de agricultura (KIM *et al.*, 2014; RAMIREZ *et al.*, 2014; DURÁN *et al.*, 2016).

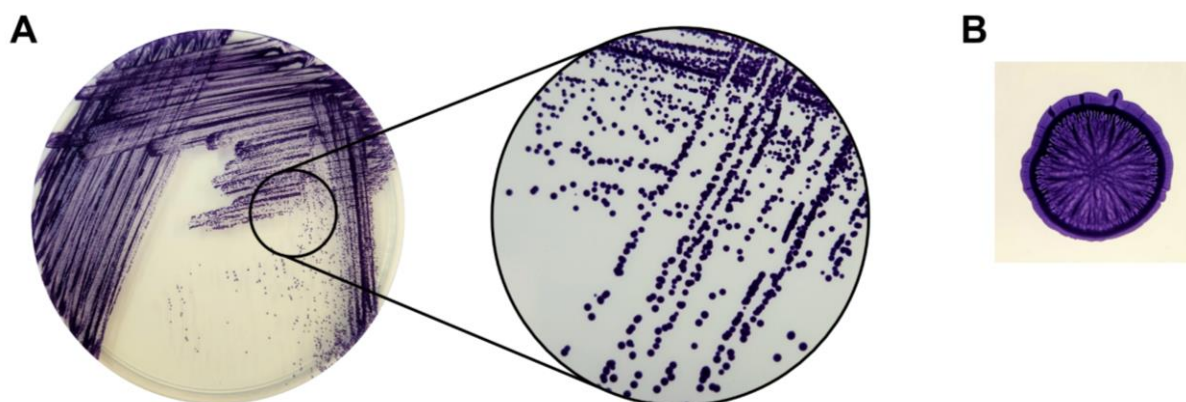


Figura 9. *Chromobacterium violaceum*. (A) Crescimento por esgotamento em ágar LB e (B) formação de biofilme após 7 dias de cultivo em ágar PSA. Esquema do próprio autor.

Dentre os vários compostos bioativos produzidos por *C. violaceum*, sobressai-se a violaceína, um pigmento roxo hidrofóbico (Figura 9) com atividade contra bactérias, fungos, protozoários, vírus e células tumorais (DURÁN *et al.*, 2016), sendo que a sua entrega às células alvo ocorre em vesículas de membrana externa (BATISTA *et al.*, 2020). Sua síntese ocorre por meio da expressão do operon *vioABCDE* e usa L-triptofano como substrato. No entanto, sua ativação ocorre apenas em alta densidade celular através de um sistema de *quorum sensing* composto pelo regulador CviR e pela enzima Cvil que produz o autoindutor L-homoserina lactona (C10-HSL) (MCCLEAN *et al.*, 1997; FUQUA *et al.*, 2001; STAUFF & BASSLER, 2011; PARK *et al.*, 2021). A violaceína não é somente produzida por *C. violaceum*, sendo encontrada em diferentes outros gêneros bacterianos, como *Duganella sp.*, *Iodobacter sp.*, *Massilia sp.* e *Pseudoalteromonas sp.* (PARK *et al.*, 2021).

No genoma de *C. violaceum* existem genes que codificam diferentes sistemas de secreção, como sistema de secreção do tipo I (T1SS), T2SS, T3SS, T5SS e T6SS (BNGPC, 2003). Destes, o T3SS codificado por genes da Ilha de Patogenicidade de *Chromobacterium 1* e 1a (Cpi-1/1a) é especialmente relevante para a virulência de *C. violaceum* (MIKI *et al.*, 2011) e atua como um agonista do inflamassoma NLRC4, desencadeando morte celular do tipo piroptose em macrófagos do hospedeiro (MALTEZ *et al.*, 2015). Este T3SS é responsável pela translocação de diferentes

fatores de virulência, como CopE e CopC, que atuam no rearranjo do citoesqueleto de actina e na inibição de apoptose em células do hospedeiro, respectivamente (MIKI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2022).

Outros mecanismos de virulência de *C. violaceum* têm sido descritos. A homeostase de ferro coordenada pelo regulador Fur é vital para a patogênese desta bactéria (SANTOS *et al.*, 2020). A captação de ferro do hospedeiro também é muito importante para a virulência de *C. violaceum*, seja por meio de dois sideróforos distintos (BATISTA *et al.*, 2019) ou via o sistema de captação de heme ChuPRSTUV (DE LIMA *et al.*, 2022). Além disso, a desintoxicação de hidroperóxidos orgânicos e a defesa contra o estresse oxidativo foi investigada em *C. violaceum*. Os reguladores da família MarR, OhrR e OsbR, foram caracterizados, contribuindo em virulência, respiração anaeróbica e formação de biofilme (DA SILVA NETO, 2012; PREVIATO-MELLO *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2021).

Os mecanismos de resistência a antibióticos em *C. violaceum* ainda são pouco estudados. Nosso grupo demonstrou o papel de uma bomba de efluxo na resistência a quinolona (BARROSO *et al.*, 2018). Há vários relatos médicos de que *C. violaceum* possui resistência intrínseca a antibióticos, sobretudo aos beta-lactâmicos, o que dificulta o tratamento e contribui para a alta taxa de letalidade das infecções causadas por esta bactéria (ALDRIDGE *et al.*, 1988; FANTINATTI-GARBOGGINI *et al.*, 2004; YANG & LI, 2011; SWAIN *et al.*, 2014; BATISTA & DA SILVA NETO, 2017; GOMEZ *et al.*, 2023). Além disso, alguns estudos têm mostrado a infecção por esta bactéria em hospitais, o que levanta a preocupação dela tornar-se um patógeno nosocomial (PANT *et al.*, 2017; BATISTA & DA SILVA NETO, 2017). Em todo caso, acredita-se que essa resistência não envolva a transferência de elementos genéticos móveis, considerando que *C. violaceum* parece não abrigar plasmídeos (BNGPC, 2003). Com relação a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, nosso grupo demonstrou a contribuição diferencial de duas beta-lactamases cromossômicas, AmpC (classe C, grupo 1) e CphA (metalo-beta-lactamase de classe B, grupo 3b) (NEME, 2019). No entanto, ainda não foram estudados os mecanismos de regulação da expressão destas enzimas e a inter-relação entre a expressão delas com a ocorrência de mutações em genes da via de reciclagem do PGN. Portanto, o estudo da regulação de enzimas beta-lactamases de *C. violaceum* é importante em contexto ambiental e clínico, uma vez que esta bactéria é um patógeno oportunista ambiental.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo desvendar as vias de sinalização e potenciais fatores de transcrição envolvidos na expressão das beta-lactamases AmpC e CphA de *Chromobacterium violaceum*, buscando isolar mutantes com expressão elevada destas enzimas. Para tanto, utilizamos as seguintes estratégias:

- I. Isolar mutantes espontâneos resistentes a antibióticos beta-lactâmicos;
- II. Determinar o perfil de resistência e verificar a expressão dos genes *ampC* e *cphA* nos mutantes espontâneos;
- III. Sequenciar genes específicos conhecidos por atuarem na via de regulação das beta-lactamases nos mutantes espontâneos;
- IV. Realizar o sequenciamento do genoma completo de alguns mutantes espontâneos selecionados;
- V. Gerar mutantes nulos das amidases de *C. violaceum*, caracterizá-los e avaliar a expressão das beta-lactamases;
- VI. Identificar potenciais proteínas regulatórias capazes de ligar na região promotora dos genes das beta-lactamases.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens e plasmídeos

As linhagens bacterianas de *Escherichia coli* e *Chromobacterium violaceum* e os plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão apresentados na tabela 1 e tabela 2, respectivamente. A linhagem selvagem de *C. violaceum* utilizada foi ATCC 12472, cujo genoma foi completamente sequenciado pelo Consórcio Projeto Genoma Nacional Brasileiro (BNGPC, 2003), sendo adquirida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello de Campinas - SP. Para os procedimentos de clonagem, conjugação e expressão heteróloga, foram utilizadas as linhagens de *E. coli* DH5 α (HANAHAN, 1983), S17-1 (SIMON *et al.*, 1983) e BL21(DE3) (Novagene), respectivamente.

Tabela 1. Linhagens utilizadas neste estudo.

LINHAGEM	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Linhagem usada em clonagem.	(HANAHAN, 1983)
S17-1	Linhagem usada em conjugação para mobilização de plasmídeos.	(SIMON <i>et al.</i> , 1983)
BL21(DE3)	Linhagem usada para expressão heteróloga de proteínas.	Novagene
ATCC 25922	Linhagem selvagem usada como controle em ensaios de sensibilidade a antimicrobianos.	ATCC collection
<i>Chromobacterium violaceum</i>		
WT	Linhagem selvagem (ATCC 12472) com o genoma sequenciado.	(BNGPC, 2003)
WT [pMR20]	Linhagem selvagem com vetor de complementação pMR20 vazio.	(NEME, 2019)
Δ CV_1310 (Δ ampC)	Linhagem selvagem com deleção de 1131 pb do gene CV_1310 (<i>ampC</i>), restando 12 pb do começo e 48 pb do final do gene.	(NEME, 2019)
Δ CV_1310 [pMR20]	Linhagem mutante Δ CV_1310 (Δ ampC) com vetor pMR20 vazio.	(NEME, 2019)
Δ CV_1310 [CV_1310::pMR20]	Linhagem mutante Δ CV_1310 (Δ ampC) com vetor pMR20 contendo a região promotora e codificadora do gene CV_1310.	(NEME, 2019)
Δ CV_3150 (Δ cphA)	Linhagem selvagem com deleção de 609 pb do gene CV_3150 (<i>cphA</i>), restando 81 pb do começo e 150 pb do final do gene.	(NEME, 2019)

(Continua)

(Conclusão)		
ΔCV_3150 [pMR20]	Linhagem mutante ΔCV_3150 ($\Delta cphA$) com vetor pMR20 vazio.	(NEME, 2019)
ΔCV_3150 [CV_3150::pMR20]	Linhagem mutante ΔCV_3150 ($\Delta cphA$) com vetor pMR20 contendo a região promotora e codificadora do gene CV_3150.	(NEME, 2019)
$\Delta CV_1310\Delta CV_3150$	Linhagem mutante com deleção combinada dos genes CV_1310 e CV_3150 ($\Delta ampC\Delta cphA$).	(NEME, 2019)
ΔCV_0566 ($\Delta ampD1$)	Linhagem selvagem com 924 pb do gene CV_0566 ($ampD1$) deletados, restando 30 pb do começo e 46 pb do final do gene.	Este trabalho
ΔCV_0566 [pMR20]	Linhagem mutante ΔCV_0566 ($\Delta ampD1$) com vetor pMR20 vazio.	Este trabalho
ΔCV_0566 [CV_0566::pMR20]	Linhagem mutante ΔCV_0566 ($\Delta ampD1$) com vetor pMR20 contendo a região promotora e codificadora do gene CV_0566.	Este trabalho
ΔCV_1309 ($\Delta ampD2$)	Linhagem selvagem com 822 pb do gene CV_1309 ($ampD2$) deletados, restando 54 pb do começo e 24 pb do final do gene.	(NEME, 2019)
ΔCV_1309 [pMR20]	Linhagem mutante ΔCV_1309 ($\Delta ampD2$) com vetor pMR20 vazio.	Este trabalho
ΔCV_1309 [CV_1309::pMR20]	Linhagem mutante ΔCV_1309 ($\Delta ampD2$) com vetor pMR20 contendo a região promotora e codificadora do gene CV_1309.	Este trabalho
ΔCV_3031 ($\Delta ampD3$)	Linhagem selvagem com 687 pb do gene CV_3031 ($ampD3$) deletados, restando 45 pb do começo e 42 pb do final do gene.	Este trabalho
ΔCV_3031 [pMR20]	Linhagem mutante ΔCV_3031 ($\Delta ampD3$) com vetor pMR20 vazio.	Este trabalho
ΔCV_3031 [CV_3031::pMR20]	Linhagem mutante ΔCV_3031 ($\Delta ampD3$) com vetor pMR20 contendo a região promotora e codificadora do gene CV_3031.	Este trabalho
$\Delta CV_0566\Delta CV_1309$ ($\Delta ampD1D2$)	Linhagem mutante CV_0566 com deleção combinada do gene CV_1309 ($\Delta ampD1D2$).	Este trabalho
$\Delta CV_0566\Delta CV_3031$ ($\Delta ampD1D3$)	Linhagem mutante ΔCV_0566 com deleção combinada do gene CV_3031 ($\Delta ampD1D3$).	Este trabalho
$\Delta CV_1309\Delta CV_3031$ ($\Delta ampD2D3$)	Linhagem mutante ΔCV_1309 com deleção combinada do gene CV_3031 ($\Delta ampD2D3$).	Este trabalho
$\Delta CV_0566\Delta CV_1309$ ΔCV_3031 ($\Delta ampD1D2D3$)	Linhagem mutante $\Delta CV_0566\Delta CV_1309$ com deleção combinada do gene CV_3031 ($\Delta ampD1D2D3$).	Este trabalho
<i>gntR</i> ::pNPT	Linhagem selvagem com inserção do vetor suicida pNPTS138 por recombinação homóloga na região codificadora de CV_1922.	Este trabalho

Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste estudo.

NOME	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
pRK/lacZ290	Vetor para fusão transcricional ao <i>lacZ</i> ; baixo número de cópias; <i>oriV</i> ; Tet ^r	(GOBER & SHAPIRO, 1992)

(Continua)

(Conclusão)

PCV_1310::pRK <i>lacZ</i> 290	Vetor pRK <i>lacZ</i> 290 com a região promotora do gene CV_1310 (<i>ampC</i>)	B. B. BATISTA (não publicado)
PCV_3150::pRK <i>lacZ</i> 290	Vetor pRK <i>lacZ</i> 290 com a região promotora do gene CV_3150 (<i>cphA</i>)	B. B. BATISTA (não publicado)
pGEM-T-Easy	Vetor de clonagem linearado; <i>oriF1</i> ; <i>lacZ</i> ; <i>Amp^r</i>	Promega
CV_1309::pGEM	Vetor pGEM com a região codificadora de CV_1309 (<i>ampD2</i>) para clonagem intermediária	Este trabalho
pNPTS138	Vetor suicida; <i>ori ColE1</i> ; <i>oriT</i> ; <i>ori M13</i> ; <i>nptI</i> , <i>sacB</i> ; <i>Kan^r</i>	M. R. K. Alley (não publicado)
CV_0566::pNPTS138	Vetor pNPTS138 com as regiões flanqueadoras do gene CV_0566 (<i>ampD1</i>)	Este trabalho
CV_3031::pNPTS138	Vetor pNPTS138 com as regiões flanqueadoras do gene CV_3031 (<i>ampD3</i>)	Este trabalho
CV_1922::pNPTS138	Vetor pNPTS138 com fragmento interno da região codificadora do gene CV_1922 (<i>GntR</i>)	Este trabalho
pMR20	Vetor usado para complementação de mutantes com baixo número de cópias e amplo espectro de hospedeiros; <i>RK2 oriV</i> ; <i>trfA</i> ; <i>oriT</i> ; <i>lacZα</i> ; <i>Tet^r</i>	(ROBERTS <i>et al.</i> , 1994)
CV_0566::pMR20	Vetor pMR20 com a região promotora e codificadora do gene CV_0566	Este trabalho
CV_1309::pMR20	Vetor pMR20 com a região promotora e codificadora do gene CV_1309	Este trabalho
CV_3031::pMR20	Vetor pMR20 com a região promotora e codificadora do gene CV_3031	Este trabalho
pET-15b	Vetor para expressão de proteína heteróloga com N-terminal His-tag; sítio de trombina; <i>ori-pBR322</i> ; <i>lacI</i> , <i>Amp^r</i>	Novagene
CV_1922::pET-15b	Vetor pET-15b para expressão induzida de CV_1922 (<i>GntR</i>)	Este trabalho

Abreviaturas: canamicina (Kan); tetraciclina (Tet); ampicilina (Amp); resistência (°)

3.2 Meios de cultura e condições de cultivo

As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio Mueller Hinton (MH) (Sigma Aldrich, 70191 e 70192 e OXOID, CM0337), meio Luria-Bertani (LB) ou o meio mínimo M9 (AUSUBEL *et al.*, 1992) acrescido de 0,1% de hidrolisado de caseína (M9HC). Os cultivos foram realizados a partir de colônias obtidas em placas com ágar LB ou MH. Pré-inóculos foram realizados em meio líquido dos mesmos meios de cultura e cultivados *overnight* a 37 °C sob agitação constante de 250 RPM, usando como limite apenas 20% do volume total dos recipientes de cultivo para garantir boa

aeração à cultura. Durante o cultivo geral das bactérias, quando necessário, os meios de cultura foram suplementados com os antibióticos ampicilina, canamicina ou tetraciclina (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição das concentrações de antibióticos usadas no cultivo geral.

ANTIBIÓTICO	SOLUÇÃO ESTOQUE (mg/mL)	<i>E. coli</i>	<i>C. violaceum</i>
		CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/mL)
Ampicilina	100	100	-
Canamicina	50	50	50
Tetraciclina (em líquido)	12	12	5
Tetraciclina (em ágar)	12	12	10

3.3 Ensaio de prospecção de mutantes espontâneos

Mutantes espontâneos de *C. violaceum* resistentes a beta-lactâmicos foram isolados em ágar MH contendo diferentes quantidades de antibiótico. O preparo das placas seguiu a metodologia do ensaio de diluição em ágar presente no documento CLSI M07A10 (2015) e descrita no tópico 3.4.1 deste trabalho. Resumidamente, foi preparada uma solução estoque (S.E.) a 50 mg/mL de ceftazidima (CAZ) (Sigma Aldrich), uma cefalosporina de 3ª geração. Soluções de trabalho (S.T.) foram feitas com 10X a concentração desejada a partir da diluição da S.E. (CLSI M100, 2021). As concentrações escolhidas foram 40, 80, 160 e 320 µg/mL de CAZ por estarem acima do valor de concentração inibitória mínima (CIM) da linhagem selvagem. As soluções dos antibióticos foram preparadas com água Milli Q estéril. Placas com ágar MH sem antibiótico foram utilizadas como controle do ensaio. Cem microlitros de pré-inóculo *overnight* de *C. violaceum* ATCC 12472 foram acrescentados em 400 µL de MH líquido e espalhados sobre as placas recém-preparadas. Quando secas, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Um segundo ensaio de prospecção independente foi realizado usando 32, 64, 128, 256 e 512 µg/mL de CAZ com Na₂CO₃ (Hikma PLB803-POR/2).

As colônias que tiveram crescimento isolado (sem a presença de um fundo bacteriano) nas placas de concentrações mais altas que o valor de CIM foram repicadas em novas placas de ágar MH sem antibiótico com o intuito de evitar colônias

que tivessem resistência induzida na presença do antimicrobiano. Posteriormente, essas colônias foram testadas no ensaio de ágar-diluição (descrito no item 3.4.1) com o objetivo de verificar se a resistência dos mutantes espontâneos foi mantida após cultivo em meio sem antibióticos.

3.4 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

3.4.1 Método de diluição em ágar

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM), *minimum inhibitory concentration* (MIC) em inglês, foram determinados pelo teste de ágar-diluição conforme descrito pelo CLSI M07A10 (2015) e M100 (2021). Resumidamente, placas de Petri individuais possuindo meio de cultura acrescido de diferentes concentrações seriadas de um determinado antimicrobiano foram utilizadas. Cada antibiótico em pó foi solubilizado e diluído de acordo com o indicado pelo fabricante. A S.E. de cada antibiótico foi preparada e diluída para S.T.s, possuindo 10x a concentração desejada (CLSI M100, 2021). Seguindo a relação 1:9, foi incorporado ao ágar MH ainda líquido a S.T. [10X] correspondente, sendo esse processo repetido a fim de se obter cada placa com uma concentração diferente do antibiótico. Foram utilizados 10 mL finais para placas de Petri de 55 mm e 20 mL para placas de 90 mm. O preparo das placas se deu a partir da menor concentração para a maior concentração. Duas placas utilizadas como controle positivo de crescimento foram preparadas adicionando água Milli Q ao ágar MH também na proporção de 1:9.

Por conseguinte, suspensões bacterianas ajustadas a $DO_{600\text{ nm}} 0,1$ providas de um pré-inóculo *overnight* em ágar MH não seletivo, foram diluídas para $DO_{600\text{ nm}} 0,01$. Gotas de 2 μL dessa suspensão foram inoculadas em todas as placas preparadas anteriormente, seguindo a sequência de inoculação por uma das placas controle sem antibiótico, passando pelas placas de menor a maior concentração do antibiótico testado, finalizando com um novo inóculo na segunda placa controle. Dessa forma, espera-se obter a concentração de $\sim 10^4$ UFC/ponto de 5 a 8 mm de diâmetro de crescimento bacteriano (CLSI, 2015). A linhagem *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade em todas as placas dos testes por possuir valores de cortes de CIM bem conhecidos e estudados (CLSI M100, 2021). Após a secagem dos inóculos (gotas), as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. A

visualização dos resultados foi realizada sobre uma superfície escura, onde o CIM é definido como a menor concentração do antibiótico sem crescimento, desconsiderando o crescimento de uma única colônia isolada ou de leve turvação da superfície do ágar causada pelo inóculo (CLSI, 2015).

3.4.2 Ensaio de disco-difusão

Os ensaios foram feitos conforme descrito em CLSI M2A11 (2012). Placas de Petri circular foram usadas com 71 mL (placas 150 mm) ou 25 mL (placas 90 mm) de ágar MH (espessura de 4 mm \pm 0,5 mm de meio). O cultivo *overnight* em ágar MH não seletivo das linhagens testadas foi ajustado a DO_{600 nm} 0,1 em salina 0,85% (p/v). A suspensão de cada linhagem foi semeada usando *swab* estéril cobrindo toda a área do meio para formação de um tapete uniforme, seguidos de 5 minutos para absorção do inóculo pelo ágar. Os discos com antibióticos beta-lactâmicos (BD BBL™ Sensi-Disc™/Thermo Scientific Oxoid™) descritos na tabela 4, foram aplicados com o auxílio de uma pinça flambada ou dispensador automático de discos (Oxoid™ ST6090). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. Os halos de inibição das linhagens testadas foram medidos com régua, anotados em milímetros e comparados sempre aos halos obtidos na linhagem selvagem *C. violaceum* ATCC 12472. A linhagem *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade em todas as réplicas do ensaio por possuir valores de cortes bem conhecidos e estudados (CLSI M100).

Tabela 4. Discos impregnados com antibióticos beta-lactâmicos utilizados no antibiograma.

NOME	SIGLA	FAMÍLIA	QUANTIDADE (µg)
Ampicilina	AMP	Penicilina	10
Amoxicilina-ácido clavulânico	AMC	Penicilina	30
Aztreonam	ATM	Monobactâmico	30
Cefoperazona	CFP	Cefalosporina 3ª gen.	75
Cefotaxima	CTX	Cefalosporina 3ª gen.	30
Ceftazidima	CAZ	Cefalosporina 3ª gen.	30
Cefepima	FEP	Cefalosporina 4ª gen.	30
Cefoxitina	FOX	Cefalosporina 2ª gen.	30
Ertapenem	ETP	Carbapenêmico	10
Imipenem	IPM	Carbapenêmico	10

(Continua)

(Conclusão)

NOME	SIGLA	FAMÍLIA	QUANTIDADE (µg)
Meropenem	MEM	Carbapenêmico	10
Piperacilina	PIP	Penicilina	100
Piperacilina+Tazobactam	TZP	Penicilina	110
Ticarcilina	TIC	Penicilina	75

3.4.3 Teste de antagonismo

Para diferenciar antibióticos beta-lactâmicos como fortes ou fracos indutores das beta-lactamases de *C. violaceum* foi realizado teste de antagonismo. Trata-se de um ensaio de disco-difusão (tópico 3.4.2) com o uso dos discos de antibióticos a uma distância de 15 a 20 mm para que os halos de inibição entrem em contato e se sobreponham (Figura 10). Antibióticos como IPM, MEM, FOX, AMP e AMC são fortes indutores em diferentes bactérias (JACOBY, 2009; KOHLMANN *et al.*, 2018). Estes foram escolhidos e testados frente a outros discos de beta-lactâmicos com o objetivo de encontrar fracos indutores de beta-lactamases. O exemplo mostra o antagonismo entre FOX (indutor forte) e CAZ (indutor fraco) (Figura 10). Na zona de interface indicada pela letra A, a concentração de FOX induz resistência de forma mais veloz do que a concentração inibitória de CAZ é atingida. No entanto, na zona de inibição B, a concentração inibitória de CAZ é atingida mais rapidamente do que a indução de resistência causada por FOX. Logo, as bactérias nesta zona são inibidas por CAZ antes de serem afetadas pelo efeito indutor de FOX, criando a forma característica de D (COURVALIN *et al.*, 2010; MICROBIOLOGIE CLINIQUE, 2021).

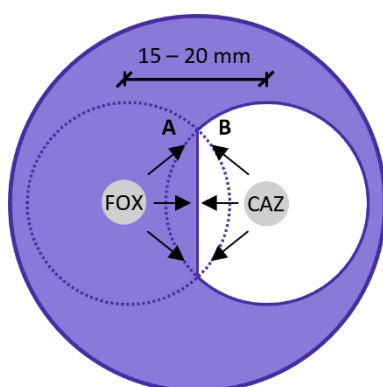


Figura 10. Representação do teste de antagonismo. A disposição próxima dos discos de antibióticos permite sobreposição de halos. Antimicrobianos com ação antagonista produzem uma zona de inibição em forma de D. Esquema do próprio autor, criado com inspiração em MICROBIOLOGIE CLINIQUE, 2021.

3.4.4 Teste de Hodge Modificado

Para verificar a produção de carbapenemase foi realizado o teste de Hodge (LEE *et al.*, 2001; HILT *et al.*, 2020). Neste ensaio, a bactéria sensível indicadora *E. coli* ATCC 25922 foi semeada em uma placa de ágar MH, da mesma forma como no ensaio de disco-difusão, e um disco de 10 µg meropenem (MEM) foi adicionado ao centro da placa. Colônias frescas cultivadas em ágar MH não seletivo das linhagens testadas, incluindo um controle positivo para produção de carbapenemase, como *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705, e um controle negativo, são coletadas com a alça de platina estéril e riscadas em linha reta da borda da placa até o centro de encontro ao disco de MEM (Figura 11). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16-20 horas. A distorção do halo de inibição do organismo indicador na porção de encontro com a área de crescimento das linhagens testadas, indica a presença de carbapenemase por estas linhagens.

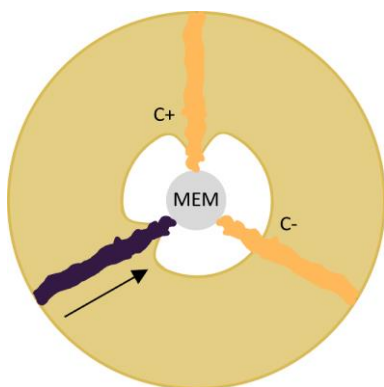


Figura 11. Representação do Teste de Hodge Modificado. As distorções geradas no halo de inibição do organismo indicador *E. coli* ATCC 25922 indicam a produção de carbapenemase pelo organismo testado. A seta preta indica a direção em que o inóculo é realizado com a alça de platina; C equivale aos controles, positivo e negativo. Esquema do próprio autor.

3.4.5 Teste de sinergia com disco de EDTA

Teste rápido realizado com o objetivo de verificar a presença de metalo-carbapenemase em diferentes linhagens (LEE *et al.*, 2001). O ensaio foi realizado com a semeadura da linhagem a ser testada a uma concentração de OD_{600nm} 0,1 em placas MH. Um disco de antibiótico carbapenêmico foi adicionado a uma distância de 10 mm (borda a borda) de um disco de papel filtro autoclavado. Uma solução de 0,5 M EDTA foi preparada e 10 µL foram adicionados neste disco de papel. As placas foram

incubadas em estufa a 37 °C por 16-20 horas. A distorção do halo de inibição do disco do carbapenêmico em direção ao disco de EDTA indica a presença de metalo-carbapenemase por estas linhagens.

3.4.6 Método de inativação de carbapenêmico modificado (mCIM) e método de inativação EDTA-carbapenêmico (eCIM)

A fim de complementar as verificações fenotípicas de resistência a antibiótico em *C. violaceum*, mCIM e eCIM foram realizados com o objetivo de detectar a presença de carbapenemase e diferenciar a produção de metalo-beta-lactamase e serina carbapenemase (CLSI, 2021). Neste ensaio, colônias frescas (*overnight*) das linhagens testadas foram inoculadas em duplicata com alça descartável de 1 µL em 2 mL de meio TSB, seguido de 15 segundos de vórtex. Uma réplica permaneceu sem (mCIM) e na outra foi adicionado 20 µL de 0,5 M EDTA para obter a concentração final de 5 mM (eCIM). Um disco de carbapenêmico, no caso 10 µg IPM, foi adicionado em todos os inóculos e estes foram incubados sob agitação de 250 RPM a 37 °C durante 4 horas a fim de se obter indução das beta-lactamases. A *E. coli* ATCC 25922 indicadora foi semeada na placa ágar MH, como no ensaio de disco-difusão e, posteriormente, o disco de IPM de cada linhagem foi retirado do inóculo com uma alça descartável e aplicado na placa. As placas foram incubadas por 18-24 horas a 37 °C. Como controle de qualidade do ensaio, a linhagem *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 produtora de serina carbapenemase foi testada juntamente com as linhagens de *C. violaceum*. Ausência de halo em eCIM e mCIM indica serina carbapenemase; Ausência de halo em mCIM mas presença em eCIM indica produção de metalo-beta-lactamase; halos em eCIM e mCIM indicam a ausência de carbapenemase (CLSI, 2021).

3.5 Técnicas de clonagem e biologia molecular

3.5.1 Reações de PCR e eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos dos genes de interesse para a clonagem e sequenciamento foram amplificados por PCR utilizando a enzima de alta fidelidade Phusion DNA polimerase (Thermo Scientific #F503F). O volume final das reações foi de 50 µL,

contendo 0,5 µL de DNA molde, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 5), 0,2 mM mix de dNTP, 1X Phusion HF buffer, 0,02 U/µL de Phusion DNA polimerase, 3% DMSO e água Milli Q. Os ciclos utilizados para as reações foram: desnaturação inicial a 98 °C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento com temperatura média calculada pela *melting temperature* (T_m) dos oligonucleotídeos por 30 segundos, e extensão a 72 °C por tempo determinado de acordo com os tamanhos dos fragmentos a serem amplificados (30 segundos a cada 1 kb); extensão final a 72 °C por 5 minutos e, ao final, as reações mantidas a 4 °C.

Para reações de PCR de clonagem no vetor pGEM-T-Easy, foi utilizado a enzima Taq DNA polimerase (Thermo Scientific #EP046) no volume final de 50 µL por reação. Foi utilizado 0,5 µL de DNA molde, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 5), 0,2 mM mix de dNTP, 1X Taq buffer KCl, 2 mM MgCl₂, 0,06 U/µL de Taq DNA polimerase, 5% DMSO e água Milli Q.

Já as reações utilizando como molde colônias bacterianas foram realizadas em 20 µL finais, contendo 1 µL de colônia ressuspensa em água Milli Q, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 5), 0,2 mM mix de dNTP, 1X Taq buffer (NH₄)₂SO₄, 1,25 mM MgCl₂, 0,05 U/µL de Taq DNA polimerase (Thermo Scientific #EP046; ou Cellco POL-100L), 5% DMSO e água Milli Q. Os ciclos utilizados para as reações foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a temperatura média calculada com a *melting temperature* (T_m) dos oligonucleotídeos por 30 segundos, e extensão a 72 °C por tempo determinado de acordo com os tamanhos dos fragmentos a serem amplificados (60 segundos a cada 1 kb); extensão final a 72 °C por 5 minutos e ao final, as reações mantidas a 4 °C.

Os produtos amplificados, em ambos os casos, foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0.8%, 1% ou 2% em tampão 0,5X TBE (*Tris-borate-EDTA* - [44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA]), com o marcador de DNA GeneRuler 1 Kb Plus (Thermo Scientific SM1331) e quando necessário, recuperados do gel com o kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel 740609.250).

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

NOME	SEQUÊNCIA 5' → 3'	APLICAÇÃO
CV0566_Seq_FW	TGGACATGATGCGCCTCAAG	Sequenciamento do gene CV_0566 (<i>ampD1</i>) nas linhagens, 1259 pb.
CV0566_Seq_RV	CGTTCTACCTGGGCTTCAGC	
CV0566del1	TACCGGAAGCTTGAACCTCTGCAGCTCGTTGC	Clonagem em pNPTS138 com sítio HindIII e BamHI para deleção de CV_0566 (<i>ampD1</i>), 626 pb.
CV0566del2	TACCGGGGATCCAGCTCCCTCACTTCAAACGG	
CV0566del3	TACCGGGGATCCAAGACCGATCCCGGTCCCTG	Clonagem em pNPTS138 com sítio BamHI e EcoRI para deleção de CV_0566 (<i>ampD1</i>), 577 pb.
CV0566del4	TACCGGGAATTCGTTGGAGCAGAGCGAACTGG	
CV1309_Seq_FW	TGGCTGGGTTTGGCTTTTCC	Sequenciamento do gene CV_1309 (<i>ampD2</i>) nas linhagens, 1225 pb.
CV1309_Seq_RV	CAGGTCCCGATTGGGAAAGC	
CV1309del1	GATTACAGGATCCGTGGGCGCTCAATTCACCTTG	Clonagem em pGEM seguido de pMR20 com sítio BamHI e Sall para
CV1309del4	GATTACAGTCGACCCAGTTGCAGCAGCGAGACG	complementação de mutante CV_1309 (<i>ampD2</i>), 1993 pb (NEME, 2019).
CV3031_Seq_FW	GCATTGCTCATCACAGACGTG	Sequenciamento do gene CV_3031 (<i>ampD3</i>) nas linhagens, 1195 pb.
CV3031_Seq_RV	ACACTCCACTTGCCTACTGG	
CV3031del1	TACCGGAAGCTTGCATCAGGATTCCTAACAGGG	Clonagem em pNPTS138 com sítio HindIII e BamHI para deleção de CV_3031 (<i>ampD3</i>), 605 pb.
CV3031del2	TACCGGGGATCCAAACCCCTTAATAGCACGATAGC	
CV3031del3	TACCGGGGATCCGCGATCTTGTATGCGCTGGTG	Clonagem em pNPTS138 com sítio BamHI e EcoRI para deleção de CV_3031 (<i>ampD3</i>), 588 pb.
CV3031del4	TACCGGGAATTCGCCAGTCTCCGGGAAACAG	
CV1310_Seq_FW	GAATGGGACGAGAAAACCAGG	Sequenciamento do gene CV_1310 (<i>ampC</i>) nas linhagens, 1846 pb.
CV1310_Seq_RV	GTGCCGGGAACATAAGCGAAC	
CV1310_RTqPCR_FW	CATTTCGACCAGGCGATGGAA	Análise de expressão do gene CV_1310 (<i>ampC</i>) por RT-qPCR, 119 pb.
CV1310_RTqPCR_RV	CTTGCCCTGCCTTGGCATAAC	
CV1310_Promot_FW	GATTACGGATCCGAAGAGGGAGAGCATCCCTG	Região promotora do gene CV_1310 (<i>ampC</i>) usada como sonda para EMSA, sítios BamHI e HindIII, 220 pb (B. B. BATISTA, não publicado).
CV1310_Promot_RV	GATTACAAGCTTGGATTGCATCATCGCGGAAC	Produção de <i>bead</i> com biotina do gene CV_1310 (<i>ampC</i>) com CV1310_Promot_RV para <i>pull-down</i> , 220 pb.
CV1310_PromBiot_FW	BIOTINA-GAAGAGGGAGAGCATCCCTG	
CV3150_Seq_FW	GAAATCGGCAAACGCTCGGGA	Sequenciamento do gene CV_3150 (<i>cphA</i>) nas linhagens, 1310 pb.
CV3150_Seq_RV	CACCGTCATCGATTTCCGCCAG	
CV3150_RTqPCR_FW	GGAACGCATACTGGAAGTCCA	Análise de expressão do gene CV_3150 (<i>cphA</i>) por RT-qPCR, 123 pb.
CV3150_RTqPCR_RV	CCGATAATCGGGAAAGCCG	
CV3150_Comp_FW	GATTACAAGCTTTCGGTTACGGCAGTTACGGC	Região promotora do gene CV_3150 (<i>cphA</i>) usada

(Continua)

(Conclusão)

NOME	SEQUÊNCIA 5' → 3'	APLICAÇÃO
CV3150del2	GATTACCTGCAGTGTGCGCATCTTGATATCCACA	como sonda para EMSA, sítios HindIII e PstI, 192 pb (NEME, 2019).
CV3150_PromBiot_FW	BIOTINA-GGTCATGTCGTTTCGGTTACGG	Produção de <i>bead</i> com biotina do gene CV_3150 (<i>cphA</i>) com CV3150del2 para <i>pull-down</i> , 202 pb.
CV2058_RTqPCR_FW	TCGGCATCAATACGGCCAAA	Análise de expressão do gene CV_2058 (<i>rpoE</i>) por RT-qPCR, 122 pb.
CV2058_RTqPCR_RV	GTTCAGGTCGGGAATTTGGC	
CV0004_Seq_FW	CTCCCCGTGAGTAAAAGATGC	Sequenciamento do gene CV_0004 nas linhagens, 2080 pb.
CV0004_Seq_RV	GATGAACCCGGAACAGCTGTG	
CV1248_Seq_FW	CAGCGGCTGGATTGGACTGC	Sequenciamento do gene CV_1248 nas linhagens, 2283 pb.
CV1248_Seq_RV	CGGAAAGGCTTCATTGCTGTG	
CV2224_Seq_FW	TCCAGTCGGACAATCGGCAG	Sequenciamento do gene CV_2224 nas linhagens, 2001 pb.
CV2224_Seq_RV	CGAAGGCGCTCTTGAAGATCA	
CV2556_Seq_FW	CTTGATGGTGGCGCGCTGAC	Sequenciamento do gene CV_2556 nas linhagens, 1928 pb.
CV2556_Seq_RV	GCAATACCAGAAGCTGTTCTCG	
CV1922_MODEL_UP	CCGATTGACTGACAGATAAGCC	Amplificação da região como CV_1923 e CV_1922 com sítio Sall, 2599 pb.
CV1922del4	TACCGGGTTCGACGCTGGCGAACTGCTGCGTCA	
CV1922_Mut_FW	CCTAGCAAGCTTCCAGATCATCGACCACAAGGG	Clonagem em pNPTS138 com sítio HindIII e Sall para inserção em CV_1922, 230 pb.
CV1922_Mut_RV	GGCCTAGTTCGACCCAGGTGGAAGCGGGAGTTG	
CV1922_Exp_FW	CCTAGCCATATGACCACCCTGCAGCCG	Clonagem em pET-15b com sítios NdeI e BamHI para expressão heteróloga de CV_1922, 675 pb.
CV1922_Exp_RV	GGCCTAGGATCCTCAGTGATTGGCCTGCTGG	
M13_FW	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenciamento das construções realizadas no vetor suicida pNPTS138 (M. R. K. Alley, não publicado).
M13_RV	AGCGGATAACAATTTAC	Verificação da clonagem em pRK/ <i>lacZ</i> 290 com o primer FW do inserto (GOBER & SHAPIRO, 1992).
<i>lacZ</i> 290UP	TGACGGCTATCACCATCA	
CV4090_Comp_FW	CCTAGCGGTACCGGATGCTCACACCATTCTCGC	Região promotora do gene CV_4090 (<i>cviR</i>) usada como sonda para EMSA, sítios KpnI e HindIII, 302 pb (ALCOFORADO, J. D., não publicado).
CV4090del2	GGCCTAAAGCTTGAGCGGTCTTGCATTGATGGG	
CV2255_RTqPCR_FW	GCAATCACGTCTTTATCGGGC	Região promotora do gene CV_2255 usada como sonda para EMSA, 112 pb (B.B. BATISTA, não publicado).
CV2255_RTqPCR_RV	TCTTCTATCACCCTGGCGC	

3.5.2 Clonagem

Os produtos de PCR recuperados do gel foram digeridos com as enzimas de restrição (Thermo Scientific) adequadas para os sítios de restrição adicionados à montante do início dos primers (Tabela 5). O vetor plasmidial a ser utilizado para clonagem foi diferido do mesmo modo. As reações foram realizadas com o volume final de 20 μ L, variando a composição e as condições de incubação de acordo com a(s) enzima(s) e o tampão utilizado.

A ligação dos insertos aos vetores previamente digeridos foi realizada em reações finais de 20 μ L com 200 U da enzima T4 DNA ligase (Biolabs M0202S), no tampão de ligação fornecido pelo fabricante, por 16 horas a 16 °C.

Ao todo, 2 μ L da reação de ligação foi utilizado para transformar alíquotas de 40 μ L de *E. coli* DH5 α eletrocompetente. A eletroporação foi feita em cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad 165-2086) a 2500 V, 200 Ω e 25 μ F. Posteriormente, as células passaram pela recuperação em 1 mL de LB sob agitação de 250 RPM por 1 hora e enfim inoculadas em ágar LB suplementado com o antibiótico apropriado para seleção dos transformantes. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Colônias isoladas foram recuperadas e analisadas por PCR através da amplificação do inserto conforme descrito no tópico anterior. As colônias escolhidas foram então inoculadas em LB suplementado com o antibiótico apropriado para seleção e incubadas a 37 °C por 24 horas sob agitação de 250 RPM. Posteriormente, 3 mL da cultura foi utilizado para preparação de DNA plasmidial (miniprep), usando o kit comercial NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel 740727).

Para os ensaios de conjugação, 3 μ L de miniprep foram utilizados para transformar alíquotas de 40 μ L de *E. coli* S17-1 eletrocompetente nas mesmas condições descritas anteriormente. Na conjugação, *E. coli* S17-1 e *C. violaceum* (selvagem e/ou mutantes) foram misturadas sobre ágar LB com alça de platina. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Após este período, toda massa bacteriana foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e ressuspenso em 1 mL de LB. Cem microlitros desta suspensão foi inoculada com auxílio de esferas de vidro ou alça de Drigalski em uma placa com ágar LB suplementado com ampicilina a 100 μ g/mL e o antibiótico usado como marca de seleção do vetor. Após a secagem, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Colônias isoladas de *C. violaceum* que cresceram na placa foram repicadas em uma placa com ágar LB suplementado

com o antibiótico usado como marca de seleção do vetor para posterior uso ou congelamento a - 80 °C de cultura em glicerol 20%.

3.5.3 Obtenção de mutantes nulos por dupla recombinação homóloga

Como estratégia para analisar a função dos genes parálogos de amidase em *C. violaceum*, foram construídos mutantes nulos com a deleção da região codificadora por meio de troca alélica (SANTOS *et al.*, 2020). A estratégia utilizada na obtenção destes mutantes segue inicialmente com a amplificação das regiões flanqueadoras (aproximadamente 700 pb) dos genes que serão deletados do genoma. Para isto, foram utilizados, como descrito no tópico 3.5.1, a PCR de clonagem utilizando a enzima de alta fidelidade Phusion DNA polimerase e oligonucleotídeos com sítios de enzimas de restrição na extremidade 5' identificados na tabela 5 como del1/2 e del3/4. Os produtos obtidos foram digeridos com a enzima em comum no sítio presente nos oligonucleotídeos del2 e del3 (região interna). A ligação desses fragmentos pela T4 ligase foi realizada conforme descrito no tópico 3.5.2 e então utilizado como molde para a PCR de clonagem usando os primers identificados como del1 e del4 (Tabela 5). Estes novos fragmentos foram digeridos com as enzimas dos sítios del1 e del4 (regiões externas) que também estão presentes no MCS (*Multiple Cloning Sites*) do vetor suicida pNPTS138. A ligação do inserto final no vetor foi realizada e transformada em *E. coli* DH5 α . As minipreps das construções finais foram confirmadas por sequenciamento utilizando os primers del1, del4, M13_FW e M13_RV (Tabela 5).

Após a transferência para *C. violaceum* por conjugação com *E. coli* S17-1, estas construções se inserem no genoma por meio de recombinação homóloga (Figura 12) e são confirmadas por PCR de colônia. Para que ocorra a segunda recombinação homóloga, as colônias transconjugantes foram inoculadas em LB e incubadas por 48 horas a 37 °C sob agitação de 250 RPM. Após, a seleção dessas linhagens é realizada com o inóculo de 1 μ L da cultura em placas com ágar LB suplementado com 20% de sacarose e/ou 16% de sacarose e incubadas por 48 a 72 horas a 37 °C. A seleção por sacarose é realizada pelo gene *sacB* presente no vetor pNPTS138, uma enzima que metaboliza a sacarose em um subproduto tóxico para as bactérias que permaneceram com o vetor. Portanto, as colônias emergentes resistentes a sacarose passa por uma segunda seleção com o intuito de triar aquelas com sensibilidade a canamicina (50 μ g/mL) suplementada em ágar LB. Estas colônias

sensíveis apresentam dois cenários distintos após a segunda recombinação, onde (i) pode ter ocorrido a reversão da bactéria à linhagem selvagem ou (ii) a deleção do gene de interesse (Figura 12). A validação da deleção foi feita por PCR de colônia utilizando os primers del1 e del4 de cada gene (Tabela 5). Os mutantes nulos combinados foram obtidos a partir da repetição dessa metodologia nos mutantes já obtidos. As linhagens confirmadas como mutantes foram mantidas a - 80 °C em 20% de glicerol.

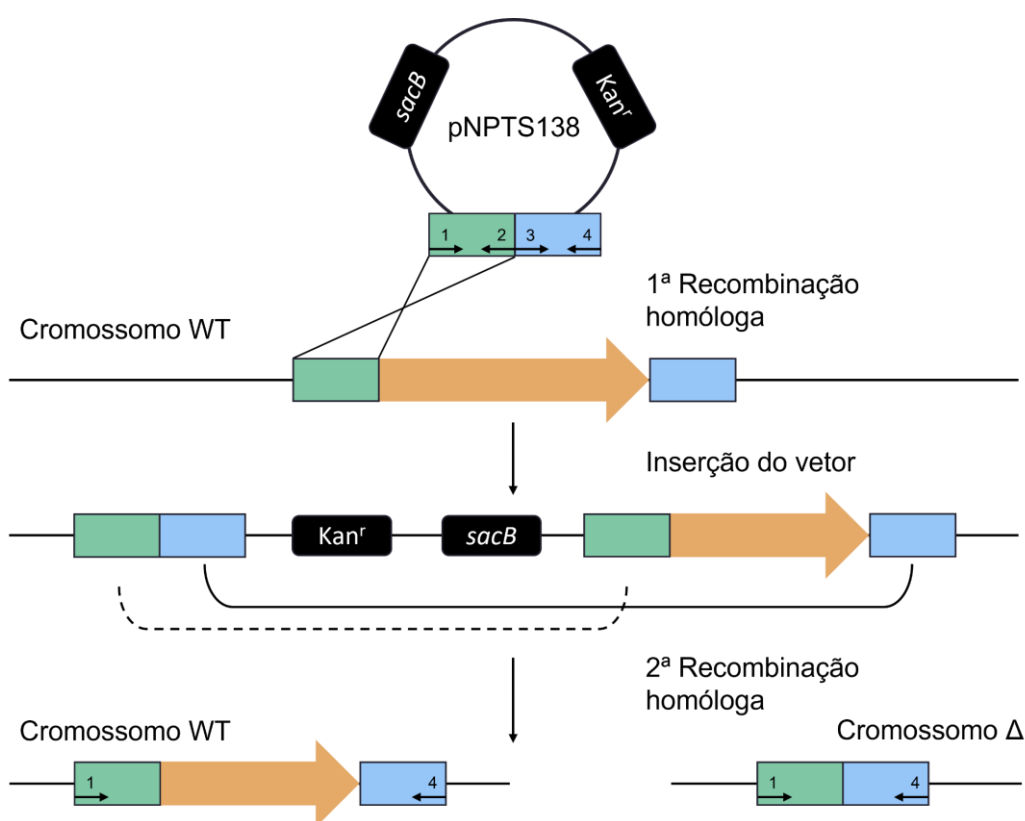


Figura 12. Esquema para obtenção de mutantes nulos. As regiões flangeadoras (verde e azul) do gene a ser deletado (laranja) foram digeridas e ligadas no vetor suicida pNPTS138 para clonagem. A introdução desta construção em *C. violaceum* permite sua inserção no cromossomo por meio de recombinação homóloga. Após um evento de segunda recombinação homóloga, é realizada a seleção de colônias resistentes a sacarose e a sensíveis à canamicina. Neste ponto, pode ocorrer a reversão da bactéria à linhagem selvagem (colchete tracejado) ou a deleção do gene de interesse (colchete contínuo). As setas numeradas de 1 a 4 representam os primers utilizados para amplificar as regiões flangeadoras, sendo o par 1 e 4 utilizado para confirmar os eventos de recombinação.

3.5.4 Obtenção de mutantes de inserção por recombinação homóloga simples

Para avaliar a função do gene CV_1922 frente a resistência a antibióticos, uma estratégia similar a explicada no tópico anterior foi realizada, mas com o objetivo de interromper a região codificadora do gene de interesse com a inserção do vetor suicida

pNPTS138 (Figura 13) (PREVIATO-MELLO *et al.*, 2017). Para isto, um fragmento interno de 230 pb da região codificadora do gene CV_1922 foi amplificado e clonado no vetor suicida como descrito nos tópicos anteriores. Essa construção foi introduzida em *C. violaceum* ATCC 12472 por conjugação. As colônias resistentes à canamicina a 50 µg/mL passaram pelo evento de recombinação homóloga e podem ter o gene interrompido pela inserção do vetor. A confirmação foi realizada por PCR de colônia com um oligonucleotídeo do vetor (M13_FW) e outro localizado no começo na região codificadora, fora da região de recombinação (Tabela 5). As linhagens confirmadas como mutantes foram mantidas em 20% de glicerol e congeladas a - 80 °C. Para complementação dos mutantes, os respectivos genes foram amplificados por PCR e clonados no vetor replicativo pMR20. As construções resultantes foram transferidas por conjugação para os mutantes de *C. violaceum*.

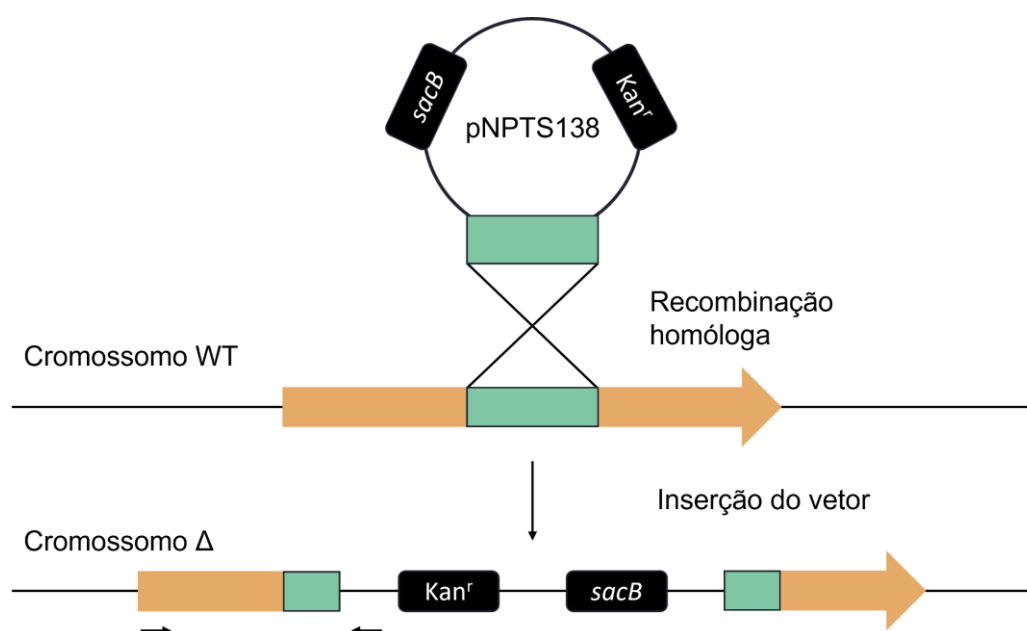


Figura 13. Esquema para obtenção de mutantes de inserção. A região interna (verde) do gene a ser interrompido (laranja) foi clonada no vetor suicida pNPTS138. Por meio da recombinação homóloga, a construção foi inserida dentro da região codificadora do gene, inativando-o. As setas indicam a posição dos primers utilizados na confirmação dos mutantes de inserção.

3.5.5 Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCRs purificados foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) com a finalidade de ajustar a concentração para 40 ng/µL. As reações de sequenciamento de Sanger foram preparadas utilizando o kit BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems) com oligonucleotídeos adequados

(Tabela 5), conforme o protocolo disponibilizado pelo fabricante. A precipitação das reações foi gerada com a adição de isopropanol 75% e duas consecutivas lavagens com etanol 70%. Os sequenciamentos foram realizados no ABI 3500XL do Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.5.6 Extração de DNA total e sequenciamento completo do genoma (WGS)

Para extração de DNA total de *C. violaceum*, um pré-inóculo *overnight* foi incubado a 37 °C sob agitação de 250 RPM. Em seguida, a cultura foi diluída para DO_{600 nm} de 0,1 em 10 mL de LB em Erlenmeyer com volume de 125 mL e incubado a 37 °C e 250 RPM por aproximadamente 4 horas para atingir a DO_{600 nm} entre 3 e 4 (fase exponencial). Após este período, 1 mL da cultura foi centrifugado em microtubos de 1,5 mL a 25 °C, 20.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o DNA total foi extraído usando o kit PureLink™ Genomic DNA Mini (Invitrogen K1820-01). A quantificação do DNA total foi realizada em Nanodrop e as amostras foram enviadas à *facility* NGS Soluções Genômicas em Piracicaba-SP para sequenciamento completo do genoma (WGS) em plataforma Illumina NextSeq 2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA). A qualidade do sequenciamento de cada amostra foi avaliada com FastQC versão 0.11.8 (Andrews, 2010). A chamada de variantes foi feita usando Snippy versão 4.3.0 (<https://github.com/tseemann/snippy>) e GATK versão 4.2.6.1 (Garrison & Marth, 2012). A cobertura ficou acima de 550X e o mapeamento no genoma de referência ficou acima de 99%. A referência para o mapeamento foi o genoma de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (BNPC, 2003).

3.6 Análise da expressão gênica diferencial

Para analisar genes específicos que possuam expressão alterada nas linhagens mutantes quando comparadas à linhagem selvagem, foram realizados diferentes ensaios com a linhagem selvagem e mutantes obtidos durante este trabalho.

3.6.1 Ensaio de atividade de beta-galactosidase

Os níveis de expressão do gene *lacZ*, sob controle das regiões promotoras dos genes CV_1310 e CV_3150 clonadas no vetor pRK/*lacZ*290, foram avaliados para determinar a atividade destas regiões por ensaio de beta-galactosidase em diferentes linhagens de *C. violaceum* (WT e mutantes espontâneos) (SANTOS *et al.*, 2020; DE LIMA *et al.*, 2022). Inicialmente, pré-inóculos em 2 mL de LB com tetraciclina foram preparados com as linhagens de interesse e mantidas *overnight* incubadas sob agitação de 250 RPM a 37 °C. No dia seguinte, os pré-inóculos foram diluídos para DO_{600 nm} 0,1 em 2 mL de LB e as culturas incubadas a 37 °C sob agitação de 250 RPM até DO₆₀₀ 1. Após o crescimento, as culturas foram usadas no ensaio e, somente em casos de ausência de atividade da enzima, os inóculos foram tratados com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas por 30 minutos nas mesmas condições anteriormente citadas.

Das culturas, apenas 100 µL foi usado, sendo adicionado a tubos contendo 800 µL de tampão Z [60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7,0, 5 mM β-mercaptoetanol], 100 µL de clorofórmio e 25 µL de SDS 0,1% (p/v). Os tubos foram vortexados e incubados a 30 °C por 5 minutos para a permeabilização das células bacterianas. Posteriormente, 200 µL de ONPG 0,4% (p/v) (*ortho-Nitrophenyl-β-galactoside*) (Thermo Scientific 34055) foram adicionados nos tubos, os quais foram novamente vortexados e incubados nas mesmas condições. A reação foi finalizada ao adicionar 400 µL de 1 M Na₂CO₃ e vortexar. Os tubos foram centrifugados a 21.000 x g e a fase líquida superior foi lida em DO_{420 nm}. Por fim, as unidades de Miller de cada reação foram determinadas, normalizando pela DO_{600 nm} das culturas (SANTOS *et al.*, 2020; DE LIMA *et al.*, 2022).

$$\text{Unidades de Miller} = 1000 \times \left(\frac{A_{420}}{[\text{Tempo em minutos} \times \text{Volume de células em mL} \times A_{600}]} \right)$$

3.6.2 Extração de RNA total

Um pré-inóculo *overnight* foi preparado em 2 mL de LB e incubado a 37 °C sob agitação de 250 RPM. Após, a cultura foi diluída para DO_{600 nm} 0,01 em 10 mL de LB em Erlenmeyer com volume de 125 mL e incubado a 37 °C e 250 RPM por

aproximadamente 4 horas para atingir a $DO_{600\text{ nm}}$ entre 0,8 e 1. Após este período, 1,5 mL da cultura foram centrifugados em microtubos de 2 mL a 25 °C, 20.000 x g por 1 minuto. O *pellet* foi ressuspensionado em 500 µL do reagente TRIzol (Invitrogen 15596026) e utilizado para extração do RNA total utilizando o kit Direct-zol RNA miniprep plus (Zymo R2072-200). A qualidade das amostras de RNA total foi avaliada em gel desnaturante [1,2% agarose, 7% formaldeído, 1X MOPS] e por PCR para garantir a ausência de DNA contaminante. A quantificação do RNA total foi realizada em Nanodrop. O RNA foi extraído de 3 réplicas biológicas e armazenado a - 80 °C.

3.6.3 RT-qPCR

Os níveis de expressão dos genes alvos foram analisados pela quantidade de mRNA por qPCR. Para sintetizar o cDNA, inicialmente a quantidade de RNA total extraído foi ajustada para 2 µg por amostra. As reações com volume final de 20 µL foram realizadas utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems 4374966) conforme protocolo do fabricante. Dessa forma, a concentração final de cDNA por reação foi de 100 ng/µL. Após, a quantidade de cDNA foi ajustada para 10 ng para ser utilizada na reação de qPCR. Da mesma forma, os primers utilizados ficaram na concentração final de 500 nM em 10 µL de reação. Conforme o protocolo do fabricante, as reações foram realizadas com o kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems A25742).

A amplificação ocorreu no termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems). As condições de ciclagem seguiram a recomendação do fabricante: 50 °C por 2 minutos seguido de 95 °C por 2 minutos para ativação da fluorescência; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 segundo, anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. A etapa de dissociação padrão (*melt curve stage*) teve início imediato após o final da reação seguindo as seguintes condições: 1,6 °C/segundo a 95 °C por 15 segundos, 1,6 °C/segundo a 60 °C por 1 minuto e 0,15 °C/segundo a 95 °C por 15 segundos. A análise dos resultados foi realizada no software QuantStudio™ Design & Analysis v1.5.2 com a normalização dos resultados para o gene endógeno *minD* (CV_3376).

3.7 Análises fenotípicas

3.7.1 Ensaio de curva de crescimento

Para avaliar a aptidão das linhagens obtidas neste trabalho, o crescimento bacteriano foi acompanhado ao longo do tempo por meio de medições de absorbância por comprimento de onda de 600 nm no aparelho BioTek Epoch 2 (Agilent). Um pré-inóculo *overnight* em 2 mL de LB das linhagens testadas foi ajustado para $DO_{600\text{ nm}} 0,01$ e 150 μL desta diluição foram adicionados em placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano e levadas ao leitor de placas para incubação sob agitação orbital de 425 RPM a 37 °C durante 18 horas. As medições foram realizadas a cada meia hora. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

3.7.2 Ensaio de viabilidade

A fim de quantificar UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro) dos mutantes nulos obtidos neste trabalho, foi realizado o ensaio de viabilidade conforme protocolo estabelecido por Santos e colaboradores (2020). Para isso, um pré-inóculo ON crescido a 37 °C sob agitação de 250 RPM foi diluído em 5 mL de LB para a $DO_{600\text{ nm}} 0,01$ e incubado em shaker a 37 °C, 250 RPM por 20 horas. Após esse período, 1,65 mL da cultura foi centrifugado para posterior ressuspensão do *pellet* em 1 mL de 1X PBS (*phosphate buffered saline*) para que a concentração inicial seja de 1×10^{10} UFC/mL de *C. violaceum*. Diluições seriadas de 1:10 com volume final de 1 mL foram realizadas em 1X PBS. A diluição 10^{-7} ou menor, dependendo da linhagem, foi semeada em placa com ágar LB em quadruplicada, utilizando um volume de 100 μL . Dessa forma, após o período de incubação das placas por aproximadamente 20 horas a 37 °C, foi feita a contagem das colônias. Para quantificação, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$UFC/mL = \frac{\text{média do nº de colônias obtidas}}{\text{diluição utilizada} \times \text{volume plaqueado (mL)}}$$

3.7.3 Ensaio de biofilme

A formação de biofilme das linhagens mutantes e selvagem foi avaliada e quantificada utilizando o método de coloração por cristal violeta (AZEREDO *et al.*, 2017). Após cultivo em pré-inóculos de 2 mL em LB sob agitação de 250 RPM a 37 °C *overnight*, as linhagens de *C. violaceum* foram diluídas para uma DO_{600 nm} inicial de 0,01 em 1 mL de LB e incubadas a 37 °C por 16 e 24 horas sem agitação para acompanhamento da cinética da formação de biofilme em tubos de vidro. Após o período de incubação, a cultura foi descartada, foram adicionados 1,5 mL de cristal violeta 0,1%, seguido de incubação por 15 minutos para coloração do biofilme. Os tubos foram lavados, secados a 65 °C e posteriormente, 1 mL ácido acético 33% foi acrescentado. Após 1 hora em temperatura ambiente, cada tubo teve o biofilme solto com auxílio de uma escova de garrafa. A DO_{600 nm} do biofilme aderido aos tubos foi quantificada em espectrofotômetro.

3.7.4 Ensaio de violaceína

A quantificação da produção de violaceína foi feita após sua solubilização em acetona e leitura de absorbância (SANTOS, 2021). Para isto, após cultivo em pré-inóculo de 2 mL de LB sob agitação de 250 RPM a 37 °C *overnight*, as linhagens mutantes e selvagem de *C. violaceum* foram diluídas para uma DO_{600 nm} inicial de 0,01 em 2 mL de meio LB e incubadas a 37 °C por 24 horas sob agitação de 250 RPM. Após esse período, 500 µL de cada cultura foram coletados e vortexados com mais 500 µL de acetona por 30 segundos. As amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 5 minutos e a fase contendo violaceína foi coletada para quantificação da absorbância por comprimento de onda de 575 nm.

3.7.5 Ensaio de motilidade (*swimming*)

A avaliação de motilidade dependente de flagelo do tipo *swimming* dos mutantes nulos foi realizada em meio M9HC semissólido [1X M9 sais; 0,4% glicose; 2 mM MgSO₄; 100 µM CaCl₂; 0,1% hidrolisado de caseína; 0,3% ágar; água Milli Q] de acordo com protocolo descrito previamente (SANTOS *et al.*, 2021). Para isto, um pré-inóculo *overnight* preparado em M9HC foi diluído a DO_{600 nm} inicial de 0,1 e 5 µL

foram inoculados no interior de placas com 50 mL de M9HC semissólido. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas com medição dos halos de *swimming* (em cm²) a cada 24 horas, usando software FIJI imageJ.

3.8 Ensaio de ligação de fator de transcrição ao DNA

Para analisar a interação direta entre o regulador transcricional CV_1922 da família GntR e a região promotora dos genes das beta-lactamases, foi realizado ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel (EMSA ou gel shift).

3.8.1 Purificação de proteínas

A proteína recombinante His-GntR (CV_1922) foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-15b com a região codificadora do gene CV_1922 clonada (SANTOS *et al.*, 2020). O pré-inóculo *overnight* foi diluído a DO_{600 nm} de 0,05 em 500 mL de LB com 100 µg/mL de ampicilina e incubado a 37 °C sob agitação de 250 RPM. Após a cultura atingir a DO_{600 nm} entre 0,4 e 0,6, foi adicionado 1 mM de IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) na cultura e esta foi incubada novamente para indução a 37 °C com agitação durante 2 horas. Em seguida, a cultura foi centrifugada em garrafas de polipropileno de 250 mL (Nalgene) a 4 °C, 5.000 x g por 15 minutos. O *pellet* seco foi armazenado a - 20 °C. A fim de verificar a qualidade da indução, amostras de 1 mL da cultura antes da adição de IPTG e após a indução foram coletadas, centrifugadas por 5 minutos a 12.000 x g e os *pellets* ressuspensos em tampão 1X SDS gel-loading [50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,1% azul de bromofenol; 100 mM DTT; H₂O Milli Q] (SDS - *sodium dodecyl sulfate*; DTT - *dithiothreitol*) (SAMBROOK *et al.*, 2001).

Para purificação da proteína recombinante, o *pellet* armazenado foi ressuspensado em 20 mL de tampão de lise [50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol pH 7,4; 1 mM PMSF; H₂O Milli Q]. Para romper as células bacterianas, foi feita sonicação com 15 pulsos de 30 segundos com amplitude de 85% e intervalo de 30 segundos, mantendo a mistura homogênea do *pellet* no tampão de lise sempre em gelo. A solução sonicada foi tratada com 2 mL de 10% estreptomicina por 20 minutos a 4 °C e agitada lentamente antes de ser centrifugada a 15.000 x g, 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi filtrado em membrana

de 0,45 µm (Millipore) usando bomba a vácuo. O extrato solúvel centrifugado e filtrado foi purificado seguindo o protocolo recomendado pela Qiagen para a coluna de níquel Ni-NTA Superflow de 5 mL acoplada em bomba peristáltica P1 (GE Healthscience). A purificação foi feita em tampão fosfato [50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,4; 300 mM NaCl], acrescido de 500 mM imidazol para eluição.

A presença de proteína nas alíquotas de eluição foi verificada por coloração pelo ensaio de Bradford (Quick Start Bradford 1x Dye - BioRad). As amostras foram concentradas usando a coluna VivaSpin 6 Concentrator (Sartorius Stedim Biotech) e dessalinizadas utilizando a coluna de filtração Disposable PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare). A proteína purificada foi armazenada em tampão de estocagem [20 mM Tris-Cl pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA pH 8; 5% de glicerol; H₂O Milli Q]. Estas amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% juntamente com as alíquotas coletadas durante o processo de purificação. As proteínas foram visualizadas após o gel ser corado e descorado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad corante-1610436; descolorante-1610438) e analisado no aparelho ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) e no software Image Lab v6.1 (Bio-Rad).

A quantificação da proteína foi realizada por absorvância a 280 nm, usando o coeficiente de extinção da proteína recombinante segundo o programa Protparam Tool (Expasy <http://www.expasy.ch>) (GASTEIGER *et al.*, 2005):

$$Proteína [final em Molar] = \frac{DO\ 280\ nm \times\ diluição\ utilizada}{coeficiente\ de\ extinção}$$

3.8.2 Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA)

As regiões promotoras de genes utilizadas como sondas específicas (CV_1310 - *ampC* e CV_3150 - *cphA*) e não-específicas foram amplificadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos listados na tabela 5 e a enzima de alta fidelidade Phusion DNA polimerase. Após serem submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, as sondas foram purificadas com o kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL 740609.250). As reações de ligação ao DNA foram feitas em um volume de 20 µL contendo tampão de interação [20 mM Tris-HCl pH 7,4; 50 mM KCl; 1 mM EDTA pH 8,0, 50 µg/mL BSA, 5% glicerol; H₂O Milli Q], sondas de DNA e quantidades de 0, 5, 10, 25, 50, 100 µM da proteína purificada e reduzida com 10 mM DTT. Reações de

controle negativo foram realizadas utilizando sondas de DNA inespecíficas de regiões codificadoras (CV_2255) e promotora (CV_4090). Todas as reações de interação foram incubadas a 25 °C por 25 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, 3 µL de glicerol 50% foi adicionado em cada amostra, as quais foram aplicadas em gel nativo de poliacrilamida 5% [0,5X TBE, 5% mix poliacrilamida, 0,1% APS, 0,01% TEMED, água Milli Q] (APS - *ammonium persulfate*). A eletroforese foi realizada em tampão 0,5X TBE por 60 minutos a 30 mA. Por fim, os géis foram corados em 10 mg/mL de brometo de etídio e analisados sobre exposição à radiação ultravioleta em transiluminador.

3.9 Ensaio de *pull-down* de afinidade ao DNA

Para identificar a proteína responsável pela regulação do promotor das beta-lactamases, foi realizado um ensaio de *pull-down* conforme descrito por Chaparian & Kessel (2020), com modificações. Sondas de DNA da região intergênica dos genes CV_1310 (*ampC*) e CV_3150 (*cphA*) foram amplificadas conforme o protocolo de PCR com a enzima Phusion no tópico 3.5.1. Para cada reação, foi utilizado um primer *forward* com uma modificação na extremidade 5' com a adição de biotina. Os produtos de PCR purificados da agarose com o kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel 740609.250) e foram armazenados a - 20 °C.

A partir de um pré-inóculo *overnight*, inóculos da linhagem selvagem com e sem 100 µg/mL de ampicilina e do mutante nulo $\Delta ampD1$ ajustado a $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,01 em 100 mL de LB foram preparados e incubados a 37 °C sob agitação de 250 RPM por aproximadamente 5 horas até atingir a $DO_{600\text{ nm}}$ entre 3 e 4. Os inóculos foram centrifugados em tubos cônicos de 50 mL a 2500 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram armazenados a - 80 °C. Os *pellets* das culturas foram ressuspensos em tampão BS/THES e sonificados com 5 pulsos de 15 segundos com amplitude de 30% e intervalo de 2 minutos, mantendo a mistura homogênea sempre em gelo. Uma etapa de pré-limpeza do lisado foi realizada adicionando 100 µL da *bead* de estreptavidina no lisado celular e incubado sob agitação por 1 hora para reduzir possíveis ruídos de proteínas biotiniladas que se ligam a estreptavidina. As *beads* foram imobilizadas e o lisado foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL.

Ao todo, cerca de 40 µg de cada sonda de DNA biotinilado foram preparados. Estas sondas foram incubadas sob leve agitação por 1 hora com 100 µL de

Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (Thermo Scientific 65001) em tampão 2X B/W (*binding/washing*) com a imobilização das *beads* com uma estante magnética. Após 3 lavagens consecutivas com tampão TE, as *beads* foram equilibradas com 2 lavagens consecutivas do tampão BS/THES, seguido da adição de 500 μL do tampão BS/THES suplementado com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de esperma de salmão (competidor não-específico) e incubado por 30 minutos.

Após a incubação das *beads* com o competidor não-específico, o sobrenadante foi descartado e as *beads* ressuspensas em 750 μL do tampão BS/THES com 50 μg de DNA de esperma de salmão. Duzentos microlitros do lisado foi adicionado as *beads* e incubado sob agitação por 1 hora. Posteriormente, as *beads* foram imobilizadas e lavadas com tampão BS/THES por 5 vezes.

Por fim, as *beads* foram ressuspensas em 60 μL do tampão de eluição e incubado por 2 minutos com agitação. A avaliação final do processo foi realizada em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) carregando 15 μL de cada amostra eluída acrescida da 5 μL de 4X *Laemmli Sample buffer* (Bio-Rad #1610747). As proteínas foram visualizadas após o gel ser corado e descorado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad corante-1610436; descolorante-1610438) e analisado no aparelho ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) e no software Image Lab v6.1 (Bio-Rad). As bandas de interesse foram recortadas e enviadas para identificação através de espectrometria de massa pela *facility* LaCTAD (aguardando análise).

4 RESULTADOS

Para identificar vias de sinalização e potenciais fatores de transcrição envolvidos na expressão das beta-lactamases AmpC (CV_1310) e CphA (CV_3150) de *C. violaceum*, foi utilizada a estratégia de (i) isolar mutantes espontâneos resistentes a antibióticos beta-lactâmicos, (ii) medir a expressão dos genes *ampC* e *cphA* nestes mutantes, (iii) identificar as mutações de modo dirigido a alguns genes ou por sequenciamento do genoma total que relacionem a resistência dos mutantes espontâneos aos beta-lactâmicos devido a expressão elevada de beta-lactamases, (iv) buscar de modo não enviesado por fatores de transcrição que regulem os genes das beta-lactamases, usando os promotores de *ampC* e *cphA* como iscas para ligação de proteínas regulatórias.

4.1 Isolamento de mutantes espontâneos resistentes a beta-lactâmicos devido a expressão elevada de beta-lactamases

Os mutantes espontâneos de *C. violaceum* foram inicialmente isolados em ágar Mueller Hinton (MH) suplementado com concentrações crescentes dos antibióticos beta-lactâmicos imipenem (IPM), um carbapenêmico, e cefoxitina (FOX), uma cefalosporina de 2ª geração. Pré-inóculos *overnight* da linhagem selvagem ATCC 12472 foram espalhados em placas MH suplementadas com IPM (0, 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL) ou FOX (0, 128, 256, 512 e 1024 µg/mL). Somente após o período de 48 horas, foram obtidas 5 colônias na placa com 16 µg/mL e 4 colônias em 32 µg/mL de IPM. Nos ensaios com FOX, foram obtidas 25 colônias na placa com 256 µg/mL. No entanto, ao avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e o perfil de resistência em ensaio de disco-difusão com IPM, FOX e nove outros antibióticos beta-lactâmicos, dois tipos distintos de resultados foram obtidos: (i) em ensaios com as bactérias vindas de placas MH contendo estes antibióticos, os mutantes possuíam resistência frente aos antibióticos testados; (ii) já em ensaios com as bactérias vindas de placas MH sem antibiótico, os mutantes se mostraram tão resistentes quanto à linhagem selvagem. Portanto, estes resultados sugerem que as colônias isoladas, na verdade, não são mutantes, apesar de tolerarem níveis elevados de IPM e FOX devido a hiperprodução transitória das beta-lactamases. De fato, dados prévios do nosso grupo indicam que os genes *ampC* e *cphA* de *C. violaceum* são fortemente induzidos por

IPM e FOX. Por serem fortes indutores de beta-lactamases, estes dois antibióticos não têm sido utilizados para o isolamento de mutantes espontâneos (MINAMI *et al.*, 1980; JACOBY, 2009; KOHLMANN *et al.*, 2018).

Para escolher um antibiótico beta-lactâmico que seja um fraco indutor das beta-lactamases de *C. violaceum*, foi realizado um teste de antagonismo, no qual observa-se a formação de halos com o formato da letra D em teste de disco-difusão com discos colocados próximos (Figura 10). Isto ocorre porque ao se difundirem, os beta-lactâmicos indutores fortes causam o aumento da produção de beta-lactamases, protegem as bactérias na borda do halo do indutor fraco (COURVALIN *et al.*, 2010; MICROBIOLOGIE CLINIQUE, 2021). Em placas MH semeadas com *C. violaceum* selvagem foram adicionados discos de antibióticos considerados indutores fracos próximos de discos de antibióticos considerados indutores fortes. Nestes ensaios, os antibióticos meropenem (MEM), imipenem (IPM), ceftazidima (CAZ), ampicilina (AMP) e amoxicilina com ácido clavulânico (AMC) causaram antagonismo ao aztreonam (ATM) e ceftazidima (CAZ), evidenciado pela distorção dos halos dos antibióticos antagonizados (Figura 14). Com isto, é possível concluir que MEM, IPM, FOX, AMP e AMC são indutores fortes, enquanto ATM e CAZ são indutores fracos de beta-lactamases em *C. violaceum*, resultados que condizem com o descrito na literatura para outras bactérias (MINAMI *et al.*, 1980; KOHLMANN *et al.*, 2018).

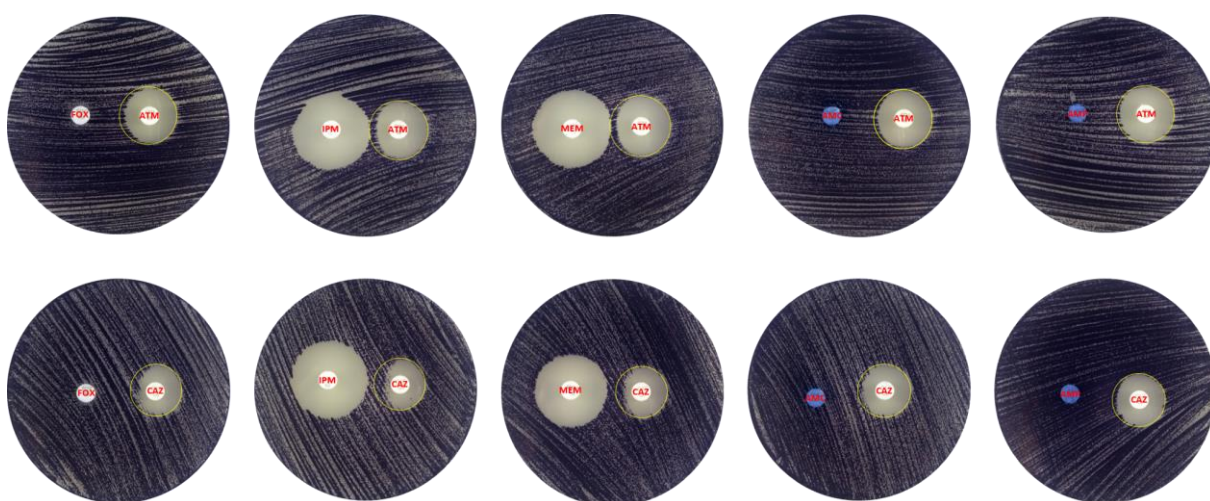


Figura 14. Teste de interação entre antibióticos indutores fracos ou fortes de beta-lactamases. Antibiogramas realizados em ágar MH semeado com a linhagem selvagem de *C. violaceum* utilizando MEM, IPM, FOX, AMP e AMC (indutores fortes) frente a ATM e CAZ (indutores fracos). As distorções nos halos estão indicadas por círculos amarelos.

Escolhemos CAZ para seleção de mutantes espontâneos, pois além de se mostrar um indutor fraco de beta-lactamases, durante os testes foi possível observar colônias isoladas que emergiram dentro dos halos de inibição de CAZ. Ainda, na literatura esta cefalosporina de 3ª geração já foi utilizada com este mesmo objetivo (HWANG & KIM, 2015; LAHIRI *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2022). Portanto, o ensaio de prospecção de mutantes espontâneos foi refeito utilizando *C. violaceum* ATCC 12472 em placas MH suplementadas com CAZ (40, 80, 160 e 320 µg/mL de CAZ). Na placa MH sem antibiótico utilizada como controle e na placa com 40 µg/mL de CAZ houve crescimento bacteriano confluyente, enquanto na placa com 320 µg/mL não houve nenhum crescimento. Colônias isoladas foram observadas nas placas com 80 e 160 µg/mL de CAZ, de onde foram recuperadas 42 e 18 colônias, respectivamente. Estes isolados foram nomeados de SM1 a SM60 (SM corresponde a *spontaneous mutant*). As 60 colônias, que possivelmente eram mutantes espontâneos para CAZ, foram repicadas em placas MH sem suplementação de antibiótico para evitar que os próximos ensaios tivessem os resultados com interferência da resistência induzida pela presença de antibiótico durante o pré-cultivo bacteriano. Posteriormente, também foram congelados em 20% glicerol para preservação.

4.1.1 Os mutantes espontâneos isolados em CAZ são resistentes a vários antibióticos beta-lactâmicos sem perda de aptidão

O perfil de resistência a CAZ das colônias SM1 a SM60 foi determinado por ensaio de ágar-diluição (CLSI, 2015), a fim de verificar se de fato são linhagens resistentes e não com indução transitória de beta-lactamases. Em todas as placas, a linhagem selvagem de *C. violaceum* ATCC 12472 e o controle de qualidade *E. coli* ATCC 25922 também foram testadas. Inicialmente, 19 dos 60 isolados apresentaram valores de CIM maiores do que o CIM da linhagem selvagem que é 32-64 µg/mL, sendo estes selecionados para seguir no estudo. Posteriormente, em novas réplicas do ensaio, foi possível observar que apenas 13 dos 19 isolados apresentaram valores de CIM maiores que o CIM da linhagem selvagem, sendo que a maioria deles teve um CIM de 512 µg/mL (Tabela 6).

Tabela 6. CIM de CAZ para a linhagem selvagem e mutantes espontâneos de *C. violaceum*.

LINHAGENS	CIM CAZ ($\mu\text{g/mL}$)		
	1ª RÉPLICA	2ª RÉPLICA	3ª RÉPLICA
WT	32	32	64
SM1	1024	1024	1024
SM2	256	512	512
SM3	512	512	512
SM10	512	512	512
SM20	64	32	32
SM24	64	32	32
SM28	512	512	512
SM29	512	512	512
SM30	512	512	512
SM31	512	512	512
SM34	512	512	512
SM35	512	512	512
SM39	512	512	512
SM41	64	32	32
SM42	64	32	32
SM52	512	512	512
SM58	32	32	32
SM59	512	512	512
SM60	32	32	32

Estas 19 linhagens SM selecionadas tiveram seu perfil de resistência também determinado pelo ensaio de disco-difusão em ágar (CLSI, 2012) utilizando discos de 11 antibióticos beta-lactâmicos (Figura 15, Tabela Suplementar 1). Em nenhuma colônia testada houve halo de inibição de crescimento para os antibióticos AMP e AMC, indicando alta resistência de *C. violaceum*, incluindo a linhagem selvagem, para estes antibióticos (Figura 15, Tabela Suplementar 1). Os isolados SM20, SM24, SM41, SM42, SM58 e SM60 apresentaram halos de tamanho semelhante aos halos da linhagem selvagem ou tiveram colônias isoladas dentro dos halos de inibição para a maioria dos antibióticos, corroborando os dados obtidos para os valores de CIM para CAZ. As demais linhagens apresentaram fenótipo de grande resistência a maioria dos beta-lactâmicos testados, principalmente SM1 e SM2, que conseguiram reduzir significativamente os halos dos carbapenêmicos MEM e IPM e da penicilina piperacilina (PIP) (Figura 15, Tabela Suplementar 1). Estes dados indicam que os

treze mutantes espontâneos isolados em CAZ também são resistentes a vários outros antibióticos beta-lactâmicos.

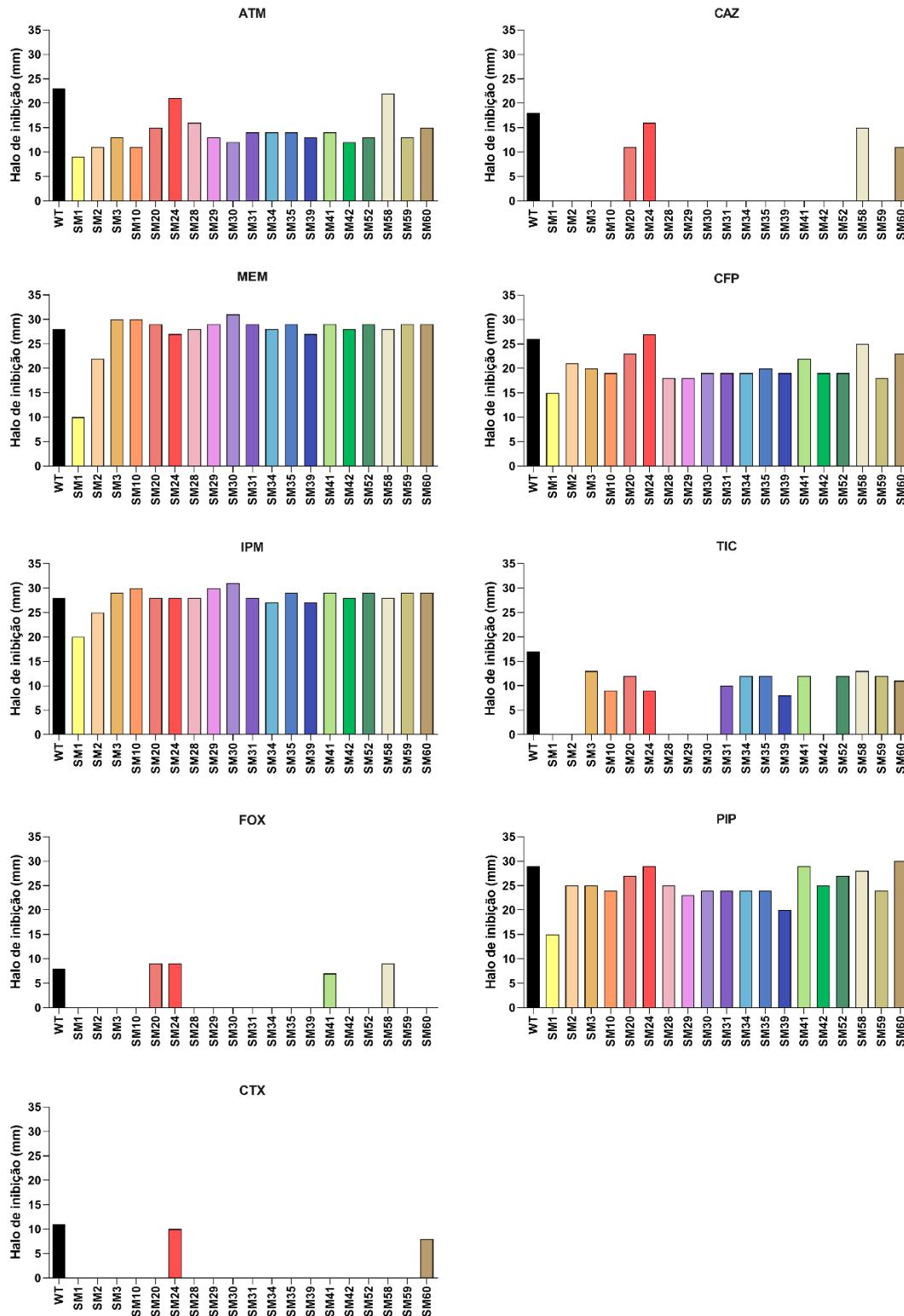


Figura 15. Perfil de resistência de SMs a beta-lactâmicos. O ensaio de disco-difusão em ágar permitiu mapear a resistência dos isolados contra diferentes antibióticos beta-lactâmicos. Valores de halos de inibição em mm. ATM - aztreonam, CAZ - ceftazidima, CFP - cefoperazona, CTX - cefotaxima, FOX - cefoxitina, IPM - imipenem, MEM - meropenem, PIP - piperacilina e TIC - ticarcilina.

A aptidão das 19 linhagens SM foi avaliada em curvas de crescimento em meio LB. De forma geral, estas linhagens tiveram perfil de crescimento semelhante ao perfil da linhagem selvagem, exceto para SM1, que apresentou uma média de 115 minutos para dobrar o número de células na cultura em comparação com os 90 minutos da linhagem selvagem. A SM1 também demorou para atingir a fase estacionária, levando cerca de 741 minutos contra os 549 da selvagem (Figura 16). Portanto, esses dados indicam que apesar de serem resistentes a vários antibióticos beta-lactâmicos, os mutantes espontâneos não têm prejuízo de aptidão. O aparente maior aumento da resistência de SM1 parece comprometer um pouco sua aptidão.

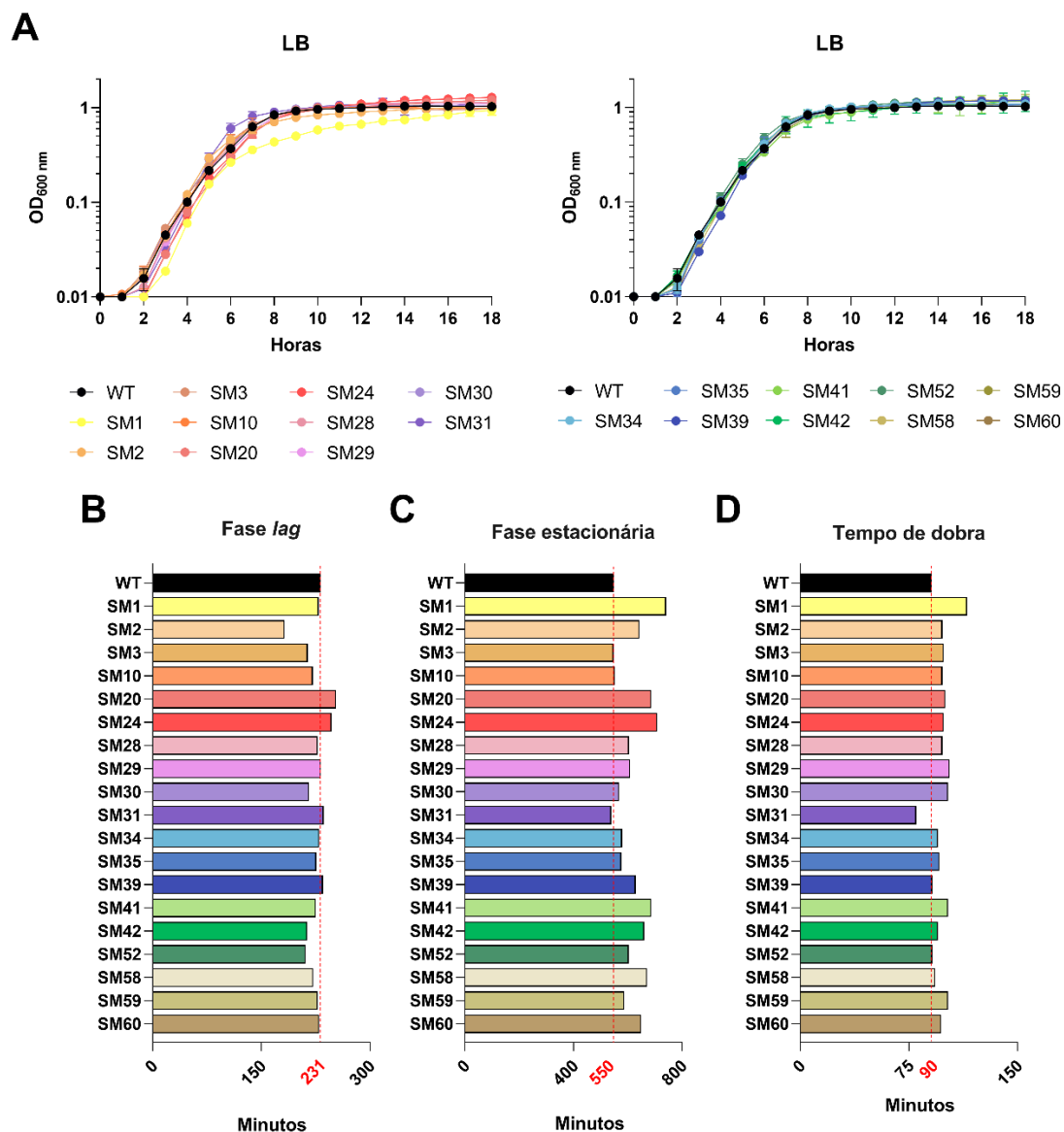


Figura 16. Mutantes espontâneos têm aptidão semelhante a linhagem selvagem. (A) curvas de crescimento dos mutantes espontâneos em meio LB. (B, C e D) Média da análise de crescimento em fase lag, estacionária e o tempo de dobra através do aplicativo Gen6 Data Analysis Software (Agilent). Gráficos representativos de triplicata biológica.

4.1.2 A maioria dos mutantes espontâneos hiperexpressam as beta-lactamases *ampC* e *cphA*

Para associar o perfil de resistência a antibióticos beta-lactâmicos das linhagens SM com a expressão das beta-lactamases, foram realizados ensaios de atividade de beta-galactosidase usando fusões transcricionais dos promotores das beta-lactamases *ampC* (*PampC*) e *cphA* (*PcphA*), transferidas por conjugação para *C. violaceum* selvagem e para as 19 linhagens SM (Figura 17). Em 12 das linhagens SM, ambos os promotores (*PampC* e *PcphA*) tiveram alta atividade de beta-galactosidase em comparação com a atividade quase basal da linhagem selvagem, sugerindo que as duas beta-lactamases estão hiperexpressas e conferindo resistência a beta-lactâmicos nestes mutantes (Figura 17A e C). No entanto, nos isolados SM1, SM20, SM24, SM41, SM42, SM58 e SM60, ambos os promotores tiveram apenas a expressão basal observada na linhagem selvagem em meio LB sem antibiótico (Figura 17A e C). Estes dados indicam que em 12 dos 13 isolados SM que confirmaram aumentada resistência a beta-lactâmicos, esta resistência pode ser atribuída a expressão elevada das beta-lactamases. A exceção é SM1, que apesar de ser a linhagem mais resistente aos beta-lactâmicos, não possui as beta-lactamases superexpressas.

Para verificar se as fusões de *lacZ* estão corretas nestas linhagens com expressão basal, foi realizado ensaio de atividade de beta-galactosidase na presença de AMP por 30 minutos (Figura 17B e D), antibiótico este para o qual demonstramos ser forte indutor das beta-lactamases em *C. violaceum* (Figura 14). Nestas condições, ambos os promotores foram bastante induzidos tanto na linhagem selvagem quanto nos 7 isolados SM em comparação com o meio LB sem antibiótico (Figura 17B e D), indicando que as fusões estão funcionais nestas linhagens. Com isto, é possível concluir que nos isolados SM20, SM24, SM41, SM42, SM58 e SM60, os perfis de resistência e expressão parecem indicar pouca ou nenhuma resistência aos beta-lactâmicos. Para SM1, apesar de muito resistente aos beta-lactâmicos, sua resistência não parece vinculada à expressão de AmpC ou CphA, mas sim a outros componentes do seu genoma, os quais estão lhe conferindo essa resistência.

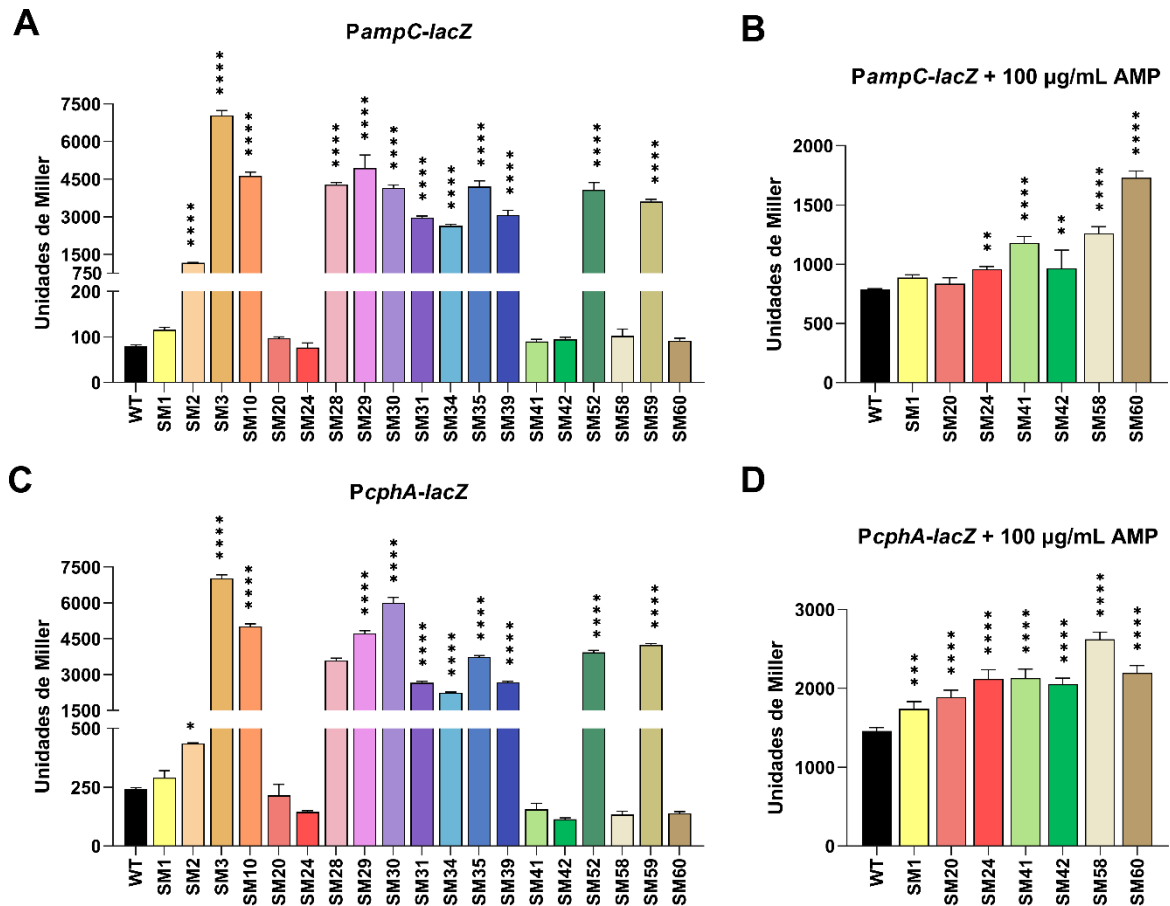


Figura 17. Ensaio de atividade de beta-galactosidase dos promotores de *ampC* e *cphA*. O nível da expressão dos promotores das beta-lactamases foi analisado pelo ensaio de atividade de beta-galactosidase nas linhagens indicadas. **(A e C)** Ensaio dos dois promotores em meio LB. **(B e D)** Ensaio dos dois promotores na presença de 100 µg/mL AMP. Notar o aumento da expressão dos promotores para além do nível basal devido a indução pelo beta-lactâmico (comparação A e C com B e D). Gráficos representativos de quintuplicata biológica. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; quando não indicado, não é significativo. One-way ANOVA seguido por teste de múltiplas comparações de Tukey.

4.2 A maioria dos mutantes espontâneos tem mutação em *ampD1*

Atentando-se à importância da enzima amidase AmpD no processo de reciclagem do peptideoglicano e sua estreita relação com a resistência a beta-lactâmicos (HWANG & KIM, 2015; TORRENS *et al.*, 2019), tornou-se imprescindível o sequenciamento do gene *ampD* na *C. violaceum* selvagem ATCC 12472, usada como controle, e nas 19 linhagens SM selecionadas em CAZ. O gene CV_1309 (900 pb e 299 aa), localizado a montante de CV_1310 (*ampC*), codifica uma amidase. Análise *in silico* revelou que este gene possui mais dois outros parálogos dentro do genoma de *C. violaceum*, CV_0566 (1020 pb e 339 aa) e CV_3031 (774 pb e 257 aa), que foram renomeados de acordo com o aparecimento da ORF no genoma, como

ampD1, *ampD2* e *ampD3* (Figura 18A). Estas três proteínas têm de 30 a 40% de similaridade entre si (Figura 18B) e possuem um domínio de amidase-2 (AMI-2; PF01510) (Figura 18C), encontrado em *E. coli* (AmpD e AmiD) e *P. aeruginosa* (AmpD, AmpDh2, AmpDh3). Curiosamente, AmpD1 possui no N-terminal um domínio de acetiltransferase (ACTF_1) (Figura 18C), não anotado na versão original do genoma, que não é comum em AmpDs de outras bactérias. Uma potencial quarta amidase em *C. violaceum*, CV_3822 (AmpD4), possui domínio amidase-3 (AMI-3; PF01520) e baixa similaridade com as três outras AmpDs (17 a 25%).

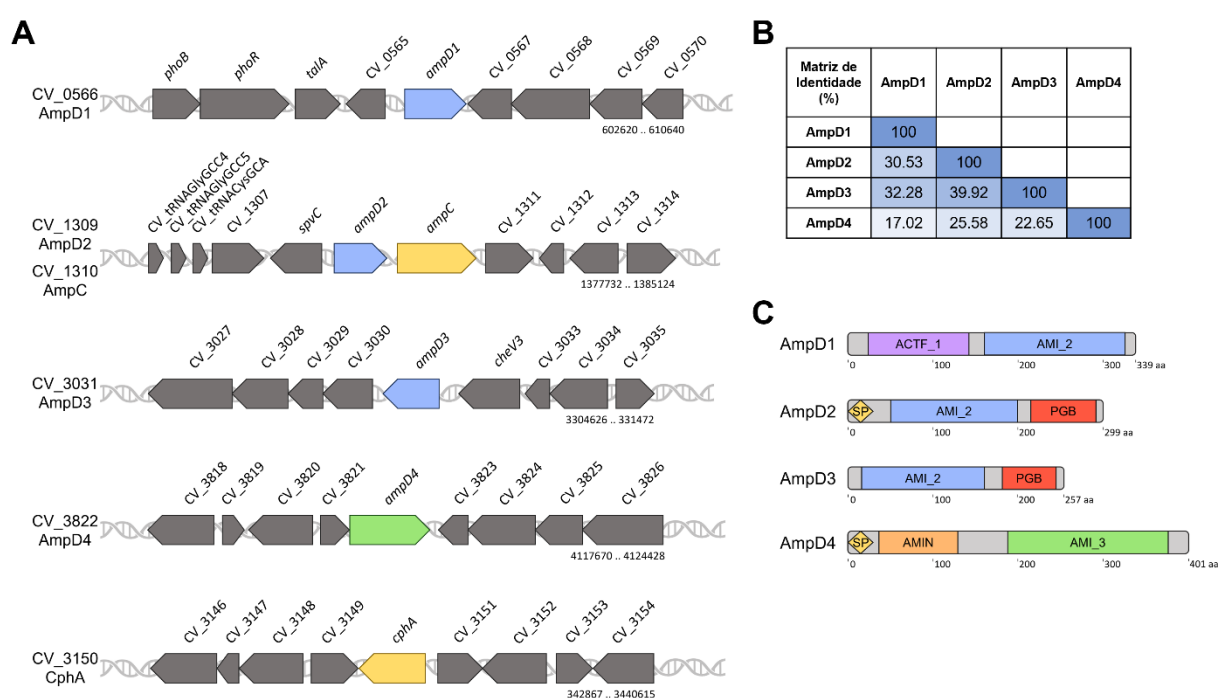


Figura 18. Organização genômica, arquitetura e alinhamento das amidases de *C. violaceum*. (A) Mapa genômico das proximidades dos genes que codificam beta-lactamases e amidases. (B) Matriz de similaridade entre as quatro amidases. (C) Arquitetura de domínios das amidases. Os domínios estão indicados em diferentes cores. SP indica peptídeo sinal.

Decidimos sequenciar os genes das amidases parálogas AmpD1, AmpD2 e AmpD3. Para isto, foram realizadas 60 reações de PCR (20 linhagens x 3 três genes) e 120 reações de sequenciamento de Sanger (60 produtos de PCR sequenciados em ambas as fitas). Os primers foram desenhados com o objetivo de cobrir toda a região codificadora e a região promotora dos três genes (CV_0566/*ampD1* - 1259 pb, CV_1309/*ampD2* - 1225 pb, CV_3031/*ampD3* - 1195 pb). Todos os produtos de PCR foram recuperados do gel de agarose e apresentaram boa quantidade quando mensurados por Nanodrop.

As sequências dos três genes *ampD* dos mutantes espontâneos foram comparadas por BLAST contra a linhagem de referência *C. violaceum* ATCC 12472 (BNGPC, 2003). Estas análises indicaram ausência de mutações para os três genes na linhagem selvagem, como era esperado. Também não foram encontradas mutações nos genes CV_1309 e CV_3031 (*ampD2* e *ampD3*) em todas as linhagens. Já para o gene CV_0566 (*ampD1*), foram detectadas diferentes mutações em várias linhagens (Tabela 7). Quatro dessas mutações são do tipo *nonsense*: as linhagens SM10, SM52 e SM59 apresentaram uma troca de triptofano por um *stop codon* (W35stop), inviabilizando a proteína AmpD1; o mesmo ocorreu com a linhagem SM3, mas em um resíduo de posição mais adiante (W166stop). Outras seis linhagens possuem mutações do tipo *missense*, enquanto uma linhagem, a SM30, tem um *frameshift* devido a deleção de 11 pb que gera um códon de parada antes do final do gene (Tabela 7; Figura 19). Por outro lado, o isolado SM2, apesar de superexpressar as beta-lactamases (Figura 17), não possui mutação em nenhum dos três genes *ampD* sequenciados. O mesmo correu para as linhagens SM1, SM20, SM24, SM41, SM42, SM58 e SM60. Essas mesmas sete linhagens também não têm hiperexpressão do promotor das enzimas beta-lactamases AmpC e CphA (Figura 17).

Tabela 7. Mutações encontradas no gene CV_0566 (*ampD1*) das linhagens SM.

LINHAGEM	MUTAÇÃO	ALTERAÇÃO	POSIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
DELETION – CV_0566 (AmpD1)				
SM30	<i>Frameshift</i>	11 bp	(406 .. 416)	-
SUBSTITUTION – CV_0566 (AmpD1)				
SM10	<i>Nonsense</i>	TGG → TAG	W35stop	Aromático → Stop codon
SM52	<i>Nonsense</i>	TGG → TAG	W35stop	Aromático → Stop codon
SM59	<i>Nonsense</i>	TGG → TAG	W35stop	Aromático → Stop codon
SM3	<i>Nonsense</i>	TGG → TAG	W166stop	Aromático → Stop codon
SM28	<i>Missense</i>	CCG → CAG	P198Q	Não-polar/Alifático → PNC
SM34	<i>Missense</i>	CCT → TCT	P199S	Não-polar/Alifático → PNC
SM29	<i>Missense</i>	TCG → TTG	S233L	PNC → Não-polar/Alifático
SM35	<i>Missense</i>	TCG → TTG	S233L	PNC → Não-polar/Alifático
SM31	<i>Missense</i>	GGT → AGT	G323S	Não-polar/Alifático → PNC
SM39	<i>Missense</i>	GGT → AGT	G323S	Não-polar/Alifático → PNC

Análise realizada no banco de dados NCBI com a ferramenta Blast, usando as opções Blastn e Blastx.

Abreviaturas: SM – *Spontaneous Mutant*; PNC – polar não-carregado.

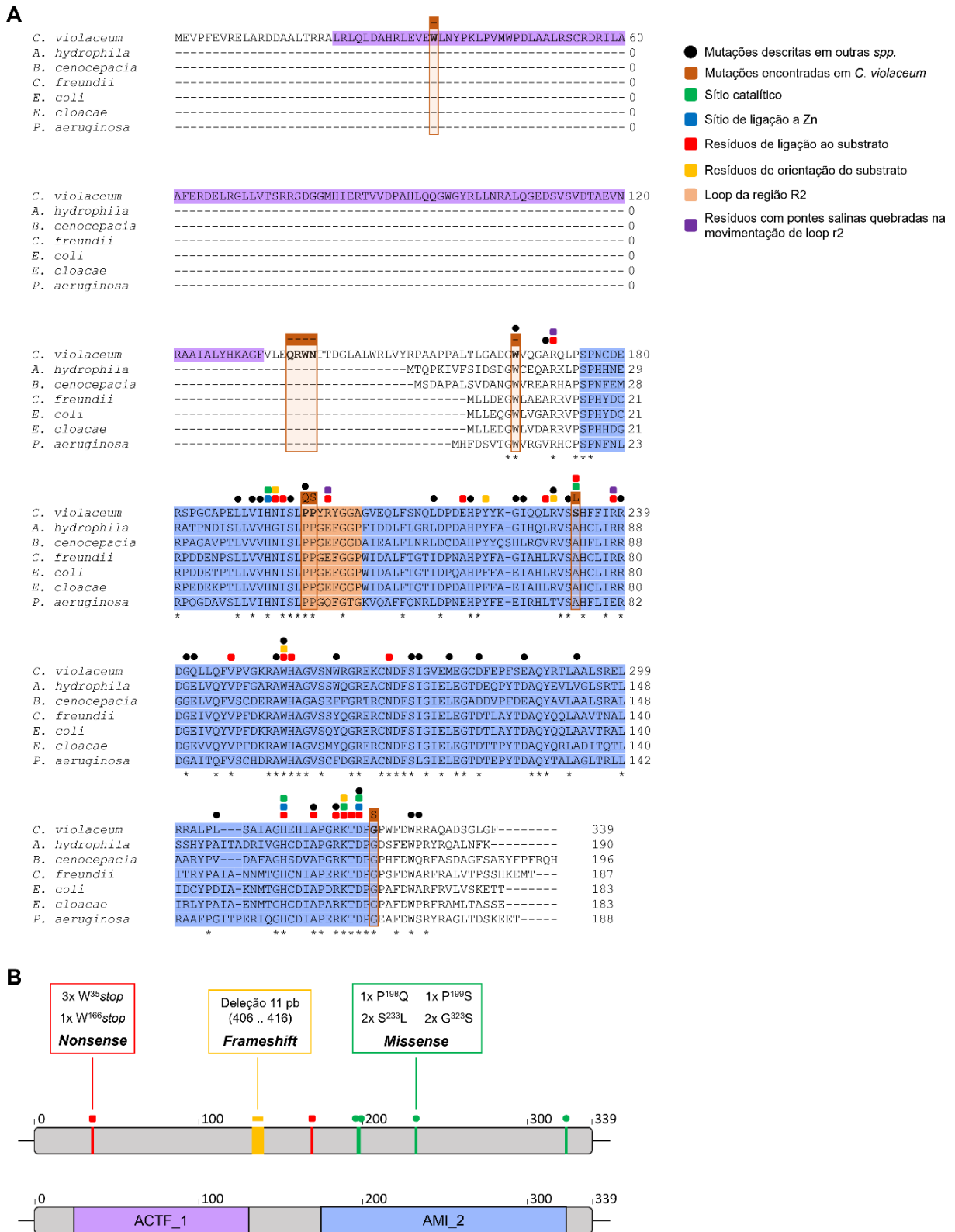


Figura 19. Alinhamento de AmpD e mutações encontradas em AmpD1 de *C. violaceum*. (A) alinhamento realizado com Clustal Omega utilizando sequências de AmpD de diferentes bactérias. Os domínios da proteína foram marcados na sequência de aminoácidos em roxo (acetiltransferase), azul (amidase₂) e laranja (loop estrutural na região r2 da proteína). Resíduos conservados estão marcados em quadrados coloridos. Esferas pretas indicam locais de mutações relatados em diferentes bactérias. A caixa marrom indica mutações encontradas em *C. violaceum*. **(B)** Sumário das mutações encontradas em AmpD1 nos mutantes espontâneos resistentes a CAZ.

Comparando o perfil de mutações encontradas em mutantes *ampD* de outras bactérias com o encontrado na *ampD1* de *C. violaceum*, é possível observar mutações já descritas e mutações novas, incluindo aquelas presentes no domínio de acetiltransferase (Figura 19). Com base na estrutura cristalográfica de AmpD de *Citrobacter freundii* (LIEPINSH *et al.*, 2003; CARRASCO-LÓPEZ *et al.*, 2011) é possível verificar que estas mutações mapeiam em diferentes regiões da proteína, como os sítios de ligação ao substrato, os resíduos que orientam a posição do substrato e os resíduos que ligam zinco, por exemplo (Figura 19).

Portanto, a análise das 19 linhagens SM isoladas em CAZ revelou que 12 (63%) delas têm hiperexpressão dos genes *ampC* e *cphA* que codificam as duas beta-lactamases de *C. violaceum* e que 11 (92%) dessas mesmas linhagens possuem mutações no gene CV_0566, o qual codifica uma das três enzimas AmpD parálogas desta bactéria. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que apontam mutações em AmpD como importantes para superexpressão de beta-lactamases (SCHMIDTKE *et al.*, 2008; HWANG & KIM, 2015; TORRENS *et al.*, 2019). Estes dados iniciais sugerem que CV_0566 (AmpD1) parece ter um papel maior em relação às duas outras AmpDs parálogas para a resistência a beta-lactâmicos em *C. violaceum*.

4.3 Análise de mutantes nulos dos genes das três amidases parálogas revela o papel preponderante de AmpD1

Para investigar melhor o papel das três AmpD parálogas de *C. violaceum*, realizou-se a construção de mutantes nulos simples $\Delta ampD1$ e $\Delta ampD3$, mutantes duplos $\Delta ampD1D2$, $\Delta ampD1D3$ e $\Delta ampD2D3$ e mutante triplo $\Delta ampD1D2D3$, conforme protocolo de troca alélica estabelecido em nosso laboratório (BATISTA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020; ALVES *et al.*, 2021). Todas as linhagens mutantes foram confirmadas por PCR de colônia (Figura 20). O mutante nulo $\Delta ampD2$ já havia sido obtido em outro trabalho do nosso grupo (NEME, 2019).

4.3.1 Ausência de AmpD1 impacta sobrevivência e ausência das três AmpDs afeta crescimento

A aptidão de todos os mutantes nulos dos genes das amidases foi avaliada por curvas de crescimento e sobrevivência celular (UFC/mL de culturas de 20h) em meio

LB (Figura 21). Nas curvas de crescimento, todos os mutantes tiveram crescimento similar ao da linhagem selvagem, com exceção do mutante triplo $\Delta ampD1D2D3$ que apresentou um crescimento mais lento (Figura 21A, C, D, E). No ensaio de viabilidade, os mutantes $\Delta ampD1$, $\Delta ampD1D2$ e $\Delta ampD1D3$ apresentaram redução de 1 a 2 logs em UFC comparado a linhagem selvagem (Figura 21B). Curiosamente, o mutante triplo $\Delta ampD1D2D3$ não teve perda de viabilidade (Figura 21B), a despeito de sua menor taxa de crescimento. No entanto, as colônias de $\Delta ampD1D2D3$ foram pequenas e menos roxas. Talvez, mutações supressoras poderiam ter ocorrido para permitir a “viabilidade” deste mutante. Os três mutantes das beta-lactamases, obtidos em um trabalho anterior (NEME, 2019), não tiveram alterações de aptidão (Figura 21A, C, D, E). Em conjunto, estes dados revelam que AmpD1 parece ser a amidase mais importante para sobrevivência em fase estacionária (20 horas de cultivo) e que somente a deleção dos três genes de amidase impactam o crescimento de *C. violaceum*.

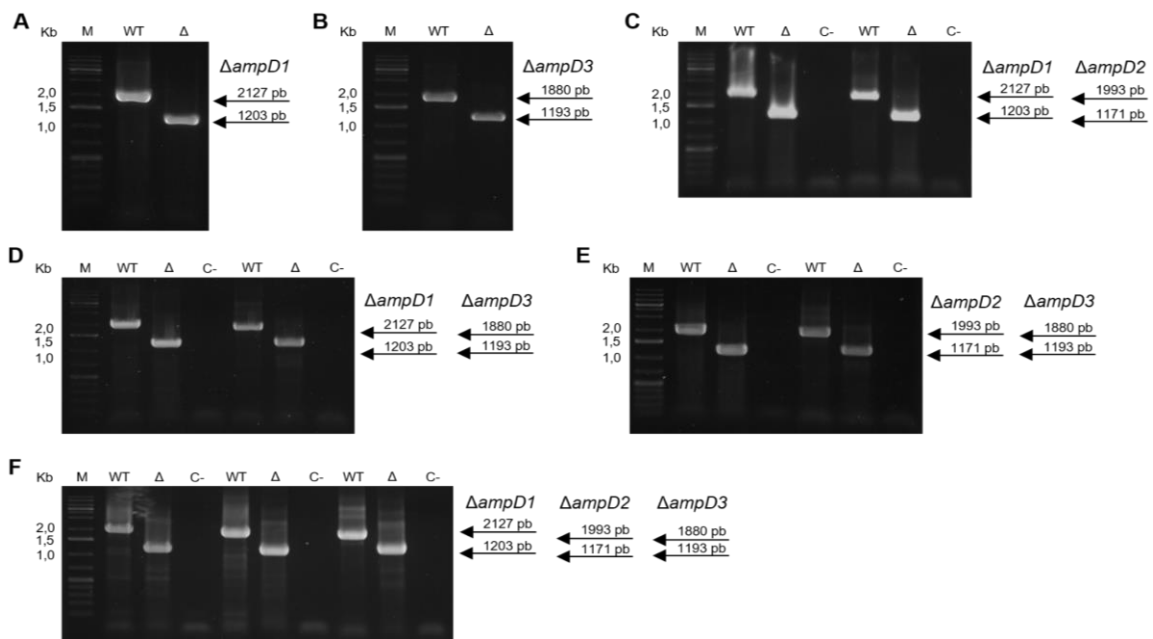


Figura 20. Confirmação das linhagens mutantes nulo dos genes *ampD*. Os genes CV_0566 (*ampD1*), CV_1309 (*ampD2*) e CV_3031 (*ampD3*) com suas regiões flangeadoras foram amplificados por PCR com os primers del1/del4 de cada gene. Eletroforese em gel de agarose 1% feito com TBE 0,5x corrido sob tensão de 100 V durante 45 minutos. O primeiro poço de cada gel é referente ao marcador (M) GeneRuler 1Kb plus DNA (Thermo Scientific), enquanto os demais poços são as linhagens analisadas. Os tamanhos esperados dos *amplicons* em cada caso estão indicados na figura. A linhagem selvagem tem o tamanho dos fragmentos sendo a soma das regiões flangeadoras com o gene, enquanto as linhagens mutantes apresentam apenas as regiões flangeadoras. **(A)** deleção do gene CV_0566 (*ampD1*); **(B)** deleção do gene CV_3031 (*ampD3*); **(C)** deleção dos genes CV_0566 e CV_1309 (*ampD1D2*); **(D)** deleção dos genes CV_0566 e CV_3031 (*ampD1D3*); **(E)** deleção dos genes CV_1309 e CV_3031 (*ampD2D3*); **(F)** deleção dos genes CV_0566, CV_1309 e CV_3031 (*ampD1D2D3*).

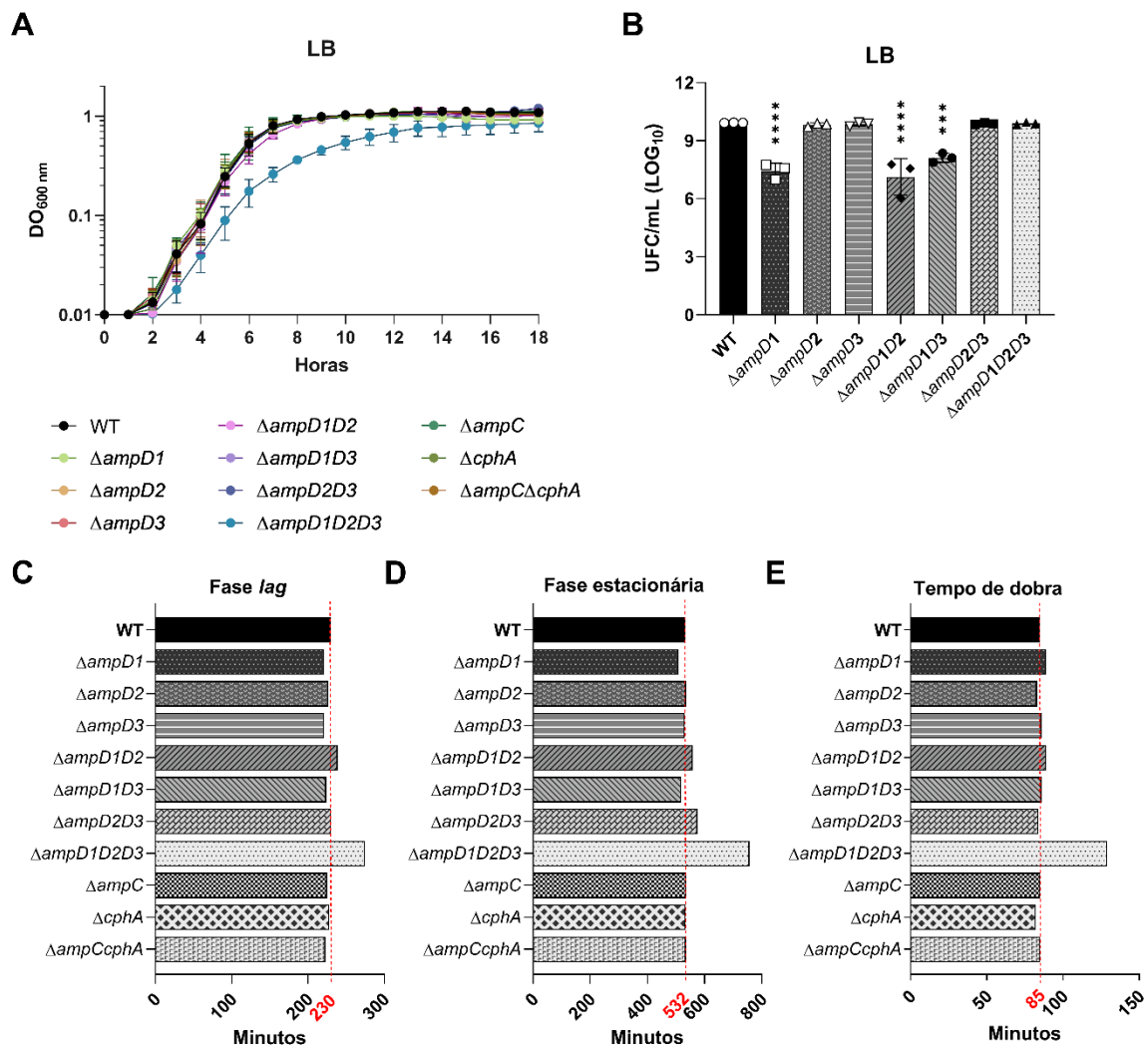


Figura 21. Efeito da deleção de *ampDs* no crescimento e sobrevivência celular. (A) O crescimento bacteriano da linhagem selvagem e mutantes foi avaliado em meio LB pela mensuração de absorvância em comprimento de onda de 600 nm no leitor de placas BioTek Epoch 2 (Agilent) durante 18 horas. (B) A viabilidade da linhagem selvagem e mutantes foi determinada por UFC/mL. (C, D e E) Média da análise de crescimento em fase lag, estacionária e o tempo de dobra através do aplicativo Gen6 Data Analysis Software (Agilent). Gráficos representativos de ensaios realizados em triplicata biológica e técnica. ****p < 0,0001; ***p < 0,001; **p < 0,01; * p < 0,05; quando não indicado, não é significativo. Para o ensaio de viabilidade foi utilizado One-way ANOVA seguido por teste de múltiplas comparações de Tukey.

4.3.2 Ausência de AmpD1 ou das três AmpDs afeta biofilme, violaceína e motilidade

Devido a importância das amidases no funcionamento correto do PGN, os mutantes nulos dos genes das amidases e das beta-lactamases foram também avaliados quanto a formação de biofilme, produção de violaceína e motilidade do tipo *swimming* (Figura 22), como previamente descrito (SANTOS *et al.*, 2021). Ensaio de cinética de formação de biofilme pelo método de coloração por cristal violeta em três diferentes tempos de cultivo (8h, 16h e 24h) revelou que a deleção dos genes das

amidases não impede o início de formação de biofilme (tempo de 8h) (Figura 22A). No entanto, a partir das 16 horas é observado menos biofilme nos mutantes $\Delta ampD1$ e $\Delta ampD1D2D3$ (Figura 22B), algo que se torna mais nítido após 24 horas de cultivo (Figura 22C), pois neste momento todos os mutantes que possuem o gene $\Delta ampD1$ deletado tiveram menos biofilme. Os mutantes $\Delta ampD1$, $\Delta ampD1D2$ e $\Delta ampD1D2D3$ produziram uma quantidade menor de violaceína em comparação com a linhagem selvagem (Figura 22D). Já para a motilidade do tipo *swimming*, avaliada em 24 e 48 horas de cultivo, somente o mutante $\Delta ampD1D2D3$ apresentou redução, sobretudo em 48h (Figura 22E). Os três mutantes das beta-lactamases (NEME, 2019) não tiveram alterações no biofilme ou produção de violaceína (Figura 22).

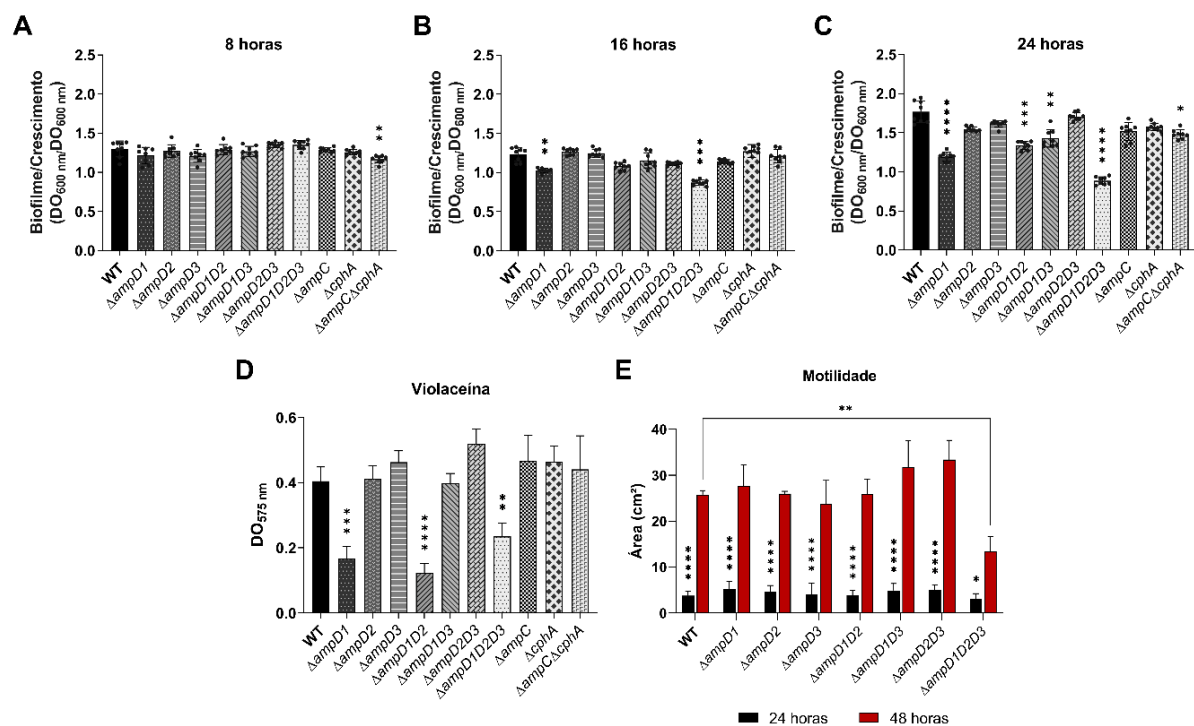


Figura 22. Efeito da deleção de *ampDs* em biofilme, produção de violaceína e motilidade. A cinética de formação de biofilme dos mutantes nulos foi avaliada durante **(A)** 8 horas, **(B)** 16 horas e **(C)** 24 horas. Foram avaliadas também **(D)** a produção de violaceína solubilizada em solvente orgânico (acetona) e **(E)** a motilidade (*swimming*) das linhagens. As estrelas verticais indicam estatística significativa na mesma amostra em condições diferentes. Gráficos representativos de ensaios realizados em triplicata biológica e técnica. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; quando não indicado, não é significativo. Para o ensaio de biofilme foi utilizado Kruskal-Wallis seguido por teste de múltiplas comparações de Dunn. Para o ensaio de violaceína foi utilizado One-way ANOVA seguido por teste de múltiplas comparações de Dunnett. Para o ensaio de motilidade foi utilizado Two-way ANOVA seguido por teste de múltiplas comparações de Tukey.

4.3.3 Mutações em *ampD1*, mas não em *ampD2* ou *ampD3*, aumenta resistência a beta-lactâmicos

Para caracterizar todos os mutantes nulos das amidases quanto a sua resistência a diversos antibióticos beta-lactâmicos, primeiramente foi realizado o ensaio de disco-difusão (CLSI, 2012) (Tabela Suplementar 2 e Figura 23). Como no ensaio realizado para os mutantes espontâneos, nenhuma linhagem testada teve halo para os antibióticos AMP e AMC. Foi possível observar o fenótipo de resistência (halos de inibição de crescimento menores) a maioria dos beta-lactâmicos testados apenas para os mutantes que possuem o gene *ampD1* deletado ($\Delta ampD1$, $\Delta ampD1D2$, $\Delta ampD1D3$ e $\Delta ampD1D2D3$) em comparação com a linhagem selvagem. Apesar disso, nenhuma das linhagens mutantes apresentou fenótipo de resistência aos carbapenêmicos testados (IPM e MEM) (Tabela Suplementar 2 e Figura 23). Estes dados são consistentes com os fenótipos de resistência aos beta-lactâmicos observados para as linhagens SM que apresentaram mutações pontuais em *ampD1* (Tabela Suplementar 1 e Figura 15). Não foi observado o aparecimento de colônias isoladas dentro dos halos de inibição, como havia sido visto em alguns dos mutantes espontâneos.

Ensaio de complementação foram realizados com o gene *ampD1* clonado no vetor pMR20 (*D1::pMR20*). Este vetor vazio foi inserido na linhagem selvagem como controle para verificar uma possível influência nos resultados obtidos. A construção *D1::pMR20* foi inserida na linhagem mutante nulo $\Delta ampD1$ e em todos os onze mutantes SM que possuíam mutação pontual em *ampD1*, gerando as respectivas linhagens complementadas. Em todas estas linhagens complementadas o fenótipo de sensibilidade a CAZ foi resgatado para padrões similares ao observado para a linhagem selvagem, exceto na linhagem SM59 (Figura 24, Tabela Suplementar 3). Estes dados respaldam a conclusão de que o aumento da resistência a beta-lactâmicos nas linhagens mutantes *ampD1* nulas e pontuais (exceto SM59) deve-se exclusivamente a mutações neste gene.

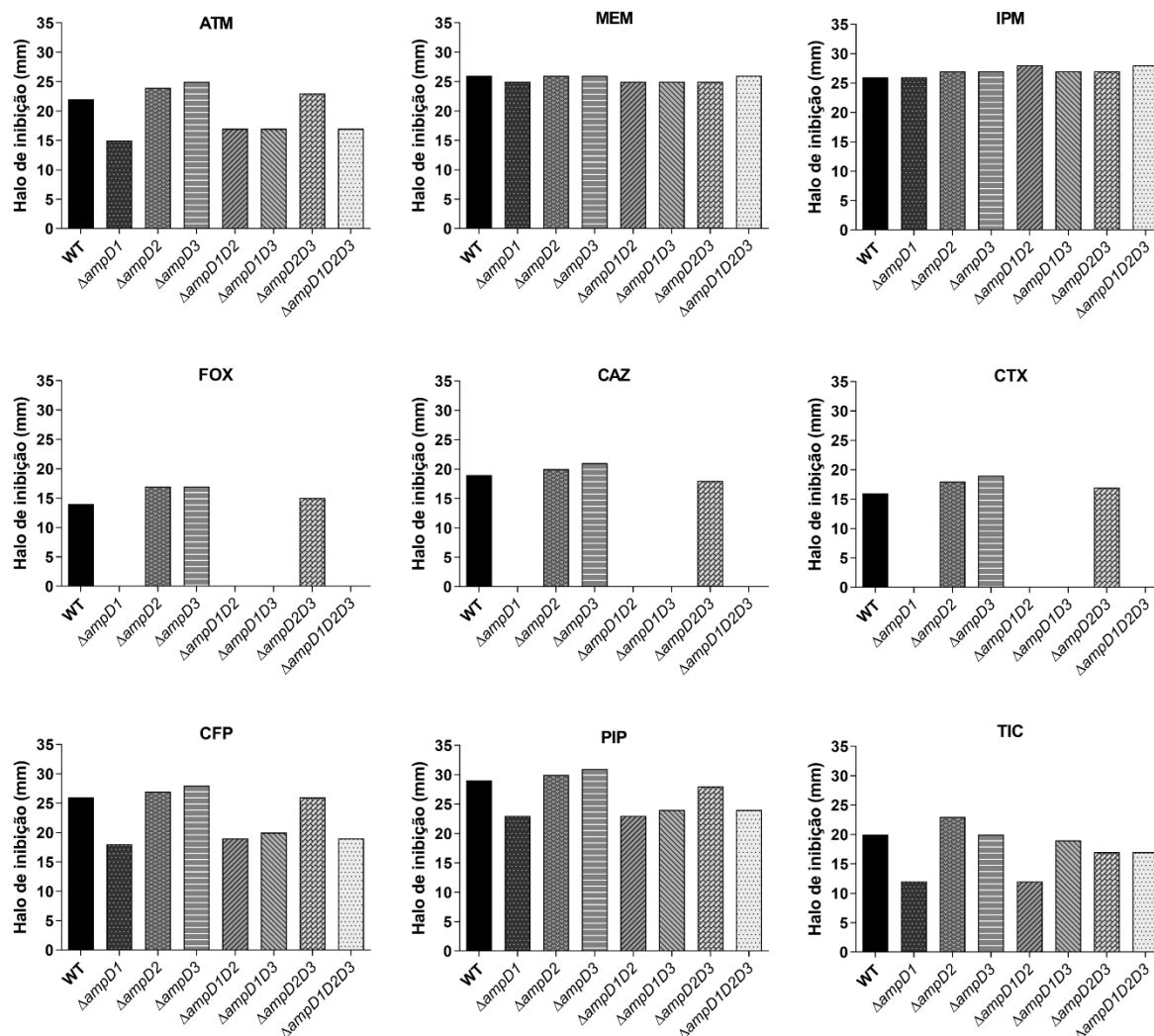


Figura 23. Ensaio de disco-difusão dos mutantes nulos das amidases. O ensaio de disco-difusão foi utilizado para caracterizar o perfil de resistência dos mutantes nulos das amidases para diferentes antibióticos beta-lactâmicos. AMC - amoxicilina com ácido clavulânico, AMP - ampicilina, ATM - aztreonam, CAZ - ceftazidima, CFP - cefoperazona, CTX - cefotaxima, FOX - cefoxitina, IPM - imipenem, MEM - meropenem, PIP - piperacilina e TIC - ticarcilina. Não estão mostrados aqui os resultados obtidos para a linhagem selvagem e mutante *ampD1* nos antibióticos ETP - ertapenem, FEP - cefepime, TZP - piperacilina com tazobactam, STX - sulfametoxazol com trimetoprima e CIP - ciprofloxacina.

O ensaio de ágar-diluição para determinação da CIM também foi realizado para algumas linhagens selecionadas (Tabela 8). Como esperado pelos ensaios anteriores, todos os mutantes com *ampD1* deletado apresentaram resistência a maioria dos antibióticos testados em relação a linhagem selvagem, com valores pelo menos 4 vezes maior para CAZ e FOX. Contudo, não foi observado fenótipo de resistência nos mutantes das demais amidases. Como representante dos mutantes espontâneos, a linhagem SM3 (mutação *nonsense* W166stop em AmpD1) apresentou valores semelhantes ao mutante $\Delta ampD1$. Conforme visto por NEME (2019), o mutante $\Delta ampC$ apresentou aumento de sensibilidade às cefalosporinas e penicilinas,

enquanto o mutante $\Delta cphA$ apresentou sensibilidade aos carbapenêmicos. O mutante duplo das beta-lactamases, $\Delta ampC\Delta cphA$, apresentou o fenótipo esperado causado pelas duas mutações separadas. Em todos os casos, as complementações dos mutantes funcionaram corretamente, revertendo para o fenótipo de sensibilidade a níveis semelhantes ao da linhagem selvagem (Figura 24, Tabela Suplementar 3). Também como uma forma de avaliação, o vetor utilizado na complementação dos mutantes foi inserido vazio nas linhagens para verificar uma possível influência nos resultados obtidos.

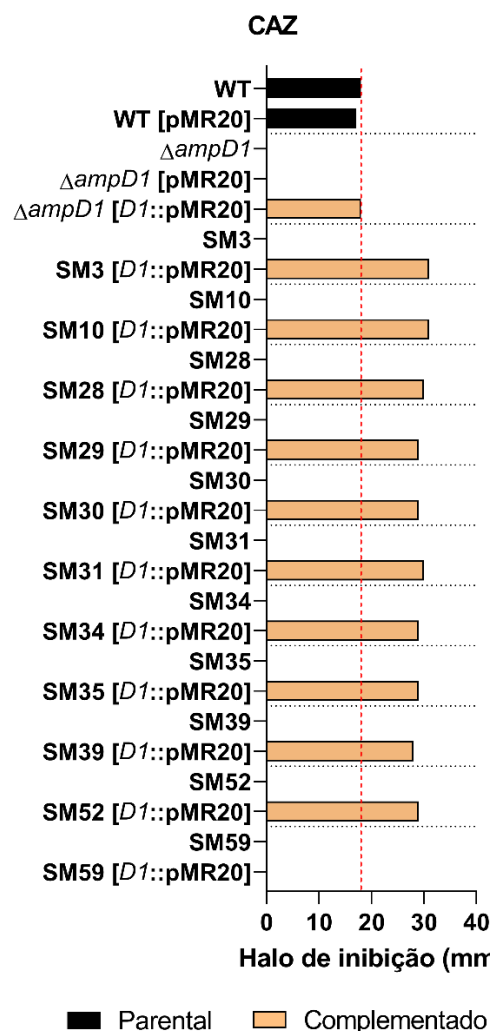


Figura 24. Ensaio de disco-difusão dos mutantes complementados com *ampD1*. O mutante nulo $\Delta ampD1$ e todos os onze mutantes SM que possuíam mutação pontual em *ampD1* foram complementados com o gene *ampD1* clonado no vetor pMR20. Ensaio de disco-difusão foram utilizados para avaliar a reversão do fenótipo de sensibilidade a CAZ. Os valores dos halos de inibição de crescimento em mm mostrados na tabela foram utilizados para plotagem no gráfico.

Tabela 8. Determinação de CIM da linhagem selvagem, mutantes e complementadas.

LINHAGENS	CIM ($\mu\text{g/mL}$)							
	MEM	IPM	CAZ	CTX	FOX	AMP	AMC	TZP
WT	0,25	4-2	64	512-256	64	1024	1024	16-8
WT [pMR20]	0,25	2-4	64	512-256	128-64	1024	1024	16-8
$\Delta ampC$	0,25-0,125	2	1	2-4	8-4	16	16	2
$\Delta ampC$ [pMR20]	NT	4	4	4-8	NT	NT	32	8-4
$\Delta ampC$ [ampC::pMR20]	0,25	2	128	256-512	256	2048-1024	1024	16
$\Delta cphA$	0,125	2-1	32-64	128-256	32	512	512	8
$\Delta cphA$ [pMR20]	0,125	1-2	64	256	64	512	512	8
$\Delta cphA$ [cphA::pMR20]	2-8	8	128	512	256	1024-2048	1024	16-32
$\Delta ampC\Delta cphA$	0,125	1	1	2	8-16	16	16	0,5-1
$\Delta ampD1$	0,5	2	512-256	1024	256-512	1024	1024	16
$\Delta ampD1$ [pMR20]	0,5	2	512	1024	512-256	1024	1024	16-32
$\Delta ampD1$ [ampD1::pMR20]	0,25	2-4	64-32	256	128-64	1024	1024	8
$\Delta ampD2$	NT	NT	64-32	NT	NT	NT	NT	NT
$\Delta ampD3$	NT	NT	64-32	NT	NT	NT	NT	NT
$\Delta ampD1D2$	NT	NT	512	NT	NT	NT	NT	NT
$\Delta ampD1D3$	NT	NT	512	NT	NT	NT	NT	NT
$\Delta ampD2D3$	NT	NT	64-32	NT	NT	NT	NT	NT
$\Delta ampD1D2D3$	NT	NT	512	NT	NT	NT	NT	NT
SM3	0,5	2	512	1024	512-256	2048-1024	1024-512	32-16
SM3 [ampD1::pMR20]	0,125-0,25	1	128	256-512	32	128-512	128	4-8

NT = não testado.

Devido à falta de fenótipo para carbapenêmicos nos mutantes das amidases, testes rápidos de checagem de atividade de carbapenemase foram realizados (Figura 11). O Teste de Hodge Modificado (THM) revelou que a linhagem selvagem de *C. violaceum* não tem produção ativa de carbapenemase (Figura 25A-D), algo também visto no ensaio de beta-galactosidase, onde essa linhagem possuía uma expressão basal da beta-lactamase CphA (Figura 17). O mesmo resultado pode ser observado nas linhagens mutantes $\Delta ampD2$, $\Delta ampD3$ e $\Delta ampD2D3$ (Figura 25A e B). Assim como os mutantes das beta-lactamases, que não apresentaram fenótipo (Figura 25D). No entanto, todos os mutantes sem AmpD1 (simples ou combinado) possuíam distorção do halo de inibição (Figura 25A, B e C), como o controle positivo, indicando aumento de resistência pela provável desrepressão da carbapenemase.

Ainda, o teste com disco de EDTA confirmou o resultado de THM, uma vez que somente o $\Delta ampD1$ e SM3 apresentaram distorção nos halos na presença de EDTA, demonstrando aumento na produção da metalo-carbapenemase CphA (Figura 25E).

Por fim, os testes mCIM e eCIM confirmaram mais uma vez a produção de uma metalo-carbapenemase induzida devido ao crescimento do organismo indicador na presença do disco antibiótico em mCIM e a formação de um halo de 14 mm em eCIM por efeito da ação de EDTA (Figura 25F). É importante ressaltar que, neste ensaio, a linhagem selvagem apresentou um resultado positivo na produção da carbapenemase devido à diferença metodológica do ensaio, uma vez que aqui a bactéria teve prévia exposição a um antibiótico.

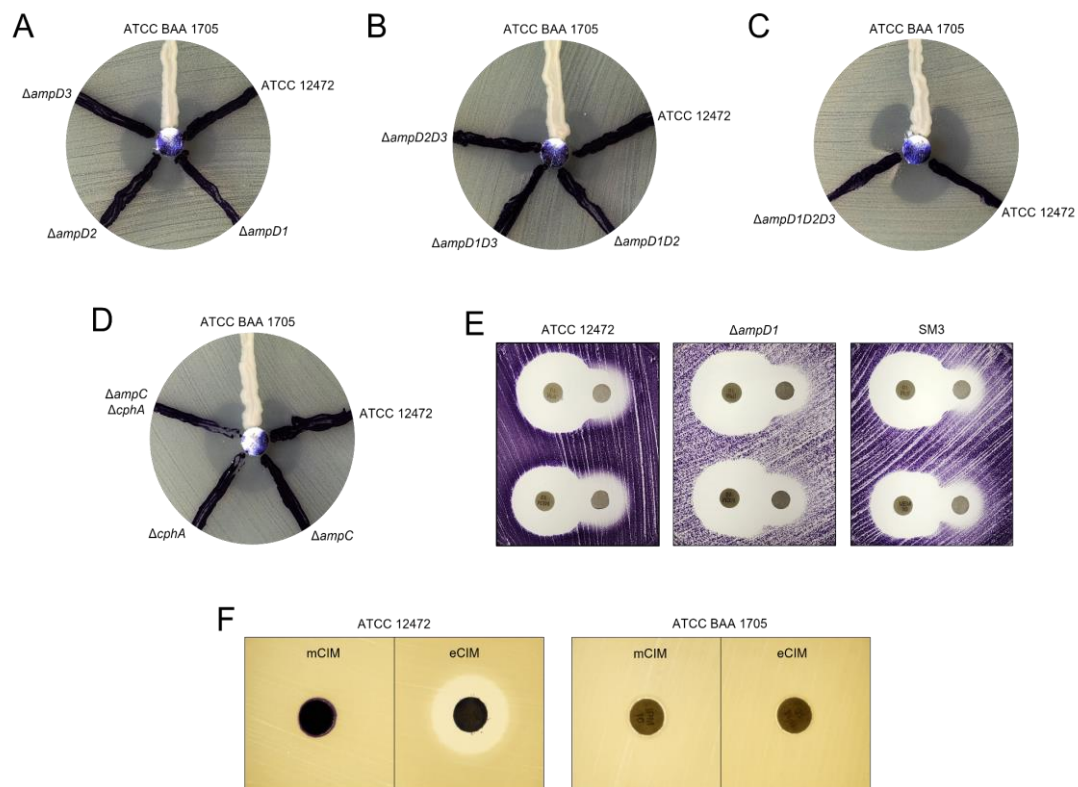


Figura 25. Produção de metalo-carbapenemase ativa em linhagens com mutação em *ampD1*. A verificação da atividade de *C. violaceum* contra carbapenêmicos ocorreu por (A a D) Teste de Hodge Modificado, (E) Teste de Sinergia com disco de EDTA e (F) mCIM e eCIM.

4.3.4 Mutação em *ampD1*, mas não em *ampD2* ou *ampD3*, leva a hiperexpressão das beta-lactamases *ampC* e *cphA*

Conforme realizado anteriormente, as mesmas construções em pRK/*lacZ*290 foram transferidas para os mutantes nulos das amidases por conjugação. Os ensaios realizados indicam que tanto o promotor *PampC* quanto *PcphA* apresentaram alta atividade de beta-galactosidase no mutante $\Delta ampD1$, indicando que as duas beta-lactamases estão hiperexpressas (Figura 26A), o que explica claramente o fenótipo

de resistência a beta-lactâmicos nos mutantes nulos e SM que tem mutação no gene *ampD1*. No entanto, nos mutantes das duas outras amidases, $\Delta ampD2$ e $\Delta ampD3$, ambos promotores tiveram apenas expressão basal comparável ao observado na linhagem selvagem em meio sem antibiótico (Figura 26A), indicando que essas AmpDs não estão relacionadas com a expressão das beta-lactamases. Como antes, AMP foi adicionado nas culturas do ensaio para confirmar a funcionalidade dessas construções nesses mutantes e na linhagem selvagem (Figura 26B). Embora tenha havido certa diferença entre as linhagens, em todas elas houve expressão aumentada na presença de AMP em comparação com o meio LB, indicando que as fusões estavam funcionando nestas linhagens (Figura 26B).

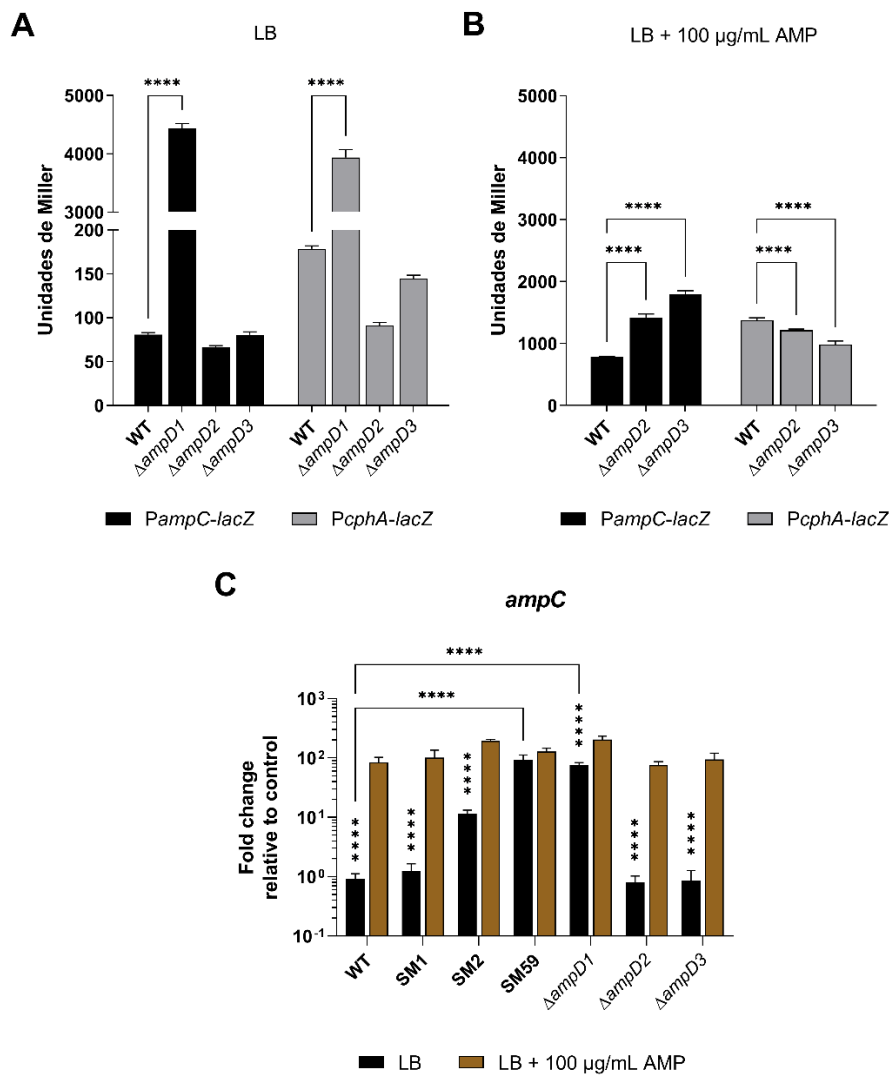


Figura 26. A deleção de *ampD1* eleva a expressão das beta-lactamases em *C. violaceum*. (A) O nível da expressão dos promotores das beta-lactamases foi analisado pelo ensaio de atividade de beta-galactosidase. **(B)** Adição de 100 µg/mL AMP confirma o aumento da expressão dos promotores para além do nível basal devido a indução de beta-lactâmicos. **(C)** Análise da expressão de mRNA de *ampC* em diferentes linhagens por RT-qPCR. Gráficos representativos de ensaios realizados em triplicata

biológica. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; quando não indicado, não é significativo. As estrelas verticais indicam estatística significativa à mesma linhagem em condições diferentes. Foi utilizado Two-way ANOVA seguido por teste de múltiplas comparações de Tukey.

Complementando os dados da expressão das beta-lactamases, foi realizado ensaio de RT-qPCR para *ampC*, usando RNA total de triplicata biológica das linhagens WT, SM1, SM2, SM59, $\Delta ampD1$, $\Delta ampD2$ e $\Delta ampD3$. Após a conversão do RNA para cDNA, foi realizado o ensaio de PCR em tempo real (qPCR) com SYBR Green (Figura 26C). Em meio LB, os mutantes SM2, SM59 e $\Delta ampD1$ apresentaram expressão elevada de *ampC*, enquanto SM1, $\Delta ampD2$ e $\Delta ampD3$ tiveram a expressão de *ampC* nos níveis basais da linhagem selvagem. Estes resultados corroboram os dados do ensaio de beta-galactosidase. Na presença do indutor AMP, *ampC* foi superexpressa em todas as linhagens (Figura 26C).

4.4 Sequenciamento do genoma completo de mutantes espontâneos selecionados

Para encontrar outros genes, além de *ampD1*, envolvidos na via de sinalização e regulação das beta-lactamases de *C. violaceum*, foi realizado o sequenciamento do genoma completo (WGS) de 3 mutantes espontâneos isolados em CAZ e da linhagem selvagem ATCC 12472 (WT) (Figura 27). Para isto, foram escolhidas as seguintes linhagens SM: SM1, que não possui mutação em nenhuma das três amidases e não tem expressão aumentada nem de *ampC* nem de *cphA*; SM2, que não possui mutação nos genes das três amidases, mas tem superexpressão de *ampC* e *cphA*; e SM59, por possuir níveis mais altos de expressão de *ampC* e *cphA* e apresentar uma mutação em CV_0566 (*ampD1*). A escolha de SM59 foi justamente para confirmar se haveria outras potenciais mutações que pudessem contribuir com o aumento da resistência a beta-lactâmicos, uma vez que *ampD1* não complementou esta linhagem. O DNA genômico (gDNA) foi extraído (Figura 27A) e submetido a sequenciamento completo em plataforma NextSeq 2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA). A *facility* NGS Soluções Genômicas em Piracicaba/SP realizou o WGS e a análise de bioinformática em busca de variantes. As chamadas de variantes foram feitas contra o genoma de referência da linhagem WT sequenciada em 2003, depositado no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF016825.1>). Inicialmente, foi feita uma análise de variantes entre a nossa WT ressequenciada e a mesma linhagem WT

sequenciada em 2003. Esta comparação revelou quase três dezenas de mutações localizadas em regiões intergênicas ou regiões codificadoras de vários genes que podem significar mudanças acumuladas com efeito neutro ou de alteração de funcionalidade gênica (Tabela Suplementar 4).

Descontadas estas diferenças já presentes na nossa *C. violaceum* WT ressequenciada, foram detectadas variantes específicas das linhagens SM, sendo duas mutações em cada uma das linhagens SM1, SM2 e SM59, que mapearam em diferentes regiões do genoma de *C. violaceum*, próximo ou dentro da região codificadora de diferentes genes (Figura 27B, Tabela 9). A existência e o efeito de algumas destas mutações foram investigadas e estão apresentadas nos tópicos seguintes.

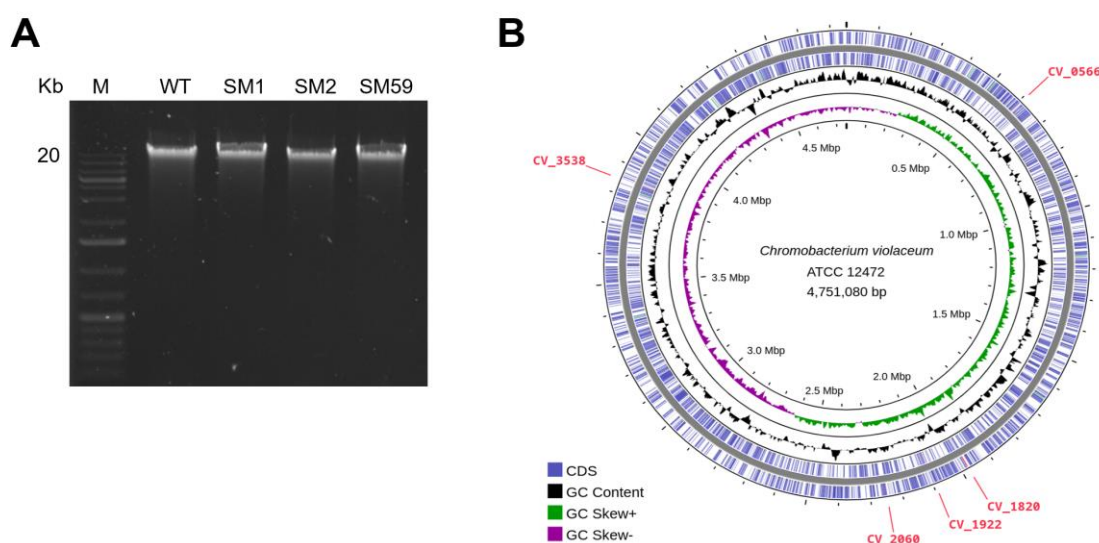


Figura 27. Sequenciamento completo do genoma (WGS) de isolados SM. (A) DNA genômico extraído da linhagem selvagem (WT) e dos mutantes espontâneos SM1, SM2 e SM59. Eletroforese em gel de agarose 1% feito com 0,5x TBE corrido sob tensão de 100 V durante 45 minutos. M, marcador GeneRuler 1Kb plus DNA (Thermo Scientific). **(B)** Representação gráfica do genoma de *C. violaceum* com indicação (em vermelho) dos genes mutados nos isolados SM1, SM2 ou SM59.

Tabela 9. Mutações encontradas nos isolados SM em comparação com linhagem selvagem.

LINHAGENS	ORF	GENE	MUTAÇÕES	ALTERAÇÃO	POSIÇÃO
SM1	CV_1820	Rne/Rng família ribonuclease E	Frameshift	13 pb	(402 .. 415)
	CV_1922	Região intergênica	SNP - NCR	G → C	-
SM2	CV_1922	Região intergênica	SNP - NCR	G → C	-
	CV_2060	RseB fator anti-sigma E	Missense	CAA → TAA	Q304Stop
SM59	CV_0566	AmpD1 amidase	Missense	TGG → TAG	W35Stop
	CV_3538	IspG flavodoxina/ ferredoxina/dihydropteroato sintase	Missense	TTC → CTC	F131L

ORF = Open Reading Frames; NCR = Non-Coding Region.

4.4.1 Variantes com mutação na região intergênica do regulador CV_1922 são um artefato decorrente da ausência da transposase CV_1923

Nos isolados SM1 e SM2 foi detectada uma troca G por C na região intergênica entre os genes CV_1922 e CV_1923 (Tabela 9), que codificam um regulador transcricional da família GntR e uma transposase da família IS3, respectivamente. Uma hipótese levantada foi que CV_1922 pudesse ser um regulador das beta-lactamases e que a mutação encontrada no WGS na região intergênica deste gene pudesse alterar sua expressão e afetar a resistência aos beta-lactâmicos. Para testar esta hipótese, decidimos gerar um mutante do gene CV_1922. No entanto, houve dificuldades com o protocolo de dupla recombinação homóloga: não conseguimos obter o produto de PCR da região flanqueadora do lado do gene CV_1923 com os oligos del1/del2. Análise *in silico* apontou a presença de outras 4 cópias idênticas da transposase CV_1923 (CV_0004, CV_1248, CV_2224, CV_2556) no genoma de *C. violaceum*, sugerindo que a dificuldade para obter o produto de PCR foi decorrente de del1 parear dentro de CV_1923. Além disso, por possuir 5 cópias idênticas de transposase, no momento da primeira recombinação homóloga (Figura 13) poderiam ocorrer recombinações errôneas nos outros 4 genes. Para contornar isso, foi utilizado a metodologia de obtenção de mutante de inserção por meio de um único evento de recombinação homóloga (BATISTA *et al.*, 2019), que se dá com a inserção do vetor pNPTS138 no meio do gene a ser interrompido (CV_1922). Um mutante por inserção em CV_1922 (*gntR*:pNPTS138) foi obtido e confirmado por PCR (Figura 28A, B).

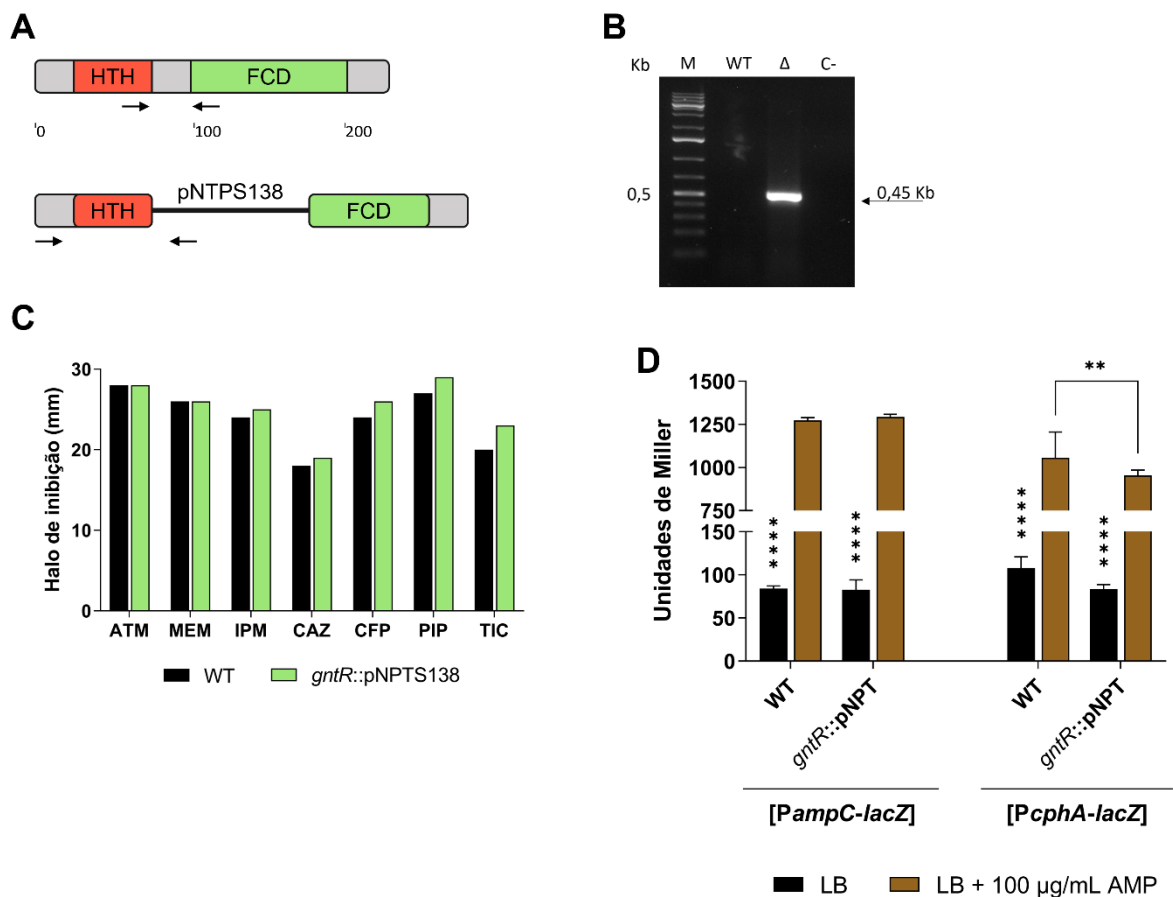


Figura 28. O gene CV_1922 (GntR) não mostrou papel na resistência aos beta-lactâmicos. (A) Esquema de obtenção do mutante de inserção *gntR::pNPTS138*. HTH e FDC indicam domínios do regulador da família GntR CV_1922. As setas indicam o fragmento clonado no vetor pNPTS138 (superior) e os oligos usados para confirmar o mutante (inferior). **(B)** Fragmento gerado por PCR foi obtido utilizando um oligo do começo da região codificadora (CV1922_Exp_FW) e outro do vetor (M13_FW) para confirmar a inserção no genoma. Eletroforese em gel de agarose 1% feito com 0,5x TBE corrido sob tensão de 100 V durante 45 minutos. M, marcador GeneRuler 1Kb plus DNA (Thermo Scientific); os demais poços são as linhagens analisadas; C-, controle negativo, sem molde. O tamanho esperado do *amplicon* está indicado na figura. O mutante *gntR::pNPTS138* foi caracterizado em relação a linhagem selvagem nos ensaios de **(C)** disco-difusão (representação gráfica da tabela suplementar 5) e **(D)** atividade de beta-galactosidase. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; quando não indicado, não é significativo. As estrelas verticais indicam estatística significativa na mesma amostra em condições diferentes. Two-way ANOVA seguido por teste de múltiplas comparações de Tukey.

Após a obtenção do mutante de inserção *gntR::pNPTS138*, foi possível estudar o papel de CV_1922 na resistência aos beta-lactâmicos (Figura 28C) e na expressão das beta-lactamases (Figura 28D). No ensaio de disco difusão não foram observadas diferenças significativas nos halos de inibição de crescimento entre o mutante *gntR::pNPTS138* e a linhagem selvagem, indicando o mesmo perfil de resistência (Figura 28C). A expressão de *ampC* e *cphA* também não se mostrou alterada no mutante *gntR::pNPTS138*, seja na ausência ou presença de AMP (Figura 28D). Além disso, foi testada a capacidade de CV_1922 (GntR) purificada (Figura 29A) de ligar

nos promotores de *cphA* e *ampC* em ensaios de EMSA (Figura 29B, C). Embora tenha havido uma aparente ligação com 50 e 100 nM de GntR nas sondas de ambas beta-lactamases, isto não parece ser algo específico, pois o mesmo foi visto em sonda do promotor de *cviR*, usado como controle negativo (Figura 29D). Logo, estes dados contrapõem a hipótese de que o regulador CV_1922 esteja relacionado à regulação das beta-lactamases em *C. violaceum*.

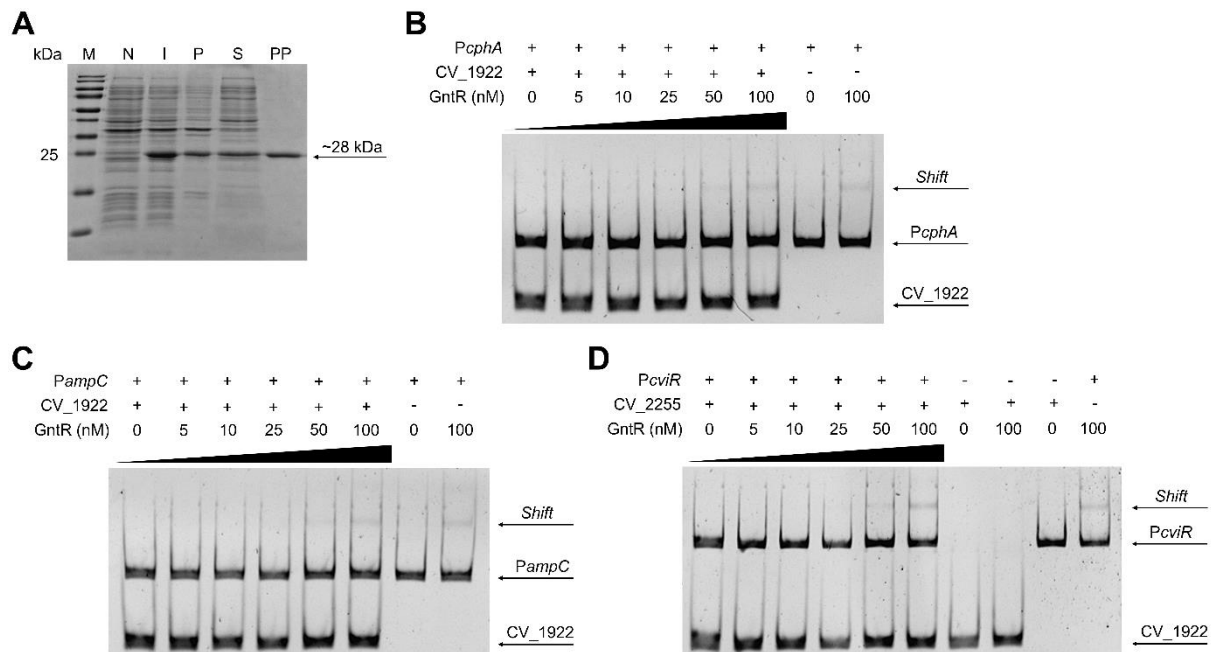


Figura 29. Purificação e EMSA de CV_1922 (GntR). (A) A proteína CV_1922 fusionada a cauda de histidina foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. As amostras obtidas no processo de purificação foram visualizadas em SDS-PAGE 15% a 120 V por 90 minutos. O primeiro poço do gel é referente ao marcador (M) PageRuler Prestained Protein (Thermo Scientific), enquanto os demais poços são as linhagens analisadas: N - *pellet* não induzido, I - *pellet* induzido com IPTG, P - *pellet* do sonicado, S - sobrenadante do sonicado e PP - proteína CV_1922 purificada. (B e C) EMSA da proteína CV_1922 purificada (GntR em nM) com as sondas da região promotora das beta-lactamases (*PcphA* ou *PampC*) e uma sonda inespecífica interna na reação (CV_1922, fragmento da região codificadora do gene CV_1922). (D) EMSA usando duas sondas não relacionadas inespecíficas (*PcviR* e CV_2255).

Como a troca G por C na região intergênica entre os genes CV_1922 e CV_1923 não pareceu afetar CV_1922, decidimos avaliar o gene seguinte, que compartilha a região intergênica, CV_1923 (transposase). A dificuldade de gerar um *amplicon* por PCR com oligo dentro de CV_1923, relatada acima, nos fez levantar a hipótese da saída do gene da transposase daquela região. Para testar isto, foi feito PCR com o par de oligos CV1922_MODEL_UP/CV1922del4, com a expectativa de gerar um produto de PCR com 2,6 Kb contendo os genes CV_1922 e CV_1923 e suas respectivas regiões promotoras. Reações de PCR foram realizadas com o mesmo

DNA das quatro linhagens enviado e usado no WGS para verificar o tamanho do fragmento em cada uma das linhagens (Figura 30). Curiosamente, todas apresentaram um produto de 1,3 kb, a metade do esperado, e a análise da sequência dessa região do genoma permitiu concluir que o tamanho faltante equivale ao tamanho do gene da transposase. Sequenciamento de Sanger deste produto de PCR nas quatro amostras revelou ausência do gene da transposase e presença do gene CV_1922 (*gntR*), indicando que esta troca na análise WGS, na verdade, é um artefato.

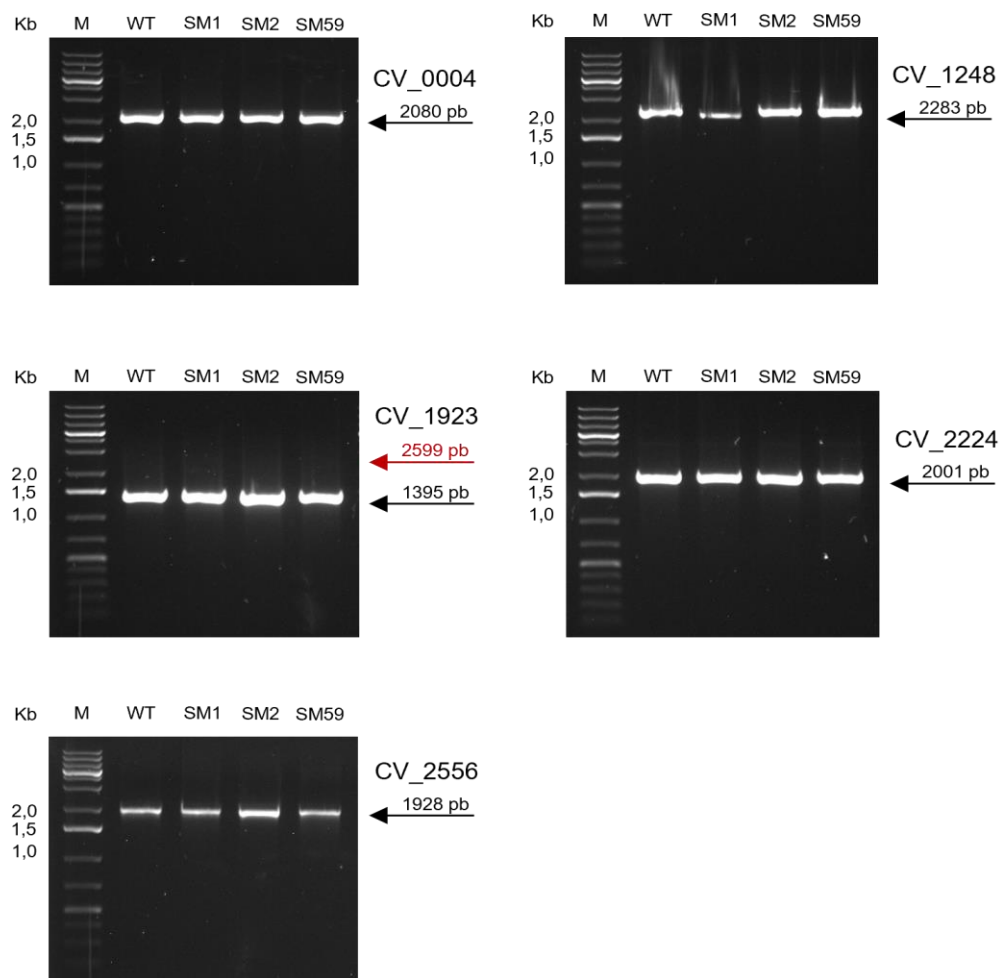


Figura 30. Verificação de transposases. O DNA enviado para WGS da linhagem selvagem e mutantes foram utilizados como molde nas reações de PCR para verificar a presença dos cinco genes de transposase em *C. violaceum*. Eletroforese em gel de agarose 1% feito com 0,5x TBE corrido sob tensão de 100 V durante 50 minutos. O primeiro poço de cada gel é referente ao marcador (M) GeneRuler 1Kb plus DNA (Thermo Scientific), enquanto os demais poços são as linhagens analisadas. O tamanho esperado de cada *amplicon* está indicado na figura.

A visualização *in silico* do DNA genômico sequenciado no aplicativo IGV nos permitiu observar uma baixa qualidade do sequenciamento na região do gene

CV_1923 em decorrência desta região está repetida cinco vezes no genoma (transposases CV_1923, CV_0004, CV_1248, CV_2224, CV_2556). O genoma referência nos bancos de dados NCBI e KEGG conta com a presença do gene CV_1923. Logo é possível pensar em duas possibilidades: (i) ocorreu a excisão do gene da transposase CV_1923 na linhagem selvagem de nosso laboratório em algum momento posterior a 2003, (ii) devido à dificuldade de trabalhar com essas regiões repetidas, a anotação do gene CV_1923 no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 nos bancos está errada. A mesma abordagem de PCR com oligos flanqueando cada gene de transposase seguido de sequenciamento de Sanger revelou que todos os genes das transposases, exceto CV_1923, estão presentes nas quatro linhagens usadas no WGS (Figura 30). Portanto, a aumentada resistência aos beta-lactâmicos dos isolados SM1 e SM2 não se deve os genes CV_1922 e CV_1923, e talvez seja decorrente das mutações detectadas na análise WGS em CV_1820 (ribonuclease E) (SM1) e CV_2060 (RseB) (SM2) (Tabela 9). Para SM59, foi confirmada a mutação em AmpD1 e detectada outra mutação em CV_3538 (*ispG*) (Tabela 9) que codifica uma proteína da via de síntese de isoprenoides. Como *ampD1* não complementou SM59, talvez a resistência deste isolado aos beta-lactâmicos seja devido a mutação em *IspG*.

4.4.2 O mutante SM2 tem expressão aumentada de sigma E

O mutante SM2 apresentou uma mutação *nonsense* no gene *rseB* (Tabela 9, Figura 31). Em *E. coli*, RseB é uma proteína acessória que se liga ao fator anti-sigma RseA. Tanto RseA quanto RseB controlam negativamente a atividade de RpoE (sigma E), um fator sigma que tem seu regulon expresso em resposta a estresse do envelope (CHABA *et al.*, 2011). Assim, a expressão de *rpoE* foi avaliada por RT-qPCR para verificar se a mutação em *rseB* geraria aumento da atividade de sigma E (assumindo que o operon é autorregulado) (Figura 31). Foi observado um aumento na expressão de *rpoE* no mutante SM2 em relação a linhagem selvagem, independente da presença do antibiótico beta-lactâmico ampicilina (Figura 31B), sugerindo que SM2 está com o regulon sigma E ativado. Mais experimentos são necessários para determinar se a resistência de SM2 aos beta-lactâmicos pode ser atribuída a ativação do regulon sigma E em *C. violaceum*.

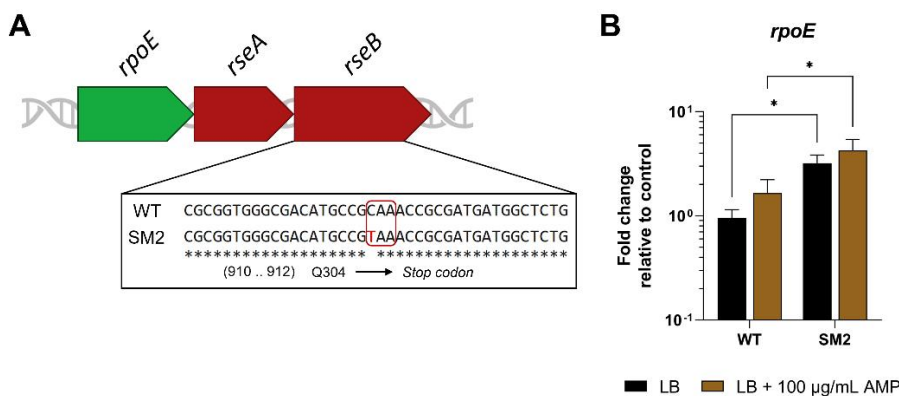


Figura 31. O gene *rpoE* tem expressão aumentada no mutante SM2. (A) Esquema representativo do operon *rpoE-rseA-rseB* em *C. violaceum*. No detalhe, a mutação encontrada em *rseB* na linhagem SM2. **(B)** Expressão do gene *rpoE* (CV_2058) analisada por RT-qPCR. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata biológica. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; quando não indicado, não é significativo. Two-way ANOVA e múltiplas comparações de Tukey.

4.5 Novos mutantes espontâneos e mais questionamentos quanto a resistência a beta-lactâmicos em *C. violaceum*

Visto o potencial dos mutantes espontâneos como ferramenta para encontrar novas vias e genes envolvidos na regulação da resistência aos beta-lactâmicos, uma nova prospecção foi realizada em CAZ durante o estágio BEPE. Esta também seria uma forma de validar a frequência com que mutações em *ampD1* ocorrem em *C. violaceum*, uma vez que mutações nesse gene é uma forma de sobrevivência contra antibióticos beta-lactâmicos em *Burkholderia cenocepacia* e *P. aeruginosa* (HWANG & KIM, 2015; PÉREZ-GALLEGU *et al.*, 2016). As concentrações escolhidas para o ensaio foram 32, 64, 128, 256 e 512 $\mu\text{g/mL}$. Após 24 horas de cultivo em placa, foi surpreendente encontrar 22 colônias em 512 $\mu\text{g/mL}$ e 33 colônias em 256 $\mu\text{g/mL}$ de CAZ, uma vez que na primeira prospecção as colônias de *C. violaceum* foram isoladas em concentrações menores de CAZ. A principal diferença entre os dois ensaios foi a troca do uso de CAZ como pó comercial (Sigma A6987-1G) sem a presença de Na_2CO_3 por pó comercial voltado para a prática clínica que possui Na_2CO_3 (Hikma PLB803-POR/2), uma condição que melhoraria a solubilização do antibiótico (CLSI, 2021).

Para confirmação do fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos desses 55 isolados, o ensaio de ágar-diluição foi realizado como descrito anteriormente (Tabela 10). Aqui, foi observado um super aumento da resistência a CAZ em 26 isolados (CIM acima de 2048 $\mu\text{g/mL}$) em relação à linhagem selvagem. Esta resistência elevada também se confirmou por ensaio de disco-difusão para vários outros antibióticos beta-

lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos (Tabela Suplementar 6). Muitos isolados apresentaram colônias dentro dos halos, assim como os SMs anteriormente obtidos.

Tabela 10. Valores de CIM para CAZ de novos mutantes espontâneos.

LINHAGENS	CIM CAZ ($\mu\text{g/mL}$)		
	1ª RÉPLICA	2ª RÉPLICA	3ª RÉPLICA
WT	32	32	64
SMB2	>2048	>2048	>2048
SMB4	512	512	512
SMB5	256	256	256
SMB9	512	512	512
SMB12	128	128	128
SMB15	1024	1024	1024
SMB18	>2048	>2048	>2048
SMB19	2048	2048	2048
SMB20	>2048	>2048	>2048
SMB25	2048	2048	2048
SMB31	2048	2048	2048
SMB32	>2048	>2048	>2048
SMB33	2048	2048	2048
SMB34	>2048	>2048	>2048
SMB37	2048	2048	2048
SMB39	>2048	>2048	>2048
SMB42	1024	1024	1024
SMB43	2048	2048	2048
SMB44	2048	2048	2048
SMB45	2048	2048	2048
SMB47	>2048	>2048	>2048
SMB48	>2048	>2048	>2048
SMB49	>2048	>2048	>2048
SMB50	>2048	>2048	>2048
SMB51	512	512	512
SMB55	2048	2048	2048

A avaliação de aptidão por curvas de crescimento em meio LB revelou que as linhagens SMB12, SM18, SM19, SMB32, SMB34, SMB39, SMB42, SMB44, SMB45, SMB47, SMB48 e SMB55 possuem atraso de crescimento em comparação com a linhagem selvagem (Figura 32A) que também pode ser observado no tempo maior para dobra da cultura, bem como a chegada à fase estacionária (Figura 32B, C, D). Por outro lado, inesperadamente a expressão dos promotores das beta-lactamases, analisada por beta-galactosidase, não se mostrou além do nível basal encontrado na linhagem selvagem (Figura 32 E e G), sendo necessária a indução por AMP para

observar esse aumento (Figura 32F e H). Assim como SM1, todos esses 26 mutantes possuem sua grande resistência determinada por outros componentes do seu genoma e não pela expressão elevada das beta-lactamases.

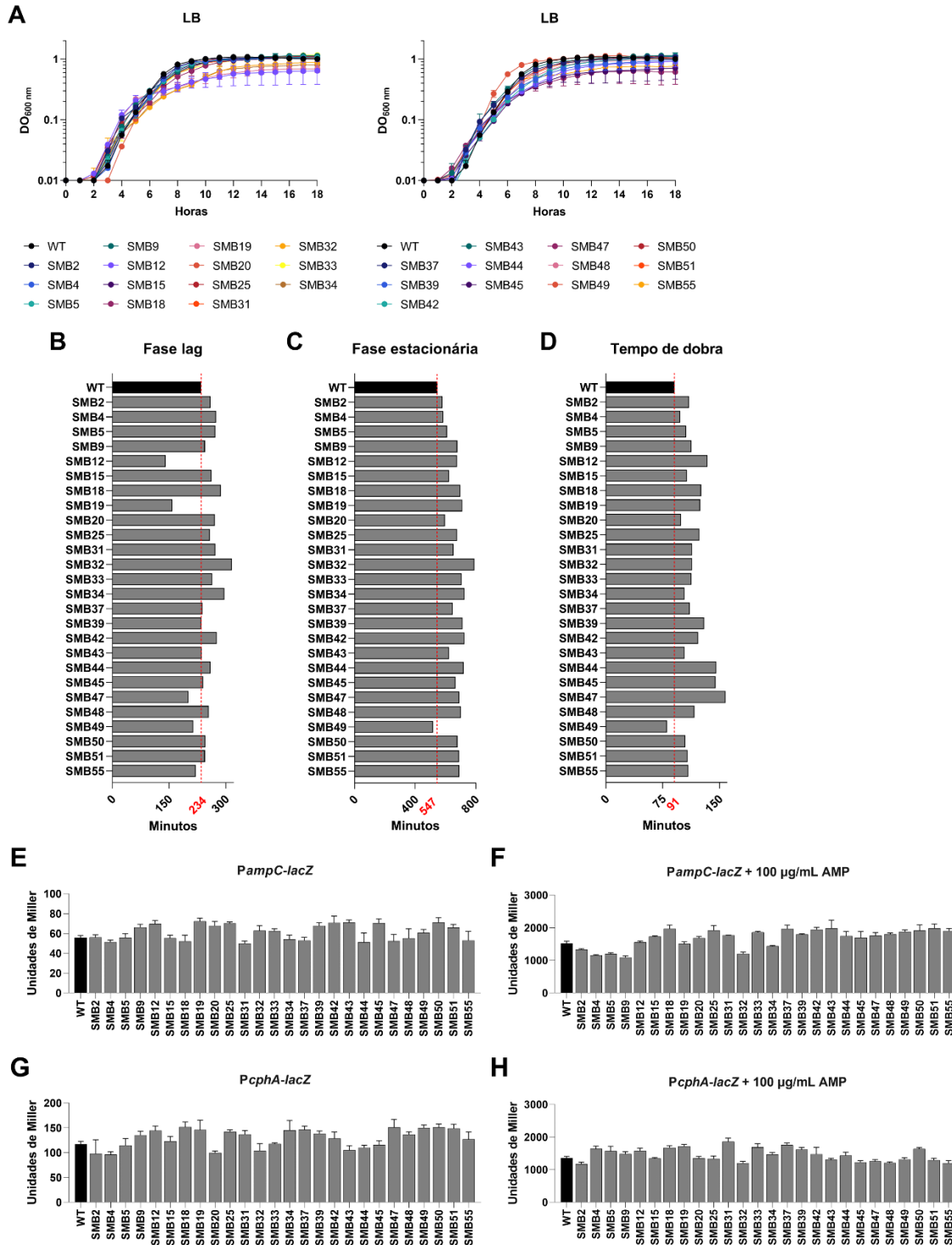


Figura 32. Avaliação da aptidão e da expressão de beta-lactamases em novos mutantes espontâneos. (A) O crescimento bacteriano da linhagem selvagem e mutantes foi avaliado em meio LB no leitor de placas BioTek Epoch 2 (Agilent). **(B, C e D)** Média da análise de crescimento em fase lag, estacionária e o tempo de dobra através do aplicativo Gen6 Data Analysis Software (Agilent). Ensaio de beta-galactosidase com **(E e F)** promotor de *ampC* na ausência e presença de AMP e **(G e H)** do promotor de *cpmA* nas mesmas condições. Gráficos representativos de ensaios realizados em triplicata biológica.

Ainda, através do sequenciamento de CV_0566 (*ampD1* - 1259 pb), CV_1310 (*ampC* - 1846 pb) e CV_3150 (*cphA* - 1310 pb), foi confirmado que nenhuma das linhagens selecionadas apresentou mutações nesses genes, algo não esperado visto o grande aumento de resistência em comparação com os mutantes obtidos anteriormente. Mais estudos são necessários para averiguar que outros mecanismos de resistência estão ocorrendo nestes novos mutantes espontâneos isolados de *C. violaceum* selvagem ATCC 12472.

4.6 Proteínas com potencial ligação aos promotores de *ampC* e *cphA* capturadas por ensaio de *pull-down*

Para identificar fatores de transcrição responsáveis pela regulação das beta-lactamases em *C. violaceum*, inicialmente foi realizada uma análise *in silico* com o objetivo de comparar os reguladores das beta-lactamases presentes em *P. aeruginosa* (o fator de transcrição AmpR e o sistema de dois componentes CreBC) e *Aeromonas sp.* (o sistema de dois componentes BlrAB) (JACOBY, 2009; JUAN *et al.*, 2017) com o genoma de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, por meio da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). No entanto, esta análise não foi conclusiva, pois altos valores de similaridade foram encontrados para diversos fatores de transcrição de *C. violaceum*.

Devido a dificuldade de encontrar *in silico* uma possível proteína reguladora das beta-lactamases em *C. violaceum*, uma alternativa a esse dilema foi testar quais proteínas poderiam se ligar às regiões promotoras de *ampC* e *cphA*, usando um ensaio de *pull-down* de afinidade a DNA (CHAPARIAN & KESSEL, 2020) (Figura 33). Para isto, foram preparados extratos solúveis por sonicação de culturas das linhagens selvagem (WT) e $\Delta ampD1$ cultivadas em meio LB e WT cultivada em LB suplementado com AMP. No caso de um regulador ativador, poderia ser visto o aumento da ligação nas sondas com extrato do mutante $\Delta ampD1$ e da linhagem WT com indução por AMP, condições em que há aumentada expressão das beta-lactamases. No entanto, para o caso de um regulador repressor, o aumento da ligação estaria na linhagem WT em LB. As reações de PCR utilizando os oligos biotinizados funcionaram corretamente, mas com pouca eficiência por reação, sendo obtido 123,3 ng/ μ L para a sonda de *PampC* e 191 ng/ μ L para *PcphA*. Assim, a sonda *PampC* foi utilizada em dois extratos, enquanto *PcphA* foi usada nos três extratos planejados.

As etapas de lavagem e eluição do ensaio de *pull-down* foram analisadas em SDS-PAGE 15% (Figura 33). Após a incubação das *beads*-sondas com o extrato solúvel, foram realizadas cinco lavagens. As proteínas que não se ligaram às sondas foram eliminadas, sendo perceptível a saída de grande quantidade logo na primeira lavagem (Figura 33C, D). Um gradiente com concentração do tampão de eluição foi aplicado para que as proteínas soltassem das sondas (Figura 33A, B). Poucas proteínas se soltaram das sondas na presença de 0,2 M de NaCl. Grande parte das proteínas passaram a ser eluídas em 0,5 M de NaCl, mas aquelas mais fortemente ligadas se soltaram com 1 M de NaCl. Curiosamente, todas as linhagens apresentaram um perfil proteico semelhante em todas as condições testadas (Figura 33A, B). Cinco proteínas eluídas com tamanhos típicos de fatores de transcrição foram recortadas do gel e enviadas para espectrometria de massas (aguardando resultado).

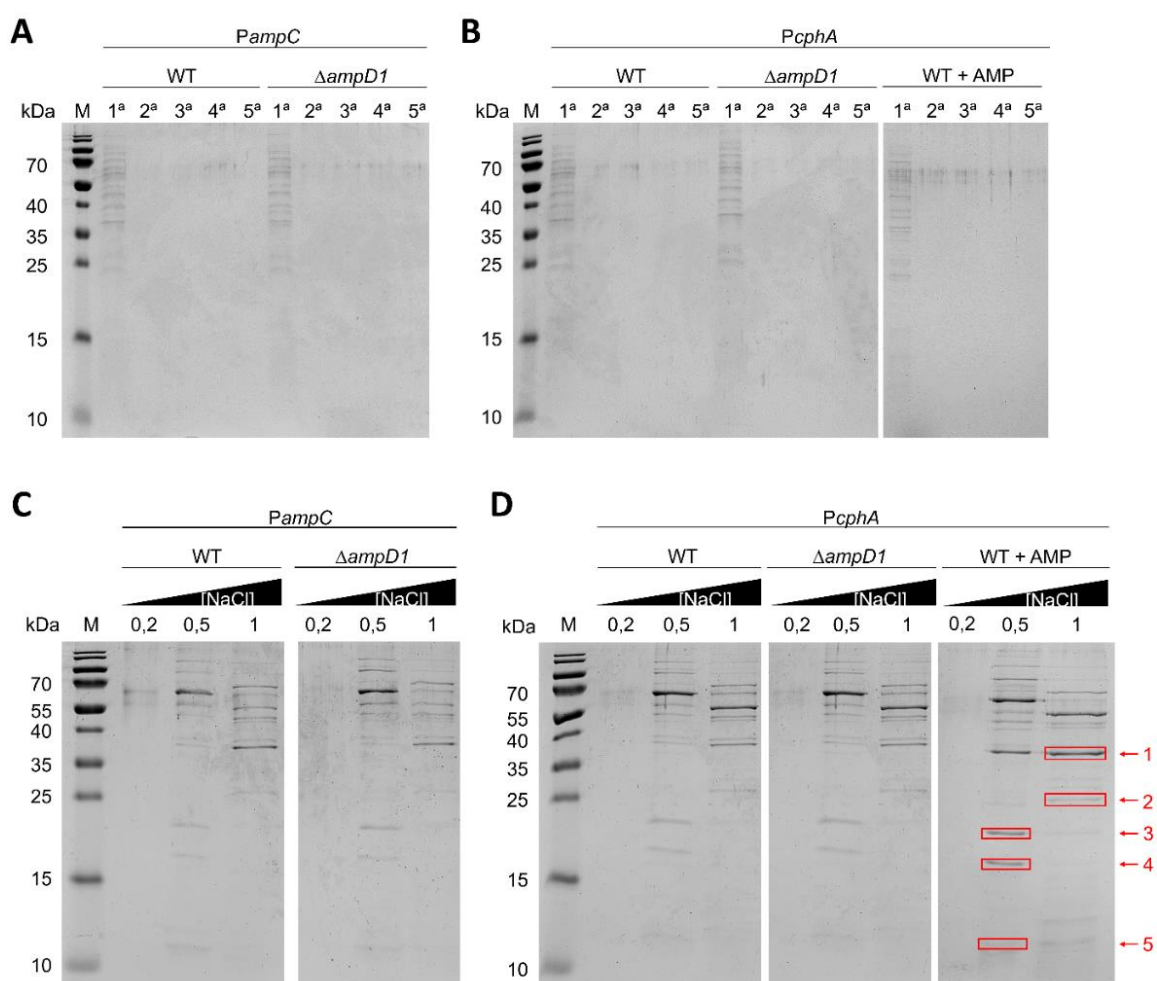


Figura 33. Análise das proteínas eluídas no *pull-down* com DNA do promotor de *ampC* e *cphA*. (A e B) Lavagens das *beads* após a incubação com o extrato de cada linhagem com *PampC* e *PcpA*. (C) Proteínas eluídas de WT e $\Delta ampD1$ em *PampC*. (D) Proteínas eluídas de WT, $\Delta ampD1$ e WT suplementado com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMP em *PcpA*. As proteínas das lavagens e eluições foram analisadas em SDS-PAGE 15%. M, marcador PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). As eluições foram feitas com 0,2, 0,5 e 1 M de NaCl.

5 DISCUSSÃO

Visto o amplo e emergente aumento de resistência a antibióticos por diferentes bactérias de importância clínica nas últimas décadas e a crescente ocorrência de infecções humanas por bactérias oportunistas incomuns devido a fatores relacionados ao paciente (JUAN *et al.*, 2017; ECDC, 2023), tornam-se cada vez mais urgentes estudos para compreender os diferentes mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. *Chromobacterium violaceum* é um bom exemplo de patógeno oportunista ambiental com elevada resistência intrínseca a antibióticos, sobretudo aos beta-lactâmicos (ALDRIDGE *et al.*, 1988; FANTINATTI-GARBOGGINI *et al.*, 2004; YANG e LI, 2011; SWAIN *et al.*, 2014; GOMEZ *et al.*, 2023). No entanto, pouco se sabe sobre mecanismos de resistência a antibióticos em *C. violaceum*. Nosso grupo descreveu um mecanismo de resistência à quinolona ácido nalidíxico por mutações no repressor EmrR que levam a superexpressão da bomba de efluxo do tipo MFS EmrCAB e consequente resistência a este antibiótico (BARROSO *et al.*, 2018). Em *Chromobacterium subustugae*, foi identificado que o *cluster cdeAB-oprM* codifica uma bomba de efluxo RND que confere resistência a antibióticos, cuja regulação envolve o sistema de *quorum sensing* CviLR e o repressor CdeR da família TetR (BENOMAR *et al.*, 2019; KOIRALA *et al.*, 2023).

Apesar de *C. violaceum* não possuir beta-lactamases de classe A, recentemente foi descoberto por análises de alinhamento de aminoácidos em banco de dados a presença de três enzimas desta classe em três diferentes espécies de *Chromobacterium* (*C. piscinae* ND17, *Chromobacterium* sp. C-61 e *C. haemolyticum* DSM19808), apresentando identidade de até 76% com a enzima KPC-2, o que sugere um papel importante delas na evolução de KPC (GUDETA *et al.*, 2016). Dentre essas três enzimas descobertas, CRH-1 de *C. haemolyticum* apresenta semelhanças bioquímicas e estruturais com KPC-2, possuindo atividade contra penicilinas, algumas cefalosporinas e carbapenêmicos (BRUNETTI *et al.*, 2023).

Análise do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 revela duas beta-lactamases, AmpC e CphA (BNGPC, 2003). Um estudo recente do nosso grupo demonstrou que muito da resistência aos beta-lactâmicos em *C. violaceum* é mediada por estas duas enzimas beta-lactamases cromossômicas, a cefalosporinase AmpC (classe C, grupo 1) e a carbapenemase de espectro limitado CphA (metalo-beta-lactamase de classe B, grupo 3b) (NEME, 2019). No entanto, como a expressão destas enzimas é

regulada, os mecanismos pelos quais emergem linhagens com mutações de resistência e a frequência dessas em genes envolvidos na via de sinalização e regulação destas enzimas, são questões até então ainda não investigadas em *C. violaceum*. Neste trabalho, exploramos estas questões tendo como ponto de partida o isolamento de mutantes espontâneos na presença de ceftazidima (CAZ). Em uma primeira prospecção, emergiram isolados com mutações sobretudo na amidase AmpD1, os quais tinham hiperexpressão de *ampC* e *cphA*. Sequenciamento WGS de isolados selecionados revelou novas mutações potencialmente envolvidas na resistência aos beta-lactâmicos. Na segunda prospecção, os isolados resistentes a CAZ não tiveram alteração na expressão das beta-lactamases, nem mutações em AmpD1. Proteínas ligantes ao DNA dos promotores de *ampC* e *cphA* foram obtidas em ensaio de *pull-down* e identificação destas poderá revelar fatores de transcrição que regulam estas beta-lactamases.

Após tentativas frustradas de isolar mutantes espontâneos (SM) de *C. violaceum* em imipenem (IPM) e cefoxitina (FOX) devido ao caráter fortemente indutor de beta-lactamases destes antibióticos, padronizamos o isolamento em CAZ, uma cefalosporina de terceira geração que se mostrou um fraco indutor (Figura 14). De 60 isolados SM selecionados em CAZ, 19 foram analisados quanto a sua resistência a diferentes antibióticos beta-lactâmicos através do ensaio de disco-difusão (Figura 15) e diluição em ágar para determinação dos valores de CIM de CAZ (Tabela 6). Isso permitiu selecionar 13 isolados SM que apresentaram grande resistência para a maioria dos beta-lactâmicos testados. Curiosamente, somente os isolados SM1 e SM2 apresentaram fenótipo de resistência para os carbapenêmicos testados (MEM e IPM), sendo o mutante SM1 o mais resistente entre os 13 isolados. Este dado sugere a existência de possíveis vias diferentes ativas nessas duas linhagens em relação as demais. A aptidão destes 19 isolados, testada por parâmetros de curvas de crescimento em meio LB, relevou diminuição de aptidão apenas para SM1, justamente o isolado com maior resistência aos antibióticos (Figura 16). Conforme apresentado na literatura, há uma correlação entre grande aumento de resistência a antibióticos e redução de aptidão e de virulência causada pelas diferentes mutações nesses isolados (MOYA *et al.*, 2008; PÉREZ-GALLEGO *et al.*, 2016). Em um estudo futuro, um ensaio de virulência pode ser realizado para verificar se essa particularidade é igualmente presente em *C. violaceum*.

Tendo isso em vista, foram analisados nos isolados SM os níveis de expressão dos promotores de *ampC* e *cphA* por ensaio de atividade de beta-galactosidase (Figura 17). Os resultados obtidos foram conclusivos em relação à elevada expressão de ambas beta-lactamases em 12 dos 13 isolados SM que confirmaram aumentada resistência a beta-lactâmicos (exceto SM1), reforçando a ideia de que a resistência destes isolados deve-se a hiperexpressão das duas beta-lactamases cromossômicas de *C. violaceum*. Estudos têm demonstrado que mutações em amidases AmpD, enzimas importantes na reciclagem do PGN, estão associadas a aumentada expressão de beta-lactamases e resistência a antibióticos beta-lactâmicos em isolados clínicos de diferentes bactérias, como *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia*, *C. freundii*, *E. cloacae* e *E. coli* (STAPLETON *et al.*, 1995; PETROSINO *et al.*, 2002; KORSACK *et al.*, 2005; SCHMIDTKE *et al.*, 2008; CARRASCO-LÓPEZ *et al.*, 2011; HWANG & KIM, 2015; GUÉRIN *et al.*, 2015; TORRENS *et al.*, 2019). Assim, o sequenciamento de amidases nos isolados SM de *C. violaceum* poderia ajudar na compreensão da cascata regulatória das beta-lactamases.

Análises *in silico* indicaram três parálogos de amidases AmpD em *C. violaceum* (AmpD1/CV_0566, AmpD2/CV_1309 e AmpD3/CV_3031) com domínio de amidase-2 (PF01510), algo semelhante ao que ocorre em *P. aeruginosa* (MOYA *et al.*, 2009; PÉREZ-GALLEGO *et al.*, 2016; TORRENS *et al.*, 2019). Uma potencial quarta amidase em *C. violaceum* (AmpD4/CV_3822) possui domínio amidase-3 (PF01520) e se aproxima mais de AmiABC de *E. coli* (DE SOUZA *et al.*, 2008) (Figura 18). O sequenciamento das três amidases parálogas de *C. violaceum* nos 19 isolados SM indicou ausência de mutação em AmpD2 e AmpD3 e mutações de diferentes tipos em AmpD1 em 11 dos 12 isolados SM (exceto SM2) que tiveram expressão e resistência aumentadas aos beta-lactâmicos (Tabela 7, Figura 19). O papel preponderante de AmpD1 em relação aos parálogos AmpD2 e AmpD3 em mediar a regulação e resistência aos beta-lactâmicos foi confirmado utilizando mutantes nulos simples e combinados com deleção dos genes destas três amidases, uma vez que (i) mutação em *ampD1*, mas não em *ampD2* ou *ampD3*, causou aumento da resistência aos beta-lactâmicos (Tabela 7, Figura 23) e da expressão das beta-lactamases (Figura 26); (ii) com exceção de SM59, *ampD1* resgatou a susceptibilidade a CAZ quando introduzido em todos os demais 10 mutantes SM com mutação pontual em *ampD1* (Figura 24, Tabela Suplementar 3). Estes achados diferem do que foi visto em *P. aeruginosa*, uma vez que nesta bactéria é necessária a inativação sequencial das três amidases em

um mutante triplo para obter níveis tão altos de expressão e resistência (JUAN *et al.*, 2006; MOYA *et al.*, 2009; PÉREZ-GALLEGO *et al.*, 2016).

A AmpD1 de *C. violaceum* possui outra importante peculiaridade, a presença na sua porção N-terminal de um domínio de acetiltransferase (ACTF_1; PF00583; EC 2.3.1) pertencente à família GNAT (*N-acetiltransferases-like-Gcn5*) (Figura 18). A proteína nesta configuração de domínios (1020 pb, 339 aa) resultou de uma reanotação, uma vez que na anotação original do genoma o gene CV_0566 (*ampD1*) era precedido de uma grande região intergênica e apresentava o tamanho de 546 pb, iniciando a tradução pelo códon TTG apenas do domínio de amidase (181 aa). Nossas análises usando InterPro e alinhamento por BLAST sugerem que somente bactérias filogenéticas próximas a *C. violaceum* (gêneros *Aquitalea spp.*, *Chromobacterium spp.*, *Gulbenkiania spp.*, *Pseudogulbenkiania spp.* e *Vogesella spp.*) possuem amidase com essa arquitetura (não mostrado). É plausível acreditar que, de alguma forma, esses gêneros evoluíram para uma estrutura de amidase similar. Apesar da função desse domínio ser catalisar a transferência de um grupo acetil para um substrato, ainda é desconhecido o real papel desse domínio em uma amidase. Dentro da família GNAT existem N-acetiltransferases capazes de inativar antibióticos aminoglicosídeos ao acetilar grupamentos amino na sua estrutura (BURK *et al.*, 2003). Análise preliminar com AlphaFold2 sugere que o domínio de acetiltransferase de AmpD1 assemelha-se a SpeG de *Vibrio cholerae* (não mostrado) que codifica uma SSAT (*Spermidine/Spermine N-acetyltransferase*), uma proteína dodecamérica capaz de acetilar as poliaminas espermidinas e esperminas para que possam ser exportadas ou marcadas para reciclagem (LE *et al.*, 2021). Assim, mais estudos são necessários para entender o papel do domínio de acetiltransferase na amidase AmpD1 de *C. violaceum*.

Além de seu envolvimento em vias de sinalização de resistência a beta-lactâmicos, as amidases desempenham diversos papéis no metabolismo do PGN, impactando outros processos fisiológicos. Caracterização fenotípica dos mutantes nulos das três amidases parálogas de *C. violaceum* para aptidão, motilidade e produção de biofilme e violaceína indicou, de modo geral, redução nestes parâmetros nos mutantes que possuam a deleção de *ampD1*, estando este efeito mais nítido no mutante triplo (Figuras 21, 22). O motivo da maior relevância de AmpD1 em relação as demais amidases ainda precisa ser melhor investigado, mas é compreensível que o mutante triplo seja mais afetado, ao considerarmos que a deleção das três amidases

deve impactar mais fortemente a saúde do PGN. De fato, perturbações na síntese da parede celular alteram a formação do biofilme em *Bacillus subtilis* (BUCHER *et al.*, 2015). Em *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium smegmatis* a amidase CwIM se mostrou importante para o processo de autólise e formação de biofilme (WANG *et al.*, 2019). Além disso, uma amidase foi mais abundante no biofilme de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (DE SÁ *et al.*, 2021).

Geralmente é comum bactérias terem mais de uma amidase e estas terem diferentes funções. Algumas enzimas como AmiD (*E. coli*) e AmpDh2 (*P. aeruginosa*), atuam no remodelamento do PGN acopladas à face interna da membrana externa (KORSAK *et al.*, 2005; UEHARA & PARK, 2007; LEE *et al.*, 2013). Algumas outras têm papel importante na divisão celular (VOLLMER *et al.*, 2008). Em *E. coli*, existem 5 amidases, sendo as amidases AmiA, AmiB e AmiC importantes na divisão celular, uma vez que mutantes nestes genes não conseguem degradar o septo, formando longas cadeias de células (HEIDRICH *et al.*, 2001; BERNHARDT & DE BOER, 2003). Em *B. subtilis*, quatro amidases de parede celular (CwID, LytC, CwIC e CwIB) desempenham distintos papéis, como formação de esporos dormentes funcionais, autólise e divisão celular (SMITH *et al.*, 2000; BLACKMAN *et al.*, 1998). Já em *M. smegmatis*, quatro amidases apresentam as mais diversas funções: Ami1 é importante na divisão celular (mutante forma cadeias de células) (SENZANI *et al.*, 2017); Ami2 (CwIM) tem papel na síntese do PGN (BOUTTE *et al.*, 2016); Ami3 não tem função conhecida; Ami4 parece atuar na proteção da bactéria contra espécies reativas de oxigênio (ROS), algo semelhante ao observado em *Cyanobacterium anabaena* PCC 7120, onde AmiC1 tem papel importante na formação de heterocistos que protegem os componentes citoplasmáticos contra oxigênio (BERENDT *et al.*, 2012). Portanto, embora as enzimas amidases catalisem essencialmente a mesma reação, elas desempenham papéis não redundantes e essenciais no crescimento e sobrevivência bacteriana. O papel das amidases de *C. violaceum* na divisão celular ainda precisa ser investigado.

Um fator relevante para a função das amidases é sua localização celular. Das quatro amidases que encontramos em *C. violaceum*, CV_1309 (AmpD2) e CV_3822 (AmpD4) aparentam ser periplasmáticas por possuírem peptídeo sinal, o que não é encontrado em CV_0566 (AmpD1) e CV_3031 (AmpD3) em análises com a ferramenta SignalP. Além do peptídeo sinal, AmpD4 apresenta um domínio N-terminal denominado AMIN (PF11741), o qual parece atuar como uma assinatura de

exportação para fora do citoplasma em AmiC de *E. coli* (DE SOUZA *et al.*, 2008). AmpD2 e AmpD3 apresentam um domínio de ligação ao PGN (PGB) (Figura 18C). Nenhuma das quatro amidases apresentou domínios transmembrana na análise de topologia usando a ferramenta DeepTMHMM, mas mesmo sem um peptídeo sinal, nesta análise, AmpD3 foi identificada como uma proteína periplasmática. Dois estudos recentes revelaram que AmpDh3 de *P. aeruginosa* (maior similaridade com AmpD3 de *C. violaceum*) está em grande quantidade no citoplasma e pouco no periplasma (COLAUTTI *et al.*, 2023; EGGERS *et al.*, 2023). Este resultado contraria a ideia de que essa enzima seria periplasmática (ZHANG *et al.*, 2013). Portanto, estudos experimentais são necessários para determinar a localização celular das amidases de *C. violaceum*.

A aumentada resistência aos beta-lactâmicos de apenas três dos treze mutantes SM isolados em CAZ (SM1, SM2 e SM59) não pôde ser atribuída exclusivamente a mutações na amidase AmpD1, motivo pelo qual estes três isolados foram submetidos a análise por WGS (Figura 27). Para evitar falsas variantes, o genoma de *C. violaceum* linhagem selvagem ATCC 12472 foi ressequenciado em paralelo. Comparação deste com o genoma referência (BNGPC, 2003) revelou mutações em regiões intergênicas (NCR) e em regiões codificadoras (CDS) (Tabela Suplementar 4), cujo impacto não foi investigado neste trabalho. Descontadas estas diferenças, restaram apenas seis potenciais mutações em SM1, SM2 ou SM59 (duas em cada isolado) (Tabela 9).

Uma potencial mutação em SM1 e SM2, que depois mostrou ser um artefato, foi a troca de um G por um C na região intergênica entre os genes CV_1923 (transposase) e CV_1922 (fator de transcrição da família GntR com domínios HTH (hélice-volta-hélice) e FCD (*FadR C-terminal Domain*)). Embora tenhamos hipotetizado que esta troca pudesse afetar a expressão/tradução do regulador GntR (por localizar-se 9 pb *upstream* do ATG deste gene), ensaios de disco-difusão, expressão e EMSA revelaram que CV_1922 não está envolvido com resistência a beta-lactâmicos nem regula *ampC* ou *cphA* (Figuras 28 e 29). Esta possível troca de G por C, na verdade, foi o ponto de excisão da transposase CV_1923, um evento já presente na linhagem selvagem. Das cinco cópias desta transposase no genoma de *C. violaceum*, apenas esta não parece estar no local esperado (Figuras 30), podendo ter saído permanentemente do genoma, mudado de local ou ter sido anotada errado no genoma referência (BNGPC, 2003).

Excluindo a possibilidade de resistência pelo regulador GntR e pela transposase, SM1 possui mutação em uma ribonuclease E. Essa mutação poderia explicar o motivo da perda de aptidão deste isolado, contudo, não foram encontradas ligações na literatura entre a perda de RNase e o aumento da resistência a antibióticos. Quanto a SM2, foi observado a mutação em RseB, um segundo regulador negativo de sigma E (Tabela 9). No ensaio de RT-qPCR, foi observado um aumento na expressão de CV_2058 (*rpoE*, sigma E) em SM2 em comparação com a linhagem selvagem (Figura 31), possivelmente devido a mutação em RseB. Em *E. coli*, RseB antagoniza, juntamente com o antissigma RseA, a atividade do fator sigma E. Em resposta a estresse do envelope, eventos de proteólise regulados por RseB levam a clivagem de RseA, liberando sigma E para transcrever os genes do seu regulon (CEZAIIRLIYAN *et al.*, 2007; CHABA *et al.*, 2011). A relação entre uma potencial ativação do regulon sigma E em SM2 e sua aumentada resistência a beta-lactâmicos precisa de maior evidência experimental. Por fim, como SM59 não foi complementado por *ampD1*, talvez sua resistência aos beta-lactâmicos ocorra devido a mutação em *ispG* (Tabela 9). A enzima IspG é parte da via de síntese de isoprenóides, os quais, dentre vários outros processos, são precursores do lipídio II, o carreador fundamental na síntese do PGN (DIK *et al.*, 2018; COCHRANE & LOHANS, 2020). Inibidores de enzimas da via Isp tem efeito sinérgico com antibióticos na morte de bactérias (Singh *et al.*, 2021).

Embora tenhamos identificado AmpD1 como fundamental na via da ativação das beta-lactamases AmpC e CphA de *C. violaceum*, a parte final efetora da via, mediada por fatores de transcrição como AmpR, CreBC e BlrAB em outras bactérias (JACOBY, 2009; GUÉRIN *et al.*, 2015; HWANG & KIM, 2015; JUAN *et al.*, 2017; DIK *et al.*; 2018), permanece não identificada em *C. violaceum*. Ainda assim, ambas as beta-lactamases de *C. violaceum* aparentam estarem sob o controle do mesmo regulador, devido ao aumento conjunto de expressão nos mutantes com deleção ou mutações pontuais em AmpD1. Alguns fatores colaboraram para esta dificuldade em encontrar estes reguladores: (i) diferente do que acontece com outras bactérias, em *C. violaceum* *ampC* e *cphA* não estão adjacentes aos genes dos reguladores AmpR e BlrAB (Figura 18A); (ii) análise por similaridade de sequência encontra dezenas de candidatos destes reguladores em *C. violaceum*.

Por exemplo, um mutante do regulador da família AraC, gene CV_1314, localizado próximo de *ampC* foi obtido, mas não mostrou fenótipo de resistência aos

beta-lactâmicos (NEME, 2019). Ainda, um sistema de dois componentes próximo de *ampD1*, denominado *phoBR*, foi recentemente caracterizado como um sistema de captação de fosfato em *C. violaceum* (VASCONCELOS, 2014), descartando a hipótese de ser um homólogo a BlrAB relacionado às beta-lactamases. Outros genes candidatos relacionados a via de regulação das beta-lactamases foram encontrados nas análises *in silico* realizadas neste trabalho, incluindo CV_0783 (permease AmpG) e CV_0259 e CV_2073 (NagZ). Diante da dificuldade de encontrar por análises *in silico* um regulador transcricional das beta-lactamases de *C. violaceum*, foi utilizado um ensaio de *pull-down* de afinidade ao DNA, conforme recentemente descrito em *Vibrio harveyi* e *Vibrio parahaemolyticus* (CHAPARIAN *et al.*, 2016 e 2020; TAGUE *et al.*, 2022). Os resultados revelaram várias proteínas que ligaram *in vitro* em sondas dos promotores de *ampC* e *cphA* (Figura 33). Alguns destes candidatos estão no momento em etapa de identificação por espectrometria de massa. Dessa forma será possível, em um estudo futuro, traçar novas rotas para o estudo de fatores de transcrição desconhecidos que atuem sobre a regulação das beta-lactamases de *C. violaceum*.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho identificamos e caracterizamos mecanismos de resistência a antibióticos beta-lactâmicos em *Chromobacterium violaceum* mediados pela amidase AmpD1 atuando na via de regulação da expressão das beta-lactamases AmpC e CphA. As principais conclusões são:

- I. Mutantes espontâneos de *C. violaceum* resistentes a antibióticos beta-lactâmicos foram isolados na presença de antibióticos fraco indutores, mas não na presença de fortes indutores, devido ao caráter induzível das beta-lactamases desta bactéria;
- II. A maioria dos mutantes espontâneos de *C. violaceum* isolados em ceftazidima (CAZ) que foram resistentes a vários outros antibióticos beta-lactâmicos hiperexpressam as beta-lactamases *ampC* e *cphA* por possuírem mutações em *ampD1*;
- III. AmpD1 tem papel preponderante dentre as três amidases parálogas de *C. violaceum*, pois deleção de *ampD1*, mas não de *ampD2* ou *ampD3*, conferiu resistência aos antibióticos beta-lactâmicos via elevada expressão de ambas beta-lactamases;
- IV. A amidase AmpD1 possui arquitetura única entre as amidases bacterianas com presença de um domínio N-terminal de acetiltransferase;
- V. A análise do sequenciamento do genoma completo (WGS) de três mutantes espontâneos isolados em CAZ revelou mutações nos genes CV_1820 (RNAse E), CV_2060 (RseB) e CV_3538 (IspG), sugerindo novas vias potencialmente envolvidas na resistência aos antibióticos beta-lactâmicos;
- VI. A mutação identificada por WGS na região intergênica do fator de transcrição CV_1922, na verdade, foi um artefato decorrente da excisão do gene CV_1923, uma das cinco cópias de transposases encontradas em *C. violaceum*;
- VII. Proteínas ligadas *in vitro* à região promotora de *ampC* e *cphA* foram obtidas em ensaio de *pull-down* de afinidade ao DNA, podendo revelar potenciais fatores de transcrição destas beta-lactamases.

REFERÊNCIAS¹

- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. **Nature.**, v. 146, p. 837, 1940. doi: <https://doi.org/10.1038/146837a0>
- ALDRIDGE, K. E.; VALAINIS, G. T.; SANDERS, C. V. Comparison of the in vitro activity of ciprofloxacin and 24 other antimicrobial agents against clinical strains of *Chromobacterium violaceum*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 10, p. 31-9, 1988. doi: 10.1016/0732-8893(88)90124-1
- ALISJAHBANA, B.; DEBORA, J.; SUSANDI, E.; DARMAWAN, G. *Chromobacterium violaceum*: A Review of an Unexpected Scourge. **Int. J. Gen. Med.**, v. 9, n. 14, p. 3259-70, 2021. doi: 10.2147/IJGM.S272193
- ALVES, J. A.; PREVIATO-MELLO, M.; BARROSO, K. C. M.; KOIDE, T.; *et al.* The MarR family regulator OsbR controls oxidative stress response, anaerobic nitrate respiration, and biofilm formation in *Chromobacterium violaceum*. **BMC Microbiol.**, v. 21, n. 1, p. 304, 2021. doi: 10.1186/s12866-021-02369-x
- AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.**, v. 289, p. 321-31, 1980. doi: 10.1098/rstb.1980.0049
- AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Front. Microbiol.**, v. 1, p. 134, 2010. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Medidas de Prevenção e Controle da Resistência Microbiana e Programa de Uso Racional de Antimicrobianos em Serviços de Saúde.** 2007. Disponível em <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/inicio.htm>. Acesso em 17 de janeiro de 2021.
- ASHTON, P. M.; NAIR, S.; DALLMAN, T.; RUBINO, S.; *et al.* MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. **Nat Biotechnol.**, v. 33, n. 3, p. 296-300, 2015. doi: 10.1038/nbt.3103
- AUSUBEL, F. M.; *et al.* (ed.). **Short protocols in molecular biology**: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. 2nd. ed. New York, EUA: John Wiley & Sons, 1992. SBN 0-471-57735-9
- AZEREDO, J.; AZEVEDO, N. F.; BRIANDET, R.; CERCA, N.; *et al.* Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 313–51, 2017. doi: 10.1080/1040841X.2016.1208146
- BARRETO, E. F.; WEBB, A. J.; PAIS, G. M.; *et al.* Setting the beta-lactam therapeutic range for critically ill patients: is there a floor or even a ceiling?. **Crit. Care Explor.**, v. 3, p. e0446, 2021. doi: 10.1097/CCE.0000000000000446

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BARROSO, K. C. M.; *et al.* EmrR-Dependent Upregulation of the Efflux Pump EmrCAB Contributes to Antibiotic Resistance in *Chromobacterium violaceum*. **Front Microbiol.**, v. 9, p. 2756, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.02756

BATISTA, B. B.; SANTOS, R. E. R. S.; RICCI-AZEVEDO, R.; DA SILVA NETO, J. D. Production and Uptake of Distinct Endogenous Catecholate-Type Siderophores Are Required for Iron Acquisition and Virulence in *Chromobacterium violaceum*. **Infect. Immun.**, v. 87, n. 12, p. e00577-19, 2019. doi: 10.1128/IAI.00577-19

BATISTA, J. H., LEAL, F. C., FUKUDA, T. T. H., ALCOFORADO DINIZ, J., ALMEIDA, F., PUPO, M. T., & DA SILVA NETO, J. F. (2020). Interplay between two quorum sensing-regulated pathways, violacein biosynthesis and VacJ/Yrb, dictates outer membrane vesicle biogenesis in *Chromobacterium violaceum*. **Environ Microbiol.**, v. 22, p. 2432–2442, 2020. Doi: 10.1111/1462-2920.15033

BATISTA, J.H.; DA SILVA NETO, J. F. *Chromobacterium violaceum* Pathogenicity: Updates and Insights from Genome Sequencing of Novel *Chromobacterium* Species. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 2231, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.02213

BENKÖ, R.; MATUZ, M.; PETÖ, Z.; WEIST, K.; *et al.* Trends in the hospital-sector consumption of the WHO AWaRe Reserve group antibiotics in EU/EEA countries and the United Kingdom, 2010 to 2018. **Eurosurveillance**, v. 27, n. 41, 2022. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.41.2101058

BENOMAR, S.; EVANS, K. C.; UNCKLESS, R. L.; CHANDLER, J. R. Efflux pumps in *Chromobacterium* species increase antibiotic resistance and promote survival in a coculture competition model. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 85, n. 19, p. e00908-19, 2019. doi: 10.1128/AEM.00908-19

BERENDT, S.; LEHNER, J.; ZHANG, Y. V.; RASSE, T. M.; *et al.* Cell wall amidase Amic1 is required for cellular communication and heterocyst development in the *Cyanobacterium anabaena* PCC 7120 but not for filament integrity. **J. Bacteriol.**, v. 194, n. 19, p. 5218–27, 2012. doi: 10.1128/JB.00912-12

BERNHARDT, T. G.; DE BOER, P. A. J. The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. **Mol. Microbiol.**, v. 48, n. 5, p. 1171-82, 2003. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03511.x.

BIRCK, C.; CHA, J. Y.; CROSS, J.; SCHULZE-BRIESE, C.; *et al.* X-ray crystal structure of the acylated beta-lactam sensor domain of BlaR1 from *Staphylococcus aureus* and the mechanism of receptor activation for signal transduction. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 126, n. 43, p. 13945-7, 2004. doi: 10.1021/ja044742u

BLACKMAN, S. A.; SMITH, T. J.; FOSTER, S. J. The role of autolysins during vegetative growth of *Bacillus subtilis* 168. **Microbiol.**, v. 144, n. 1, p. 73-82, 1998. doi: 10.1099/00221287-144-1-73.

BLAIR, J. M. A.; *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015. doi: 10.1038/nrmicro3380

BNGPC (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM). The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 100, n. 20, p. 11660-5, 2003. doi: 10.1073/pnas.1832124100

BOISBAUDRAN L. Matière colorante se formant dans la colle de farine. **Comp. Rend. Acad. Sci.**, v. 94, p. 562-3, 1882.

BONOMO, R. A. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 7, n. 1, :a025239, 2017. doi: 10.1101/cshperspect.a025239.

BOSCHUNG-PASQUIER, L.; ATKINSON, A.; KASTNER, L. K.; BANHOLZER, S.; *et al.* Cefepime neurotoxicity: thresholds and risk factors. A retrospective cohort study. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 26, n. 3, p. 333-9, 2020. doi: 10.1016/j.cmi.2019.06.028

BOUTTE, C. C.; BAER, C. E.; PAPA VINASASUNDARAM, K.; LIU, W.; *et al.* A cytoplasmic peptidoglycan amidase homologue controls mycobacterial cell wall synthesis. **eLife**, v. 5, p. e14590, 2016. doi: 10.7554/eLife.14590

BRUNETTI, F.; GHIGLIONE, B.; GUDETA, D. D.; GUTKIND, G.; *et al.* Biochemical and Structural Characterization of CRH-1, a Carbapenemase from *Chromobacterium haemolyticum* Related to KPC β -Lactamases. **Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. e0006123, 2023. doi: 10.1128/aac.00061-23

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, J. C. (org). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre, Brasil: AMGH, 2012. ISBN 978-85-8055-117-4.

BUCHER, T.; OPPENHEIMER-SHAANAN, Y.; SAVIDOR, A.; BLOOM-ACKERMANN, Z.; *et al.* Disturbance of the bacterial cell wall specifically interferes with biofilm formation. **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 7, n. 6, p. 990-1004, 2015. doi: 10.1111/1758-2229.12346

BURK, D. L.; GHUMAN, N.; WYBENGA-GROOT, L. E.; BERGHUIS, A. M. X-ray structure of the AAC(6')-II antibiotic resistance enzyme at 1.8 Å resolution; examination of oligomeric arrangements in GNAT superfamily members. **Protein Science**, v. 12, n. 3, p. 426-37, 2003. doi: 10.1110/ps.0233503.

BUSH, K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 62, n. 10, p. e01076-18, 2018. doi: 10.1128/AAC.01076-18

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 6, n. 8, a025247, 2016. doi: 10.1101/cshperspect.a025247

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010. doi: 10.1128/AAC.01009-09

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 39, n. 6, p. 1211-33, 1995. doi: 10.1128/AAC.39.6.1211

CALDAS, L. R.; LEITÃO, A. A. C.; SANTOS, S. M.; TYRRELL, R. M. **Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein**. In: TYRRELL R. M. Proceedings of the International Symposium on Current Topics in Radiology and Photobiology. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p. 121–126, 1978.

CARRASCO-LÓPEZ, C.; ROJAS-ALTUVE, A.; ZHANG, W.; HESEK, D.; *et al.* Crystal structures of bacterial peptidoglycan amidase AmpD and an unprecedented activation mechanism. **J. Biol. Chem.**, 2v. 286, n. 36, p. 31714–22, 2011. doi: 10.1074/jbc.M111.264366

CEZAIIRLIYAN, B. O; SAUER, R. T. Inhibition of regulated proteolysis by RseB. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.104, n. 10, p. 3771–6, 2007. doi: 10.1073/pnas.0611567104

CHABA, R.; ALBA, B. M.; GUO, M. S.; SOHN J.; *et al.* Signal integration by DegS and RseB governs the σ^E -mediated envelope stress response in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, n. 5, p. 2106–11, 2011. doi: 10.1073/pnas.1019277108

CHAPARIAN, R. R.; KESSEL, J. C. Promoter pull-down assay: a biochemical screen for DNA-Binding proteins. **Methods Mol. Biol.**, v. 2346, p. 165-72, 2020. doi: 10.1007/7651_2020_307

CHAPARIAN, R. R.; OLNEY, S. G.; HUSTMYER, C. M.; ROWE-MAGNUS, D. A.; KESSEL, J. C. Integration host factor and LuxR synergistically bind DNA to coactivate quorum-sensing genes in *Vibrio harveyi*. **Mol. Microbiol.**, v. 101, n. 5, p. 823-40, 2016. doi: 10.1111/mmi.13425.

CHOPRA, I.; HESSE, L.; O'NEILL, A. Discovery and development of new anti-bacterial drugs. **Parmacochem. Libr.**, v. 32, p. 213–25, 2002. doi: 10.1093/jac/dky019

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; 10th ed. CLSI M07-A10. Pensilvânia, EUA: CLSI, 2015. ISBN 1-56238-988-2

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 31st ed. CLSI M100. Pensilvânia, EUA: CLSI, 2021. ISBN 978-1-68440-105-5

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; 11st ed. CLSI M02-A11. Pensilvânia, EUA: CLSI, 2012. ISBN 1-56238-782-0

COCHRANE, S. A.; LOHANS, C. T. Breaking down the cell wall: Strategies for antibiotic discovery targeting bacterial transpeptidases. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 194, p. 112262, 2020. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112262

COLAUTTI, J.; BULLEN, N. P.; WHITNEY J. C. Lack of evidence that *Pseudomonas aeruginosa* AmpDh3-PA0808 constitute a type VI secretion system effector–immunity pair. **Mol Microbiol.**, v. 119, n. 2, p. 262-74, 2023. doi: 10.1111/mmi.15021

COURVALIN, P.; LECLERCQ, R.; RICE, L. B. (org). **Antibiogram**. Portland, Oregon, EUA: ESKA Publishing, 2010. 673 p. (Antibiotic Combinations). ISBN 978-2-7472-1545-9.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 6-7, p. 287-92, 2013. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.009

DA SILVA NETO, J. F.; NEGRETTO, C. C.; NETTO, L. E. S. Analysis of the organic hydroperoxide response of *Chromobacterium violaceum* reveals that OhrR is a Cys-based redox sensor regulated by thioredoxin. **PLoS One**, v. 7, e47090, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0047090

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, n. 3, p. 417–33, 2010. doi: 10.1128/MMBR.00016-10

DE LIMA, V. M.; BATISTA, B. B.; DA SILVA NETO, J. F. The Regulatory Protein ChuP Connects Heme and Siderophore-Mediated Iron Acquisition Systems Required for *Chromobacterium violaceum* Virulence. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 12, p. 873536, 2022. doi: 10.3389/fcimb.2022.873536

DE SÁ, M. C. A.; DA SILVA, W. M.; RODRIGUES, C. C. S.; REZENDE, C. P.; *et al.* Comparative Proteomic Analyses Between Biofilm-Forming and Non-biofilm-Forming Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated From Goats. **Front. Vet. Sci.**, v. 8, p. 614011, 2021. doi: 10.3389/fvets.2021.614011

DE SOUZA, R. F.; ANANTHARAMAN, V.; DE SOUZA, S. J.; ARAVIND L.; *et al.* AMIN domains have a predicted role in localization of diverse periplasmic protein complexes. **Bioinformatics**, v. 24, n. 21, p. 2423-6, 2008. doi: 10.1093/bioinformatics/btn449

DIK, D. A.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Cell-Wall Recycling of the Gram-Negative Bacteria and the Nexus to Antibiotic Resistance. **Chem. Rev.**, v. 118, n. 12, p. 5952-84, 2018. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00277

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010. doi: 10.1128/CMR.00037-09

DURÁN, N.; JUSTO, G. Z.; DURÁN, M.; BROCCHI, M.; *et al.* Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: a review. **Biotechnol. Adv.**, v. 34, n. 5, p.1030-45, 2016. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.06.003

ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL). **Antibiotics: be responsible**. 2016. Disponível em <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antibiotics-be-responsible>. Acesso em 14 de janeiro de 2021.

ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL). **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data**. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization; 2023. Disponível em <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2023-2021-data>. Acesso em 14 de setembro de 2023.

ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL). **Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018**. 2019. Disponível em <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>. Acesso em 16 de janeiro de 2021.

EGGERS O.; RENSCHLER, F. A.; MICHALEK, L. A.; WACKLER N.; *et al.* YgfB increases β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by counteracting AlpA-mediated *ampDh3* expression. **Nature Communications Biology**, v. 6, 2023. doi: 10.1038/s42003-023-04609-4

FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; ALMEIDA, R.; PORTILLO, V. A.; BARBOSA, T. A. P.; *et al.* Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. **Genet. Mol. Res.**, v. 3, n. 1, p. 134-47, 2004. PMID: 15100994

FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the Gram-negative *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorg. Chem.**, v. 56, p. 41-8, 2014. doi: 10.1016/j.bioorg.2014.05.011

FISHOVITZ, J.; TAGHIZADEH, N.; FISHER, J. F.; CHANG, M.; *et al.* The Tipper-Strominger Hypothesis and Triggering of Allostery in Penicillin-Binding Protein 2a of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **J. Am. Chem. Soc.**, v. 137, n. 20, p. 6500-05, 2015. doi: 10.1021/jacs.5b01374

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, p. 226-36, 1929. PMID: PMC2566493

FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. **Annual Review of Genetics**, v. 35, p. 439-68, 2001. doi: 10.1146/annurev.genet.35.102401.090913

GARTIN, M.; BREWIS, A. A.; SCHWARTZ, N. A. Nonprescription antibiotic therapy: cultural models on both sides of the counter and both sides of the border. **Med. Anthropol. Q.**, v. 24, n. 1, p. 85–107, 2010. doi: 10.1111/j.1548-1387.2010.01086.x

GASTEIGER, E.; *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WILKINS M. R.; *et al.* **The proteomics protocols**. Humana press, v. 112, p. 531-52, 1999.

GOBER, J. W.; SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter flagellar* promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. **Mol. Biol. Cell.**, v. 3, n. 8, p. 913-26, 1992. doi: 10.1091/mbc.3.8.913

GOMEZ, S. A.; SANZ, M. B.; RAPOPORT, M.; SUCIN, G.; *et al.* Novel metallo- β -lactamase *bla_{CVI-1}* isolated from a *Chromobacterium violaceum* clinical Strain resistant to colistin. **Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 961, 2023. doi: 10.3390/pathogens12070961

GOURSON, C.; BENHADDOU, R.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; *et al.* Valorization of maize bran to obtain biodegradable plastic films. **J. Appl. Pollu. Sci.**, v. 74, n. 13, p. 3040-5, 1999. doi: 10.1002/(SICI)1097-4628(19991220)74:13<3040::AID-APP5>3.0.CO;2-M

GUARIM, V. L. M. S. Ocorrência e distribuição de *Chromobacterium violaceum* (Schroeter) Bergonzini 1881, na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 3, p. 501-6 1979. doi: 10.1590/1809-43921979093501

GUDETA, D. D.; BORTOLAIA, V.; JAYOL, A.; POIREL, L.; *et al.* *Chromobacterium spp.* harbour Ambler class A β -lactamases showing high identity with KPC. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, p. 1493–6, 2016. doi: 10.1093/jac/dkw020

GUÉRIN, F.; ISNARD, C.; CATTOIR, V.; GIARD, J. C. Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated β -Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 59, n. 12, p. 7753–61, 2015. doi: 10.1128/AAC.01729-15

HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, n. 4, p. 557-80, 1983. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8

HAO, H.; DAI, M.; WANG, Y., HUANG, L.; *et al.* Key genetic elements and regulation systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiol.**, v. 7, n. 11, p. 1315-29, 2012. doi: 10.2217/fmb.12.107

HEIDRICH, C.; TEMPLIN, M. F.; URSINUS, A.; MERDANOVIC, M.; *et al.* Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 167-78, 2001. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02499.x

HESEK, D.; LEE, M.; ZHANG, W.; NOLL, B. C.; *et al.* Total Synthesis of N-Acetylglucosamine-1,6-anhydro-N-acetylmuramyl pentapeptide and Evaluation of Its Turnover by AmpD from *Escherichia coli*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, n. 14, p. 5187-93, 2009. doi: 10.1021/ja904230q

HILT, E. E.; *et al.* Carbapenem Resistant *Aeromonas hydrophila* Carrying *bla_{cphA7}* Isolated From Two Solid Organ Transplant Patients. **Front Cell Infect Microbiol.**, 10, p. 563482, 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.563482

HÖLTJE, J. V. Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 1, p. 181-203, 1998. doi: 10.1128/MMBR.62.1.181-203.1998

HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M. F.; GUIMARÃES, C. T.; JARDIM, S. N.; *et al.* Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genet. Mol. Res.**, v. 3, n. 1, p. 102-16, 2004. PMID: 15100992

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 51, p. 72-80, 2019. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008

HWANG, J.; KIM, H. S. Cell Wall Recycling-Linked Coregulation of AmpC and PenB β -Lactamases through ampD Mutations in *Burkholderia cenocepacia*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, n. 12, p. 7602-10, 2015. doi: 10.1128/AAC.01068-15

JACOBY, G. A. AmpC β -Lactamases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 22, n. 1, p. 161-82, 2009. doi: 10.1128/CMR.00036-08

JUAN, C.; MOYÁ, B.; PÉREZ, J. L.; OLIVER, A. Stepwise Upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Chromosomal Cephalosporinase Conferring High-Level β -Lactam Resistance Involves Three AmpD Homologues. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 5, p. 1780-7, 2006. doi: 10.1128/AAC.50.5.1780-1787.2006

JUAN, C.; TORRENS, G.; GONZÁLEZ-NICOLAU, M.; OLIVER, A. Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 41, n. 6, p. 781-815, 2017. doi: 10.1093/femsre/fux043

KIM, H. J.; Choi, H. S.; Yang, S. Y.; Kim, I. S.; *et al.* Both extracellular chitinase and a new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contribute to the biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. C61. **Mol. Plant. Pathol.**, v. 15, n. 2, p. 122-32, 2014. doi: 10.1111/mpp.12070

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423, 2010. doi: 10.1038/nrmicro2333

KOHLMANN, R., BÄHR, T.; GATERMANN, S. G. Species-specific mutation rates for ampC derepression in *Enterobacteriales* with chromosomally encoded inducible AmpC β -lactamase. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 73, n. 6, p. 1530-6, 2018. doi: 10.1093/jac/dky084

KOIRALA, P.; DOODY, C.; BLACKWELL, H.; CHANDLER, J. R. Regulation of an antibiotic resistance efflux pump by quorum sensing and a TetR-family repressor in *Chromobacterium subtsugae*. 2023. *Ahead of print.* **bioRxiv**,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37693375/>. Acesso em 07 de novembro de 2023. doi: 10.1101/2023.09.02.556004

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 575-93, 1988.

KORSAK, D.; LIEBSCHER, S.; VOLLMER, W. Susceptibility to Antibiotics and β -Lactamase Induction in Murein Hydrolase Mutants of *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 4, p. 1404-9, 2005. doi: 10.1128/AAC.49.4.1404-1409.2005

LAHIRI, S. D.; WALKUP, G. K.; WHITEAKER J. D.; PALMER T.; *et al.* Selection and molecular characterization of ceftazidime/avibactam-resistant mutants in

Pseudomonas aeruginosa strains containing derepressed AmpC. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 70, p. 1650-8, 2015. doi: 10.1093/jac/dkv004

LE, V. T. B.; TSIMBALYUK, S.; LIM, E. Q.; SOLIS, A.; *et al.* *Vibrio cholerae* SpeG Spermidine/Spermine N-Acetyltransferase Allosteric Loop and β 6- β 7 Structural Elements Are Critical for Kinetic Activity. **Front. Mol. Biosci.**, v. 8, p. 645768, 2021. doi: 10.3389/fmolb.2021.645768

LEE K, CHONG, Y.; SHIN, H. B.; KIM, Y. A.; *et al.* Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase- producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clin Microbiol Infect.**, v. 7, n. 2, p. 88-91, 2001. doi: 10.1046/j.1469-0691.2001.00204.x

LEE, D.; PARK, J.; YI, H.; CHO, K.; *et al.* A Two-Component-System-Governed Regulon That Includes a β -Lactamase Gene is Responsive to Cell Envelope Disturbance. **mBio**, v. 13, n. 4, p. e01749-22, 2022. doi: 10.1128/mbio.01749-22

LEE, M.; ARTOLA-RECOLONS, C.; CARRASCO-LÓPEZ, C.; MARTÍNEZ-CABALLERO, S.; *et al.* Cell-Wall Remodeling by the Zinc-Protease AmpDh3 from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 135, n. 34, 2013. doi: 10.1021/ja407445x

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 371-87, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrd3975>

LIEPINSH, E.; GÉNÉREUX, C.; DEHARENG, D.; JORIS, B.; *et al.* NMR structure of *Citrobacter freundii* AmpD, comparison with bacteriophage T7 lysozyme and homology with PGRP domains. **J. Mol. Biol.**, v. 327, n. 4, p. 833-42, 2003. doi: 10.1016/s0022-2836(03)00185-2

LIMA, L. M.; DA SILVA, B. N. M.; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 208, p. 112829, 2020. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112829

LIMA-BITTENCOURT, C. I.; ASTOLFI-FILHO, S.; CHARTONE-SOUZA, E.; SANTOS, F. R.; *et al.* Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from different Brazilian ecosystems. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 58, 2007. doi: 10.1186/1471-2180-7-58

LIU, Y.; ZENG, H.; HOU, Y.; LI, Z.; *et al.* Calmodulin Binding Activates *Chromobacterium* CopC Effector to ADP-Riboxanate Host Apoptotic Caspases. **mBio**, v. 13, n. 3, p. e0069022, 2022. doi: 10.1128/mbio.00690-22

LUENGO, J. M. **Enzymatic Synthesis of Penicillins**. In: BARTON D.; NAKANISHI K.; METH-COHN O (ed.). *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Amsterdã: Elsevier; 1999. p. 239-274.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin.**

Microbiol. Infect., v. 18, n. 3, p. 268-81, 2012. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

MALTEZ, V. I.; TUBBS, A. L.; COOK, K. D.; AACHOUI, Y.; *et al.* Inflammasomes coordinate pyroptosis and natural killer cell cytotoxicity to clear infection by a ubiquitous environmental bacterium. **Immunity**, v. 43, n. 5, p. 987-97, 2015. doi: 10.1016/j.immuni.2015.10.010

MANGALORE, R. P.; PEEL, T. N.; UDY, A. A.; PELEG, A. T. The clinical application of beta-lactam antibiotic therapeutic drug monitoring in the critical care setting. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 78, n. 10, p. 2395–2405, 2023. doi: 10.1093/jac/dkad223

MCCLEAN, K. H., WINSON, M. K., FISH, L., TAYLOR, A., *et al.* Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, p. 3703-11, 1997. doi: 10.1099/00221287-143-12-3703

MEHER-HOMJI, Z.; MANGALORE, R. P.; JOHNSON, P. D. R.; CHUA, K. Y. L. *Chromobacterium violaceum* infection in chronic granulomatous disease: a case report and review of the literature. **JMM Case Rep.**, v. 31, n. 4, p. e005084, 2017. doi: 10.1099/jmmcr.0.005084

MICROBIOLOGIE CLINIQUE. **D test clindamycine: antagonisme.** 2021. Disponível em <https://microbiologie-clinique.com/D-test.html>. Acesso em 20/08/2021.

MIKI, T.; AKIBA, K.; IGUCHI, M.; DANBARA, H.; *et al.* The *Chromobacterium violaceum* type III effector CopE, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42, is involved in bacterial invasion of epithelial cells and pathogenesis. **Mol. Microbiol.**, v. 80, n. 5, p. 1186-203, 2011. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07637.x

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics.** New York, EUA: Cold Spring Harbor, 1972.

MINAMI, S.; YOTSUJI, A.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Induction of beta-lactamase by various beta-lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, n. 3, p. 382-5, 1980. doi: 10.1128/AAC.18.3.382

MORAR, M.; WRIGHT, G. D. The genomic enzymology of antibiotic resistance. **Annu. Rev. Genet.**, v. 44, p. 25-51, 2010. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163517

MOYÁ, B.; DÖTSCH, A.; JUAN, C.; BLÁZQUEZ, J.; *et al.* Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. **PLoS Pathog.**, v. 5, e1000353, 2009. doi: 10.1371/journal.ppat.1000353

MOYA, B.; JUAN, C.; ALBERTÍ, S.; PÉREZ, J.L.; OLIVER A. Benefit of having multiple *ampD* genes for acquiring beta-lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, n. 10, p. 3694-3700. 2008. doi:10.1128/AAC.00172-08

NEME, C. E. M. **Papel de beta-lactamases na resistência a antibióticos beta-lactâmicos em *Chromobacterium violaceum***. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biomédicas) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). **Report on Surveillance of Antibiotic Consumption**. 2018. Disponível em https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/oms-amr-amc-report-2016-2018/en. Acesso em 20 de janeiro de 2021.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). **The 2019 WHO AWaRe classification of antibiotics for evaluation and monitoring of use**. Geneva: WHO; 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/327957>. Acesso em 15 de agosto de 2023.

PAGÁN, V. M. The Birth of Medical Literature. **World Neurosurgery**, v. 76, p. 2-5, 2011. doi: 10.1016/j.wneu.2011.05.046

PANT, N. D.; ACHARYA, S. P.; BHANDARI, R.; YADAV, U. N.; *et al.* Bacteremia and urinary tract infection caused by *Chromobacterium violaceum*: case reports from a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. **Case Rep. Med.**, p. 7929671, 2017. doi: 10.1155/2017/7929671

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R. A. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 11, p. 4943–60, 2011. doi: 10.1128/AAC.00296-11

PARK, H.; PARK, S.; YANG, Y. H.; CHOI, K. Y. Microbial synthesis of violacein pigment and its potential applications. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 41, n. 6, p. 879-901, 2021. doi: 10.1080/07388551.2021.1892579

PAYNE, L. E.; GAGNON, D. J.; RIKER, R. R.; *et al.* Cefepime-induced neurotoxicity: a systematic review. **Crit Care**, v. 21, p. 276, 2017. doi: 10.1186/s13054-017-1856-1

PÉREZ-GALLEGO, M.; *et al.* Impact of AmpC derepression on fitness and virulence: the mechanism or the pathway? **mBio**, v. 7, n. 5, p. e01783-16, 2016. doi: 10.1128/mBio.01783-16

PETROSINO, J. F.; *et al.* Chromosomal System for Studying AmpC-Mediated β -Lactam Resistance Mutation in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 5, p. 1535–9, 2002. doi: 10.1128/AAC.46.5.1535-1539.2002

PHILIPPON, A.; DUSART, J.; JORIS, B.; FRÈRE, J. M. The diversity, structure and regulation of beta-lactamases. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 54, n. 4, p. 341-6, 1998. doi: 10.1007/s000180050161

POLZ, M. F.; ALM, E. J.; HANAGE, W. P. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. **Trends Genet.**, v. 29, n. 3, p. 170-5, 2013. doi: 10.1016/j.tig.2012.12.006

PREVIATO-MELLO, M.; MEIRELES, D. A.; NETTO, L. E. S.; DA SILVA NETO, J. F. Global Transcriptional Response to Organic Hydroperoxide and the Role of OhrR in the Control of Virulence Traits in *Chromobacterium violaceum*. **Infect. Immun.**, v. 85, n. 8, p. e00017-17, 2017. doi: 10.1128/IAI.00017-17

PUTAROV, N. B.; GALENDE, S. B. **Estudo da relação estrutura química e atividade farmacológica dos antibióticos**. Revista Uningá. 2011, v. 30, n. 1. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/988>. Acesso em: 19 jan. 2021.

RAMIREZ, J. L.; SHORT, S. M.; BAHIA, A. C.; SARAIVA, R. G.; *et al.* *Chromobacterium* Csp_P Reduces Malaria and Dengue Infection in Vector Mosquitoes and Has Entomopathogenic and In Vitro Anti-pathogen Activities. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 10, p. e1004398, 2014. doi: 10.1371/journal.ppat.1004398

RANG, H. P.; DALE, M. M. (2016) **Farmacologia**. 8ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier.

ROBERTS, R. C.; TOOCHINDA, C.; AVEDISSIAN, M.; BALDINI, R. L.; *et al.* Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 7, p. 1829-41, 1996. doi: 10.1128/jb.178.7.1829-1841.1996

RUDD, K. E.; JOHNSON, S. C.; AGESA, K. M.; SHACKELFORD, K. A.; *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease study. **Lancet**, v. 395, p. 200–11, 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7

SAKR, Y.; JASCHINSKI, U.; WITTEBOLE, X.; SZAKMANY, T.; *et al.* Sepsis in intensive care unit patients: worldwide data from the Intensive Care Over Nations audit. **Open Forum Infect Dis**, v. 5, p. ofy313, 2018. doi: 10.1093/ofid/ofy313

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.; MANIATIS T. **Molecular cloning**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.

SANTOS, R. E. R. S. **Fatores de transcrição da família Fur e a resposta a ferro e zinco em *Chromobacterium violaceum***. 2021. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

SANTOS, R. E. R. S.; BATISTA, B. B.; DA SILVA NETO, J. F. Ferric Uptake Regulator Fur Coordinates Siderophore Production and Defense against Iron Toxicity and Oxidative Stress and Contributes to Virulence in *Chromobacterium violaceum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 86, n. 21, p. e01620-20, 2020. doi: 10.1128/AEM.01620-20

SCHMIDTKE, A. J.; HANSON, N. D. Role of *ampD* homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, p. 3922–7, 2008. doi:10.1128/AAC.00341-08

SCHWEIZER, I.; PETERS, K.; STAHLMANN, C.; HAKENBECK, R.; *et al.* Penicillin-Binding Protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: The Mutation Ala707Asp Within the C-terminal PASTA2 Domain Leads to Destabilization. **Microb. Drug Resist.**, v. 20, n. 3, p. 250–7, 2014. doi: 10.1089/mdr.2014.0082

SENZANI, S.; LI, D.; BHASKAR, A.; EALAND, C.; *et al.* An Amidase_3 domain-containing N-acetylmuramyl-L-alanine amidase is required for mycobacterial cell division. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 1140, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-01184-7

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 1, n. 9, p. 784-91, 1983. doi: 10.1038/nbt1183-784.

SINGH, K. S.; SHARMA, R.; REDDY, P.; VONTEDDU, P.; *et al.* IspH inhibitors kill Gram-negative bacteria and mobilize immune clearance. **Nature**. 2021 Jan;589(7843):597-602. doi: 10.1038/s41586-020-03074-x.

SMITH, T. J.; BLACKMAN, S. A.; FOSTER, S. J. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. **Microbiol.**, v. 146, n. 2, 2000. doi: 10.1099/00221287-146-2-249.

SNEATH, P. H. A.; WHELAN, J. P. F.; BHAGWAN-SINGH, R.; EDWARDS, D. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. **Lancet**, v. 265, n. 6780, p. 276-7, 1953. doi: 10.1016/s0140-6736(53)91132-5

STAPLETON, P.; *et al.* DNA Sequence Differences of ampD Mutants of *Citrobacter freundii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 11, p. 2494–8, 1995. doi: 10.1128/AAC.39.11.2494.

STAUFF, D. L., BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. **J Bacteriol.**, v. 193, n. 15, p. 3871-8, 2011. doi: 10.1128/JB.05125-11

STEINBUHEL, A.; DEBZI, E. M.; MARCHESSAULT, R. H., *et al.* Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p. 443-9, 1993. doi: 10.1007/BF00205030

STRACHAN, C. R.; DAVIES, J. The Whys and Wherefores of Antibiotic Resistance. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 7, n. 2, p. a025171, 2017. doi: 10.1101/cshperspect.a025171

SWAIN, B.; OTTA, S.; SAHU, K. K.; PANDA, K.; *et al.* Urinary tract infection by *Chromobacterium violaceum*. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 8, n. 8, p. 6–7, 2014. doi: 10.7860/JCDR/2014/9230.4703

TAGUE, J. G.; HONG, J.; KALBURGE, S. S.; BOYD, E. F. Regulatory small RNA Qrr2 is expressed independently of sigma factor-54 and can function as the sole Qrr small RNA to control quorum sensing in *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Bacteriology**, v. 204, n. 1, p. e00350-21, 2022. doi: 10.1128/JB.00350-21

TORRENS, G.; HERNÁNDEZ, S. B.; AYALA, J. A.; MOYA, B.; *et al.* Regulation of AmpC-Driven β -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Different Pathways, Different Signaling. **mSystems**, v. 4, n. 6, p. e00524-19, 2019. doi: 10.1128/mSystems.00524-19

UEHARA, T.; PARK, J. T. An Anhydro-N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase with Broad Specificity Tethered to the Outer Membrane of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 15, p. 5634-41, 2007. doi: 10.1128/JB.00446-07

VASCONCELOS, F. N. C. **Caracterização dos genes *phoA*₁, *phoA*₂, *phoB*, *phoU* e *pstS*, membros do regulon PHO de *Chromobacterium violaceum***. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VOLLMER, W.; JORIS, B.; CHARLIER, P.; FOSTER, S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 32, n. 2, p. 259-86, 2008. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x

WANG, C.; ZHANG, Q.; TANG, X.; AN, Y.; *et al.* Effects of CwIM on autolysis and biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 309, n. 1, p. 73-83, 2019. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.12.002.

XUE, H.; CORDERO, O. X.; CAMAS, F. C.; TRIMBLE, W.; *et al.* Eco-Evolutionary Dynamics of Episomes among Ecologically Cohesive Bacterial Populations. **mBio**, v. 6, n. 3, p. e00552-15, 2015. doi: 10.1128/mBio.00552-15

YANG, C. H.; LI, Y. H. *Chromobacterium violaceum* infection: A clinical review of an important but neglected infection. **J. Chin. Med. Assoc.**, v. 74, n. 10, p. 435-41, 2011. doi: 10.1016/j.jcma.2011.08.013

ZAMORANO, L.; MOYA, B.; JUAN, C.; MULET X.; *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to β -lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 9, p. 5084-95, 2014. doi: 10.1128/AAC.02556-14

ZANINI, A. C.; OGA, S. **Farmacologia aplicada**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu; 1994, p. 515-518.

ZHANG, H. Z., HACKBARTH, C. J.; CHANSKY, K. M.; CHAMBERS, H. F. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. **Science**, v. 291, n. 5510, p. 1962-5, 2001. doi: 10.1126/science.1055144

ZHANG, W.; LEE, M.; LASTOCHKIN, E.; BOGGESS, B.; MOBASHERY, S. Reactions of the three AmpD enzymes of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 135, n. 13, p. 4950-3, 2013. doi: 10.1021/ja400970n.

APÊNDICE

Apêndice A – Material suplementar

Tabela Suplementar 1. Perfil de resistência dos mutantes espontâneos determinado por ensaio de disco-difusão.

LINHAGENS	ATM	MEM	IPM	FOX	CTX	CAZ	CFP	TIC	PIP	AMP	AMC
WT	23	28	28	8	11	18	26	17	29	0	0
SM1	9	10	20	0	0	0	15	0	15	0	0
SM2	11	22	25	0	0	0	21	0	25	0	0
SM3	13	30	29	0	0	0	20	13	25	0	0
SM10	11	30	30	0	0	0	19	9	24	0	0
SM20	15*	29	28	9	0	11*	23*	12*	27	0	0
SM24	21	27	28	9	10	16	27	9	29	0	0
SM28	16	28	28	0	0	0	18	0	25	0	0
SM29	13	29	30	0	0	0	18	0	23	0	0
SM30	12	31	31	0	0	0	19	0	24	0	0
SM31	14	29	28	0	0	0	19	10	24	0	0
SM34	14*	28	27	0	0	0	19	12	24	0	0
SM35	14	29	29	0	0	0	20	12	24	0	0
SM39	13	27	27	0	0	0	19	8	20	0	0
SM41	14*	29	29	7*	0*	0*	22*	12*	29*	0	0
SM42	12*	28	28	0	0*	0*	19*	0*	25*	0	0
SM52	13	29	29	0	0	0	19	12	27	0	0
SM58	22	28	28	9	0	15	25	13	28	0	0
SM59	13	29	29	0	0	0	18	12	24	0	0
SM60	15*	29	29	0	8*	11*	23*	11*	30	0	0

* Halos com a presença de colônias em seu interior. Valores de halos de inibição em mm. Dados referentes a figura 15.

Tabela Suplementar 2. Perfil de resistência dos mutantes nulos das amidases por ensaio de disco-difusão.

LINHAGENS	ATM	MEM	IPM	ETP	FOX	CAZ	CTX	CFP	FEP	TIC	PIP	TZP	AMP	AMC	STX	CIP
WT	22	26	26	28	14	19	16	26	22	20	29	26	0	0	31	40
$\Delta ampD1$	15	25	26	25	0	0	0	18	18	12	23	22	0	0	30	38
$\Delta ampD2$	24	26	27	NT	17	20	18	27	NT	23	30	NT	0	0	NT	NT
$\Delta ampD3$	25	26	27	NT	17	21	19	28	NT	20	31	NT	0	0	NT	NT
$\Delta ampD1D2$	17	25	28	NT	0	0	0	19	NT	12	23	NT	0	0	NT	NT
$\Delta ampD1D3$	17	25	27	NT	0	0	0	20	NT	19	24	NT	0	0	NT	NT
$\Delta ampD2D3$	23	25	27	NT	15	18	17	26	NT	17	28	NT	0	0	NT	NT
$\Delta ampD1D2D3$	17	26	28	NT	0	0	0	19	NT	17	24	NT	0	0	NT	NT

NT = não testado. Dados referentes a figura 23.

Tabela Suplementar 3. Ensaio de disco-difusão de linhagens complementados com *ampD1*.

	WT	$\Delta ampD1$	SM3	SM10	SM28	SM29	SM30	SM31	SM34	SM35	SM39	SM52	SM59
CAZ	18	0-18	0-31	0-31	0-30	0-29	0-29	0-30	0-29	0-29	0-28	0-29	0-0

Preto = parental; **vermelho** = complementado. Dados referentes a figura 24.

Tabela Suplementar 4. Mutações encontradas na linhagem selvagem em comparação com o genoma de referência. (Conclusão)

ORF	NOME	GENE	MUTAÇÃO	ALTERAÇÃO	POSIÇÃO
REGULAÇÃO					
CV_0004	-	<i>IS3 family transposase</i>	5'UTR - NCR	C → T	(6679)
CV_0555	-	<i>GntR-type transcriptional regulator</i>	Missense	ATC → ACC	I203T
CV_1923	-	<i>IS3 family transposase</i>	3'UTR - NCR	C → G	(2093005)
CV_2015	-	<i>LysR-type transcriptional regulator</i>	Frameshift	- 1 pb	(719)
CV_3037	<i>pdhR</i>	<i>GntR-type transcriptional regulator</i>	Missense	TTG → TTC	L89F
CV_3351	-	<i>ArsR-type transcriptional regulator</i>	Missense	AAG → CAG	K57Q
ÁCIDO NUCLEICO					
CV_1020	-	<i>DNA polymerase III subunit epsilon</i>	5'UTR - NCR	+ 1 pb	(1062111)
CV_1020	-	<i>DNA polymerase III subunit epsilon</i>	5'UTR - NCR - Complex	TGCA	(1062144)
CV_tRNAGlyGCC1	-	tRNA-Gly	Missense	C → T	(1377500)
CV_1347	<i>tgt</i>	<i>Queuine tRNA-ribosyltransferase</i>	Missense	AGC → GGC	S369G
METABOLISMO					
CV_0633	<i>nuoA1</i>	<i>NADH dehydrogenase chain A</i>	3'UTR - NCR	- 1 pb	(664851)
CV_1070	<i>gtlA</i>	<i>Citrate synthase</i>	Frameshift	- 9 pb	(428 .. 436)
CV_1070	<i>gtlA</i>	<i>Citrate synthase</i>	Missense	TGC → GGC	C264G
CV_1306	<i>pgsA</i>	<i>Cardiolipin synthase</i>	3'UTR - NCR	+ 1 pb	(1377344)
CV_1412	<i>pflB</i>	<i>Formate C-acetyltransferase</i>	Frameshift	- 1 pb	(176)
CV_3101	<i>mdlC</i>	<i>Benzoylformate decarboxylase</i>	Frameshift	- 3 bp	(1485 .. 1487)
CV_3458	-	<i>Probable phosphopyruvate hydratase</i>	Frameshift	- 1 pb	(43)
CV_3944	-	<i>3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase</i>	3'UTR - NCR	A → G	(4264224)
TRANSPORTADORES					
CV_1097	-	<i>Dipeptide transport system ABC</i>	5'UTR - NCR	G → A	(1142874)
CV_1138	<i>proY</i>	<i>Proline-specific permease</i>	5'UTR - NCR	T → C	(1193782)
CV_1296	<i>fimD</i>	<i>Outer membrane usher protein precursor</i>	Frameshift	+ 21 pb	(2525)
FUNÇÃO DESCONHECIDA					
CV_0900	-	<i>Hypothetical protein</i>	Complex	CGGC → GG	(930852)
CV_1693	-	<i>Conserved hypothetical protein</i>	Missense	CTC → CTT	L241L
CV_1723	-	<i>Hypothetical protein</i>	5'UTR - NCR	- 1 pb	(1864098)
CV_1873	-	<i>Hypothetical protein</i>	5'UTR - NCR	+ 1 pb	(2031733)
CV_2377	-	<i>Conserved hypothetical protein</i>	Missense	GAC → TAC	D75Y
CV_3076	-	<i>Hypothetical protein</i>	Frameshift	- 3 bp	(37 .. 39)
CV_4074	-	<i>Conserved hypothetical protein</i>	Frameshift	+ 1 pb	(533)

* Mutações em NCR possuem a posição descrita no genoma, enquanto mutações em região codificadora, possuem a posição descrita no gene. ORF = Open Reading Frames; NCR = Non-Coding Region.

Tabela Suplementar 5. Perfil de resistência do mutante de inserção em CV_1922 determinado por ensaio de disco-difusão.

LINHAGENS	ATM	MEM	IPM	FOX	CAZ	CTX	CFP	PIP	TIC	AMC	AMP
WT	28	26	24	0	18	0	24	27	20	0	0
<i>gntR</i> ::pNPTS138	28	26	25	0	19	0	26	29	23	0	0

Dados referentes a figura 28.

Tabela Suplementar 6. Perfil de resistência dos novos mutantes espontâneos por ensaio de difusão em disco.

LINHAGENS	ATM	IPM	MEM	ETP	FOX	CTX	CAZ	CFP	FEP	TIC	PIP	TZP	AMP	AMC	STX	CIP
WT	17	23	30	28	11	0	15	23	22	14	26	26	0	0	31	40
SMB2	0*	24	32	32	0	0	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0	0	34	42
SMB4	0*	25	32	29	18	0*	0*	0*	14	0*	0*	29	0	0	28	43
SMB5	0*	22	30	28	0	0	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0	0	30	40
SMB9	0*	24	30	30	0	0	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0	0	30	40
SMB12	0*	24	30	28	0	0	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0	0	30	40
SMB15	0*	22	30	28	0	0	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0	0	30	40
SMB18	0*	29	35	32	14	0*	0*	0*	0*	0*	0*	20	0	0	24	42
SMB19	0*	24	29	29	0	0	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0	0	30	40
SMB20	0	32	38	34	8	0	0*	0*	0*	0	0*	14	0	0	25	46
SMB25	0*	25	30	27	0	0	0*	0*	0*	0	0*	14	0	0	25	42
SMB31	0*	22	30	28	0	0	0	0*	0*	0	0*	18	0	0	32	42
SMB32	0*	28	32	31	0	0	0*	0*	0*	0	0*	0*	0	0	24	44
SMB33	0*	29	34	32	10	0	0*	0*	0*	0	0*	30	0	0	23	42
SMB34	0*	27	32	30	0	0	0*	0*	0*	0	0*	0	0	0	24	44
SMB37	0	23	29	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	40
SMB39	0*	24	32	30	0	0	0*	0*	0*	0	0*	0	0	0	32	43
SMB42	0	22	29	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	40
SMB43	28	28	34	32	16	0*	25	30	28	10	32	34	0	0	24	40
SMB44	0*	26	32	30	0	0	0*	0*	0*	0	0*	14	0	0	30	42
SMB45	0*	28	32	31	8	0	0*	0*	0*	0	0*	16	0	0	22	42
SMB47	0*	23	29	28	0	0	0*	0*	0*	0	0*	0	0	0	32	42
SMB48	0*	30	32	30	12	0	0*	0*	0*	0	0*	10	0	0	43	42
SMB49	0*	25	30	30	10	0	0*	0*	0*	0	0*	0	0	0	28	42
SMB50	0*	28	35	32	0	0	0*	0*	12	0	0*	26	0	0	22	44
SMB51	0*	28	32	30	12	0	0*	0*	0*	0	0*	24	0	0	24	42
SMB55	0*	26	31	29	12	0	0*	0*	0*	0	0*	20	0	0	26	42

* Halos com a presença de colônias em seu interior.