

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

IGOR VASCONCELOS ROCHA

ESTUDO DE VARIANTES DE BETALACTAMASES ADC DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* NA RESISTÊNCIA AOS
BETALACTÂMICOS

RECIFE

2021

IGOR VASCONCELOS ROCHA

**ESTUDO DE VARIANTES DE BETALACTAMASES ADC DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* NA RESISTÊNCIA AOS
BETALACTÂMICOS**

Tese apresentada ao Doutorado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, como requisito para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Danilo Elias Xavier

Coorientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

RECIFE

2021

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- R672e Rocha, Igor Vasconcelos.
Estudo de variantes de betalactamases ADC de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* na resistência aos betalactâmicos / Igor Vasconcelos Rocha. — Recife: [s.n.], 2021.
143 p. : ilus., graf., tab. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.
Orientadores: Danilo Elias Xavier; Nilma Cintra Leal.
1. *Acinetobacter baumannii* - isolamento & purificação. 2. Infecções por *Acinetobacter* - microbiologia. 3. *Acinetobacter baumannii* - microbiologia. 4. *Acinetobacter baumannii* - genética. 5. Resistência Microbiana a Medicamentos. 6. Genes bacterianos. 7. Farmacorresistência bacteriana. 8. DNA Bacteriano - análise. 9. Proteínas de Bactérias - genética. 10. beta-Lactamases - química. 11. Conformação Proteica. 12. Unidades de Terapia Intensiva. 13. Brasil. I. Xavier, Danilo Elias. II. Leal, Nilma Cintra. III. Título.

IGOR VASCONCELOS ROCHA

**ESTUDO DE VARIANTES DE BETALACTAMASES ADC DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* NA RESISTÊNCIA AOS
BETALACTÂMICOS**

Tese apresentada ao Doutorado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, como requisito para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 30/06/2021

BANCA EXAMINADORA

Dr. Danilo Elias Xavier

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Christian Robson de Souza Reis

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Sibebe Ribeiro de Oliveira

Centro Universitário Tabosa de Almeida

Dra. Eloiza Helena Campana

Universidade Federal da Paraíba

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr. Danilo Elias Xavier e Dra. Nilma Cintra Leal, pela atenção, por todo o conhecimento compartilhado, pelo incentivo e por toda confiança em mim depositada durante minha trajetória acadêmica.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite de participar da avaliação deste trabalho, pelos apontamentos, discussões e sugestões que contribuíram para a melhoria do estudo.

Aos servidores e colaboradores do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), em especial a Antônio Rezende, Cássia Docena, Tatiany Romão, Túlio Campos, Viviane Carvalho, Roberto Werkhäuser, Cláudio Araújo, Fabiana Laura, Silvana Santos e Matheus Bezerra, pelo grande auxílio na preparação de experimentos e na realização de etapas fundamentais deste trabalho.

A todos os meus amigos e colegas do Instituto Aggeu Magalhães, em especial a Gabriel Faienstein, Lílian Amorim, Wagner Tenório, Gustavo Lima, Romário Araújo, Isis Cirino e Danyele Mello, por todo auxílio com os experimentos e discussões científicas.

Aos amigos e colaboradores da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e em especial a Carlos Alberto, pelo auxílio na tabulação e análises de dados, e a todos do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular Aplicada à Microbiologia e Epidemiologia Molecular do IAM, pelas proveitosas reuniões e discussões científicas.

Aos amigos do Centro Latino-Americano de Formação Interdisciplinar (CELFI) e da Universidade de Buenos Aires (UBA), por todo o auxílio com os *softwares* para realização do *docking* molecular.

À minha família, especialmente aos meus pais, irmã e avós, por todo o apoio, amor, carinho, suporte emocional e por sempre apoiar e incentivar minhas escolhas. Obrigado por tudo.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em especial ao Instituto Aggeu Magalhães, por todos os recursos, ferramentas e suporte científico empregado neste trabalho, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

ROCHA, Igor Vasconcelos. **Estudo de variantes de betalactamases ADC de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* na resistência aos betalactâmicos.** 2021. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

Acinetobacter sp. tem emergido como patógeno oportunista em casos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em todo o mundo. Sua emergência tem sido atribuída à resistência intrínseca a diversos antimicrobianos e à capacidade de adquirir mecanismos de resistência aos mesmos. As *Acinetobacter-derived cephalosporinases* (ADCs) compreendem um grupo de betalactamases capazes de hidrolisar as cefalosporinas e incapazes de hidrolisar os carbapenêmicos. No entanto, mudanças na sua capacidade hidrolítica têm sido associadas a alterações de aminoácidos em regiões específicas da enzima. Recentemente, a variante ADC-68 foi caracterizada com atividade contra carbapenêmicos, além das cefalosporinas de terceira e quarta geração. Em estudo realizado no Instituto Aggeu Magalhães, foram identificadas variantes de ADC com substituições de aminoácidos similares às descritas na ADC-68 em isolados de *A. baumannii* oriundos de infecções em pacientes hospitalizados na cidade do Recife e Caruaru. O objetivo deste estudo foi investigar a capacidade dessas variantes de ADC em hidrolisar os carbapenêmicos, bem como identificar os principais motivos envolvidos com a resistência aos carbapenêmicos e demais betalactâmicos. As variantes enzimáticas foram clonadas em vetor de expressão pET28a(+) e expressas em *E. coli* BL21(DE3). O perfil de sensibilidade de *E. coli* BL21(DE3) transformantes aos betalactâmicos foi determinado por microdiluição e testes de hidrólise enzimática. A fim de investigar demais substituições de aminoácidos envolvidas com a ampliação do espectro hidrolítico de ADC, as variantes enzimáticas foram modificadas com motivos próprios de ADC-68 por mutagênese sítio-dirigida e avaliadas quanto a sua capacidade de causar resistência aos betalactâmicos e *docking* molecular. Os resultados demonstraram que as ADCs avaliadas nesse estudo possuem atividade de ESBL e carbapenemase, além da identificação de substituições isoladas e simultâneas de aminoácidos que alteram parcialmente ou completamente o perfil de hidrólise destas ao imipenem e demais betalactâmicos.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana a medicamentos; Betalactamases; Infecções nosocomiais.

ROCHA, Igor Vasconcelos. **Study of variants of betalactamases ADC from clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in beta-lactams resistance.** 2021. Thesis (PhD. in Bioscience and Biotechnology for Health) –Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2021.

ABSTRACT

Acinetobacter sp. has emerged as an opportunistic pathogen in cases of healthcare associated infections (HAI) worldwide. Its emergence as a pathogen has been attributed to the intrinsic resistance to several antimicrobials and the capacity to acquire mechanisms of resistance. *Acinetobacter*-derived cephalosporinases (ADCs) comprise a group of beta-lactamases capable of hydrolyzing cephalosporins and incapable of hydrolyzing carbapenems. However, changes in its hydrolytic capacity have been associated with amino acid changes in specific regions of the enzyme. Recently, the ADC-68 variant was characterized with activity also against carbapenems, in addition to the third and fourth generation cephalosporins. In a study developed at Aggeu Magalhães Institute, ADC variants with amino acid substitutions like those described in ADC-68 were identified in *A. baumannii* isolates from infections in hospitalized patients in the cities of Recife and Caruaru. The aim of this study was to investigate the ability of these different ADC variants to hydrolyze carbapenems, as well as to identify the main motifs involved with resistance to carbapenems and other beta-lactams. ADC enzyme variants were cloned into pET28a(+) expression vector and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The sensitivity profile of *E. coli* BL21(DE3) transformants to beta-lactams was evaluated by microdilution and enzymatic hydrolysis tests. In order to investigate other amino acid substitutions involved with the expansion of the hydrolytic spectrum of ADC, the enzymatic variants of ADC carried by the clinical isolates of *A. baumannii* were modified with ADC-68 motifs by site-directed mutagenesis technique and evaluated as to its ability to cause resistance to beta-lactams and molecular docking. The results demonstrated that the ADCs evaluated in this study have ESBL and carbapenemase activity, in addition to the identification of isolated and simultaneous substitutions of amino acids that partially or completely alter its hydrolysis profile to imipenem and other beta-lactams.

Key words: Drug resistance; Beta-lactamases; Health Care Associated Infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos principais grupos de betalactâmicos.	25
Figura 2 - Hidrólise de uma molécula de cefalosporina por uma betalactamase.	33
Figura 3 - Representação da estrutura proteica de ADC-68 de <i>Acinetobacter baumannii</i>	41
Figura 4 - Mecanismo de hidrólise enzimática mediado por betalactamase tipo AmpC	44
Figura 5 - Representação das estruturas moleculares de imipenem e benzilpenicilina.	44
Figura 6 - Esquema empregado para mutagênese sítio-dirigida pela técnica de <i>megaprimer</i>	61
Figura 7 - Relação filogenética das variantes alélicas de <i>bla_{ADC}</i> de <i>Acinetobacter</i> spp.	75
Figura 8 - Alinhamento múltiplo de sequências de nucleotídeos e aminoácidos das variantes alélicas de <i>bla_{ADC}</i> do clado de interesse.	76
Figura 9 - Eletroforese dos produtos de PCR com oligonucleotídeos utilizados para detecção de <i>IS_{Aba1}/bla_{ADC}</i>	77
Figura 10 - Alinhamento e principais alterações de aminoácidos das sequências preditas para cada variante enzimática de ADC.	79
Figura 11 - SDS-PAGE representativo do extrato proteico total das cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas com os diferentes clones pET28a(+): <i>bla_{ADC}</i>	82
Figura 12 - Teste <i>CIMplus</i> para detecção de atividade de carbapenemase das linhagens de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas com pET28a(+):ADCs após indução de síntese proteica.	86
Figura 13 - Representação da estrutura proteica geral de ADC de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	93
Figura 14 - Sobreposição das estruturas e superfícies proteicas de ADC-A e ADC-B.	96
Figura 15 - Representação gráfica das características estruturais do sítio ativo de ADC-A e ADC-B.	100
Figura 16 - Principais aminoácidos determinantes da formação de complexos proteína-ligante localizados no sítio ativo de ADC-A e ADC-B.	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das betalactamases.....	35
Quadro 2 - Características fenotípicas e genéticas dos isolados clínicos de <i>A. baumannii</i> utilizados neste estudo	51
Quadro 3 - Cepas e plasmídeos utilizados nesse estudo	54
Quadro 4 - Oligonucleotídeos utilizados para a modificação nas sequências de aminoácidos das ADCs.....	59
Quadro 5 - Concentrações de antimicrobianos avaliadas no teste fenotípico de resistência bacteriana	66
Quadro 6 - Identidade e divergência entre as sequências de aminoácidos das variantes enzimáticas de ADC do presente estudo.	78
Quadro 7 - Comparação entre o número e resíduos de interação que formam ligações de hidrogênio entre as variantes de ADC e diferentes carbapenêmicos.....	104

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição das variantes ADC identificadas no presente estudo entre as diferentes STs de <i>A. baumannii</i>	73
Gráfico 2 - Degradação do imipenem e decaimento de sua absorbância em função do tempo de exposição às variantes enzimáticas de ADC selecionadas.	90
Gráfico 3 - Representação dos valores de ponto isoelétrico das variantes enzimáticas de ADC do presente estudo e aquelas depositadas no banco de dados <i>Beta-Lactamase Data Base</i>	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito potencial das modificações de aminoácidos para alteração funcional das variantes de ADC investigadas neste estudo.	81
Tabela 2 - Potencial efeito das modificações simuladas na sequência de aminoácidos predita para ADC-68 exercem sobre sua atividade enzimática.	81
Tabela 3 - Teste fenotípico para detecção de hidrólise e inativação <i>in vitro</i> de antimicrobianos da classe dos betalactâmicos pelo método <i>CIMplus</i> realizado para os transformantes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) com as diferentes variantes alélicas de <i>bla</i> _{ADC} (pET28a(+):: <i>bla</i> _{ADC}).	85
Tabela 4 - Valores de concentração inibitória mínima de antimicrobianos da classe dos betalactâmicos para as cepas de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) expressando as variantes de ADC.	88
Tabela 5 - Ponto isoelétrico (pI) das variantes enzimáticas de ADC.	91
Tabela 6 - Predição do tamanho médio da cavidade do sítio ativo enzimático entre as diferentes variantes de ADC	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	- Alanina
ACT	- <i>AmpCtype</i>
ADC	- <i>Acinetobacter-derived cephalosporinase</i>
AFB	- Ácido fenilborônico
AIM	- <i>Australian imipenemase</i>
AMP	- Ampicilina
AMP/SUB	- Ampicilina/Sulbactam
AmpC	- Betalactamase da classe C
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BKC	- <i>Brazilian Klebsiella carbapenemase</i>
C	- Celsius
CA-MHB	- <i>Cation-adjusted Mueller-Hinton broth</i>
CARB	- <i>Active on carbenicillin</i>
CAZ	- Ceftazidima
CC	- Complexo clonal
cESBL	- Betalactamases de espectro estendido da classe C
<i>CIMplus</i>	- <i>Carbapenem Inactivation Method Plus</i>
CMY	- <i>Cephamicinase activity</i>
CphA	- <i>Carbapenem hydrolyzing and first (A) de Aeromonas hydrophila</i>
CPM	- Cefepima
CRO	- Ceftriaxona
CTX-M	- <i>Active on Cefotaxime, first isolated in Munich</i>
D	- Ácido aspártico
DHA	- <i>Discovered at Dhahran, Arabia Saudita</i>
DIM	- <i>Dutch imipenemase</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	- Betalactamase de Espectro Estendido
FIM	- <i>Florence imipenemase</i>

FIOCRUZ	-	Fundação Oswaldo Cruz
G	-	Glicina
GIM	-	<i>German imipenemase</i>
I	-	Isoleucina
IAM	-	Instituto Aggeu Magalhães
IMP	-	Imipenemase
IPM	-	Imipenem
IRAS	-	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IS	-	Elemento de inserção
K	-	Lisina
k_{cat}	-	Número de eventos catalíticos / atividade catalítica
KHM	-	<i>Kyorin Health Science metallo-β-lactamase</i>
K_m	-	Constante de Michaelis
KPC	-	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LB	-	Luria-Bertani
LCR	-	Líquido cefalorraquidiano
M	-	Molar
mA	-	Mili Ampere
MBL	-	Metalobetalactamase
MDR	-	Multidroga resistente
MER	-	Meropenem
MER/VAB	-	Meropenem/vaborbactam
mL	-	Mililitros
mM	-	Milimolar
MRSA	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MRSE	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente à meticilina
N	-	Asparagina
NDM	-	<i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>
ng	-	Nanograma
OXA	-	Oxacilinase
P	-	Prolina
Pb	-	Pares de bases

PBP	- Proteína Ligadora de Penicilina
PC	- de <i>Staphylococcus aureus</i> cepa PC1
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PE	- Pernambuco
PER	- de <i>Pseudomonas extended resistant</i> ou Patrice, Esthel e Roger
pH	- Potencial hidrogeniônico
pl	- Ponto isoelétrico
Q	- Glutamina
R	- Arginina
Rpm	- Rotações por minuto
RTG	- Enzima com tríade RTG (arginina, treonina, glicina)
S	- Serina
s	- Segundos
SBM	- <i>Serratia metallo-β-lactamase</i>
Sfh	- <i>Serratia fonticola carbapenem hydrolase</i>
SHV	- <i>Sulfhydryl reagent variable</i>
SPM	- <i>São Paulo metallo-β-lactamase</i>
ST	- <i>Sequence type</i>
T	- Treonina
TBM	- <i>Tripoli metallo-β-lactamase</i>
TEM-1	- Temoniera betalactamase-1
TSA	- Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
UTI	- Unidade de Terapia Intensiva
VIM	- <i>Verona imipenemase</i>
μg	- Micrograma
μL	- Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 <i>Acinetobacter</i> spp: aspectos gerais e clínicos	21
2.2 Resistência antimicrobiana: mecanismos moleculares e de disseminação	23
2.3 Betalactâmicos: estrutura e classificação	24
2.3.1 Penicilinas	25
2.3.2 Cefalosporinas	26
2.3.3 Monobactâmicos	28
2.3.4 Carbapenêmicos	29
2.3.4.1 <i>Imipenem</i>	29
2.3.4.2 <i>Meropenem</i>	30
2.3.4.3 <i>Doripenem</i>	30
2.3.4.4 <i>Ertapenem</i>	31
2.4 Mecanismos de resistência antimicrobiana em <i>A. baumannii</i>	31
2.4.1 Resistência antimicrobiana por produção enzimática	32
2.5 Betalactamases: aspectos gerais e classificação	32
2.5.1 Betalactamases da classe A de Ambler	37
2.5.2 Betalactamases da classe B de Ambler	37
2.5.3 Betalactamases da classe D de Ambler	38
2.5.4 Betalactamases da classe C de Ambler	39
2.5.4.1 <i>Acinetobacter-derived cephalosporinases: aspectos genéticos, bioquímicos e resistência antimicrobiana</i>	40
2.5.4.2 <i>Mecanismos catalíticos das carbapenemases da classe C</i>	43
2.6 Inibidores de betalactamases	45
2.7 Elementos de inserção e superexpressão de ADC em <i>A. baumannii</i>	47
3 OBJETIVO	49
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos	49
4 METODOLOGIA	50
4.1 Isolados clínicos de <i>Acinetobacter baumannii</i> e comparação entre variantes alélicas de ADCs	50

4.2 Confirmação da presença do elemento IS<i>Aba1</i> a montante <i>bla</i>_{ADC} dos isolados clínicos de <i>A. baumannii</i>.....	53
4.3 Clonagem e expressão das variantes alélicas do gene <i>bla</i>_{ADC}	54
4.3.1 Clonagem das variantes alélicas do gene <i>bla</i> _{ADC}	56
4.3.2 Comparação entre as sequencias proteicas de ADC e mutagênese sítio-dirigida	58
4.3.3 Expressão das variantes ADC.....	61
4.4 Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos	63
4.5 Testes fenotípicos de inativação de betalactâmicos e hidrólise enzimática dos carbapenêmicos	67
4.5.1 Carbapenem Inactivation Method Plus (<i>CIMplus</i>).....	67
4.5.2 CarbAcineto	68
4.6 Detecção espectrofotométrica da hidrólise de imipenem pelas variantes enzimáticas de ADC	69
4.7 Modelagem computacional da estrutura proteica terciária de ADC e <i>docking</i> molecular	70
4.8 Cálculo do ponto isoelétrico teórico (pI) das variantes enzimáticas de ADC	72
4.9 Análise dos dados	72
4.10 Considerações Éticas e de Biossegurança.....	72
5 RESULTADOS	73
5.1 Agrupamento das diferentes variantes enzimáticas de ADC de acordo com as sequências de aminoácidos e suas características genéticas.....	73
5.2 Identificação de IS<i>Aba1</i> a montante <i>bla</i>_{ADC} nos isolados clínicos de <i>A. baumannii</i>.....	77
5.3 Predição da estrutura proteica terciária e identificação de domínios estruturais de interesse.....	77
5.4 Efeito das diferentes substituições de aminoácidos na atividade enzimática de ADC	80
5.5 Expressão das variantes de ADC em linhagem laboratorial de <i>Escherichia coli</i>	82
5.6 Teste fenotípico-colorimétrico de hidrólise enzimática dos carbapenêmicos	83
5.7 Teste fenotípico da hidrólise enzimática de betalactâmicos: <i>CIMplus</i>	83

5.8 Concentração inibitória mínima de betalactâmicos contra linhagens transformantes de <i>Escherichia coli</i> expressando as variantes de <i>bla</i>_{ADC}	86
5.9 Hidrólise enzimática de imipenem pelas variantes de ADC.....	89
5.10 Ponto isoelétrico teórico (pI) das variantes enzimáticas de ADC.....	91
5.11 Modelagem estrutural e ensaio <i>in silico</i> de interação de ADC com ligantes betalactâmicos	92
5.11.1 Características e propriedades estruturais	92
5.11.2 Ensaios <i>in silico</i> de interação molecular de ADC-A e ADC-B com carbapenêmicos.....	97
6 DISCUSSÃO.....	105
7 CONCLUSÃO.....	118
REFERÊNCIAS	120
APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS	140
ANEXO A – DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	141
ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO DE BIOSSEGURANÇA.....	142

1 INTRODUÇÃO

Inicialmente descritos como microrganismos comensais presentes em solo, água, vegetais, animais, pele e trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis, *Acinetobacter baumannii* tem se tornado um microrganismo de sucesso e emergido como patógeno oportunista em casos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), causando infecções como pneumonia, bacteremia, endocardites, infecções da pele e tecidos moles, infecções do trato urinário e meningites, principalmente em pacientes imunocomprometidos e assistidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) (CAMP; TATUM, 2010; GOGOU *et al.*, 2011; VISCA *et al.*, 2011).

A. baumannii possui notória capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos, seja de forma adaptativa ou adquirida. A associação de mecanismos de resistência a múltiplas drogas, frequentemente observada entre isolados clínicos desse gênero, torna a sua erradicação e a resolução da infecção um desafio para a prática clínica (GOGOU *et al.*, 2011).

A resistência de *A. baumannii* aos betalactâmicos (uma das classe de antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções causadas por esta espécie bacteriana), ocorre principalmente devido à diminuição da permeabilidade de sua membrana externa a essas drogas; à hiperexpressão (ou superexpressão) de bomba de efluxo e drogas; à produção de betalactamases cromossômicas induzíveis do tipo AmpC e oxacilinases (ZAVASCKI *et al.*, 2010); ou adquiridas por transferência horizontal de genes que conferem resistência aos betalactâmicos, inclusive aos carbapenêmicos (FORSBERG *et al.*, 2012).

As *Acinetobacter-derived cephalosporinases* (ADCs) são betalactamases da classe C e compreendem um vasto grupo de enzimas codificadas por genes localizados no cromossomo de *Acinetobacter* spp.. Estas enzimas foram descritas inicialmente com a capacidade de hidrolisar cefalosporinas, como a cefotaxima e ceftazidima, mas incapazes de hidrolisar o cefepima e os carbapenêmicos (NORDMANN; MAMMERI, 2007). No entanto, mudanças na atividade hidrolítica das betalactamases da classe C têm sido associadas a substituições de aminoácidos e/ou deleções/inserções em regiões estruturais específicas, como aquelas que ocorrem em seu sítio ativo; Ω -loop; hélices H2 e H10 e na região do C-loop (C-terminal) apresentado por essas enzimas (NORDMANN; MAMMERI, 2007).

Mais recentemente, as variantes ADC-33 e ADC-56 dessas enzimas foram descritas com a capacidade de hidrolisar cefepima (PÉREZ *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2011) e, posteriormente, a variante ADC-68 foi caracterizada apresentando atividade contra os carbapenêmicos, que representam umas das últimas opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram negativos (JEON *et al.*, 2014).

Os genes *bla*_{ADC} apresentam expressão basal e o aumento da sua expressão está relacionado à inserção de elementos genéticos móveis (como as ISs, *insertion sequences*), que carregam regiões promotoras da transcrição gênica (JEON *et al.*, 2014). Entretanto, o estudo do contexto genético de *bla*_{ADC-68} isolado de *A. baumannii* D015 não identificou inserção de elementos genéticos como IS*Aba1*, o que indica que a sua expressão basal poderia ser suficiente para levar à resistência aos carbapenêmicos (JEON *et al.*, 2014).

Em estudo realizado no Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), com foco na caracterização genética de 45 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* oriundos de infecções em pacientes hospitalizados em cinco diferentes hospitais da cidade do Recife (LEAL *et al.*, 2020), foi identificada alta frequência da presença de IS*Aba1* na região à montante ao gene *bla*_{ADC}, atentando para a possível vantagem adaptativa que esse evento poderia acarretar com a superexpressão de ADC betalactamase e desenvolvimento de resistência aos betalactâmicos, essencial para a manutenção dessas cepas no ambiente hospitalar.

Uma análise geral das sequências de aminoácidos preditas para a enzima naturalmente codificada pelos genes *bla*_{ADC} desses isolados identificou quatro variantes alélicas dessas enzimas e que codificavam substituições de aminoácidos e motivos comparáveis àquelas previamente descritas na carbapenemase ADC-68 em comparação com a ADC-1 (JEON *et al.*, 2014), inclusive, aquelas que foram determinantes para a ampliação da capacidade catalítica de ADC-68 contra os carbapenêmicos. Além disso, pôde-se observar também uma inserção de três aminoácidos, Prolina-Alanina-Serina (PAS), na região do Ω -loop da enzima ADC de vários isolados resistentes aos carbapenêmicos.

Diante dessas observações e evidências, levantou-se a hipótese de que as alterações de aminoácidos presentes nas variantes enzimáticas de ADC naturalmente expressas pelos isolados clínicos de *A. baumannii* poderia contribuir para a alteração do seu espectro catalítico e possível hidrólise dos carbapenêmicos por essas

variantes de ADC, ou ainda se existem outras substituições/inserções de aminoácidos envolvidas com a ampliação do espectro de ação das ADC.

Este estudo apresenta dados sobre o espectro de atividade dessas variantes enzimáticas de ADC contra betalactâmicos de uso clínico, acrescenta conhecimento para o entendimento sobre os mais diversos mecanismos envolvidos no estabelecimento de *Acinetobacter baumannii* como patógeno emergente de sucesso no cenário clínico atual e alerta para a possibilidade de evolução funcional dessas enzimas com ampliação de seu espectro contra os carbapenêmicos, favorecida pela pressão seletiva exercida pelo crescente uso dessas drogas para tratamento de IRAS em todo mundo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Descrito inicialmente em amostras de solo pelo microbiologista holandês Martinus Willem Beijerinck, 1911, o gênero *Acinetobacter* (primeiramente nomeado de *Micrococcus calcoaceticus*) compreende um grupo de aproximadamente 40 espécies de bactérias aeróbicas e não fermentadoras de glicose pertencentes à Família Moraxellaceae, da Ordem Gammaproteobacteria (CAMP; TATUM, 2010; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; MARTINS; BARTH, 2013).

2.1 *Acinetobacter* spp: aspectos gerais e clínicos

O gênero *Acinetobacter* é caracterizado por apresentar reações de catalase positiva e citocromo C oxidase negativa, sendo facilmente cultivado nos principais meios de cultura utilizados na prática laboratorial (MARTINS; BARTH, 2013). Em ágar sangue, formam colônias lisas, cremosas ou ocasionalmente mucoides, que variam entre as colorações branca e acinzentada e possuem diâmetro que varia de 1,5 a 3,0 milímetros após incubação por 12 horas a 35 ± 2 °C, enquanto em ágar MacConkey, devido à capacidade de oxidação de lactose que possuem, se dispõem em colônias levemente rosa e de morfologia convexa, podendo ser translúcidas ou opacas (CARVALHO, 2013; PELEG *et al.*, 2008).

As espécies do gênero *Acinetobacter* apresentam estreita relação genética entre si e aquelas pertencentes ao complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, que inclui as espécies *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis* e *A. pittii*, são consideradas clinicamente mais relevantes. A denominação deste grupo foi proposta no ano de 1991, para facilitar a identificação destas espécies, sendo o termo “Complexo *A. baumannii-calcoaceticus*” empregado por diversos estudos epidemiológicos em todo o mundo (CAMP; TATUM, 2010; MARTINS; BARTH, 2013; SILVEIRA, 2018).

Inicialmente descritos como microrganismos comensais, presentes em solo, água, vegetais, animais, pele e trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis, *A. baumannii* compreende a espécie de maior importância clínica do complexo, tendo se tornado um microrganismo de sucesso durante as últimas décadas e emergido como patógeno oportunista em casos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), causando infecções como pneumonia, bacteremia, endocardites, infecções da

pele e tecidos moles, infecções do trato urinário e meningites, principalmente em pacientes imunocomprometidos e assistidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) (CAMP; TATUM, 2010; GOGOU *et al.*, 2011; VISCA *et al.*, 2011).

O sucesso de *A. baumannii* como patógeno tem sido atribuído principalmente à sua versatilidade nutricional e metabólica, à sua capacidade de adaptação a condições adversas do ambiente (tais como variações consideráveis de temperatura, pH e umidade), à sua capacidade de formação de biofilme, à sua resistência intrínseca a diversas drogas antimicrobianas e habilidade em desenvolver e adquirir mecanismos de resistência aos antimicrobianos (JUNI, 1978; VISCA *et al.*, 2011).

A principal forma de transmissão de *A. baumannii* se dá pelo contato direto ou indireto do agente bacteriano com o indivíduo suscetível, seja por fontes endógenas (sobretudo o trato gastrointestinal e respiratório do hospedeiro) ou ambientais (equipamentos hospitalares de respiração, colchões, componentes das macas/camas do leito, mesas de cabeceira e prateleiras dispostas no leito, pias ou cortinas) e, embora a colonização do indivíduo por *A. baumannii* seja mais comum que a infecção, quando esta segunda ocorre, pode evoluir de maneira severa, estando associada a taxas de mortalidade que variam de 8 a 23% nos diferentes hospitais do mundo, desconsiderando-se fatores não relacionados à infecção, como por exemplo a gravidade inerente da doença base (TAKAJI, 2011; OTTER *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2018; SILVEIRA, 2018).

Os principais fatores de risco para infecção por *A. baumannii* compreendem principalmente a submissão do indivíduo a procedimentos médicos invasivos (tais como cirurgias, utilização de cateter venoso, traqueostomia, exposição à ventilação mecânica e fraturas ósseas que necessitem de fixadores), no entanto, estudos também têm associado à exposição prévia a antibióticos, a longa permanência hospitalar, internação em UTIs, presença de queimaduras extensas e deficiência imunológica do hospedeiro como fatores cruciais para o desenvolvimento e persistência da infecção por esta espécie (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007; BLANCO *et al.*, 2018; ELLIS *et al.*, 2015; SILVEIRA, 2018).

As infecções causadas por *A. baumannii* eram inicialmente consideradas como de fácil resolução, sendo tratadas sem maiores complicações com a administração de gentamicina, monociclina, ampicilina ou carbenicilina. No entanto, a partir da segunda metade da década de 1970, tem se observando uma gradual elevação da taxa de resistência aos antimicrobianos comumente empregados no tratamento destas

infecções, que incluíam as cefalosporinas de reduzido e amplo espectro, cefamicinas, aminoglicosídeos e tetraciclina. Atualmente, a maioria das cepas nosocomiais de *A. baumannii* isoladas de variadas amostras biológicas apresentam resistência a estas e outras classes de antimicrobianos, tais como os carbapenêmicos - que representam uma das últimas opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram negativos multirresistentes - e mais recentemente, à polimixina B, colistina e tigeciclina, estando incluída entre as seis principais espécies bacterianas que apresentam elevada morbidade e mortalidade em pacientes em todo o mundo (BARLETTA *et al.*, 2018; GENTELUCI *et al.*, 2016; ISLER *et al.*, 2019; QURESHI *et al.*, 2015; SILVEIRA, 2018). Além disso, *A. baumannii* é considerado prioridade 1 (crítica) na Lista de Agentes Patogênicos Prioritários da Organização Mundial de Saúde, que compreende doze espécies bacterianas que representam maior ameaça à saúde humana (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

2.2 Resistência antimicrobiana: mecanismos moleculares e de disseminação

Diversos são os mecanismos através dos quais as bactérias podem se tornar menos suscetíveis aos antimicrobianos, no entanto, as principais formas de resistência antimicrobiana incluem: *i)* a produção de enzimas capazes de inativar o antibiótico ou impedir a ligação do mesmo ao seu sítio-alvo (CLÍMACO, 2011; ARDEBILI *et al.*, 2015); *ii)* as alterações estruturais e/ou diminuição da expressão de proteínas de membrana (CLÍMACO, 2011; LIU *et al.*, 2014); *iii)* a expressão de bombas de efluxo ou transportadores de drogas (BECEIRO *et al.*, 2013); ou *iv)* alterações do sítio-alvo destes antimicrobianos (FONSECA *et al.*, 2013; ROCHA, 2017).

Dentre os principais fatores relacionadas ao aumento dos níveis de resistência antimicrobiana de *A. baumannii* e de outras espécies bacterianas, os mais impactantes se concentram na utilização excessiva e prescrição inapropriada de antimicrobianos na prática clínica e o seu uso extensivo na agricultura e pecuária (GANDRA *et al.*, 2018; VENTOLA, 2015). Diversos estudos têm demonstrado a existência de uma relação direta entre a utilização de antimicrobianos e o aumento da resistência bacteriana e, em ambientes hospitalares, especialmente, tal fator constitui a base para o rápido desenvolvimento desta nos isolados clínicos (FERRI *et al.*, 2015; VENTOLA, 2015).

A antibioticoterapia de amplo espectro empregada no tratamento de pacientes infectados exerce pressão seletiva sobre a população bacteriana, resultando na depleção de competidores bacterianos sensíveis aos antimicrobianos e na consequente manutenção de linhagens resistentes ocasionando a rápida emergência de isolados clínicos resistentes aos antimicrobianos (FERRI *et al.*, 2015; VENTOLA, 2015). Na prática clínica, o uso inapropriado de antimicrobianos chega a variar de 30 a 50%, seja por escolha inadequada do agente antimicrobiano, duração de tratamento empregado ou ainda pela dispensabilidade da realização do tratamento. Estudos demonstram que concentrações subinibitórias e/ou subterapêuticas de antimicrobianos expõem o paciente a potenciais quadros de desfavorável evolução, uma vez que são capazes de promover a resistência bacteriana ao favorecerem variação do padrão da expressão gênica bacteriana, transferência horizontal de genes e/ou eventos de mutagênese que possam ocasionar o aumento de virulência bacteriana e a propagação da resistência antimicrobiana entre as diferentes espécies (BANIN *et al.*, 2017; FRIERI *et al.*, 2017; VENTOLA, 2015; VISWANATHAN, 2014).

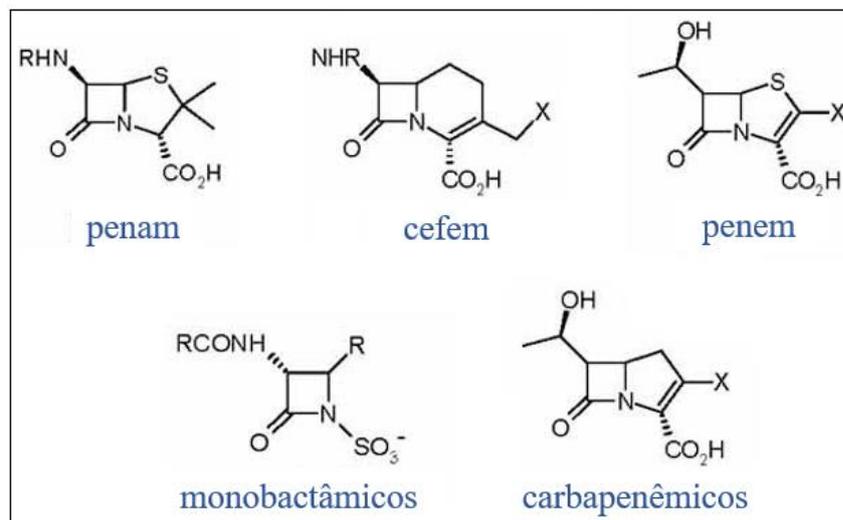
Na agricultura e pecuária, os antimicrobianos são extensivamente utilizados como promotores de crescimento, para o tratamento ou como medida profilática contra infecções que acometam os animais nos diversos setores da criação (WOOLHOUSE *et al.*, 2015). A transferência de bactérias resistentes de animais para seres humanos foi primeiramente relatada há mais de 40 anos (VENTOLA, 2015). Na última década, estudos de metagenômica realizados em amostras de intestino de humanos e animais da pecuária têm reportado não apenas a transferência de bactérias entre estas populações, mas também a transferência de elementos genéticos móveis, adquiridos por ingestão direta do produto animal ou demais produtos contaminados com o esterco utilizado como fertilizante e águas contaminadas por urina ou fezes dos animais de criadouros (VENTOLA, 2015; WOOLHOUSE *et al.*, 2015).

2.3 Betalactâmicos: estrutura e classificação

Os betalactâmicos representam a classe de antimicrobianos mais utilizada no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* e demais bacilos Gram negativos, compreendendo as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (BECEIRO *et al.*, 2013; RUPPÉ *et al.*, 2015). Seu mecanismo de ação se dá pela

inibição de enzimas do tipo transpeptidase (as proteínas ligadoras de penicilina - ou PBPs), que se encontram ancoradas na membrana celular bacteriana e participam da biossíntese da camada de peptidoglicano e da estruturação da parede celular. A porção do anel betalactâmico destes antimicrobianos liga-se a diferentes PBPs, tornando-as incapazes de desempenhar o seu papel, ocasionando, desta forma, a morte celular devido à instabilidade osmótica ou autólise (PALZKILL, 2013). A estrutura molecular dos antimicrobianos desta classe é composta basicamente pela presença de um ou mais sistemas de anéis betalactâmicos e um grupamento amida cíclico, altamente reativo. Cinco grupos de sistemas de anéis betalactâmicos clinicamente relevantes foram descritos: *i)* penam; *ii)* cefem; *iii)* penem; *iv)* monobactâmicos e *v)* carbapenêmicos (Figura 1), que variam entre si de acordo com suas propriedades químicas, biológicas, farmacocinéticas e imunológicas (FERNANDES *et al.*, 2013). Assim, os principais representantes de betalactâmicos encontram-se subdivididos em:

Figura 1 - Estrutura química dos principais grupos de betalactâmicos.



Fonte: Adaptado de Kuhn *et al.* (2004).

2.3.1 Penicilinas

As penicilinas, principais representantes do grupo dos “penams” e produzidas naturalmente por fungos da espécie *Penicillium crysogenum*, foram descobertas em 1928 por Alexander Fleming, sendo o primeiro grupo de antimicrobiano a ser utilizado com sucesso na prática clínica (FERREIRA *et al.*, 2008). Possuem estrutura bicíclica

básica formada por ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), composto pela condensação de L-cisteína e D-valina, que resulta na formação de um anel betalactâmico e outro tiazolidínico (FERNANDES *et al.*, 2013). Inicialmente produzidas por fermentação, as penicilinas eram muitas vezes produtos da mistura de vários betalactâmicos, como a penicilina G e V. No entanto, a maior facilidade de acesso ao 6-APA possibilitou o desenvolvimento de variedades semi-sintéticas e sintéticas destes antimicrobianos, tais como ampicilina, amoxicilina, oxacilina e piperacilina, que são amplamente utilizadas para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. até a atualidade (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013; RINCÓN *et al.*, 2021).

2.3.2 Cefalosporinas

As cefalosporinas foram descritas inicialmente no ano de 1945, sendo originadas naturalmente a partir de fungos do gênero *Acremonium*. Estes antimicrobianos compreendem os principais representantes do grupo dos “cefems”, sendo amplamente utilizados desde o início da década de 1970 como sendo um dos mais potentes e efetivos agentes (FERNANDES *et al.*, 2013; MEHTA; SHARMA, 2016).

Em virtude de sua relevância no cenário clínico, diversos modelos de classificação foram propostos para estes antimicrobianos, considerando seus aspectos químicos, biológicos, farmacocinéticos e imunológicos (FERNANDES *et al.*, 2013). O modelo de classificação mais utilizado, no entanto, é o microbiológico, que se baseia no espectro de atividade antimicrobiana destes agentes e subdivide as cefalosporinas em cinco principais grupos, denominados de gerações:

- a) Cefalosporinas de 1ª geração - são ativas predominantemente contra cocos Gram positivos (com exceção de *Enterococcus* e *Staphylococcus* resistentes à meticilina [MRSA]) e algumas cepas da Família Enterobacteriaceae, tais como *Escherichia coli*, *Proteus* e *Klebsiella*. São utilizadas principalmente para o tratamento de infecções de pele e tecidos moles ou como agente profilático cirúrgico. Os principais fármacos deste grupo são a cefalotina e cefalexina (FERNANDES *et al.*, 2013; MEHTA; SHARMA, 2016).

- b) Cefalosporinas de 2ª geração - possuem maior espectro que as cefalosporinas de 1ª geração, sendo também efetiva contra Gram negativos como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *P. mirabilis*, *Klebsiella*, *Neisseria gonorrhoeae* e cepas menos suscetíveis de *E. coli*. São utilizadas sobretudo para o tratamento de infecções do trato respiratório, infecções cutâneas, de tecidos moles, ginecológicas e também como agente profilático cirúrgico, tendo como principais exemplares a cefuroxima e cefoxitina (MEHTA; SHARMA, 2016; SALIM *et al.*, 2017).
- c) Cefalosporinas de 3ª geração - a principal característica deste grupo é sua atividade aumentada contra bactérias Gram negativas. São menos suscetíveis às enzimas do tipo betalactamase e possuem eficácia no tratamento de infecções causadas por Gram positivos resistentes à meticilina. Dentre os principais antimicrobianos deste grupo, destacam-se a cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefoperazona, sendo as duas últimas denominadas de “cefalosporinas anti-*Pseudomonas*”, por serem também efetivas no combate às infecções causadas por este gênero bacteriano. São empregadas no tratamento de sepse e infecções do trato respiratório superior, tecidos moles e infecções hospitalares (MEHTA; SHARMA, 2016; SHIELDS *et al.*, 2018).
- d) Cefalosporinas de 4ª geração - possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo eficazes para o tratamento de infecções causadas por microrganismos Gram positivos, além de possuir também atividade bactericida aumentada frente espécies da Família Enterobacteriaceae resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, tais como *Enterobacter* e *Citrobacter* e *P. aeruginosa*. A cefepima e cefpiroma compõem os únicos fármacos disponíveis atualmente no mercado, sendo utilizados sobretudo no tratamento da sepse nosocomial de origem desconhecida, meningites e infecções do sistema nervoso central (FERNANDES *et al.*, 2013; MEHTA; SHARMA, 2016).
- e) Cefalosporinas de 5ª geração - a partir da identificação de isolados com perfis de multirresistência aos betalactâmicos comumente empregados na prática clínica, novas cefalosporinas têm surgido como opções de tratamento

para infecções causadas por estes agentes. As cefalosporinas de 5ª geração compreendem antimicrobianos sintéticos desenvolvidos em laboratórios de pesquisa para utilização exclusiva frente a microrganismos resistentes às demais opções de tratamento (FERNANDES *et al.*, 2013). Este grupo de cefalosporinas inclui a ceftarolina e ceftobiprole, eficazes no tratamento de infecções causadas por cocos Gram positivos - incluindo aquelas por MRSA, *S. epidermidis* resistente à meticilina (MRSE) e *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina - e também aquelas causadas por cepas de Gram negativos produtores de betalactamase da classe C (AmpC) e betalactamases de espectro estendido (ESBL) (DUPLESSIS; CRUM-CIANFLONE, 2011; MEHTA; SHARMA, 2016) e, mais recentemente, o ceftolozane, que possui atividade estendida contra cepas de enterobactérias e *P. aeruginosa* com perfis de multirresistência (CRAIG; ANDES, 2013; SADER *et al.*, 2011; SHARMA, 2016).

2.3.3 Monobactâmicos

Os monobactâmicos, em contraste aos demais betalactâmicos, constituem moléculas formadas por um anel betalactâmico monocíclico único e não fundido a anéis próximos, sendo amplamente ativos contra bacilos Gram negativos, incluindo *P. aeruginosa*, mas sem atividade frente a microrganismos Gram positivos (KUMAR, 2017; KURIYAMA *et al.*, 2014). Produzidos naturalmente por espécies de *Chromobacterium*, estes antimicrobianos apresentam relativa estabilidade à ação de betalactamases da classe B e alguns exemplares das classes A e D, sendo hidrolisados por betalactamases do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), ESBL e AmpC (DOI; CHAMBERS, 2015; KUMAR, 2017; SAUBERAN; BRADLEY, 2018).

O aztreonam representa o único monobactâmico disponível no mercado e, embora seja utilizado em pacientes que apresentam reações alérgicas às penicilinas e apresentem perfil de toxicidade semelhante à de outros betalactâmicos, raramente é administrado isoladamente, sendo utilizado em combinação a outros antimicrobianos de ação estendida a Gram positivos e bactérias anaeróbias (DOI; CHAMBERS, 2015; KUMAR, 2017; SAUBERAN; BRADLEY, 2018).

2.3.4 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são betalactâmicos com amplo espectro de atividade, caracterizados pela presença de um átomo de carbono na posição 4 da porção tiazolidínica e por apresentarem elevada resistência às principais betalactamases (inclusive as de espectro estendido). Possuem atividade antimicrobiana mais ampliada quando comparado às penicilinas e cefalosporinas, mostrando-se efetivo para o tratamento de bactérias Gram negativas e Gram positivas, com exceção de *Enterococcus faecium*, *Stenotrophomonas maltophilia* e cepas de MRSA (BONFIGLIO; RUSSO; NICOLETTI, 2002; PAPP-WALLACE *et al.*, 2011).

No Brasil, os principais antimicrobianos pertencentes ao grupo dos carbapenêmicos são o imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem, que por vezes são administrados em combinação com demais antibióticos, sobretudo quando utilizados no tratamento empírico de pacientes com IRAS graves, infecções de origem desconhecida ou infecções polimicrobianas (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011; ZHANEL *et al.*, 2007).

Na prática clínica, imipenem e meropenem apresentam-se eficazes no tratamento de pneumonias, infecções complicadas do trato gênito-urinário e neutropenia febril, enquanto as propriedades farmacocinéticas do ertapenem o torna mais apropriado para o tratamento de infecções comunitárias e terapia antimicrobiana intravenosa (ZHANEL *et al.*, 2007). Nos primórdios de sua utilização, a estrutura única destes antimicrobianos proporcionava à molécula uma proteção a praticamente todas as betalactamases, inclusive às metalobetalactamases (MBL) e às ESBL. No entanto, mecanismos de resistência antimicrobiana acumulados através da dispersão de carbapenemases têm proporcionado, ao longo dos últimos anos, o surgimento de cepas resistentes aos carbapenêmicos (CODJOE; DONKOR, 2018), limitando as opções de tratamento empregado nas infecções bacterianas.

2.3.4.1 Imipenem

O imipenem é uma tienamicina (primeiro carbapenêmico descoberto e que serviu como base para o desenvolvimento de derivados) semissintética que apresenta um amplo espectro de atividade antibacteriana, sendo consideravelmente estável a diversas betalactamases e eficaz sobretudo contra microrganismos Gram negativos,

incluindo cepas com perfis de multirresistência (YANG *et al.*, 2021; ZHANEL *et al.*, 2007).

Comumente utilizado em combinação com cilastatina e, mais recente com relebactam, o imipenem é administrado por via parenteral para o tratamento de infecções bacterianas respiratórias, cutâneas, ósseas, do trato urinário e intra-abdominais, bem como septicemia e endocardite (MARAOKI *et al.*, 2021; MUSHTAQ *et al.*, 2021).

2.3.4.2 Meropenem

Possui espectro de ação semelhante ao imipenem, embora seja mais ativo contra Enterobacteriaceae e menos ativo contra bactérias Gram-positivas, além de ser estável à desidropeptidase renal humana (DHP-1), tornando a administração concomitante de cilastatina (inibidor DHP-1) não necessária (JONES, 2004).

Em agosto de 2017 foi aprovado como terapia antibacteriana combinada sob o nome de mercado Vabomere® (meropenem + vaborbactam), sendo utilizado para o tratamento de infecções complicadas do trato urinário, infecções abdominais e pneumonias de causa hospitalar e meningite bacteriana causada por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, sob administração intravenosa, exercendo sua ação mediante rápida penetração celular e interferência na síntese de componentes vitais da parede celular bacteriana (ZHANEL *et al.*, 2017).

Embora tenha-se demonstrado excelente atividade de meropenem/vaborbactam contra produtores de KPC *in vitro*, mutações que causam perda de função ou expressão reduzida das porinas OmpK35 e OmpK36 têm sido associadas à resistência a MER/VAB em cepas de *K. pneumoniae* na Europa (GAIBANI *et al.*, 2021).

2.3.4.3 Doripenem

Compreende um antimicrobiano de amplo espectro, inicialmente comercializado sob a marca Doribax® (Janssen), sendo indicado para o tratamento de infecções do trato urinário e intra-abdominais complicadas, incluindo pielonefrite (PATERSON; DE PESTEL, 2009; ZHANEL *et al.*, 2007).

Possui uma cadeia lateral de 1-beta-metil, permitindo relativa resistência à desidropeptidase renal humana (DHP-1), além de um grupo trans-alfa-1-hidroxietil na posição 6, que fornece resistência às principais betalactamases (ZAHRA; NAQVI, 2021).

Possui atividade contra cepas de *P. aeruginosa* sem mecanismos de resistência adquiridos comparáveis ao do meropenem e diluições até 2 vezes superior à do imipenem e, em *Acinetobacter* spp., demonstrou não ter qualquer atividade *in vitro* aumentada em comparação com imipenem ou meropenem (JONES, 2004; MUSHTAQ *et al.*, 2004; PATERSON; DE PESTEL, 2009).

2.3.4.4 Ertapenem

É um composto inicialmente comercializado sob o nome Invanz[®] (Merck & Co.), possuindo estrutura semelhante ao meropenem e um grupo 1-beta-metil (PHAM, 2002).

É indicado para o tratamento de infecções intra-abdominais, pneumonias, infecções pélvicas, infecções complicadas da pele e infecções de pé-diabético, sendo administrado na forma de infusões ou injeções (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011; SHAH; ISAACS, 2003).

Assim como o doripenem e meropenem, o ertapenem possui atividade ligeiramente maior contra muitas bactérias Gram-negativas do que outros carbapenêmicos, como o imipenem, no entanto apresenta inatividade contra *Staphylococcus* resistentes à meticilina, *Aeromonas* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (COLLINS *et al.*, 2012; PAPP-WALLACE *et al.*, 2011).

2.4 Mecanismos de resistência antimicrobiana em *A. baumannii*

Diversos são os mecanismos que conferem resistência aos betalactâmicos. Em *Acinetobacter*, esta ocorre principalmente devido à diminuição da permeabilidade de sua membrana externa a essas drogas; à hiperexpressão de bomba de efluxo; à produção de betalactamases cromossômicas induzíveis do tipo AmpC (*Acinetobacter-derived cephalosporinases* - ADC) e oxacilinases (OXA-betalactamases); e aquelas adquiridas por transferência horizontal de genes que conferem resistência aos

betalactâmicos, inclusive aos carbapenêmicos (FORSBERG *et al.*, 2012; ZAVASCKI *et al.*, 2010).

2.4.1 Resistência antimicrobiana por produção enzimática

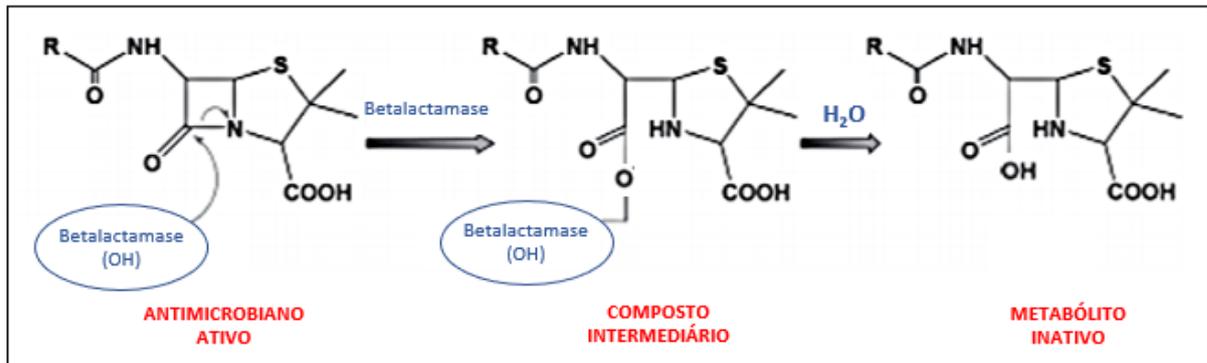
Em *A. baumannii*, a produção enzimática de betalactamases - capazes de hidrolisar o anel betalactâmico de penicilinas, cefalosporinas e antimicrobianos relacionados - representa o principal mecanismo de resistência aos betalactâmicos (BECEIRO *et al.*, 2013; CLÍMACO, 2011; OLIVEIRA, 2008; ROCHA, 2017; SILVA; LINCOPAN, 2012).

Diversos fatores podem influenciar a expressão do fenótipo de resistência aos antimicrobianos. Dentre os principais, destacam-se: *i*) a quantidade de enzima expressa pelo microrganismo; *ii*) a capacidade que a enzima apresenta em hidrolisar o antimicrobiano (potência); e *iii*) a velocidade de permeabilidade do antibiótico pela membrana externa bacteriana (CAMPANA, 2009; LIVERMORE, 1995; MACEDO *et al.*, 2005).

2.5 Betalactamases: aspectos gerais e classificação

Descritas inicialmente na década de 1940 a partir de estudos realizados em extratos de *E. coli* (anteriormente denominada de *Bacillus coli*), as betalactamases constituem a principal causa de resistência aos betalactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (ABRAHAM; CHAIN, 1940; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008). Estas enzimas possuem capacidade de hidrolisar o anel betalactâmico presente nestes antimicrobianos através da quebra da ligação amida, impedindo, desta maneira, a ação destes fármacos (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; BUSH, 2010; NARCISO, 2011). Inicialmente, a betalactamase interage com o anel betalactâmico do antimicrobiano através de uma ligação não-covalente. Em seguida, este anel betalactâmico sofre um ataque nucleofílico causado pelo radical hidroxila localizado no sítio ativo da enzima, formando uma ligação acil-éster (covalente). A hidrólise do éster permite a desvinculação da enzima com preservação de sua atividade hidrolítica e a liberação do antimicrobiano inativo e hidrolisado (Figura 2) (LIVERMORE, 1995; PICÃO, 2009).

Figura 2 - Hidrólise de uma molécula de cefalosporina por uma betalactamase.



Fonte: Adaptado de D'Costa e Wright (2009).

As betalactamases são amplamente distribuídas entre Gram negativos e Gram positivos, possuindo elevada capacidade de disseminação e variedade estrutural e funcional. Até o ano de 2009, estudos desenvolvidos por Bush e Jacoby (2010) estimaram a existência de aproximadamente 900 sequências proteicas específicas de diferentes betalactamases. Em 2021, este número de sequências proteicas ultrapassou os 7.279, de acordo com consultas realizadas no banco de dados *Beta-Lactamase Data Base* (<http://www.bldb.eu>), sendo 3.561 destas correspondentes a exemplares da Classe C (AmpC), que abrange as ADCs.

Devido à grande variedade das betalactamases e, com o intento de corrigir circunstanciais falhas de classificação anteriores ou caracterizar novas enzimas desta classe, distintas propostas de classificação têm sido apresentadas em relação às betalactamases (GRALHA, 2011).

Atualmente existem dois modelos de classificação das betalactamases. O primeiro deles foi proposto por Ambler (1980) e possui como base a estrutura molecular da enzima. Considerando este padrão, quatro grupos básicos foram construídos: Classe ou Grupo A (betalactamases de espectro estendido - ESBL); Grupo B (metalobetalactamases - MBL); Grupo C (cefalosporinases); e o Grupo D (oxacilinas) (AMBLER, 1980; GRALHA, 2011; EVANS; AMYES, 2014; NICOLETTI, 2014). O segundo modelo, proposto por Bush e atualizado por Bush, Jacoby e Medeiros (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995), subdivide estas enzimas levando em consideração seus aspectos bioquímicos e funcionais, sendo constituída por quatro grupos principais (1 a 4) e seis subgrupos (A a F) (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; GRALHA, 2011; LIVERMORE, 1995). Posteriormente, com o intento de

classificar novas enzimas descritas, este modelo foi atualizado por Karen Bush e George Jacoby (BUSH; JACOBY, 2010) e encontra-se representado no Quadro 1.

De forma geral, as enzimas da classe A de Ambler tendem a hidrolisar as penicilinas, embora muitas variantes possam hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e carbapenems. As betalactamases da classe B possuem especificidade extremamente ampla de substrato, incluindo a grande maioria dos betalactâmicos, com exceção do aztreonam. Por fim, os representantes da classe C possuem atividade sobretudo sobre as cefalosporinas, enquanto as da classe D (oxacilinas) têm uma preferência de substrato alta para oxacilina e penicilinas relacionadas (<http://bldb.eu/>).

As principais betalactamases de interesse clínico são aquelas pertencentes ao grupo das Betalactamases de Espectro Estendido (ESBLs), carbapenemases das classes A, B (metalobetalactamases), betalactamases da classe D e as da classe C (AmpC) de Ambler (HAMIDIAN; HALL, 2014; LIN *et al.*, 2011; MARTINS; BARTH, 2013; MEYER; PICOLI, 2011), sendo esta última o objeto de estudo do presente trabalho.

Quadro 1 - Classificação das betalactamases

(continua)

Ambler (1980)	Bush, Jacoby e Medeiros (1995)	Bush e Jacoby (2010)	Espectro hidrolítico	Inibição			Principais enzimas descritas
				Ác. clavulânico	Tazobactam	EDTA	
A	2 ^a	2 ^a	Penicilinas	Sim	Sim	Não	PC1
A	2b	2b	Penicilinas, cefalodrina, cefazolina e Cefalotina	Sim	Sim	Não	SHV-1, TEM-1,-2 e -90
A	2be	2be	Penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos	Sim	Sim	Não	PER-1, CTX-M-15
A	2br	2br	Penicilinas, cefalodrina, cefazolina e Cefalotina	Fraca	SI	Não	TEM-30, SHV-10 e 26
A	NI	2ber	Penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos	Fraca	Fraca	SI	TEM-50, 68 e 89
A	2c	2c	Carbencilina	Sim	SI	Não	CARB-3, PSE-1
A	2e	2e	Cefalosporinas	Sim	Sim	Não	CepA
A	2f	2f	Carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e cefamicinas	Fraca	Fraca	Não	IMI-1, KPC-2 e 3, BKC-1
B	3	3 ^a	Todos os betalactâmicos	Não	Não	Sim	IMP-1, NDM-1, VIM-1
B	3	3b	Carbapenêmicos	Não	Não	Sim	CphA, Sfh-1
C	1	1	Cefalosporinas e cefamicinas	Não	Não	Não	AmpC, CMY-2
C	NI	1e	Penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas e monobactâmicos	Não	Não	SI	CMY-37, GC1

Quadro 1 - Classificação das betalactamases

(conclusão)

Ambler (1980)	Bush, Jacoby e Medeiros (1995)	Bush e Jacoby (2010)	Espectro hidrolítico	Inibição			Principais enzimas descritas
				Ác. clavulânico	Tazobactam	EDTA	
D	NI	2ce	Carbenicilina, cefepima e cefpiroma	Sim	Sim	SI	RTG-4
D	2d	2d	Cloxacilina ou oxacilina	Variável	SI	Não	OXA-1 e OXA-10
D	NI	2de	Penicilinas e cefalosporinas	Variável	SI	SI	OXA-11 e OXA-15
D	NI	2df	Carbapenêmicos e cloxacilina ou oxacilina	Variável	SI	SI	OXA-23 e OXA-48
ND	4	NI	Não sequenciadas. Não agrupáveis.				

Fonte: Adaptado de Bush, Jacoby e Medeiros (1995), Bush e Jacoby (2010), Gralha (2011), Nicoletti (2014) e Rocha (2017).

Legenda: ND - não determinado; NI - não incluído; SI – sem informação.

2.5.1 Betalactamases da classe A de Ambler

As betalactamases da classe A - ou serino betalactamases - são caracterizadas por apresentarem serina no sítio ativo da enzima e compreendem um grupo capaz de hidrolisar a maioria dos betalactâmicos (BUSH, 2010).

Dentre as betalactamases da classe A, o grupo das betalactamases de espectro estendido (ESBL) destaca-se por apresentar grande relevância clínica. Até o ano de 2010, mais de 150 variantes de ESBL já haviam sido descritas, incluindo as da família CTX-M (*active on cefotaxime, first isolated in Munich*), que compreende um vasto, complexo e heterogêneo grupo com mais de 50 enzimas, representado principalmente pela CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (POIREL *et al.*, 2008; RODRÍGUEZ *et al.*, 2014); SHV (*sulfhydryl reagent variable*), derivada de *K. pneumoniae* e que confere resistência a penicilinas de amplo espectro como ampicilina, tigeciclina e piperacilina (SHAIKH *et al.*, 2015); e TEM (Temoniera betalactamase), que possui capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalodrina, cefazolina e cefalotina (BUSH; JACOBY, 2010).

Demais betalactamases da classe A têm sido descritas também no contexto da resistência aos carbapenêmicos, que são geralmente estáveis à hidrólise por outras betalactamases (BUSH, 2010). Dentre as serino carbapenemases, a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) destaca-se como a mais relevante da classe A. Diferentes variantes desta enzima têm sido descritas sobretudo em Enterobacteriaceae, sendo capazes de hidrolisar todas as classes de betalactâmicos, possuindo eficiência de hidrólise aumentada principalmente para cefalotina, nitrocefim, ampicilina e piperacilina, além de ser capaz de hidrolisar também o imipenem, meropenem, cefotaxima, aztreonam, ceftazidima (QUEENAM; BUSH, 2007).

2.5.2 Betalactamases da classe B de Ambler

As betalactamases da classe B, conhecidas por metalobetalactamases, caracterizam-se por necessitarem de íons divalentes (usualmente zinco) como cofator, sendo capazes de hidrolisar a maioria dos betalactâmicos disponíveis atualmente, com exceção dos monobactâmicos (MENDES *et al.*, 2006; PALZKILL, 2013).

Diferentemente das betalactamases de classe A, as metalobetalactamases não são inibidas por clavulanato, sulbactam ou tazobactam (PALZKILL, 2013), mas sim por substâncias quelantes de zinco, tais como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e derivados de tiol (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008).

Dentre as enzimas da classe B identificadas em Gram negativos, destacam-se a IMP (imipenemase), SPM (*São Paulo metallo- β -lactamase*), GIM (*German imipenemase*), NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*), VIM (*Verona imipenemase*), KHM (*Kyorin Health Science metallo- β -lactamase*), DIM (*Dutch imipenemase*), AIM (*Australian imipenemase*), SBM (*Serratia metallo- β -lactamase*), TBM (*Tripoli metallo- β -lactamase*) e a FIM (*Florence imipenemase*) (CLÍMACO, 2011; HAWKEY; JONES, 2009; NORDMANN *et al.*, 2011).

2.5.3 Betalactamases da classe D de Ambler

As betalactamases da classe D compreendem uma classe de enzimas expressas intrinsecamente por diversas espécies de bacilos Gram negativos, incluindo *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, possuindo capacidade de hidrolisar, mesmo que parcialmente, os carbapenêmicos, além de outros antimicrobianos betalactâmicos (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; POIREL *et al.*, 2010).

As principais enzimas representantes desta classe são as oxacilinasas, caracterizadas por apresentar uma grande diversidade genética e heterogeneidade em termos de espectro de hidrólise, sendo divididas em nove grupos, de acordo com suas sequências de aminoácidos, sendo cinco destes presentes em *Acinetobacter* sp. (BROWN; AMYES, 2005; POIREL *et al.*, 2010).

O primeiro grupo é composto pelas enzimas OXA-23, -27 e -49 que, no Brasil, têm conferido fenótipos de multirresistência bacteriana aos antimicrobianos, inclusive aos carbapenêmicos (DALLA-COSTA *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2009; MOSTACHIO *et al.*, 2009).

O segundo grupo é formado por cinco variantes enzimáticas, compreendendo as enzimas OXA-24, -25, -26, -40 e -72, sendo esta última a mais prevalente no estado de Pernambuco (ANTÔNIO, 2010; MEDEIROS; LINCOPAN, 2013).

O terceiro grupo é composto por um total de 13 enzimas (OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80, -82 e -107), sendo o maior grupo de oxacilinasas (ANTÔNIO, 2010), enquanto o quarto e quinto grupos são formados pela OXA-58 e

OXA-143 respectivamente, sendo o primeiro relato de OXA-58 descrito na França, em um isolado de *A. baumannii* (POIREL *et al.*, 2005).

Amplamente distribuídas no cenário clínico e epidemiológico brasileiro, as principais oxacilinases relacionadas à multirresistência antimicrobiana em *Acinetobacter* sp. são a OXA-23, -51, -58, -72 e -143, sobretudo quando associadas a elementos de inserção, tal como o IS*Aba*1 (LEAL *et al.*, 2020; MEDEIROS; LINCOPAN, 2013; MU *et al.*, 2016).

2.5.4 Betalactamases da classe C de Ambler

As betalactamases da classe C (AmpC) constituem um importante grupo de betalactamases frequentemente expressas de forma induzida ou constitutiva por diversas espécies de Gram negativos, incluindo *A. baumannii* (AGODI *et al.*, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2016). Codificadas por genes cromossomais ou plasmidiais, estas são capazes de hidrolisar grande variedade dos betalactâmicos disponíveis para uso clínico, incluindo as amino e ureidopenicilinas, cefamicinas e, ocasionalmente, oximinocefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e aztreonam (monobactâmico), além de suas combinações com inibidores de betalactamases, incluindo o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (NORCIA *et al.*, 2015; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2016), podendo ser inibidas por ácido fenilborônico (AFB) e cloxacilina (POLSFUSS *et al.*, 2011; THOMSON, 2010). A atividade de AmpCs com especificidade de substratos de espectro estendido da classe C (cESBLs) tem sido relatada desde 2004, por estudos sobre cinética enzimática e cristalografia estrutural das betalactamases CMY-10 (plasmidial) e GC1 de *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae*, respectivamente (KIM *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2004).

Em 2005, após a caracterização de um grupo de cefalosporinases do tipo AmpC com pontos isoelétricos altamente alcalinos ($pI \sim 9,0$) produzidas por *Acinetobacter*, uma nomenclatura específica e baseada em estudos de análise filogenética enzimática entre as diferentes AmpCs foi proposta para agrupar estas betalactamases produzidas por esta espécie, dando origem ao grupo ADC - cefalosporinases derivadas de *Acinetobacter* - (do inglês, *Acinetobacter-derived cephalosporinases*) (HUJER *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2010). Desde então, números crescentes de ADCs que conferem resistência às

cefalosporinas de amplo espectro têm sido descritas em *Acinetobacter* sp., sendo esta mediada sobretudo pelo elemento de inserção IS*Aba*1 (JEON *et al.*, 2014; PÉREZ *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2011).

2.5.4.1 *Acinetobacter*-derived cephalosporinases: aspectos genéticos, bioquímicos e resistência antimicrobiana

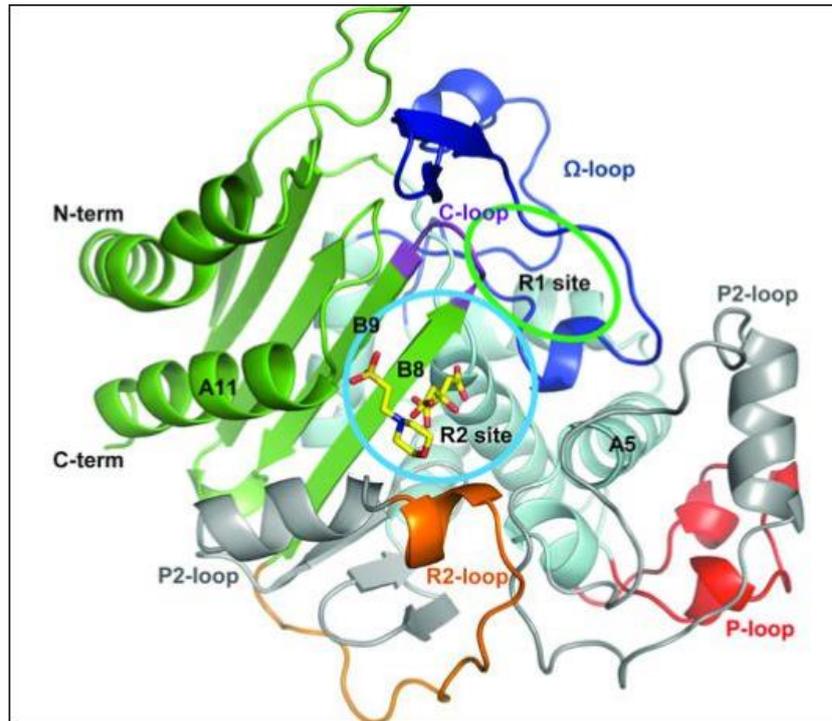
Inicialmente identificada em uma cepa clínica de *Acinetobacter baumannii* (Ab RYC 52763/97) oriunda de um surto de infecção hospitalar na Espanha no ano de 2000 (ADC-1, posteriormente caracterizada e nomeada em 2005), as *Acinetobacter*-derived cephalosporinases (ADCs) compreendem atualmente um grande grupo de variantes enzimáticas cromossomais produzidas por espécies do gênero *Acinetobacter* (BHATTACHARYA *et al.*, 2014), sendo composto por mais de 235 exemplares de variantes alélicas de aproximadamente 390 aminoácidos (BOU; MARTÍNEZ-BELTRAN, 2000; BUSH, 2018).

As ADCs apresentam elevada similaridade entre si, diferenciando-se por 1 a 25 aminoácidos e compartilhando de 35 a 45% de identidade em relação a outras betalactamases da classe C (BHATTACHARYA *et al.*, 2014).

Diferentemente das demais betalactamases da classe C, as ADCs são do tipo não-induzíveis e normalmente expressas em níveis basais, sendo descritas como capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de espectro reduzido, mas incapazes de hidrolisar cefepima e os carbapenêmicos (NORDMANN; MAMMERI, 2007). No entanto, mudanças na atividade das ADCs têm sido associadas a sua superexpressão - mediada sobretudo por IS*Aba*1 (BHATTACHARYA *et al.*, 2014; REZAEI *et al.*, 2016) - ou pela presença de substituições e/ou deleções/inserções de aminoácidos em regiões estruturais específicas destas enzimas, tais como seu sítio ativo; C-loop, Ω -loop e hélices H2 e H10 (Figura 3) (JEON *et al.*, 2014; NORDMANN; MAMMERI, 2007), resultando na resistência às cefalosporinas de terceira geração e, ocasionalmente, aos carbapenêmicos.

Recentemente, as variantes de cESBLs ADC-33 e ADC-56 foram reportadas com capacidade de hidrolisar cefepima (cefalosporina de 4ª geração) e, em 2014, a variante ADC-68 foi descrita com atividade contra os carbapenêmicos imipenem, meropenem e ertapenem (JEON *et al.*, 2014; PÉREZ *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2011).

Figura 3 - Representação da estrutura proteica de ADC-68 de *Acinetobacter baumannii*.



Fonte: JEON *et al.* (2014).

Legenda: Domínio 1 (verde); Domínio 2 (azul claro); P-loop (vermelho); P2-loop (cinza), Ω -loop (azul escuro), R2-loop (laranja); C-loop (roxo); Sítio R1 (círculo verde); Sítio R2 (círculo azul). Moléculas de citrato e ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico - provenientes da solução de cristalização - estão ligadas ao sítio R2 e encontram-se representadas em bastões amarelos e vermelhos.

O estudo do contexto genético de *bla*_{ADC-68} no isolado clínico *Acinetobacter baumannii* D015, em que esta carbapenemase foi inicialmente descrita, não identificou a presença de elementos genéticos de inserção (IS), indicando que a sua expressão em baixas concentrações (nível basal) pode ser suficiente para ocasionar a resistência aos carbapenêmicos (JEON *et al.*, 2014). A expressão do gene *bla*_{ADC-68} em vetor pHSG398 por linhagens isogênicas de *E. coli* TOP10 elevou a concentração inibitória mínima (CIM) de imipenem, meropenem e ertapenem para essa cepa de 0,5, 0,015 e 0,015 µg/mL para 8, 4 e 16 µg/mL, respectivamente, em sua transformante *E. coli* TOP10 pHSG398-*bla*_{ADC-68}, confirmando a capacidade que a ADC-68 possui de hidrolisar os carbapenêmicos (JEON *et al.*, 2014).

A variante da enzima ADC-68 (carbapenemase) apresenta 98% de identidade com a sequência de aminoácidos da variante ADC-1 (não carbapenemase) (JEON *et al.*, 2014). As principais substituições de aminoácidos encontradas na ADC-68 em comparação com a ADC-1 são: G77A, K128Q, S145P, T179I, P194A, G220D e R320G. Uma dessas alterações (Gly320 na ADC-68) encontra-se localizada na região

do *C-loop* da enzima, que compreende a região entre Thr318 e Phe321 e abrange um domínio característico de betalactamases com atividade contra os carbapenêmicos. Demais modificações (P194A e G220D) foram observadas também no Ω -*loop* da enzima (correspondente à região entre Gly185 e Thr229). Apesar das estruturas conformacionais de ADC-1 e ADC-68 determinadas por estudos de cristalografia serem bastante conservadas, as principais diferenças entre as estruturas dessas duas betalactamases estão localizadas na região do *C-* e Ω -*loop*, determinada principalmente pelos resíduos de Gly320 e Asp220 na ADC-68 (JEON *et al.*, 2014). Especula-se que essas substituições de aminoácidos - principalmente a substituição de Gly220 no Ω -*loop* da ADC-1 pelo aminoácido mais volumoso Asp220 na ADC-68 - produza uma mudança conformacional na enzima, resultando na “abertura” de seu sítio ativo e uma melhor acomodação das moléculas dos carbapenêmicos e um aumento na eficiência de catálise da hidrólise desses substratos (JEON *et al.*, 2014).

Em estudos realizados no Departamento de Microbiologia do IAM, que objetivou a caracterização genética de 45 isolados clínicos de *A. baumannii* oriundos de infecções em pacientes hospitalizados em cinco diferentes hospitais da cidade do Recife (LEAL *et al.*, 2020), análises das sequências de aminoácidos preditas para a enzima naturalmente codificada pelos genes *bla*_{ADC} desses isolados revelaram a presença de substituições de aminoácidos similares àquelas previamente descritas na carbapenemase ADC-68 em comparação com a ADC-1 (JEON *et al.*, 2014), inclusive, as que foram citadas como determinantes para a ampliação da capacidade catalítica de ADC-68 contra os carbapenêmicos: G220D e R320G. Demais substituições de aminoácidos na região do *C-loop* das variantes ADC-A (N319T); ADC-B (N319T) e ADC-C (N319S) foram observadas nas enzimas ADC expressa pelos isolados clínicos de *A. baumannii* do presente estudo.

Interessantemente, pôde-se observar também uma inserção de três aminoácidos, Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS), na região do Ω -*loop* da enzima ADC de vários isolados resistentes aos carbapenêmicos que codificam a variante enzimática do grupo A (ADC-A).

Em estudo previamente citado (JEON *et al.*, 2014), especulou-se que a substituição de aminoácidos no Ω -*loop* por aminoácidos mais volumosos produziria mudança conformacional na estrutura da enzima, com expansão do Ω -*loop* e do *C-loop*, abertura do sítio ativo e conseqüente ampliação do espectro catalítico da enzima. Diante dessas observações e evidências, questiona-se se as alterações de

aminoácidos presentes nas variantes enzimáticas de ADC naturalmente expressas pelos isolados clínicos de *A. baumannii*, poderiam também contribuir para a ampliação do seu espectro catalítico e hidrólise dos carbapenêmicos e/ou interfeririam na capacidade de inibição da enzima pelos inibidores de betalactamases comumente co-administrados com betalactâmicos no tratamento de infecções causadas bacilos Gram negativos; se existem outras substituições/inserções de aminoácidos envolvidas com a ampliação do espectro hidrolítico das ADC; ou ainda se a inserção A221_P222insPAS no Ω -loop na variante enzimática ADC-A codificada por esses isolados poderia contribuir para a ampliação do seu espectro catalítico e hidrólise.

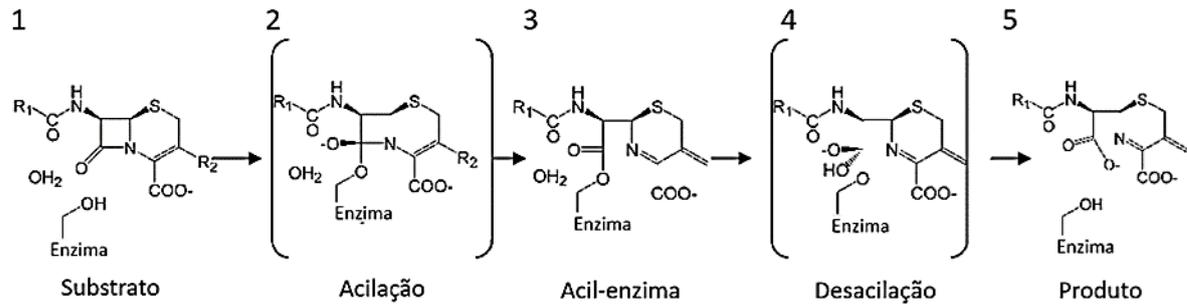
2.5.4.2 Mecanismos catalíticos das carbapenemases da classe C

Atualmente, cinco betalactamases da classe C foram reportadas apresentando atividade contra os antimicrobianos carbapenêmicos, sendo elas: ACT-1, DHA-1, CMY-2, CMY-10 e ADC-68 (BRADFORD *et al.*, 1997; JEON *et al.*, 2014; JEON *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2004a; LEE *et al.*, 2004b; LEE *et al.*, 2007).

Embora as cefalosporinases da classe C compartilhem estruturas gerais muito semelhantes em relação às betalactamases da classe A, as enzimas da classe C apresentam cavidades de maiores dimensões em seu sítio ativo, proporcionando melhor interação com moléculas de maior volume, como as cefalosporinas de espectro estendido (JEON *et al.*, 2015). Nessas enzimas, o sítio ativo é dividido em duas porções: R1, que compreende a região que acomoda a cadeia lateral R1 no carbono de número 6 do núcleo betalactâmico dos antimicrobianos desta classe; e a porção R2, que representa a região oposta de interação com o anel betalactâmico, estando ambas envolvidas em processos de acilação e desacilação da droga pela enzima (Figura 3) (JEON *et al.*, 2015).

Inicialmente, o processo de hidrólise inicia a partir do ataque nucleofílico do carbono carbonílico do anel betalactâmico do antimicrobiano pelo resíduo de Ser66, presente no sítio ativo enzimático, resultando na formação de um composto intermediário acilado. Posteriormente, esse composto reage com uma molécula de água, ocasionando assim sua desacilação, promovendo a hidrólise do antimicrobiano (JEON *et al.*, 2015) e a consequente liberação da enzima em sua forma ativa (Figura 4).

Figura 4 - Mecanismo de hidrólise enzimática mediado por betalactamase tipo AmpC

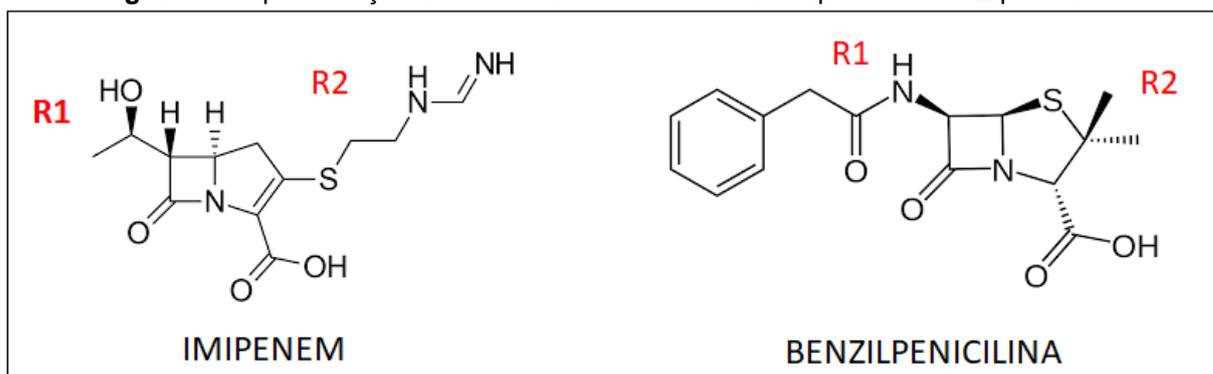


Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2006).

Legenda: Mecanismo de hidrólise enzimática mediado por betalactamase tipo AmpC. **1** - complexo inicial pré-covalente; **2** - etapa intermediária de acilação; **3** - formação do complexo acil-enzima; **4** - etapa intermediária de desacilação após reação com molécula de água; **5** - produto hidrolisado e liberado do complexo enzimático.

Além dos aspectos enzimáticos descritos, as características estruturais dos diferentes antimicrobianos também desempenham um importante papel nos mecanismos catalíticos das betalactamases da classe C. Em relação ao imipenem, a cadeia lateral R1 deste antimicrobiano possui estrutura menor quando comparada a outras betalactamases, como a benzilpenicilina (Figura 5), no entanto, a presença desta característica não é considerado um fator que impeça a hidrólise do mesmo, visto que não há dificuldade na interação molecular entre a região R1 do antimicrobiano e a porção R1 do sítio ativo da enzima (JEON *et al.*, 2015; LEE; LEE, 2006). O principal motivo responsável por sua resistência à hidrólise enzimática, no entanto, parece estar relacionado à longa cadeia R2 presente na estrutura molecular deste carbapenêmico (Figura 5) (JEON *et al.*, 2014, JEON *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2006).

Figura 5 - Representação das estruturas moleculares de imipenem e benzilpenicilina.



Fonte: O autor.

Legenda: Cadeias laterais R1 e R2 das moléculas de imipenem e benzilpenicilina identificadas em vermelho.

2.6 Inibidores de betalactamases

Desde a descoberta das penicilinas, diversos estudos têm sido desenvolvidos para otimizar as propriedades antibacterianas dos betalactâmicos e combater os mecanismos de resistência aos antimicrobianos (WANG *et al.*, 2016).

Com o surgimento e identificação da resistência bacteriana mediada por betalactamases, duas estratégias foram propostas a fim de se preservar a utilização dos betalactâmicos e desacelerar o processo de resistência: *i)* a identificação e/ou desenvolvimento de moléculas mais estáveis às ações das diferentes betalactamases; e *ii)* a inibição da atividade das betalactamases por moléculas de origem natural, semi-sintética ou sintética capazes de bloquear a atividade destas enzimas, prevenindo a degradação dos betalactâmicos (BUSH; BRADFORD, 2016; BUSH; BRADFORD, 2019; DRAWZ, BONOMO, 2010).

A partir da década de 1970, estudos para identificação de possíveis inibidores de betalactamases foram desencadeados pela emergência da penicilinase TEM-1 (BUSH, BRADFORD, 2019), resultando em compostos betalactâmicos que atuam como antibacterianos, inibidores de betalactamases ou compostos que possuem ambas as propriedades (WANG *et al.*, 2016). Nesse contexto, o ácido clavulânico surgiu como o primeiro inibidor natural de amplo espectro, sendo utilizado na prática clínica desde 1984 e agindo sinergicamente com penicilinas e cefalosporinas (BUSH; BRADFORD, 2019). Sua atividade como inibidor tem sido descrita devido a sua capacidade de reduzir significativamente as CIMs de betalactâmicos em diversos Gram positivos e Gram negativos que expressam betalactamases da classe A (tais como CTX-M, TEM-1, TEM-2 e SHV-1), apresentando-se, no entanto, ineficaz contra as betalactamases da classe B, C e D (BUSH; BRADFORD, 2016, 2019; DRAWZ, BONOMO, 2010).

Demais inibidores de betalactamases disponíveis na prática clínica incluem o sulbactam e tazobactam, frequentemente associados à ampicilina e piperacilina, respectivamente. Assim como o ácido clavulânico, essas duas moléculas compartilham semelhanças estruturais com penicilinas e demonstram-se eficazes contra microrganismos que expressam betalactamases da classe A, sendo, no entanto, ineficientes contra cepas que produzem múltiplas ESBLs, serino-carbapenemases ou ainda AmpCs (BUSH, BRADFORD, 2019; DRAWZ, BONOMO, 2010).

A cloxacilina e o ácido fenilborônico (AFB), por sua vez, constituem os principais agentes inibidores de betalactamases da classe C, atuando como potenciadores da atividade de antimicrobianos como cefotetan e cefoxitina (THOMSOM, 2010). Utilizada na prática clínica desde 1965, a cloxacilina constitui um agente semi-sintético cujo mecanismo de ação se dá a partir de sua ligação às PBPs bacterianas, impedindo assim a interação molecular das betalactamases em decorrência de sua grande cadeia lateral (DRAWZ, BONOMO, 2010; PAGE, 2000; TURCK *et al.*, 1965), enquanto o AFB atua como inibidor competitivo e reversível desta classe de enzimas (BEESLEY *et al.*, 1983; STOVER *et al.*, 2019).

Recentemente, considerando a necessidade de novos inibidores de betalactamases com atividade ampliada, novos agentes têm sido constantemente aprovados para uso clínico ou encontram-se nas variadas etapas de testes para futura inserção no mercado (BUSH; BRADFORD, 2019).

Estes novos inibidores, compostos em sua grande maioria por moléculas de natureza semi-sintética ou sintética, são administrados em associação com diferentes antimicrobianos betalactâmicos e apresentam distintos mecanismos de ação. Dentre os principais exemplares, destacam-se:

- i) Avibactam (AVE1330A ou NXL104) - proporciona uma excelente inibição das betalactamases de classe A e de classe C clinicamente relevantes (LIVERMORE *et al.*, 2011). Interage de forma covalente, mas reversível, com a maioria das betalactamases testadas, seguido pela regeneração da enzima na sua forma ativa e inibidor intacto. Tem sido administrado em combinação com ceftazidima, proporcionando ampla atividade contra ESBLs, KPC, oxacilinases e betalactamases da classe C (BUSH; BRADFORD, 2019; LIVERMORE *et al.*, 2011).
- ii) Relebactam (MK-7655) - é um inibidor desenvolvido para ser administrado em associação ao imipenem/cilastatina. Possui boa atividade contra isolados de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* sp. com resistência causada pela perda de porina ou expressão de ESBLs e betalactamases da classe C nesses isolados (LAPUEBLA *et al.*, 2015; LIVERMORE *et al.*, 2013), no entanto, não apresentou

atividade significativa em isolados de *A. baumannii* até o momento (BUSH; BRADFORD, 2019).

- iii) Nacubactam (OP0595 ou RG6080) - é um agente inibidor de betalactamases das classes A e C, além de possuir atividade antibacteriana intrínseca, sendo capaz de se ligar às PBPs de Enterobacteriaceae. Quando combinado com meropenem, possui boa atividade frente a cepas produtoras de KPC, oxacilinas, betalactamases da família CTX-M, SHV, TEM e também cepas produtoras da metalobetalactamase NDM (BUSH; BRADFORD, 2019; LIVERMORE *et al.*, 2016; MORINAKA *et al.*, 2015).
- iv) Zidebactam (WCK5107) - possui atividade de inibição frente a betalactamases das classes A e C quando em combinação com cefepima (LIVERMORE *et al.*, 2017).
- v) Vaborbactam (RPX7009) e VRNX5133 - são moléculas derivadas do ácido borônico. Seu mecanismo de ação ocorre devido à sua capacidade de se ligar covalentemente às betalactamases, atuando como inibidor por competição. Possui atividade frente a betalactamases da classe A e C (CASTANHEIRA *et al.*, 2016; HECKER *et al.*, 2015; MUSHTAQ *et al.*, 2018).
- vi) ETX2514 - é uma molécula especialmente desenvolvida para inibir as betalactamases da classe D. Tem apresentado boa atividade contra *Acinetobacter* sp., especialmente quando utilizada em combinação com sulbactam, devido às propriedades que este último apresenta em interagir com as PBPs presentes neste gênero bacteriano (ADNAN *et al.*, 2013; DURAND-RÉVILLE *et al.*, 2017).

2.7 Elementos de inserção e superexpressão de ADC em *A. baumannii*

Os elementos de inserção (do inglês, *insertion sequences* - IS), são elementos genéticos móveis pequenos, de até 2.000 pares de bases, que codificam para

transposases (ADAMS *et al.*, 2016; VANDECRAEN *et al.*, 2017). São encontrados em todas as formas de vida e caracterizados por apresentarem sequências contendo repetições nucleotídicas, estando presente em diversas cópias no genoma de um dado microrganismo, podendo se mover ao longo da mesma molécula ou para moléculas distintas de DNA, incluindo os plasmídeos (VANDECRAEN *et al.*, 2017).

Estes elementos genéticos móveis desempenham importante papel na plasticidade genômica, transferência horizontal de genes, diversidade e adaptação de muitas espécies bacterianas. A sua presença tem sido associada a alterações na expressão de diversos genes, que eventualmente proporcionam vantagens às bactérias. Quando se inserem no interior de uma fase aberta de leitura gênica causam alterações que levam à perda de sua função. Por outro lado, quando presentes à montante (*upstream*) a um determinado gene ou conjunto de genes, podem resultar em regulação positiva, atuando como promotores de expressão (ADAMS *et al.*, 2016; MARTÍNEZ; MATTAR, 2012; VANDECRAEN *et al.*, 2017).

Até o ano de 2017, mais de 4500 sequências únicas de IS haviam sido descritas, sendo estas classificadas em 29 famílias, de acordo com similaridades apresentadas em suas sequências de nucleotídeos, e características químicas e funcionais de seus produtos (transposases) (MAHILLON; CHANDLER, 1998; VANDECRAEN *et al.*, 2017).

Em *A. baumannii*, o elemento de inserção mais conhecido é o IS*Aba1*, pertencente à família IS4 e formado por regiões repetidas e invertidas de 16 pb (MARTÍNEZ; MATTAR, 2012). Diversos estudos têm relacionado a associação desta IS com o desenvolvimento da resistência antimicrobiana nos isolados desta espécie, inclusive no contexto de genes que codificam para importantes betalactamases como as oxacilinasas, carbapenemases e cefalosporinasas, incluindo as ADCs (MARTÍNEZ; MATTAR, 2012; REZAEI *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2013). Quando localizado à montante (*upstream*) ao gene *bla*_{ADC}, que codifica para a *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, o IS*Aba1* confere a superexpressão desta betalactamase, ocasionando resistência às cefalosporinas de espectro estendido e/ou carbapenêmicos (ADAMS *et al.*, 2016; HERITIER *et al.*, 2006).

3 OBJETIVO

Os objetivos do presente estudo foram divididos em objetivo geral e objetivos específicos, conforme descrito a seguir.

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel de diferentes variantes de *Acinetobacter-derived cephalosporinases* (ADC) codificadas por isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* na resistência aos betalactâmicos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Investigar fenotipicamente a atividade enzimática de variantes ADCs oriundas de isolados clínicos pertencentes a clones epidêmicos do Brasil expressas por transformantes frente à penicilina de largo espectro, cefalosporinas de 1^a, 3^a e 4^a gerações e carbapenêmicos;
- b) Avaliar o efeito das diferentes substituições de aminoácidos na atividade enzimática das variantes de ADC selecionadas contra betalactâmicos;
- c) Avaliar o efeito que a inserção de Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS) provoca na conformação e atividade enzimática de ADC;
- d) Avaliar a capacidade das diferentes variantes de ADC selecionadas de hidrolisar o imipenem (carbapenêmico);
- e) Determinar os motivos envolvidos com a resistência aos carbapenêmicos e demais betalactâmicos nas variantes enzimáticas das principais ADC estudadas.

4 METODOLOGIA

A metodologia utilizada nas diferentes etapas do presente estudo encontra-se descrita nos tópicos a seguir.

4.1 Isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* e comparação entre variantes alélicas de ADCs

As variantes enzimáticas de ADC foram identificadas entre isolados clínicos de *A. baumannii* de um conjunto de 48 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, cujo genoma foi sequenciado e os isolados armazenados no Banco de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães. Os isolados foram oriundos de infecções da corrente sanguínea, urina, secreção traqueal, *swab* retal, osso, líquido cefalorraquidiano (LCR), cateter e tecidos moles de diferentes pacientes assistidos em cinco hospitais terciários da cidade do Recife-PE, bem como provenientes de superfícies inanimadas de um hospital público terciário localizado na cidade de Caruaru-PE, coletados entre os anos de 2010 e 2015 e pertencentes a linhagens ou complexos clonais (CCs) epidêmicos no Brasil (LEAL *et al.*, 2020; ROCHA, 2017), conforme apresentado no Quadro 2.

Os genes *bla*_{ADC} foram identificados nestes isolados e comparados entre si e a outras variantes cujas sequências foram depositadas no *Beta-Lactamase Database* - BLDB (<http://www.bldb.eu/>). O alinhamento múltiplo das sequências de *bla*_{ADC} feito em ferramenta *ClustalW* foi utilizado para determinar a distância entre as variantes de *bla*_{ADC} pela ferramenta *jModelTest2 v.2.1.10* (<https://dposada.webs.uvigo.es/>) (POSADA, 2008) e *IQ-TREE v.1.5.5* (<http://www.iqtree.org/>). A árvore filogenética reconstruída foi visualizada e anotada na ferramenta da *web Interactive Tree of Life* - iTOL (<https://itol.embl.de/>).

Quatro diferentes variantes de ADC foram identificadas entre os isolados clínicos deste estudo, aqui denominadas A, B, C e D. O gene *bla*_{ADC} de cada variante foi isolado a partir de cepa carregando a ADC identificada por amplificação para clonagem e expressão das proteínas estudadas, além da variante ADC-158 da cepa laboratorial *A. baumannii* ATCC 19606. A ADC-68 foi construída por mutagênese sítio-dirigida e incluída neste estudo, como descrito a seguir.

Quadro 2 - Características fenotípicas e genéticas dos isolados clínicos de *A. baumannii* utilizados neste estudo

(continua)

Isolado	Grupo ADC	ST	Ano	Sítio	Hospital	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos ($\mu\text{g/mL}$)					Principais genes de resistência aos betalactâmicos (<i>bla</i>)
						CRO	CAZ	CPM	IPM	MER	
Ab_07	A	113	2014	Sangue	6	≥ 128	≥ 128	16	32	≥ 64	OXA-51, -143, PER-1
Ab107	A	79	2015	Superfície	6	≥ 128	≥ 128	16	≥ 64	≥ 64	OXA-24, -51
Ab112	A	1	2015	Superfície	6	≥ 128	≥ 128	64	64	≥ 64	OXA-23, -51, PER-1
Acb_01	A	113	2012	LCR	1	≥ 128	≥ 128	32	32	≥ 64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_04	A	113	2012	LCR	1	≥ 128	≥ 128	16	32	≥ 64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_05	A	113	2012	LCR	1	≥ 128	≥ 128	16	64	≥ 64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_06	A	79	2012	LCR	1	≥ 128	≥ 128	16	32	≥ 64	OXA-253, -65, TEM-1
Acb_15	A	79	2014	Sec. traqueal	3	≥ 128	≥ 128	64	16	≥ 64	OXA-253, -65, TEM-1
Acb_17	A	79	2014	Sec. traqueal	3	≥ 128	≥ 128	≥ 128	64	≥ 64	OXA-253, -65, TEM-1
Acb_18	A	79	2014	Urina	3	≥ 128	≥ 128	128	64	≥ 64	OXA-253, -65, TEM-1
Acb_20	A	79	2014	Sec. traqueal	3	≥ 128	≥ 128	128	64	≥ 64	OXA-65, -72, TEM-1
Acb_21	A	113	2014	Sec. traqueal	3	≥ 128	≥ 128	16	64	≥ 64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_22	A	79	2014	Sec. traqueal	3	≥ 128	≥ 128	64	32	≥ 64	OXA-253, -65, TEM-1
Acb_23	A	79	2010	Sangue	4	≥ 128	≥ 128	16	32	≥ 64	OXA-65, -72, TEM-1
Acb_24	A	113	2010	Sangue	4	≥ 128	≥ 128	16	32	≥ 64	OXA-169, -64, TEM-1
Acb_28	A	79	2010	Swab retal	4	≥ 128	≥ 128	32	32	≥ 64	OXA-65, -72, TEM-1
Acb_29	A	113	2010	Swab retal	4	≥ 128	≥ 128	16	32	≥ 64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_30	A	79	2010	Sec. traqueal	4	≥ 128	≥ 128	32	32	≥ 64	OXA-65, -72, TEM-1
Acb_31	A	79	2010	Sec. traqueal	4	≥ 128	≥ 128	128	64	≥ 64	OXA-253, -65, TEM-1
Acb_33	A	113	2014	Sangue	5	≥ 128	≥ 128	16	64	≥ 64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_35	A	113	2014	Cateter	5	≥ 128	≥ 128	64	32	≥ 64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_38	A	113	2014	Tecido mole	5	≥ 128	≥ 128	32	32	≥ 64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_40	A	881	2014	Líquido cavitário	5	≥ 128	≥ 128	32	≥ 64	≥ 64	OXA-253, -69
Acb_42	A	881	ND	ND	5	≥ 128	≥ 128	64	64	64	OXA-253, -69
Acb_45	A	1	2014	Cateter	2	≥ 128	≥ 128	128	64	≥ 64	OXA-51, -23
Acb_47	A	113	2014	Líquido cavitário	2	≥ 128	≥ 128	32	64	≥ 64	OXA-253, -64, TEM-1

Quadro 2- Características fenotípicas e genéticas dos isolados clínicos de *A. baumannii* utilizados neste estudo

(conclusão)

Acb_02	B	79	2012	LCR	1	≥128	128	128	32	≥64	OXA-253, -65, TEM-1
Acb_03	B	15	2012	LCR	1	≥128	64	16	64	≥64	OXA-253, -51
Acb_09	B	1	2012	Sangue	1	≥128	64	32	16	64	OXA-169, -69
Acb_10	B	15	2012	Sangue	1	≥128	128	32	16	≥64	OXA-253, -51
Acb_12	B	15	2012	LCR	1	≥128	64	64	≥64	≥64	OXA-253, -51
Acb_13	B	1	2014	Líquido cavitário	3	≥128	128	32	16	16	OXA-25, -169, -69
Acb_14	B	15	2014	Sec. traqueal	3	≥128	128	128	≥64	≥64	OXA-253, -51, -132
Acb_19	B	1	2014	Sec. traqueal	3	≥128	64	128	32	≥64	OXA-169, -69
Acb_25	B	15	2010	Sangue	4	≥128	64	8	32	≥64	OXA-253, -51
Acb_34	B	15	2014	Urina	5	≥128	128	16	32	≥64	OXA-253, -51
Acb_37	B	15	2014	Sec. traqueal	5	≥128	128	32	32	≥64	OXA-253, -51
Acb_16	C	1	2014	Sec. traqueal	3	≥128	128	128	32	64	OXA-169, -69
Acb_41	D	25	2014	Osso	5	8	2	8	32	32	OXA-253, -64, TEM-209
Acb_07	X	15	2012	LCR	1	≥128	128	16	32	≥64	OXA-253, -51
Acb_08	X	113	2012	LCR	1	≥128	≥128	16	32	≥64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_26	X	79	2010	Swab retal	4	≥128	≥128	32	32	≥64	OXA-65,-72, TEM-1
Acb_32	X	79	2010	Sangue	4	≥128	≥128	128	64	≥64	OXA-65,-72, TEM-1
Acb_36	X	113	2014	Cateter	5	≥128	≥128	32	16	≥64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_39	X	79	2014	Sangue	5	≥128	≥128	64	32	≥64	OXA-253, -65, TEM-1
Acb_43	X	15	2014	Sangue	2	≥128	128	16	≥64	≥64	OXA-253, -51
Acb_44	X	113	2014	Sec. traqueal	2	≥128	≥128	32	64	≥64	OXA-253, -64, TEM-1
Acb_46	X	15	2014	Sec. traqueal	2	≥128	128	32	32	≥64	OXA-253, -51
ATCC® 19606™*	158	ND	1948	Urina	ND	2	2	1	0,5	0,5	OXA-98

Fonte: O autor.

Legenda: ST - *sequence type*; TSA - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos; CRO - ceftriaxona; CAZ - ceftazidima; CPM - cefepima; IPM - imipenem; MER - meropenem; LCR - líquido cefalorraquidiano; X - grupo de sequências incompletas de *bla_{ADC}*. *Cepa *A. baumannii* ATCC® 19606™ da *American Type Culture Collection* (ATCC®) reportada pela primeira vez no ano de 1948 como isolado do trato urinário de um paciente e utilizada em diversos estudos fenotípicos e genéticos, na prática clínica e pesquisa, como microrganismo de referência.

4.2 Confirmação da presença do elemento IS*Aba1* a montante *bla*_{ADC} dos isolados clínicos de *A. baumannii*

A avaliação da presença do elemento de inserção IS*Aba1* à montante do gene *bla*_{ADC} foi realizada por PCR a partir da utilização do DNA genômico dos isolados Ab 07 [ADC-A], Acb_37 [ADC-B], Acb_16 [ADC-C] e Acb_41 [ADC-D] com o intuito de se verificar a possibilidade de hiperexpressão de *bla*_{ADC} codificadas naturalmente por estes isolados clínicos representantes de cada grupo de variantes enzimáticas do presente estudo. Para isto, a extração do DNA dos isolados representantes foi realizada pelo *DNEasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante, a partir de uma alíquota de 1,5 mL de cultura crescida em caldo Luria-Bertani (LB) (Himedia) a 35 ± 2 °C por 18 horas. O DNA genômico extraído foi quantificado em *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc.) com a verificação dos parâmetros utilizados para estimar a pureza e rendimento da extração (A260/280).

As reações de amplificação de DNA foram realizadas por PCR contendo 50 ng do DNA-alvo, 0,4 mM de cada oligonucleotídeo iniciador (5'-CATTGGCATTAAACTGAGGAGAAA-3' e 5'-GTGCTCGAGATTTCTTTATTGCATTTCAGCACAG-3'), 250 µM de cada dNTP, 5% de sulfóxido de dimetilo (DMSO), *Herculase II Reaction Buffer* (1x) e 1U de *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent Technologies) em um volume final de 50 µL. As reações foram submetidas à termociclagem em *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems), a uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos térmicos com desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 55 °C durante 45 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto (cada ciclo), finalizando em seguida por uma extensão a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) diluída em tampão 0,5x TBE (Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM pH 8,0) e contendo 0,1 µL/mL *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen), a 120 Volts e 150 mA durante 45 minutos, e posteriormente visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em aparelho de fotodocumentação *L-Pix EX* (Loccus Biotecnologia).

Como controles positivo e negativo da reação, foram utilizados o DNA genômico das cepas de *A. baumannii* Acb_40 (sabidamente positiva para IS*Aba1*/*bla*_{ADC}) e de *A. baumannii* ATCC[®] 19606[™] da *American Type Culture Collection* (ATCC[®]), respectivamente.

4.3 Clonagem e expressão das variantes alélicas do gene *bla_{ADC}*

A clonagem e expressão das variantes alélicas do gene *bla_{ADC}* foram feitas com o intuito de investigar as possíveis diferenças na capacidade de inativação de betalactâmicos por variantes enzimáticas de ADC betalactamases. Seus genes foram expressos por cepas de linhagem laboratorial transformadas para esses genes e testadas quanto as suas capacidades de inibição do crescimento bacteriano na presença de betalactâmicos e na capacidade de hidrólise do imipenem por variantes selecionadas.

As cepas bacterianas e os plasmídeos utilizados nesta etapa do estudo encontram-se listados na Quadro 3.

Quadro 3 - Cepas e plasmídeos utilizados nesse estudo

(continua)

Cepas	Descrição	Referência
<i>A. baumannii</i>		
Ab07	Cepa clínica	Rocha <i>et al.</i> , 2017
Abc_37	Cepa clínica	Leal <i>et al.</i> , 2020
Abc_16	Cepa clínica	Leal <i>et al.</i> , 2020
Abc_41	Cepa clínica	Leal <i>et al.</i> , 2020
ATCC® 19606™	Cepa laboratorial de referência	ATCC®
<i>E. coli</i>		
L191	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -A	Este estudo
L157	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -B	Este estudo
L192	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -C	Este estudo
L193	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -D	Este estudo
L195	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -158	Este estudo
L254	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -A T179I	Este estudo
L255	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -B T179I	Este estudo
L256	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -C T179I	Este estudo
L257	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -D T179I	Este estudo
L258	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -158 T179I	Este estudo
L259	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -A P194A	Este estudo
L260	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -B P194A	Este estudo
L263	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -C P194A	Este estudo
L261	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -D P194A	Este estudo
L262	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla_{ADC}</i> -158 P194A	Este estudo

Quadro 3 - Cepas e plasmídeos utilizados nesse estudo

(conclusão)

Cepas	Descrição	Referência
L244	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-A} T179I/P194A	Este estudo
L245	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-B} T179I/P194A	Este estudo
L246	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-C} T179I/P194A	Este estudo
L247	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-D} T179I/P194A	Este estudo
L248	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-158} T179I/P194A	Este estudo
L264	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-A} D220G	Este estudo
L265	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-B} D220G	Este estudo
L266	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-C} D220G	Este estudo
L267	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-D} D220G	Este estudo
L268	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-158} D220G	Este estudo
L269	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-A} G320R	Este estudo
L270	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-B} G320R	Este estudo
L271	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-C} G320R	Este estudo
L272	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-D} G320R	Este estudo
L273	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-158} G320R	Este estudo
L274	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-A} D220G/G320R	Este estudo
L275	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-B} D220G/G320R	Este estudo
L276	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-C} D220G/G320R	Este estudo
L277	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-D} D220G/G320R	Este estudo
L278	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-158} D220G/G320R	Este estudo
L251	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-68}	Este estudo
L279	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-68D220G}	Este estudo
L280	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-68} G320R	Este estudo
L281	BL21(DE3) pET28a(+>:: <i>bla</i> _{ADC-68} D220G/G320R	Este estudo
L162	BL21(DE3) pET28a(+)	Este estudo
Vetores		
pGEM-T- <i>Easy</i> [®]	Vetor intermediário Amp ^R	Promega
pET28a(+)	Vetor de expressão Kan ^R	Novagen

Fonte: O autor.

Legenda: Amp^R: resistente à ampicilina; Kan^R: resistente à canamicina. ATCC[®]: *American Type Culture Collection*.

4.3.1 Clonagem das variantes alélicas do gene *bla_{ADC}*

Para a clonagem das quatro variantes alélicas de ADC identificadas, os genes *bla_{ADC}* dos isolados de *A. baumannii* e da cepa *A. baumannii* ATCC[®] 19606[™] da *American Type Culture Collection* (ATCC[®]) (produtora de ADC-158, utilizada inicialmente como controle não-carbapenemase) foram amplificados por PCR utilizando o DNA genômico dos mesmos a partir de oligonucleotídeos modificados, contendo em sua sequência de nucleotídeos os sítios de restrição para as endonucleases *Bam*HI e *Xho*I. Para isto, a extração do DNA dos isolados representantes foi realizada pelo *DNEasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante e descritas no item 4.2.

As reações de amplificação de DNA foram realizadas por PCR contendo 50 ng do DNA-alvo, 0,4 mM de cada oligonucleotídeo iniciador (5'-ATAGGATCCATGCGATTTAAAAAATTTCTTGTCTAC-3' e 5'-CAGCTCGAGTTATTTCTTTATTGCATTCAGCACAG-3'), 250 µM de cada dNTP, 5% de sulfóxido de dimetilo (DMSO), *Herculase II Reaction Buffer* (1x) e 1U de *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent Technologies) em um volume final de 50 µL. As reações foram submetidas à termociclagem em *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems), a uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos térmicos com desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 55 °C durante 45 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto (cada ciclo), finalizando em seguida por uma extensão a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) diluída em tampão 0,5x TBE (Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM pH 8,0) e contendo 0,1 µL/mL *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen), a 120 Volts e 150 mA durante 45 minutos, e posteriormente visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em aparelho de fotodocumentação *L-Pix EX* (Loccus Biotecnologia).

Os fragmentos de DNA foram excisados do gel de agarose com auxílio de um bisturi cirúrgico, purificadas pela utilização do *GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e o DNA purificado foi quantificado em *NanoDrop 2000c*. Cada fragmento foi clonado em reações individuais com volume final de 10 µL contendo aproximadamente 60 ng do produto de PCR para *bla_{ADC}*, 25 ng do vetor de clonagem pGEM[®]-T-Easy (Promega), 1,5 U/µL de T4 DNA Ligase e *Rapid Ligation Buffer* (1x), durante 12 horas a 4 °C e posteriormente transformadas em células

quimiocompetentes de *E. coli* TOP10, de acordo com recomendações do fornecedor (Thermo Fisher Scientific Inc.). Em seguida, as células foram semeadas em placas de Petri contendo ágar LB suplementado com 60 µg/mL de ampicilina (Sigma Aldrich), 20 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal) (Serva) e 100 mM de β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Serva) e incubadas a 35 ± 2 °C por 18 horas para o isolamento das colônias transformantes.

Para confirmação da etapa de clonagem gênica, diferentes colônias das células bacterianas transformantes foram inoculadas em caldo LB acrescido de 60 µg/mL de ampicilina (Sigma Aldrich) e incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 18 horas. Após crescimento, um volume de 1,5 mL de cada cultura foi centrifugado a 10.000 × g durante 3 minutos e o DNA plasmidial das células bacterianas transformantes foi extraído com auxílio do *Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA plasmidial purificado foi submetido à restrição pelas endonucleases *Bam*HI e *Xho*I (New England Biolabs) por 5 horas a 37 °C, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em aparelho de fotodocumentação para avaliação de seu tamanho molecular médio em comparação ao marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Para a avaliação da integridade das sequências das variantes alélicas de *bla*_{ADC} clonadas por PCR, alíquotas dos diferentes preparados de DNA plasmidial, cuja restrição pelas endonucleases apresentou resultados satisfatórios após eletroforese em gel de agarose, foram encaminhadas para o Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (NPT) para realização do sequenciamento de DNA pelo método de Sanger. As reações de sequenciamento foram realizadas pela utilização do *BigDye® Direct Sanger Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc), de acordo com recomendações do fabricante e submetidas à termociclagem com etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 94 °C, seguida por 40 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 55 °C por 10 segundos e 60 °C por 4 minutos cada, realizada em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram precipitados e ressuspensos em 10 µL de *Hi-Di Formamida* (Applied Biosystems) e posteriormente submetidos ao sequenciamento no *3500 xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Após sequenciamento, os cromatogramas foram analisados com o *software Chromas Lite 2.1.1* (Technelysium) e os *contigs* montados pelo *software Lasergene*

SeqMan (DNASStar Inc), sendo posteriormente alinhados e comparados às sequências de nucleotídeos de cada variante alélica de *bla*_{ADC} pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Tom Hall).

4.3.2 Comparação entre as sequencias proteicas de ADC e mutagênese sítio-dirigida

A fim de investigar os possíveis efeitos funcionais das alterações de aminoácidos entre as variantes de ADC identificadas, bem como as principais substituições de aminoácidos envolvidas com a possível ampliação do espectro hidrolítico de ADC, as sequências de aminoácidos previstas para cada variante enzimática foram submetidas à análise pelo algoritmo PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer*) (CHOI; CHAN, 2015), utilizando-se pontuação de alinhamento Delta (*Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST*) estabelecida com base nas sequências de ADCs (de referência e das variantes de sequência-teste) em relação aos homólogos de sequência identificados no banco de dados de proteínas NCBI NR por meio da ferramenta BLAST.

Para separação máxima de cada uma das variantes proteicas submetidas à análise, o valor de corte foi definido em -2,5 (CHOI, 2012; CHOI; CHAN, 2015) de modo que fosse possível o estabelecimento de uma classificação binária: *i*) mutação deletéria - cujos efeitos apresentam maior probabilidade de influenciar na função; ou *ii*) neutra - cujos efeitos não resultariam em possíveis alterações funcionais.

Adicionalmente, foram utilizados os softwares *PHYRE2 Protein Fold Recognition Server* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) e *ESPrpt 3.0* (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/index.php>) para predição da estrutura proteica secundária e representação visual das análises, respectivamente.

Por fim, considerando as regiões estruturais de ADC (e.g., sítio ativo, Ω -loop, hélices H2 e H10 e C-loop) - cuja modificação ocasionaria alterações mais significativas na estrutura proteica - e a análise comparativa das sequências de ADCs provenientes dos resultados fornecidos pelo PROVEAN, as variantes enzimáticas do presente estudo foram modificadas individualmente pela técnica de mutagênese sítio-dirigida por *megaprimer* (Figura 6) (TYAGI; DUGGLEBY, 2004) para T179I; P194A; D220G; G320R e para as substituições T179I e P194A; e D220G e G320R, reproduzindo os possíveis motivos observados em ADC-68 (carbapenemase).

Adicionalmente, as modificações G77A e T248A foram introduzidas exclusivamente na variante ADC-158 a fim de se obter a variante alélica ADC-68, utilizada neste estudo como controle positivo para ADC-carbapenemase (JEON *et al.*, 2014).

Para a construção do *megaprimer*, o gene *bla_{ADC}* de cada variante estudada foi parcialmente amplificado por PCR, em reações contendo *Herculase II Reaction Buffer* (1x), 1U de *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent Technologies), 250 µM de cada dNTP, 5% de sulfóxido de dimetilo (DMSO), 50 ng do DNA molde e 20 µM de oligonucleotídeos iniciadores, sendo em um deles a sequência sintetizada modificada para resultar nas modificações desejadas nas sequências de aminoácidos das ADCs, conforme descrito no Quadro 4.

Quadro 4 - Oligonucleotídeos utilizados para modificação nas sequências de aminoácidos das ADCs.

ID.	Objetivo	Sequência (5' - 3')	Alvo (<i>bla_{ADC}</i>)
DX131	G77A	ATTTTTTGCATACGCACCTGCTGTC	158
DX092	T179I	GTCTTAGAAAAAATTATTTTTCCGGCC	A, B, C, D, 68, 158
DX094	P194A	CTATGTAAATGTAGCGAAGACCCAAATG	A, B, C, D, 68, 158
DX153	D220G	CCGGCCCACTTGGCGCCCCAGCATC	A
DX154	D220G	CCGGCCCACTCGGAGCCCCAGCATATG	B, C, D, 158
DX132	T248A	CAGAAATATCCGGCCGATATTCAACG	158
DX155	G320R	CTGGCTCAACCAACCGTTTCGGAACATATG	D, 68 e 158
DX156	G320R	CTGGCTCAACCACCCGTTTCGGAACATATG	ADC-A e -B

Fonte: O autor.

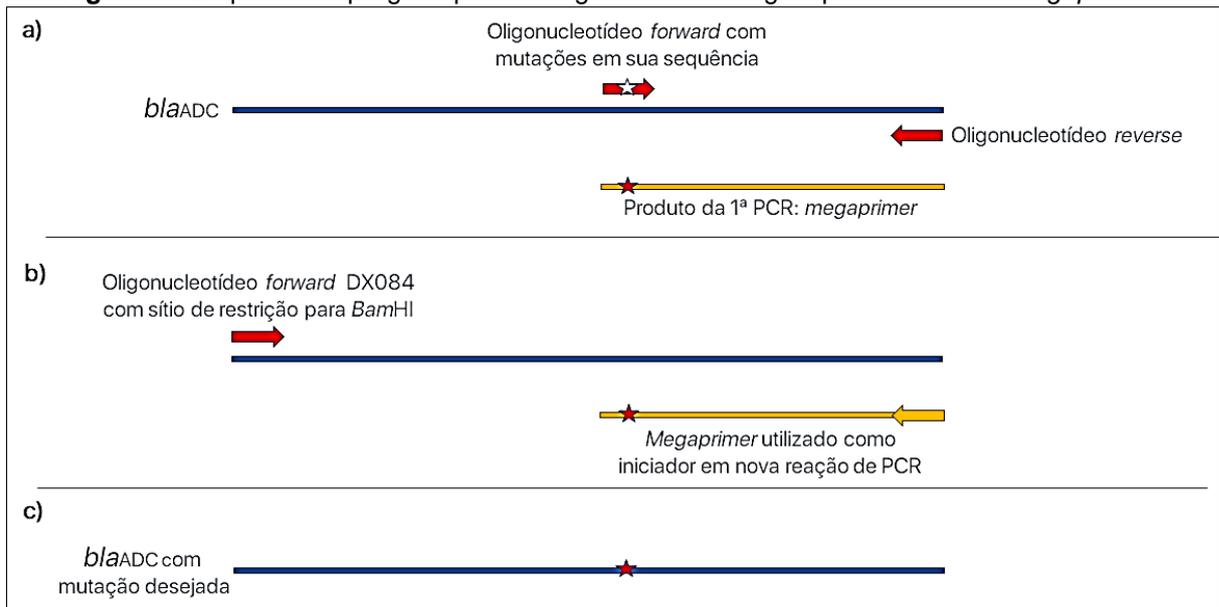
Legenda: ID. - identificação do oligonucleotídeo no Banco de Oligonucleotídeos do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães. Objetivo - mutação desejada na sequência de aminoácidos da proteína. Todas as sequências de oligonucleotídeos listadas foram desenhadas pelo autor do presente estudo.

As reações foram submetidas à termociclagem em *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) sob as mesmas condições previamente descritas. Após amplificação, os *megaprimers* obtidos nesta primeira etapa foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) diluída em tampão 0,5x TBE (Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM pH 8,0) e contendo 0,1 µL/mL *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen), a 120 Volts e 150 mA durante 45 minutos, sendo posteriormente visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em aparelho de fotodocumentação *L-Pix EX* (Loccus Biotecnologia). Os fragmentos de DNA foram excisadas do gel de agarose com auxílio de um bisturi cirúrgico, purificadas com a

utilização do *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e um volume de 10 µL de cada fragmento de DNA purificado (*megaprimer*) foi utilizado como oligonucleotídeo iniciador para a amplificação dos genes *bla_{ADC}* completo e com as mutações desejadas em uma segunda reação de PCR, contendo 50 ng do DNA genômico de cada isolado representante, 10 µM do oligonucleotídeo iniciador DX084 (5'- ATAGGATCCATGCGATTTAAAAAATTTCTTGTCTAC -3') (modificado com sítio de restrição para a endonuclease *Bam*HI, em destaque). As reações foram submetidas à termociclagem com gradiente de temperatura de anelamento (*touchdown*), cuja ciclagem inicial correspondeu a uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 10 ciclos com desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento variando de 65 a 55 °C durante 45 segundos (decréscimo de 1 °C a cada ciclo) e extensão a 72 °C durante 1 minuto. Após o término dos 10 ciclos iniciais, a temperatura de anelamento foi mantida a 55 °C pelos próximos 25 ciclos, finalizando em seguida por uma etapa de extensão a 72 °C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, purificados pela utilização do *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e utilizados em reações de clonagem em vetor pGEM®-T-Easy (Promega) e transformados em células de *E. coli* TOP10, conforme metodologia previamente descrita.

Os mutantes contendo as modificações duplas T179I/P194A e D220G/G320R foram construídos também pela técnica de mutagênese sítio-dirigida por *megaprimer* utilizando como *template* o DNA dos mutantes previamente construídos para cada variante enzimática (Figura 6) em reações de PCR com os respectivos *megaprimers* para inserção da segunda mutação desejada.

Figura 6 - Esquema empregado para mutagênese sítio-dirigida pela técnica de *megaprimer*.



Fonte: O autor.

Legenda: a) Primeira reação de PCR para amplificação parcial do gene *bla_{ADC}* e obtenção do *megaprimer* (produto) com as mutações de nucleotídeos desejadas; b) Segunda reação de PCR para amplificação completa e inserção da mutação no gene *bla_{ADC}*; c) Gene *bla_{ADC}* amplificado em sua totalidade e com as mutações desejadas, resultante da segunda reação de PCR. Setas vermelhas: oligonucleotídeos; Linhas azuis: gene *bla_{ADC}*; Linhas amarelas: produto de PCR (*megaprimer*); Estrelas: mutações sítio-dirigidas.

4.3.3 Expressão das variantes ADC

Os genes *bla_{ADC}* das variantes de ADC estudadas foram removidos do vetor de clonagem *pGEM[®]-T-Easy* (Promega) com a utilização das enzimas endonucleases de restrição sítio-específica *Bam*HI e *Xho*I (New England Biolabs) e subclonados em vetor de expressão *pET28a(+)* (Novagen), contendo marcador de resistência à canamicina para seleção de cepas transformantes também previamente submetido à restrição pelas mesmas enzimas endonucleases, em reações contendo *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs), de acordo com recomendações do fabricante para ligação das extremidades coesivas produzidas pela restrição do DNA. Posteriormente, as reações de ligação foram transformadas em células quimiocompetentes da cepa hospedeira de *E. coli* TOP10 e, em seguida, os vetores foram extraídos e subsequentemente transformados em cepa de *E. coli* BL21(DE3), para expressão gênica sob indução, conforme metodologia anteriormente previamente descrita.

As células transformantes contendo cada variante alélica de *bla_{ADC}* em vetor de expressão (*pET28a(+)*::*bla_{ADC}* bem como suas correspondentes submetidas à técnica

de mutagênese sítio-dirigida) foram selecionadas em placas de Petri contendo ágar LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen) e, após confirmação da integridade das sequências de nucleotídeos sequenciamento de DNA (metodologia descrita anteriormente), as mesmas foram armazenadas a -80 °C em solução contendo caldo LB e 15% de glicerol (Sigma Aldrich) até a realização dos demais ensaios.

Para verificação da expressão das variantes enzimáticas de ADC, as *E. coli* BL21(DE3) transformadas com cada uma das construções pET28a(+)-*bla*_{ADC} foram inoculadas separadamente em 5 mL de caldo LB acrescido de 50 µg/mL de canamicina e incubadas sob agitação de 170 rpm a 35 ± 2 °C por 16 horas. Após crescimento microbiano, esta cultura foi adicionada à 20 mL de LB acrescido de 50 µg/mL de canamicina e o crescimento foi monitorado por espectrofotometria (*UV 1101 Biotech Photometer* - WPA) até atingir densidade OD_{625nm} de 0,08 – 0,13 UA. Nesta fase, a temperatura de incubação das culturas foi ajustada para 26 °C e a expressão das variantes enzimáticas foi induzida com a adição de 0,2 mM de IPTG (Serva), e mantida sob agitação por um período de 16 horas. Como controle de expressão, foi utilizada a cepa *E. coli* BL21(DE3) transformada unicamente com o vetor pET28a(+) comercial (Novagen). Alíquotas de 200 µL de cada cultura foram retiradas antes da adição de IPTG (pré-indução), centrifugadas a 5.000 × g durante 5 minutos e cada sedimento foi ressuscitado em 50 µL de *Laemmli sample buffer* 2x [dodecil sulfato de sódio (4%), glicerol (20%), Tris-HCl pH 6.8 (120 mM), azul de bromofenol (0,02%), 2-mercaptoetanol (10%)] para obtenção dos extratos proteicos, sendo estes posteriormente desnaturados por fervura a 100 °C durante 5 minutos e imediatamente congelados a -20 °C. Decorrido o tempo da indução da expressão gênica, alíquotas de 200 µL de cada cultura (pós-indução) foram também submetidas às etapas ao mesmo procedimento, e os extratos armazenados a -20 °C. Posteriormente, os extratos proteicos (pré-indução e pós-indução com IPTG) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (m/v) (SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) diluída em solução aquosa contendo bisacrilamida 0,085% e Tris-HCl 0,38 mM (pH 8,8). A eletroforese foi realizada em tampão *running buffer* contendo glicina (2,6%), tris base (0,6%) e SDS (0,1%) durante 100 minutos, 300 V e 35 mA. Após eletroforese, o gel foi corado durante 10 minutos sob agitação com solução aquosa *stain* [azul de Coomassie R250 (0,5%), metanol (45%), ácido acético (10%)] e posteriormente descorado com solução aquosa *destain*

[metanol (25%), ácido acético (7%)] durante 12 horas, sob agitação, para visualização das bandas proteicas.

4.4 Teste de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

A fim de estabelecer uma análise quantitativa das variações da concentração inibitória mínima (CIM) destes isolados, o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) dos isolados de *E. coli* BL21(DE3) transformados com cada uma das construções pET28a(+)-*bla*_{ADC} foi determinado, em triplicata, pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização e recomendações do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), documento M07-A10 (CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE, 2015).

Resumidamente, alíquotas das células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com cada uma das construções pET28a(+):*bla*_{ADC} foram inicialmente submetidas ao processo de indução de síntese proteica em caldo LB a partir da adição de 0,2 mM (final) de IPTG (Serva), sob agitação, por um período de 16 horas, conforme previamente descrito.

Os isolados bacterianos foram testados frente aos seguintes antimicrobianos: ampicilina/sulbactam (AMP/SUB), cefalotina (CFL), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CFX), cefepima (CEP), imipenem (IPM) e meropenem (MER) (Sigma Aldrich). As concentrações dos antibióticos utilizadas no teste e o solvente/diluyente utilizado para as respectivas diluições estão apresentados no Quadro 5.

As soluções estoque de cada antimicrobiano foram preparadas, esterilizadas por filtração em filtros para seringa *Millex*[®] de poros de 0.22 µm (Merck Millipore) e armazenadas a -80 °C.

Placas de microdiluição de 96 poços foram preenchidas com um volume de 50 µL de CA-MHB (*Cation-adjusted Mueller-Hinton broth*, Fluka – Sigma-Aldrich) contendo uma diluição seriada, em cada coluna, com antimicrobiano a uma concentração correspondente ao dobro da concentração-teste desejada. As placas foram armazenadas em freezer -80 °C até a realização dos testes, sendo posteriormente inoculadas seguindo as recomendações de boas práticas de laboratório em capela de fluxo laminar.

As suspensões bacterianas foram centrifugadas a $5000 \times g$ durante 5 minutos e cada sedimento bacteriano foi ressuspenso em 1 mL de CA-MHB estéril até uma densidade OD_{625nm} de 0,08 – 0,13 UA, determinada em espectrofotômetro *UV 1101 Biotech Photometer* (WPA), correspondente a 0,5 da escala de McFarland ou $1-5 \times 10^8$ UFC/mL. Essa suspensão foi subsequentemente diluída 1:1.000 em CA-MHB em volume suficiente para inoculação dos poços da placa de microdiluição. Um volume de 50 μ L desta última diluição foi inoculado simultaneamente com o auxílio de pipetador automático multicanal em cada poço da placa previamente confeccionada de modo que, ao final desta etapa, cada poço contivesse um volume final de 100 μ L, com a concentração final desejada para cada antimicrobiano e uma densidade celular bacteriana de cerca de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL. Como controle positivo do crescimento bacteriano, foram inoculados poços contendo CA-MHB livre de antimicrobianos e, como controle negativo de crescimento foram reservados poços contendo apenas CA-MHB, sem inoculação.

Após inoculação, as mesmas foram incubadas por 18-20 horas, a $35 \pm 2^\circ$ C e, após esse período, um volume de 30 μ L do indicador de viabilidade celular resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) [0,015%, previamente esterilizada em filtro para seringa Millex[®] de poros de 0.22 μ M (Merck Millipore)] foi adicionado em cada um dos poços das placas de microdiluição (ELSHIKH *et al.*, 2016). Após nova incubação por 4 horas a $35 \pm 2^\circ$ C, as placas foram por fim inspecionadas visualmente para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), considerada a menor concentração de cada antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Para controle da qualidade do inóculo, um volume de 10 μ L recuperado do poço correspondente ao controle positivo do crescimento bacteriano foi diluído 1:1.000 (10^{-3}) imediatamente após sua inoculação e, dessa diluição, um volume de 100 μ L foi semeado em ágar BHI (Himedia) e espalhado por toda a sua superfície com o auxílio de alças de Drigalski, sendo esta etapa realizada em triplicata. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 20 horas a $35 \pm 2^\circ$ C. O número de colônias foi determinado e utilizado para o cálculo da concentração de células bacterianas presentes no inóculo. Como controle de qualidade do teste, foi utilizada a cepa da *American Type Culture Collection* (ATCC[®]) de *E. coli* ATCC[®] 25922[™].

Os testes considerados válidos foram aqueles nos quais: *i)* os controles negativos de crescimento não apresentarem turvação; *ii)* as concentrações inibitórias mínimas da cepa de *E. coli* ATCC[®] 25922[™] utilizada como controle de qualidade para

cada antibiótico corresponderam aos critérios estabelecidos pelo CLSI e *iii*) o inóculo apresentou uma densidade de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL estimada como descrito para controle de qualidade do inóculo bacteriano.

Quadro 5 - Concentrações de antimicrobianos avaliadas no teste fenotípico de resistência bacteriana

Antimicrobiano	Classe	Concentrações avaliadas (µg/mL)	Solvente/Diluyente
Ampicilina/sulbactam	Penicilina/inibidor de betalactamase	0,0625-64/0,0312-32	PBS pH 8,0; 0,1 M/Água ultrapura
Cefalotina	Cefalosporina 1ª geração	0,0625-64	Água ultrapura
Cefotaxima	Cefalosporina 3ª geração	0,0625-64	Água ultrapura
Ceftazidima	Cefalosporina 3ª geração	0,0625-64	Na ₂ CO ₃ [anidro] (10% de CAZ)/Água ultrapura
Ceftriaxona	Cefalosporina 3ª geração	0,0625-64	Água ultrapura
Cefepima	Cefalosporina 4ª geração	0,0625-64	PBS pH 6; 0,1 M
Imipenem	Carbapenêmico	0,0312-32	PBS pH 7,2; 0,01 M
Meropenem	Carbapenêmico	0,0312 -32	Água ultrapura

Fonte: Adaptado do Clinical Laboratory Standard Institute (2018).

Legenda: PBS - Tampão fosfato; Na₂CO₃ - Carbonato de sódio.

4.5 Testes fenotípicos de inativação de betalactâmicos e hidrólise enzimática dos carbapenêmicos

Para a avaliação da capacidade das variantes enzimáticas de ADC em inativar betalactâmicos e hidrolisar os antibióticos carbapenêmicos, as cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o vetor pET28a(+):*bla*_{ADC} foram submetidas aos testes fenotípicos *Carbapenem Inactivation Method Plus (CIMplus)* (CAMÉLÉNA *et al.*, 2018) e *CarbAcineto* (DORTET *et al.*, 2014), respectivamente, com pequenas modificações.

4.5.1 Carbapenem Inactivation Method Plus (*CIMplus*)

O *Carbapenem Inactivation Method Plus* foi realizado em duplicata, conforme descrito por Caméléna *et al.* (2018) e acrescido de uma etapa de lise bacteriana por ultrasonicação em *Vibra-Cell VC 505* (Sonics & Materials Inc.).

Resumidamente, as cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o vetor pET28a(+):*bla*_{ADC} foram inicialmente semeadas em ágar LB acrescido de 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen) e incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 18 horas, sendo posteriormente submetidas ao processo de indução de síntese proteica, conforme previamente descrito. Em seguida, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 5000 × g durante 5 minutos e cada sedimento bacteriano foi ressuspendido em 2 mL de água ultrapura (LGC Biotecnologia). Cada suspensão contendo as células bacterianas foi posteriormente transferida para Beckers de vidro com capacidade de 10 mL e lisada por ultrasonicação em *Vibra-Cell VC 505* (Sonics & Materials Inc.), em quatro pulsos com duração de 30 segundos cada e intervalo de 1 minuto entre os pulsos, amplitude de 40% e temperatura de 4 °C. Cada lisado celular foi transferido para diferentes microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 13000 × g durante 3 minutos, a 4 °C. Um volume de 400 µL de cada sobrenadante contendo o extrato proteico total foi então transferido para diferentes microtubos, os quais foram acrescidos, individualmente, de discos de diferentes antimicrobianos, incluindo ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem e piperacilina/tazobactam (tubos-teste) e cefalotina (tubo-controle positivo de expressão e hidrólise antimicrobiana por ADC), sendo posteriormente incubados em banho-maria a 37 °C durante 3 horas.

Após incubação, os discos foram extraídos da solução contendo o extrato proteico total e fixados na superfície de placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton (Himedia) previamente semeadas com *E. coli* ATCC® 25922™ (não produtora de carbapenemase), sendo estas posteriormente incubadas a 35 ± 2 °C por 18 horas para avaliação do crescimento bacteriano.

Os isolados considerados positivos para a produção de carbapenemase foram aqueles nos quais o crescimento da cepa de *E. coli* ATCC® obteve contato com os respectivos discos de imipenem e cefalotina posicionados na superfície do ágar, indicando que os antimicrobianos presentes nestes foram previamente hidrolisados pelas enzimas presentes em seu respectivo extrato proteico durante incubação em banho-maria.

Como controle, o teste foi realizado sob as mesmas condições a partir da utilização da cepa de *E. coli* BL21(DE3)::pET28a(+) (controle negativo de expressão de ADC) com cada um dos discos de imipenem (10 µg) e cefalotina (30 µg), de modo a garantir a não influência do meio aquoso e extrato proteico total sem a enzima ADC em cada um dos testes.

4.5.2 CarbAcineto

O *CarbAcineto* é um teste de *screening* que se baseia na detecção da hidrólise enzimática do anel betalactâmico do imipenem em reações cromogênicas, a partir da utilização do vermelho de fenol como indicador de pH. Quando hidrolisado por alguma carbapenemase, o imipenem é convertido em sua forma carboxílica, resultando na diminuição do pH e consequente variação de coloração da reação indicada pelo vermelho de fenol (DORTET *et al.*, 2012).

O *CarbAcineto* foi utilizado em triplicata para as linhagens de *E. coli* expressando as variantes de ADC em vetor de expressão. Essas linhagens foram cultivadas em ágar LB acrescido de 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen) e submetidos à indução da expressão gênica com IPTG, como anteriormente descrito. Para *CarbAcineto*, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a $5000 \times g$ durante 5 minutos e um total de 10 µL (1 alça bacteriológica) de cada sedimento bacteriano foi ressuspensionado em 100 µL da solução de lise (Tris-HCl 20 mM pH 7,52) e homogeneizado vigorosamente por 30 segundos. Um volume de 100 µL do lisado bacteriano foi diretamente testado para sua capacidade em hidrolisar o imipenem junto a 100 µL de solução de teste

contendo vermelho de fenol 0,5% (m/v), 0,1 mM ZnSO₄ e 3 mg/mL de imipenem (pH 7,5). As reações foram então incubadas a 37 °C por duas horas e a leitura foi realizada por inspeção visual. O teste foi considerado positivo para a produção de carbapenemase quando a coloração variou de sua cor original (vermelha) para coloração amarelada ou alaranjada. Como controle de qualidade, o mesmo volume do lisado celular bacteriano foi examinado contra a solução de teste na ausência do imipenem, para averiguação da interferência do lisado na variação do pH da solução. O controle positivo se deu pela utilização da cepa *K. pneumoniae* Kp13 (RAMOS *et al.*, 2014), produtora de carbapenemase do tipo KPC-2. Como controle negativo de reação, foi utilizada a cepa de *E. coli* ATCC[®] 25922[™], desprovida de carbapenemases.

4.6 Detecção espectrofotométrica da hidrólise de imipenem pelas variantes enzimáticas de ADC

A hidrólise do imipenem por variantes enzimáticas de ADC selecionadas foi investigada por espectrofotometria. O extrato bruto proteico das linhagens expressando ADC foi adicionado a uma solução de imipenem e a hidrólise da droga foi observada pelo declínio da absorbância da luz incidida a um comprimento de onda de 299 nm, de absorção máxima para essa droga.

Para isso, as cepas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET28a(+):*bla*_{ADC} das variantes selecionadas ADC-A, ADC-B, ADC-68 e ADC-158, além de seus mutantes construídos por mutagênese sítio-dirigida neste estudo, foram semeadas em placas de Petri contendo ágar LB acrescido de 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen) e incubadas por 16 horas em estufa a 35 ± 2 °C para crescimento bacteriano. Em seguida, colônias das células transformantes de *E. coli* BL21(DE3) foram cultivadas em 20 mL de caldo LB acrescido de 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen) e a expressão das variantes enzimáticas de ADC foi induzida com a adição de 0,2 mM de IPTG (Serva) a 26 °C por um período de 16 horas.

As culturas foram centrifugadas a 4000 × g durante 15 minutos e o sedimento ressuspenso em 2 mL de tampão de amostra (1 mM Tris-HCl, 1mM ZnSO₄). As suspensões de células bacterianas foram posteriormente transferidas para Beckers de vidro com capacidade de 10 mL e lisadas por ultrasonicação em *Vibra-Cell VC 505* (Sonics & Materials Inc.), em quatro pulsos com duração de 30 segundos cada e

intervalo de 1 minuto entre os pulsos, amplitude de 40% e temperatura de 4 °C. O lisado celular foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 13000 × g durante 3 minutos, a 4 °C. O sobrenadante contendo o extrato proteico total foi então transferido para um novo microtubo e posteriormente quantificado por espectrofotometria em *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc.), sendo mantido em gelo até a realização dos ensaios.

Os testes de hidrólise foram imediatamente realizados em cubetas de quartzo, utilizando-se um volume de 250 µL de cada extrato proteico total e 250 µL de uma solução aquosa de imipenem a 100 µM, preparada com PBS 10mM, pH 7.0. O monitoramento da absorbância foi realizado por espectrofotometria em *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc.) nos comprimentos de onda compreendidos entre 235 e 360 nm, durante 1 hora (3600 segundos), com intervalos de 30 segundos entre cada leitura, à temperatura de 37 °C (AGUILAR, 2013; TAKEUCHI *et al.*, 2018).

A diminuição gradativa da absorbância, observados no comprimento de onda referente à máxima absorção do imipenem (299 nm) no decorrer do tempo total do teste foi considerada como resultado positivo de hidrólise do antimicrobiano testado. A absorbância relativa (%) de cada ponto (tempo) foi calculada em relação a absorbância inicial (100%, t = 0) para cada amostra testada e dispostas em gráfico para análise visual das curvas de absorbância do imipenem em função do tempo de exposição à amostra de extrato proteico total. O extrato proteico total da linhagem *E. coli* BL21(DE3) transformadas somente com o pET28a(+) foi utilizada como controle negativo da hidrólise do imipenem.

4.7 Modelagem computacional da estrutura proteica terciária de ADC e *docking* molecular

Considerando as principais diferenças nas sequências de aminoácidos preditas para as diferentes ADCs no presente estudo, bem como os resultados dos ensaios de hidrólise do imipenem, as variantes enzimáticas -A e -B naturais e suas modificações T179I, P194A, D220G, G320R foram selecionadas e submetidas à modelagem computacional para determinação de suas estruturas proteicas terciárias bem como a ensaios *in silico* de interação proteica-ligante utilizando os servidores *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>) e *SwissDock* (<http://www.swissdock.ch/>), respectivamente.

Para isto, as sequências de aminoácidos preditas para cada uma das variantes foram individualmente submetidas à modelagem proteica por homologia, utilizando-se como referência anotações da estrutura tridimensional de diferentes betalactamases da classe C [ADC-1 (4NET); ADC-7 (4UOT); ADC-68 (4QD4)] obtidas a partir de ensaios de cristalografia de raios X e disponíveis na base de dados do *Protein Data Bank* (PDB). Foram considerados resultados de predição válidos aqueles cujo indicador de confiabilidade GMQE (*Global Model Quality Estimation*) apresentou pontuação $\geq 0,95$, indicando elevada precisão e fidedignidade de predição para cada modelo construído.

Os arquivos “.pdb” contendo os dados de predição proteica de ADC foram individualmente submetidos a predição de interação por *docking* molecular com imipenem (DB01598, <https://go.drugbank.com>) e meropenem (DB00760) em *SwissDock*, considerando os comprimentos de ligação, interações angulares, planaridade dos anéis de cadeias laterais, ângulos torcionais e impedimento estérico entre os pares de átomos não-ligados (BITENCOURT; DE AZEVEDO, 2019).

Os arquivos de saída contendo os *clusters* de interação preditos foram visualizados no *software UCSF Chimera* versão 1.14 (Universidade da Califórnia) e aqueles com *score* mais favorável de encaixe do modelo, considerando os cálculos de energia livre de ligação do complexo receptor-ligante (kcal/mol), foram selecionados para análises mais detalhadas de interação.

Por fim, os complexos receptor-ligante selecionados foram individualmente submetidos ao *software Discovery Studio Visualizer 2021 v21.1.0* (Biovia Corporation) para visualização das estruturas atômicas e conformacionais preditas, além da identificação das coordenadas espaciais proteico-atômicas do sítio ativo enzimático e de suas interações eletroquímicas com as moléculas de meropenem e imipenem.

Adicionalmente, considerando os resultados obtidos, os arquivos de saída salvos em disco rígido local foram submetidos ao algoritmo *CB-Dock* (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/>) (LIU *et al.*, 2020) para determinação do tamanho médio da cavidade do sítio ativo enzimático e melhor compreensão acerca das interações moleculares existentes entre estas proteínas e o imipenem.

4.8 Cálculo do ponto isoelétrico teórico (pI) das variantes enzimáticas de ADC

O ponto isoelétrico teórico (pI) foi estimado com o intuito de avaliar a possível influência das substituições e inserções de aminoácidos sobre variantes enzimáticas de ADC estudadas no presente trabalho.

Para isto, as sequências previstas de aminoácidos codificados por cada uma das variantes alélicas de *bla*_{ADC} (naturalmente expressas e mutantes construídos pela técnica de mutagênese sítio-dirigida) foram submetidas ao algoritmo IPC - *Isoelectric Point Calculator* (KOZLOWSKI, 2016) para a estimativa do pI de cada variante enzimática a partir da equação de Henderson-Hasselbach, utilizando diferentes conjuntos de pKa.

Adicionalmente, foram incluídas demais sequências previstas de aminoácidos codificados pelas 237 variantes alélicas de *bla*_{ADC} depositadas no banco de dados *Beta-Lactamase Data Base* (<http://www.bldb.eu>). Como controle de acurácia do algoritmo e validação do teste, foram utilizadas diferentes sequências de aminoácidos de betalactamases com pI previamente conhecido, incluindo ADC-68 (pI ~ 9,0), TEM-1 (pI 5,4), TEM-2 (pI 5,6) e SHV-1 (pI 7,6).

4.9 Análise dos dados

Os resultados foram avaliados quantitativamente e qualitativamente pela análise descritiva dos dados coletados e armazenados em banco de dados pelo *software* SPSS 13.0 (*Statistical Product and Service Solutions*®) e *Excel*® (Microsoft Corporation).

4.10 Considerações Éticas e de Biossegurança

Este estudo não envolve seres humanos e/ou animais, seja de forma direta ou indireta, dispensado, portanto, de avaliação criteriosa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Anexo A).

Este projeto foi submetido e aprovado para execução pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do IAM sob registro nº 03/2018 (Anexo B) e segue as recomendações devidas. Todas as culturas bacterianas foram realizadas em capela de fluxo laminar unidirecional e em laboratório de Nível de Biossegurança 2 (NB-2).

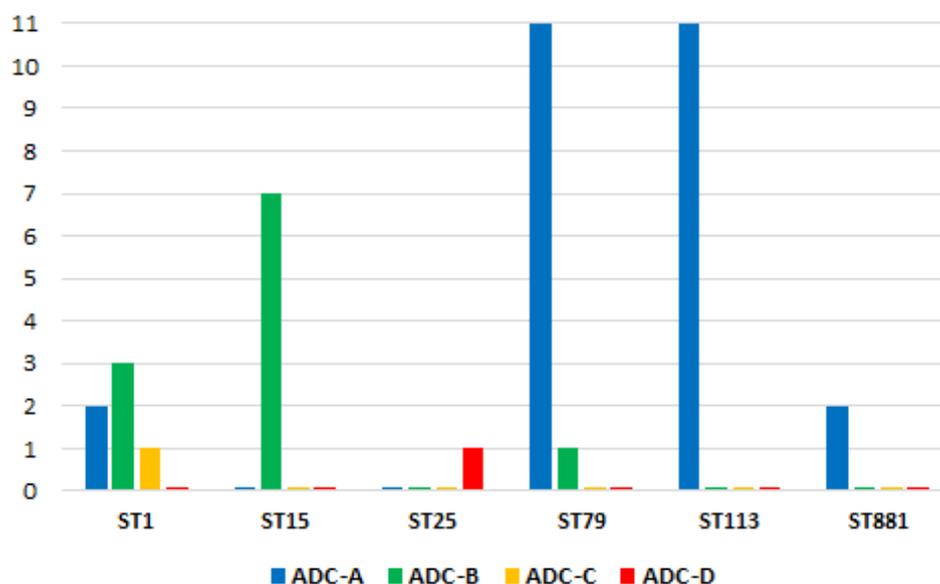
5 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo encontram-se descritos nos tópicos a seguir.

5.1 Agrupamento das diferentes variantes enzimáticas de ADC de acordo com as sequências de aminoácidos e suas características genéticas

A identificação dos genes *bla_{ADC}* entre os isolados clínicos de *A. baumannii*, predição e comparação por alinhamento de suas sequências de aminoácidos mostrou a ocorrência de quatro diferentes variantes para a enzima ADC, aqui denominadas ADC-A (ADC-182), ADC-B, ADC-C (ADC-195) e ADC-D (ADC-26) de acordo com as suas diferenças na sequência de aminoácidos. A variante enzimática ADC-A foi a mais frequente, sendo identificada em 63,3% dos isolados e distribuídas entre a ST1 (2 isolados) e sua linhagem *single locus variant* (SLV) da ST881 (2 isolados), ST79 (11 isolados) e ST113 (11 isolados). A ADC-B foi identificada entre isolados de *A. baumannii* pertencentes à ST1 (3 isolados), ST15 (7 isolados) e ST79 (1 isolado) e as variantes ADC-C e ADC-D foram identificadas em 1 isolado cada pertencentes à ST1 e ST25, respectivamente, representando 1,7% do total (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição das variantes ADC identificadas no presente estudo entre as diferentes STs de *A. baumannii*.



Fonte: O autor.

De forma geral, as variantes alélicas de *bla*_{ADC} registradas e suas proteínas ADC betalactamases guardam entre si uma similaridade, respectivamente, de no mínimo 86% e 91% de suas sequências. A análise filogenética das variantes alélicas de *bla*_{ADC} descritas até o momento e depositadas no BLDB e GenBank (NCBI) revelam uma estreita relação entre os genes das variantes ADC-A (*bla*_{ADC-182}), ADC-B e ADC-C (*bla*_{ADC-195}), além das como as variantes alélicas *bla*_{ADC-5}, *bla*_{ADC-181}, *bla*_{ADC-183}, *bla*_{ADC-234} e *bla*_{ADC-235} que são agrupadas em mesmo clado (Figura 7). Com exceção da variante *bla*_{ADC-5}, que tem sua ocorrência registrada em isolados de *A. baumannii* oriundos dos Estados Unidos e Espanha, as variantes desse clado tem registro exclusivamente entre isolados de *A. baumannii* coletados no Brasil (GenBank, NCBI).

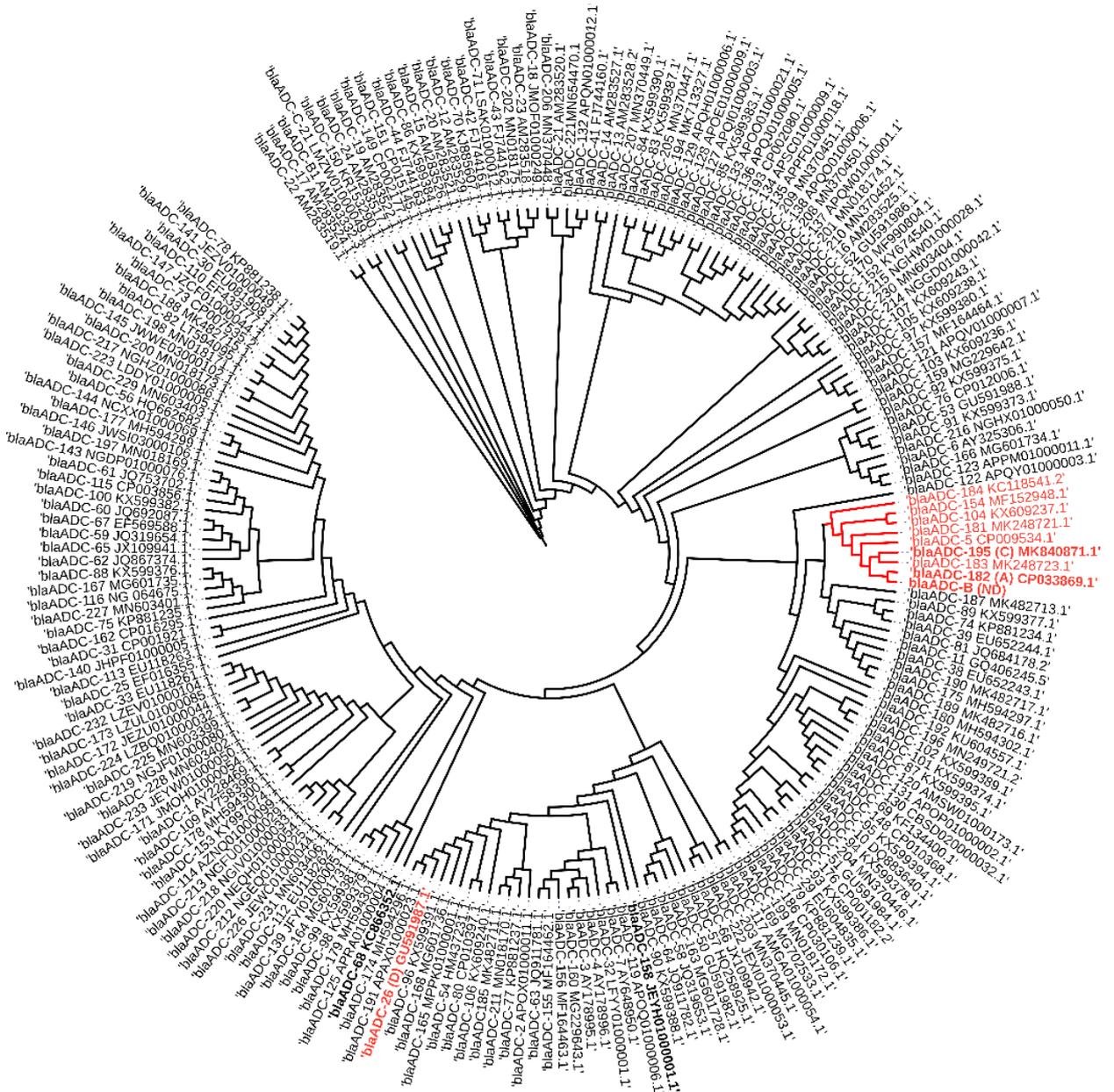
A quarta variante identificada entre os isolados clínicos investigados neste estudo, ADC-D (*bla*_{ADC-26}), apresenta relação mais distante e posiciona-se em clado distinto na árvore filogenética, assim como as outras variantes incluídas neste estudo *bla*_{ADC-68} e *bla*_{ADC-158}.

As variações alélicas dos genes *bla*_{ADC} do clado que relaciona as variantes de ADC majoritariamente relatados entre isolados de *A. baumannii* epidêmicos no Brasil produziram poucas modificações na sequência de aminoácidos de ADC (Figura 8A e B). De acordo com o cladograma construído a partir do alinhamento múltiplo dessas sequências, essas variantes derivam de um gene ancestral comum à variante *bla*_{ADC-181} em três subclados decorrentes de mutações pontuais, deleção e inserção de códons.

A alteração mais pronunciada observada é a inserção por duplicação da sequência de nucleotídeos 5'-CCCCAGCAT-3' na posição 728 da sequência consenso dos genes desse clado, que insere a sequência de Prolina(P)-Alanina(A)-Serina(S) à sequência de aminoácidos da enzima, observadas nas variantes ADC-182 (ADC-A) e ADC-235. A variante ADC-235 por sua vez difere de ADC-182 unicamente pela inserção, também por duplicação, de um códon para tirosina (5'ACC-3') na posição 1026 da sequência consenso desses genes.

Mesmo que de forma geral essas alterações parecem mínimas, ocorrem na circunvizinhança de resíduos e domínios para interação da proteína com os betalactâmicos e para a atividade enzimática, demonstrado nos tópicos seguintes em comparação com a ADC-68, descrita como tendo atividade catalítica contra imipenem (carbapenemase) e ADC-158 da cepa laboratorial *A. baumannii* ATCC 19606.

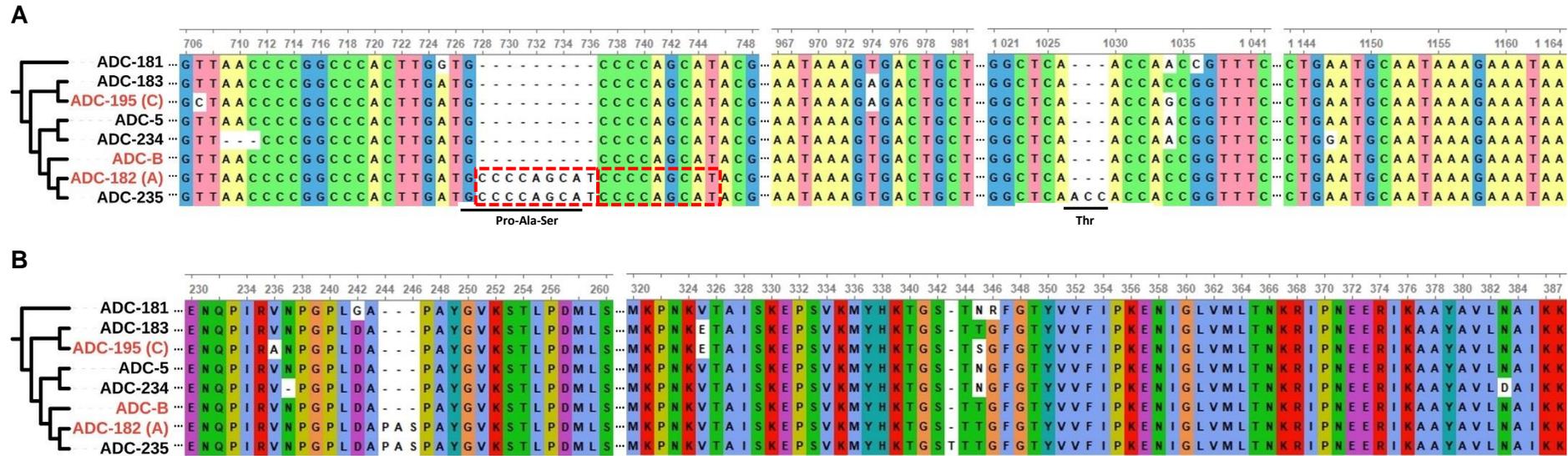
Figura 7 - Relação filogenética das variantes alélicas de *bla*_{ADC} de *Acinetobacter* spp.



Fonte: O autor.

Legenda: Árvore filogenética das variantes alélicas de *bla*_{ADC} de *Acinetobacter baumannii*. Destacado em negrito as variantes incluídas neste estudo. Encontram-se em vermelho, destacadas, aquelas identificadas em isolados clínicos do Brasil e variantes estreitamente relacionadas à ADC-A, -B e -C. O número de acesso do *locus* no GenBank (NCBI) está indicado diante do nome de cada variante. A variante ADC-B não teve correspondência com nenhuma variante registrada no banco de dados BLDB. ND, não determinada.

Figura 8 - Alinhamento múltiplo de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos das variantes alélicas de *bla_{ADC}* do clado de interesse.



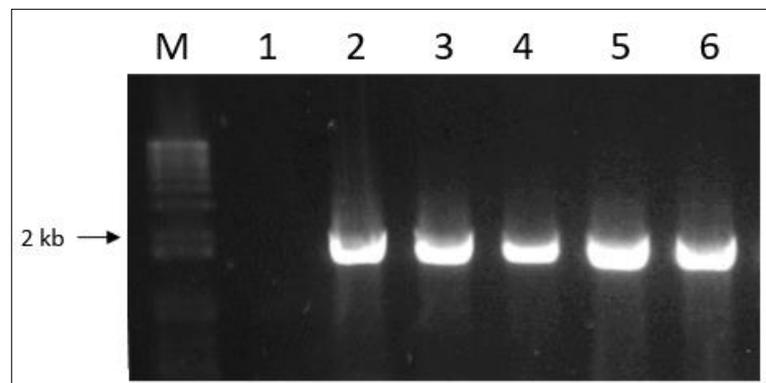
Fonte: O autor.

Legenda: **A** - Representação esquemática do alinhamento múltiplo de seqüências de nucleotídeos as variantes alélicas do gene *bla_{ADC}* relacionados e agrupados no clado de interesse. Estão representadas as seqüências entre as posições 706 e 748, 967 e 981, 1021 e 1041 e a partir da posição 1144 até a extremidade 5' da seqüência consenso destas variantes alélicas do gene *bla_{ADC}*, indicadas em régua no topo. **B** - Representação esquemática da relação entre as variantes de ADC do clado de interesse e o seu alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos das variantes de ADC. Estão representadas a seqüências entre a posição 230 e 260 e da posição 320 à porção C-terminal (387) da seqüência de aminoácidos consenso indicada em régua no topo, onde são observadas alterações entre essas variantes de ADC. As alterações de nucleotídeos dos alelos de *bla_{ADC}* (A) e de aminoácidos na seqüência da proteína (B) estão destacados em branco. As regiões omitidas apresentaram completa identidade de nucleotídeos e aminoácidos -, ausência de nucleotídeos ou aminoácido (*gap*). Os nucleotídeos e aminoácidos idênticos entre as seqüências estão destacados com a mesma cor. Em A, destacado com linhas pontilhadas em vermelho, a duplicação na seqüência de nucleotídeos *in frame* que resulta na inserção da seqüência de aminoácidos Prolina(P)-Alanina(A)-Serina(S) nas variantes ADC-182 (A) e ADC-235.

5.2 Identificação de IS*Aba1* a montante *bla*_{ADC} nos isolados clínicos de *A. baumannii*

A partir da eletroforese dos produtos provenientes das reações de PCR para identificação de IS*Aba1/bla*_{ADC} foi possível observar que este elemento de inserção estava presente em todos os isolados clínicos representantes dos grupos ADC previamente citados e avaliados neste estudo, incluindo Ab07 (ADC-A), Acb_37 (ADC-B), Acb_16 (ADC-C) e Acb_41 (ADC-D), conforme evidenciado na Figura 9, sendo a cepa de *A. baumannii* ATCC® 19606™ da *American Type Culture Collection* o único isolado no qual essa correlação entre IS*Aba1/bla*_{ADC} não foi detectada pelos testes.

Figura 9 - Eletroforese dos produtos de PCR com oligonucleotídeos utilizados para detecção de IS*Aba1/bla*_{ADC}.



Fonte: O autor.

Legenda: M - Marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1 - *A. baumannii* ATCC® 19606™; 2 - AB07 (ADC-A); 3 - Acb_37 (ADC-B); 4 - Acb_16 (ADC-C); 5 - Acb_41 (ADC-D); 6 - Controle positivo da reação (Acb_40).

5.3 Predição da estrutura proteica terciária e identificação de domínios estruturais de interesse

As sequências de aminoácidos preditas para as quatro variantes alélicas de ADC apresentaram de 96,4% a 98,4% e 96,7% a 98,6% de identidade com a ADC-1 (cefalosporinase) e ADC-68 (carbapenemase), respectivamente, e de até 99,2% de identidade entre si, como observado para ADC-A e -B (Quadro 6).

Quadro 6 - Identidade e divergência entre as sequências de aminoácidos das variantes enzimáticas de ADC do presente estudo.

		Identidade (%)						
		ADC-A	ADC-B	ADC-C	ADC-D	ADC-158	ADC-68	ADC-1
Divergência (%)	ADC-A		99,2	98,4	97,5	97,8	96,7	96,4
	ADC-B	0,8		99,2	98,4	98,6	97,5	97,3
	ADC-C	0,6	0,8		97,8	98,1	97,0	96,7
	ADC-D	1,5	1,6	2,2		99,2	98,6	98,4
	ADC-158	1,2	1,4	1,9	0,8		98,9	98,6
	ADC-68	2,3	2,5	3,0	1,4	1,1		98,1
	ADC-1	3,8	2,7	3,3	1,6	1,4	1,9	

Fonte: O autor.

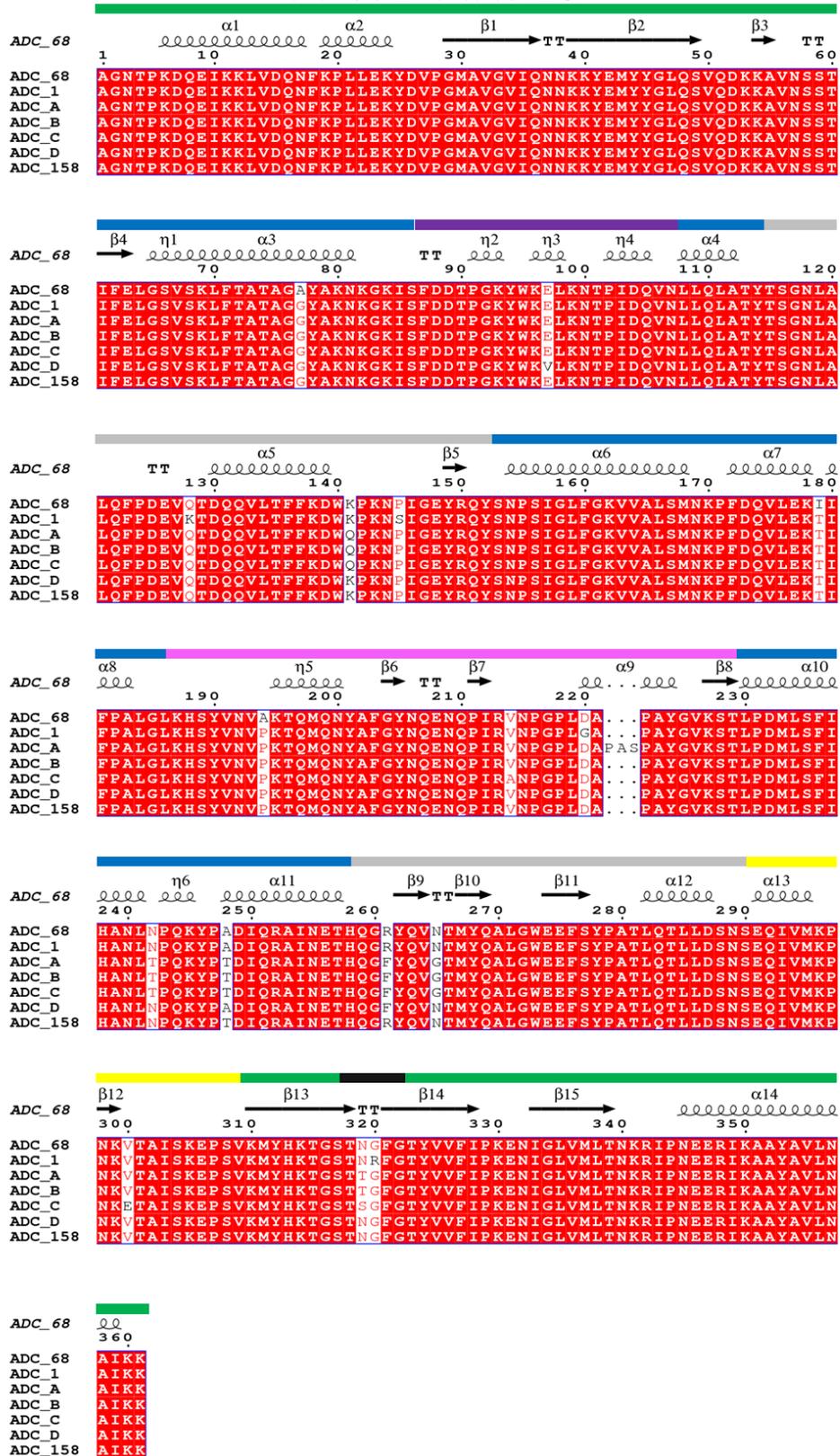
Legenda: Em azul, divisão gráfica da área referente à divergência e identidade entre as sequências.

Considerando as principais substituições de aminoácidos entre as variantes de ADCs estudadas e possivelmente envolvidas com a ampliação do espectro de atividade de ADC, as principais regiões de interesse e importância para o presente estudo, como o domínio de ligação e Ω -loop, foram identificadas e comparadas às variantes ADC-1 e ADC-68 (Figura 10).

A variante da enzima ADC-68 apresenta 98% de identidade com a sequência de aminoácidos da variante ADC-1. As principais substituições de aminoácidos encontradas na sequência da enzima ADC-68 em comparação com a ADC-1 foram: G77A, K128Q, S145P, T179I, P194A, G220D e R320G.

Demais substituições de aminoácidos na região do C-loop das variantes ADC-A (N319T); ADC -B (N319T) e ADC -C (N319S) foram observadas nas enzimas ADC-expressa pelos isolados clínicos de *A. baumannii*.

Figura 10 - Alinhamento e principais alterações de aminoácidos das sequências previstas para cada variante enzimática de ADC.



Fonte: O autor.

Legenda: Domínio 1 (verde); Domínio 2 (azul); P-loop (lilás); P2-loop (cinza); Ω-loop (rosa); R2-loop (amarelo); C-loop (preto). η - hélices 3_{10} . α-hélices exibidas como anotações. As fitas β estão representadas com setas e as voltas β com as letras TT.

5.4 Efeito das diferentes substituições de aminoácidos na atividade enzimática de ADC

A investigação dos possíveis efeitos funcionais ocasionados pelas substituições não sinônimas nas variantes de ADC do presente estudo, bem como as principais substituições de aminoácidos envolvidas a modificações e evolução funcional de ADC, foi realizada pelo algoritmo PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer*) e estão apresentados na Tabela 1.

A inserção de Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS), presente na região do Ω -loop da variante enzimática ADC-A, mostrou-se como aquela modificação da proteína mais provável de resultar em alteração funcional dessas variantes de ADC analisadas, apresentando *score* de até -10,30 para algumas variantes. As substituições P194A, G320R e D220G também apresentaram efeito deletério nas variantes enzimáticas avaliadas, apresentando *scores* de -7,89 e de até -7,95 e -5,80, respectivamente (Tabela 1).

Demais substituições com potencial efeito de alteração funcional de ADC e identificadas no P2-loop incluíram F261R e G265N. A substituição T179I, apresentou o menor *score* dentre as substituições potencialmente causadoras de alterações funcionais de ADC, com *scores* variando entre -3,59 e -3,29 (Tabela 1).

As substituições G77A, V97E, Q128K, P145S, A214V, T242N, T248A, E300V, T319N e S319N apresentaram-se como neutras, e assim, potencialmente não causadoras de alterações funcionais significativas das variantes de ADC avaliadas no presente estudo.

Para efeitos de comparação, os possíveis efeitos funcionais ocasionados pelas substituições de aminoácidos de ADC-68 estão demonstrados isoladamente na Tabela 2. As substituições simuladas de A77G, Q128K, P145S, I179T e A194P foram identificadas como não determinantes de alteração da atividade desta variante enzimática, sendo os motivos D220G e G320R da ADC-68 em comparação com ADC-1 as únicas substituições com potencial efeito sobre sua atividade.

Tabela 1 - Efeito potencial das modificações de aminoácidos para alteração funcional das variantes de ADC investigadas neste estudo.

Variante	G77A	V97E	Q128K	Q141K	P145S	T179I	P194A	A214V	D220G	A221_P222insPAS	T242N	T248A	F261R	G265N	E300V	T/S319N	G320R
ADC-A	-0.83	NA	-0.58	1.06	-0.28	-3.48	-7.89	NA	-5.80	NA	2.33	0.74	-4.70	-4.54	NA	3.9	-7.45
ADC-B	-0.91	NA	-0.55	0.79	-0.57	-3.34	-7.89	NA	-5.46	-10.15	2.37	0.74	-4.70	-4.54	NA	4.10	-7.45
ADC-C	-0.86	NA	-0.55	0.62	-0.87	-3.29	-7.89	3.78	-5.46	-10.15	2.33	0.74	-4.70	-4.54	4.25	2.50	-7.44
ADC-D	-0.99	1.78	-0.62	NA	-0.28	-3.58	-7.89	NA	-5.76	-10.30	NA	NA	-4.70	NA	NA	NA	-7.95
ADC-158	-1.09	NA	-0.58	NA	-0.23	-3.48	-7.89	NA	-5.46	-10.15	NA	0.74	NA	NA	NA	NA	-7.45

Fonte: O autor.

Nota: Potencial efeito que as modificações nas sequências de aminoácidos previstas para as variantes de ADC exercem sobre sua função. Análises realizadas a partir do algoritmo PROVEAN. Mutações deletérias, com *score* menor que -2.5 e destacadas em vermelho, foram definidas como aquelas cujos efeitos apresentam maior probabilidade de influenciar na função e/ou conduzir à inativação da sua função. Mutações neutras, com *score* maior que -2.5 e destacadas em verde, foram definidas aquelas cujos efeitos provavelmente não influenciam na função proteica. NA - não se aplica (aminoácidos provenientes da sequência proteica naturalmente expressa).

Tabela 2 - Potencial efeito das modificações simuladas na sequência de aminoácidos prevista para ADC-68 exercem sobre sua atividade enzimática.

Variante	A77G	Q128K	P145S	I179T	A194P	D220G	G320R
ADC-68	0.50	-0.45	-0.61	3.51	7.89	-5.46	-7.45

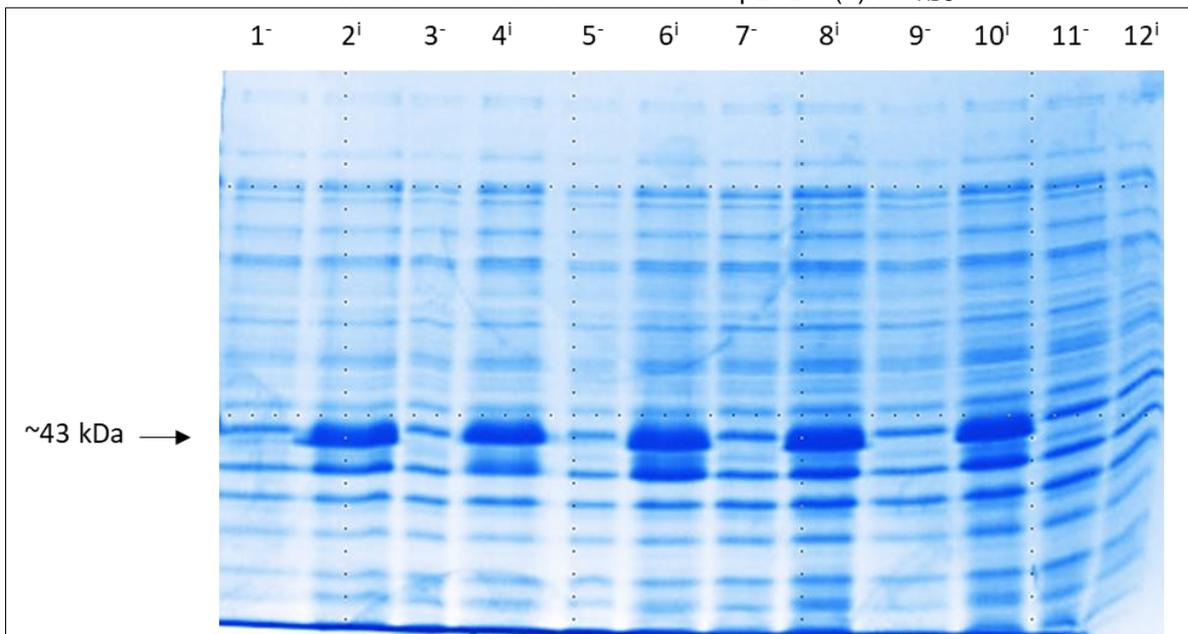
Fonte: O autor.

Nota: Potencial efeito das alterações de aminoácidos simuladas para a ADC-68 em comparação à ADC-1 Análises realizadas a partir do algoritmo PROVEAN. Mutações deletérias, com *score* menor que -2.5 e destacadas em vermelho, foram definidas como aquelas cujos efeitos apresentam maior probabilidade de influenciar na função. Mutações neutras, com *score* maior que -2.5 e destacadas em verde, foram definidas aquelas cujos efeitos provavelmente não influenciam na atividade enzimática.

5.5 Expressão das variantes de ADC em linhagem laboratorial de *Escherichia coli*

A expressão das variantes de ADC (A, B, C, D e ADC-158) e derivados clonados em vetor de expressão pET28a(+) pelas células hospedeiras *E. coli* BL21(DE3) foi confirmada por eletroforese em gel de poli(acrilamida) de extratos proteicos totais de culturas realizadas em mesmas condições de cultivo na presença e ausência de agente indutor. Os clones cuja expressão do fragmento clonado foi induzido apresentou banda mais intensa na altura correspondente a 43 kDa, esperado para o tamanho estimado de ADC, levando em consideração sua sequência de aminoácidos primária: ADC-A (43.38 kDa), ADC-B (43.12 kDa), ADC-C (43.11 kDa), ADC-D (43.15 kDa) e ADC-158 (43.16 kDa). A Figura 11 ilustra a expressão proteica total das cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com os diferentes clones pET28a(+):*bla*_{ADC} em SDS-PAGE.

Figura 11 - SDS-PAGE representativo do extrato proteico total das cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com os diferentes clones pET28a(+):*bla*_{ADC}.



Fonte: O autor.

Legenda: 1 e 2: pET28a(+):*bla*_{ADC-A}; 3 e 4: pET28a(+):*bla*_{ADC-B}; 5 e 6: pET28a(+):*bla*_{ADC-C}; 7 e 8: pET28a(+):*bla*_{ADC-D}; 9 e 10: pET28a(+):*bla*_{ADC-158}; 11 e 12: pET28a(+). -: extrato proteico total antes da adição de IPTG (pré-indução proteica); i: extrato proteico total após a adição de IPTG (pós-indução proteica); Seta preta: altura no gel de poli(acrilamida) correspondente à expressão das variantes enzimáticas de ADC com peso molecular aproximado de 43 kilodaltons.

5.6 Teste fenotípico-colorimétrico de hidrólise enzimática dos carbapenêmicos

Para a avaliação da capacidade de hidrólise aos carbapenêmicos, o *CarbAcineto* foi utilizado para testar as variantes de ADC expressas pelas cepas de *E. coli* BL21(DE3) quanto a sua capacidade de degradar imipenem, no entanto os testes resultaram negativos para presença de carbapenemase expressas pelas cepas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com as diferentes variantes alélicas de ADC deste estudo, permanecendo inalterada a coloração da solução com indicador teste. Ainda que fracamente, quando os isolados clínicos de *A. baumannii* foram testados pelo *CarbAcineto* pode-se observar conversão da coloração do indicador de pH da solução, indicando acidificação pela hidrólise do imipenem. Vale ressaltar que todos os isolados clínicos de *A. baumannii* listados estudados nesse estudo carregavam também genes adquiridos para outras betalactamases do tipo OXA-carbapenemase responsável pela hidrólise do imipenem.

5.7 Teste fenotípico da hidrólise enzimática de betalactâmicos: *CIMplus*

O teste fenotípico de hidrólise enzimática *CIMplus* foi realizado a partir do extrato proteico total das cepas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o pET28a(+) contendo as variantes *bla*_{ADC} e suas respectivas correspondentes modificadas com os possíveis motivos observados em ADC-68, estando os resultados descritos na Tabela 3.

Os resultados foram sugestivos da atividade de betalactamase de espectro estendido e carbapenemase presente no extrato proteico total de todas as cepas de *E. coli* BL21(DE3) que expressavam as variantes ADC-A, -B, -C, -D, -68 e -158, além de suas variantes construídas ADC-158-T179I, -P194A e -T179I/P194A (Tabela 3 e Figura 12) evidenciado pela redução do diâmetro do halo de inibição de crescimento da cepa de *E. coli* ATCC[®] 25922[™], desprovida de betalactamases, em relação a todas as cefalosporinas de 1^a, 3^a e 4^a geração testadas, penicilina de largo espectro, imipenem e meropenem.

O extrato proteico total da cepa *E. coli* BL21(DE3) transformada somente com o vetor de expressão pET28a(+), desprovida de *bla*_{ADC} permitiu a inibição do crescimento de *E. coli* ATCC[®] 25922[™] resultando em formação de halos com diâmetro que variaram de 17 a 34 mm pela cefalotina (17 mm), ceftriaxona (32 mm),

ceftazidima (28 mm), cefepima (34 mm), imipenem (30 mm), meropenem (30 mm) e piperacilina/tazobactam (26 mm), enquanto os extratos proteicos de culturas que expressavam as variantes ADC-A, -B, -C, -D, -68 e -158, além de suas variantes construídas ADC-158-T179I, -P194A e -T179I/P194A foram capaz de inibir os mesmos betalactâmicos testados e permitiu o crescimento da *E. coli* ATCC® 25922™ sem a formação de halo de inibição (6 mm de diâmetro correspondente ao diâmetro do disco). (Tabela 3 e Figura 12).

As substituições D220G ou G320R de forma isoladas ou combinada D220G/G320R, em todas as variantes naturais de ADC (ADC-A, -B, -C, -D, -158 e -68) resultou em incapacidade em inibir a maioria dos betalactâmicos testados pela metodologia *CIMplus*. Com exceção da cefalotina (6 mm), os halos de inibição do crescimento da *E. coli* ATCC® 25922™ produzidos pela ceftriaxona (30-32 mm), ceftazidima (25-31 mm), cefepima (30-36 mm), imipenem (29-31 mm), meropenem (26-31 mm) e piperacilina/tazobactam (24-29 mm) testadas com o extrato total de cada uma dessas variantes de ADC modificadas na posição 220 e 320 (D220G, G320R e D220G/G320R) apresentaram dimensões comparáveis àqueles produzidos pela cepa *E. coli* BL21(DE3) transformadas somente com o pET28a(+) e utilizada como controle negativo neste teste. Essas observações indicam a perda e/ou redução da capacidade de hidrólise desses betalactâmicos por essas variantes enzimáticas modificadas frente a todas as cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações testadas, penicilina de largo espectro e carbapenêmicos, ressaltando a importância desses motivos para a atividade enzimática de ADC contra esses antimicrobianos, conforme demonstrado na Tabela 3.

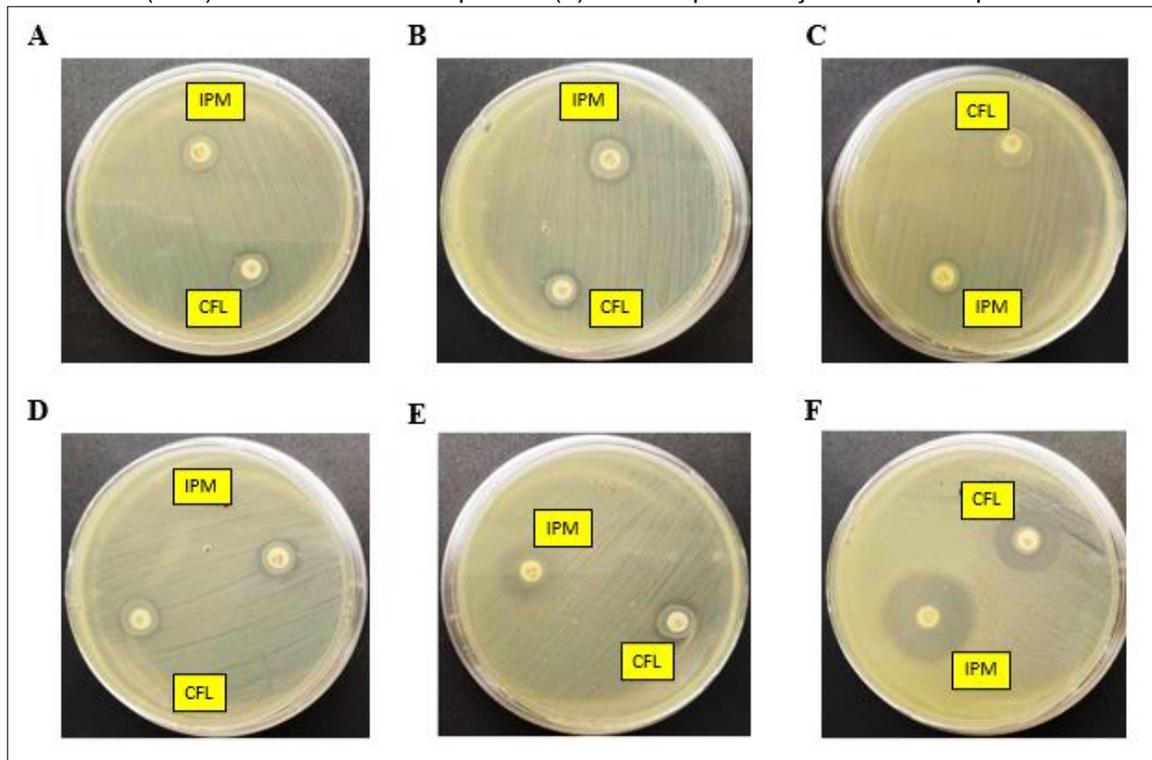
Tabela 3 - Teste fenotípico para detecção de hidrólise e inativação *in vitro* de antimicrobianos da classe dos betalactâmicos pelo método *CIMplus* realizado para os transformantes de *E. coli* BL21 (DE3) com as diferentes variantes alélicas de *bla_{ADC}* (pET28a(+):*bla_{ADC}*).

Cepa de <i>E.coli</i> BL21(DE3)	CFL	CRO	CAZ	CPM	IPM	MER	PIP/TAZ
pET28a(+)	17	32	28	34	30	30	26
ADC-A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-A T179I	6	6	6	6	6	6	6
ADC-A P194A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-A T179I/P194A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-A D220G	6	32	28	35	29	29	28
ADC-A G320R	6	33	29	36	29	29	27
ADC-A D220G/G320R	6	32	28	34	30	30	26
ADC-B	6	6	6	6	6	6	6
ADC-B T179I	6	6	6	6	6	6	6
ADC-B P194A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-B T179I/P194A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-B D220G	6	31	30	32	30	30	29
ADC-B G320R	6	30	31	31	30	29	28
ADC-B D220G/G320R	6	30	29	33	29	31	28
ADC-C	6	6	6	6	6	6	6
ADC-C T179I	6	6	6	6	6	6	6
ADC-C P194A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-C T179I/P194A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-C D220G	6	31	29	34	29	29	28
ADC-C G320R	6	32	30	33	30	29	29
ADC-C D220G/G320R	6	32	29	34	29	31	27
ADC-D	6	6	6	6	6	6	6
ADC-D T179I	6	6	6	6	6	6	6
ADC-D P194A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-D T179I/P194A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-D D220G	6	30	30	33	30	29	27
ADC-D G320R	6	31	29	32	29	30	26
ADC-D D220G/G320R	6	31	29	33	29	30	26
ADC-68	6	6	6	6	6	6	6
ADC-68 G320R	6	31	26	30	29	29	26
ADC-68 D220G	6	30	26	31	28	28	25
ADC-68 D220G/G320R	6	30	25	31	29	26	24
ADC-158	6	6	6	6	6	6	6
ADC-158 T179I	6	6	6	6	6	6	6
ADC-158 P194A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-158 T179I/P194A	6	6	6	6	6	6	6
ADC-158 D220G	6	31	27	31	30	29	26
ADC-158 G320R	6	30	28	30	31	29	27
ADC-158 D220G/G320R	6	30	26	30	29	29	25

Fonte: O autor.

Nota: CFL: Cefalotina (30 µg); CRO; ceftriaxona (30 µg); CAZ: ceftazidima (30 µg); CPM: cefepima (30 µg); IPM: imipenem (10 µg); MER: meropenem (10 µg); PIP/TAZ: piperacilina/tazobactam (100/10 µg). Resultados expressos em milímetros (mm) representam a leitura do diâmetro do halo medido no teste de sensibilidade aos antimicrobianos pela técnica de Kirby-Bauer (disco-difusão). A total inibição do crescimento da cepa teste é medido como 6 mm, correspondente ao diâmetro do disco de antimicrobiano.

Figura 12 - Teste *CIMplus* para detecção de atividade de carbapenemase das linhagens de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET28a(+):ADCs após indução de síntese proteica.



Fonte: O autor.

Legenda: Teste *CIMplus* para detecção de atividade de carbapenemase das linhagens de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET28a(+):ADCs após indução de síntese proteica. Os discos foram incubados com o extrato proteico total de cada linhagem transformante e incubados por 3 horas (temperatura ambiente), sendo testados frente cepa não produtora de carbapenemase (*E. coli* ATCC® 25922™). Crescimento da cepa em contato com o disco representa atividade enzimática. A- *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+):ADC-A; B- *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+):ADC-B; C- *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+):ADC-C; D- *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+):ADC-D; E- *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+):ADC-158; F- *E. coli* BL21(DE3):pET28a(+) (controle negativo de expressão de ADC). IPM- Disco-teste contendo imipenem (10µg); CFL- Disco-controle contendo cefalotina (30µg) (cefalosporina de 1ª geração, substrato de ADC betalactamase).

5.8 Concentração inibitória mínima de betalactâmicos contra linhagens transformantes de *Escherichia coli* expressando as variantes de *bla*_{ADC}

Os testes de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos foram realizados em triplicata nas cepas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o pET28a(+) contendo as variantes naturais de *bla*_{ADC} e aquelas modificadas com os respectivos motivos observados em ADC-68. Os valores obtidos de concentração inibitória mínima (CIM) para cada um dos antimicrobianos testados estão apresentados na Tabela 4.

Os resultados evidenciaram que as cepas de *E. coli* expressando as diferentes variantes enzimáticas de ADC apresentaram elevada resistência às cefalosporinas de

1ª geração quando comparadas às cepas de *E. coli* desprovidas de *bla*_{ADC}, obtendo valores de CIM maior que 64 µg/mL para cefalotina.

As cepas expressando as variantes enzimáticas ADC-A, -B e -68 apresentaram mesma CIM para a maioria das cefalosporinas de 1ª, 3ª e 4ª gerações e carbapenêmicos avaliados, com exceção de ceftazidima e ceftriaxona, cuja cepa produtora de ADC-A apresentou CIM ligeiramente mais elevado para estes antimicrobianos.

A cepa expressando a variante enzimática ADC-A apresentou aumento da CIM em 32, 16, e 4 vezes em relação a ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona, respectivamente, além do aumento de pelo menos 2 vezes o valor da CIM para imipenem quando comparado à cepa de *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a(+):*bla*_{ADC-158}.

A substituição de T179I em ADC-A foi capaz de reduzir em pelo menos 128 e 16 vezes os valores de CIM para cefotaxima e ceftazidima, respectivamente, enquanto a substituição P194A na mesma variante reduziu em 4 vezes os valores de CIM para as mesmas cefalosporinas de 3ª geração anteriormente citadas. Quando presentes concomitantemente em ADC-A, as substituições T179I e P194A reduziram em pelo menos 128 e 32 vezes a CIM para cefotaxima e ceftazidima, respectivamente. Nenhuma das substituições presentes de maneira isolada ou simultânea provocou alterações na MIC para ceftriaxona e meropenem, no entanto, discretas alterações foram evidenciadas em relação à cefepima e imipenem.

A substituição isolada ou combinada de D220G e G320R em ADC-A reduziu consideravelmente a CIM das cepas transformantes de *E. coli* para todas as cefalosporinas avaliadas, com exceção da cefalotina (1ª geração), demonstrando redução de pelo menos 128, 16, 64 e 2 vezes os valores da CIM para cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e cefepima, respectivamente. Discretas alterações no valor da CIM foram também evidenciadas em relação ao imipenem considerando ambas ou cada uma das substituições isoladamente.

A ADC-158, codificada pela cepa de *A. baumannii* ATCC® 19606™ conferiu valores CIM iguais à ADC-A e ADC-68 para cefalotina e cefepima nas cepas de transformantes de *E. coli*, no entanto, apresentou variações de 16, 32 e 4 vezes em relação a cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona, respectivamente, além de CIM pelo menos duas vezes menor em relação ao imipenem (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de concentração inibitória mínima de antimicrobianos da classe dos betalactâmicos para as cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) expressando as variantes de ADC.

<i>E.coli</i> BL21(DE3)	AMP/SUB	CFL	CTX	CAZ	CFX	CPM	MER	IPM
pET28a(+)	0,5	2	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	0,125	≤0,312	≤0,0625
ADC-A	2	>64	8	2	4	0,125	≤0,312	0,125
ADC-A T179I	2	>64	≤0,0625	0,125	4	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-A P194A	2	>64	2	0,5	4	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-A T179I/P194A	2	>64	≤0,0625	0,0625	4	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-A D220G	2	>64	≤0,0625	0,6	≤0,0625	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-A G320R	2	>64	≤0,0625	0,125	≤0,0625	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-A D220G/G320R	1	>64	≤0,0625	0,125	≤0,0625	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-B	2	>64	2	0,5	1	0,125	≤0,312	≤0,0625
ADC-B T179I	2	>64	≤0,0625	≤0,0625	0,5	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-B P194A	2	>64	0,5	0,125	1	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-B T179I/P194A	2	>64	≤0,0625	≤0,0625	0,5	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-B D220G	2	>64	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-B G320R	2	>64	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-B D220G/G320R	0,5	>64	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-68	2	>64	8	1	4	0,125	≤0,312	0,125
ADC-68 D220G	2	>64	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-68 G320R	2	>64	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-68 D220G/G320R	0,5	>64	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,312	≤0,0625
ADC-158	2	>64	0,5	≤0,0625	1	0,125	≤0,312	≤0,0625

Fonte: O autor.

Nota: AMP/SUB: Ampicilina/sulbactam; CFL: cefalotina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CFX: ceftriaxona, CPM: cefepima, MER: meropenem; IPM: imipenem. Resultados expressos em µg/ml.

5.9 Hidrólise enzimática de imipenem pelas variantes de ADC

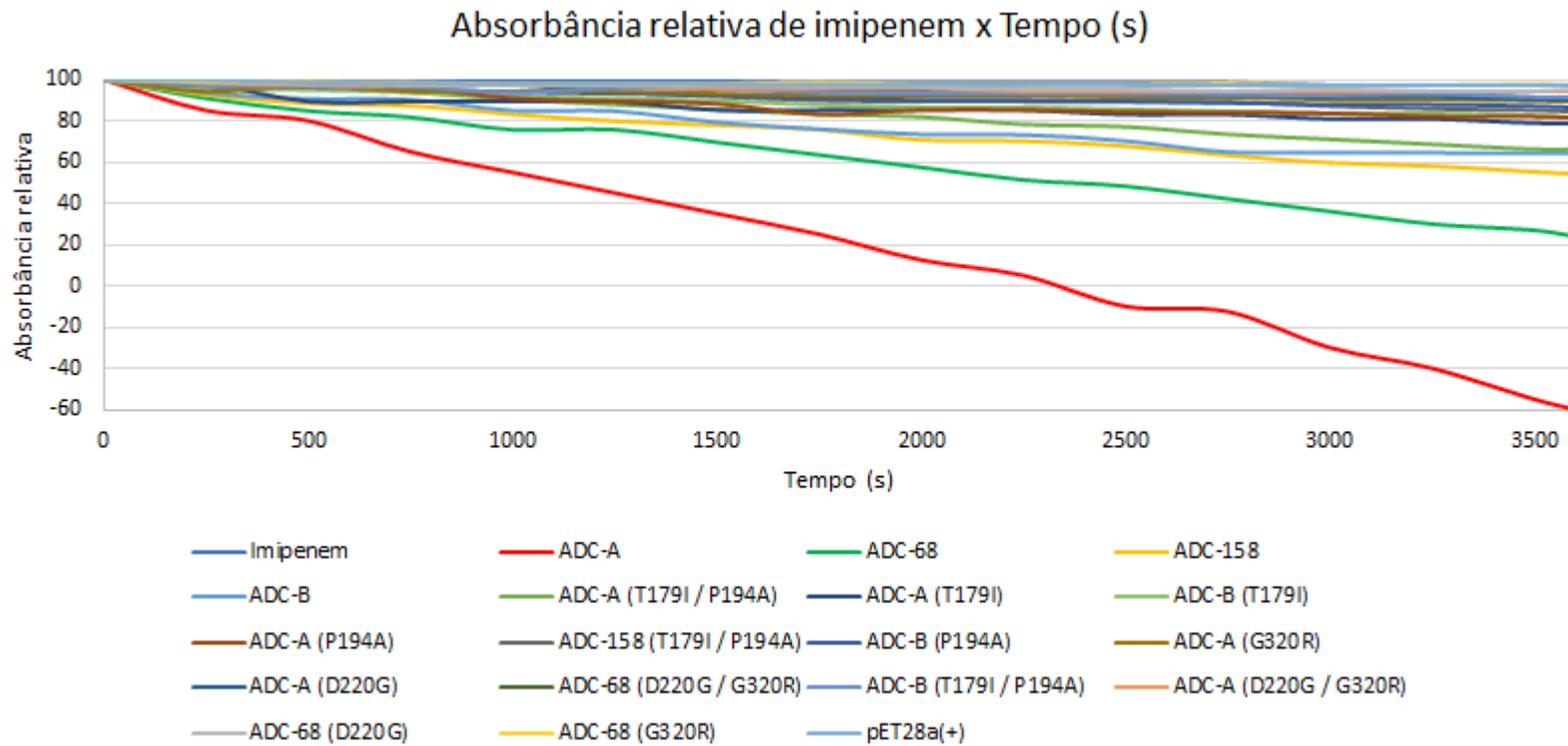
Os testes espectrofotométricos de hidrólise do imipenem pelas variantes enzimáticas de ADC foram realizados para o extrato proteico bruto das cepas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET28a(+) que expressam as variantes alélicas de *bla*_{ADC-A}, *bla*_{ADC-B}, *bla*_{ADC-158}, *bla*_{ADC-68} e aquelas derivadas por modificadas com os motivos relativos a variante ADC-68.

As variantes ADC-A e ADC-68 apresentaram as mais pronunciadas diferenças entre a absorbância final e inicial do imipenem no decorrer do tempo de monitoramento da hidrólise da droga em espectrofotômetro. Quando comparadas entre elas, a variante enzimática ADC-A apresentou maior velocidade no declínio da absorbância do imipenem, indicando uma capacidade aumentada em degradar o imipenem quando comparada com a variante ADC-68, dita carbapenemase e capaz de hidrolisar este antimicrobiano. As substituições de aminoácidos de ADC-A T179I, P194A, T179I/P194A testadas resultaram em atenuação na variação de absorbância do imipenem e possivelmente diminuição de sua capacidade de hidrólise (Gráfico 2).

O maior impacto na diferença de absorbância no teste de hidrólise do imipenem foi observado para as substituições D220G, G320R e D220G/G320R de ADC-A, bem como de ADC-68. A variante enzimática ADC-68, apresentou decaimento significativo em sua capacidade de hidrólise quando as substituições D220G e G320R foram feitas, de maneira isolada ou em combinação, indicando papel chave desses resíduos na hidrólise de imipenem e que alterações em qualquer um dos dois são suficientes para reverter a capacidade de hidrólise do imipenem.

A variante enzimática natural ADC-B provocou um decaimento da absorbância do imipenem de velocidade intermediária quando comparada às demais testadas, e análoga a variante ADC-158. Nestas duas variantes, as substituições T179I/P194A isoladas ou em combinação resultaram em significativa diminuição na velocidade de decaimento da absorbância do imipenem.

Gráfico 2 - Degradação do imipenem e decaimento de sua absorbância em função do tempo de exposição às variantes enzimáticas de ADC selecionadas.



Fonte: O autor.

Legenda: Representação gráfica da correlação entre a degradação do imipenem (% absorbância, eixo Y) realizada com os extratos proteicos totais das cepas transformantes de *E. coli* BL21(DE3) após indução proteica em função do tempo (em segundos, eixo X).

5.10 Ponto isoelétrico teórico (pI) das variantes enzimáticas de ADC

A determinação do ponto isoelétrico das variantes enzimáticas de ADC demonstrou que as variações de aminoácidos presentes nessas enzimas, bem como as diferentes substituições isoladas e combinadas de T179I e P194A e D220G e G320R, produzem sutis variações no ponto isoelétrico enzimático, conforme demonstrado na Tabela 5.

As substituições T179I e P194A não foram capazes de alterar os valores de ponto isoelétrico estabelecidos em nenhuma das variantes enzimáticas de ADC avaliadas neste estudo, enquanto as substituições D220G e G320R foram responsáveis pelo aumento de até 0,07 e 0,06 nestes valores, respectivamente, quando presentes de maneira isolada, e de até 0,12 quando presentes de maneira simultânea nestas variantes (Tabela 5).

Tabela 5 - Ponto isoelétrico (pI) das variantes enzimáticas de ADC.

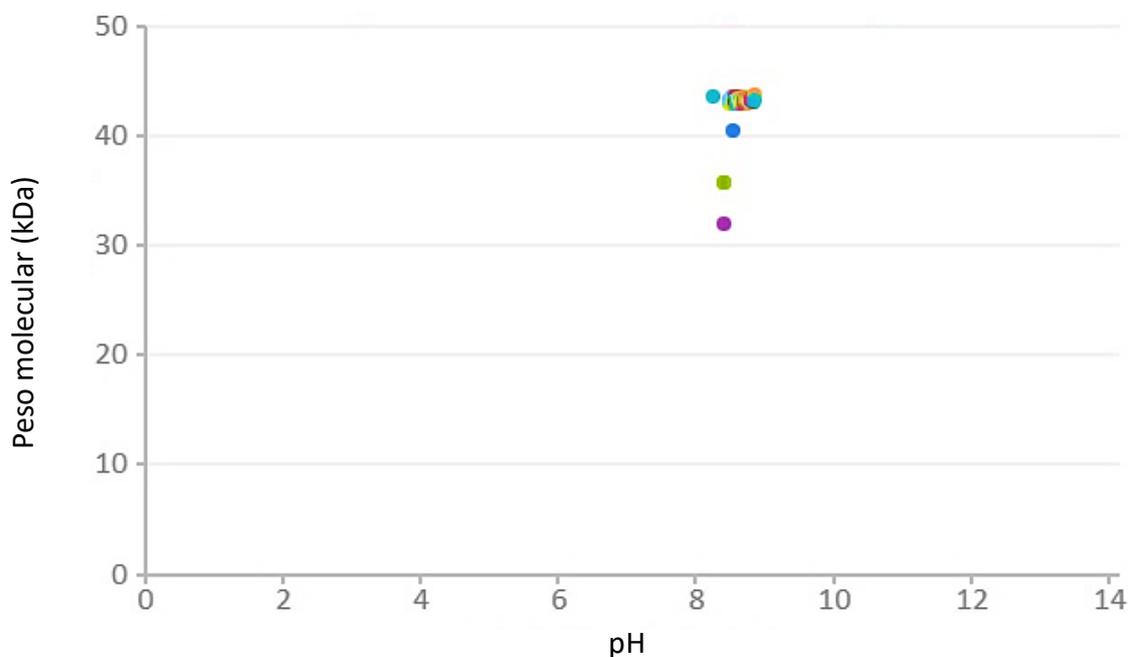
Variante enzimática	Nativa	T179I	P194A	T179I/P194A	D220G	G320R	D220G/G320R
ADC-A	8,61	8,61	8,61	8,61	8,66	8,66	8,71
ADC-B	8,61	8,61	8,61	8,61	8,66	8,66	8,71
ADC-C	8,54	8,54	8,54	8,54	8,61	8,60	8,66
ADC-D	8,70	8,70	8,70	8,70	8,75	8,75	8,80
ADC-158	8,70	8,70	8,70	8,70	8,75	8,75	8,80

Fonte: O autor.

Nota: Ponto isoelétrico (pI) das variantes enzimáticas de ADC obtidos a partir do algoritmo IPC - *Isoelectric Point Calculator* a partir da equação de Henderson-Hasselbach, utilizando diferentes conjuntos de pKa. As principais betalactamases utilizadas como controle de acurácia do teste e respectivos valores de pI calculados incluíram: ADC-68 (9,40), TEM-1 (5,49), TEM-2 (5,62), SHV-1 (7,63).

Outras pequenas alterações nos valores de ponto isoelétrico obtidos para cada uma das variantes enzimáticas avaliadas no presente estudo foram observadas quando comparados às 237 variantes enzimáticas de ADC depositadas no banco de dados *Beta-Lactamase Data Base* (<http://www.bldb.eu>), cujo ponto isoelétrico (pH) variou entre 8,39 e 8,84 (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Representação dos valores de ponto isoelétrico das variantes enzimáticas de ADC do presente estudo e aquelas depositadas no banco de dados *Beta-Lactamase Data Base*.



Fonte: O autor.

Legenda: Os pontos de diferentes colorações representam as diferentes variantes de ADC, distribuídas graficamente considerando os valores de focalização isoelétrica das variantes enzimáticas de ADC em função do peso molecular das mesmas em kDa. Os pontos isolados e destacados em azul claro, azul escuro, verde e lilás representam as ADC-C21, -33, -P1 e -69 e -71, respectivamente, cujas apenas seqüências parciais foram depositadas na base de dados *Beta-Lactamase Data Base*.

5.11 Modelagem estrutural e ensaio *in silico* de interação de ADC com ligantes betalactâmicos

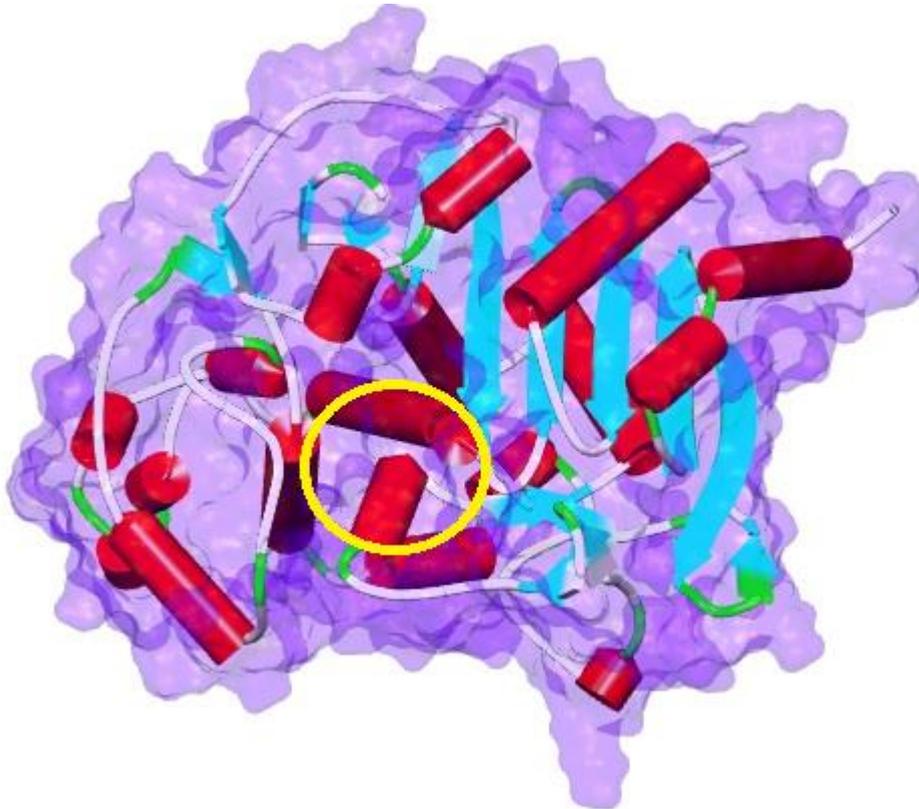
Diante a diferença na capacidade de hidrólise do imipenem demonstrada em teste espectrofotométrico e da estreita relação e semelhança entre as variantes ADC-A e ADC-B, que diferem unicamente quanto a inserção Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS), essas variantes foram selecionadas para estudo de modelagem computacional de suas estruturas e quando a capacidade de interação com os carbapenêmicos imipenem e meropenem.

5.11.1 Características e propriedades estruturais

A predição da estrutura geral de ADC-A e -B apresentou semelhanças tridimensionais às demais AmpCs, compreendendo os domínios característicos α -

helicoidal em um lado da molécula (Figura 13, à esquerda) e o domínio α/β no outro (Figura 13, à direita). O sítio ativo enzimático encontra-se no centro da enzima, localizado na borda esquerda da fita β (Figura 13).

Figura 13 - Representação da estrutura proteica geral de ADC de *Acinetobacter baumannii*.



Fonte: O autor.

Legenda: Estrutura proteica geral terciária de ADC de *Acinetobacter baumannii*. α -hélices representadas em vermelho; folhas β representadas em azul e a região do sítio ativo enzimático destacada em amarelo. A superfície proteica está representada em lilás. Domínio α -helicoidal localizado à esquerda da imagem e o domínio α/β à direita.

A predição do tamanho médio da cavidade do sítio ativo enzimático demonstrou mudanças consideráveis no tamanho da cavidade do sítio ativo predito para as diversas variantes enzimáticas de ADC, além de mudanças conformacionais que podem estar relacionadas a uma melhor acomodação da molécula de imipenem na ADC-A em relação às demais variantes enzimáticas de ADC.

As substituições T179I e P194A foram responsáveis pela variação de até 13 Å do tamanho da cavidade do sítio ativo em ADC-A, reduzindo esta de 537 Å para 531

e 524 Å, respectivamente, quando presentes de maneira isolada. A dupla substituição T179I/P194A reduziu o tamanho da mesma cavidade para 523 Å. As substituições D220G e G320R foram as que mais alteraram o tamanho cavitário, compreendendo variações de até 310 Å em relação à mesma enzima em sua constituição nativa (Tabela 6).

A mesma relação entre as substituições de aminoácidos e diminuição do volume cavitário foi observada também para ADC-B. A dupla substituição T179I/P194A reduziu o tamanho da cavidade do sítio ativo de 353 Å para 347 Å, enquanto a dupla substituição D220G/G320R foram as que mais alteraram o tamanho da cavidade do sítio ativo para esta variante, compreendendo alterações de até 157 Å (Tabela 6).

A inserção de Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS), presente na região do Ω -loop da variante enzimática ADC-A, foi responsável pelo aumento do tamanho da cavidade do sítio ativo em 184 Å, considerando os dados preditos e observados em ADC-A e ADC-B em suas constituições nativas (Figura 14).

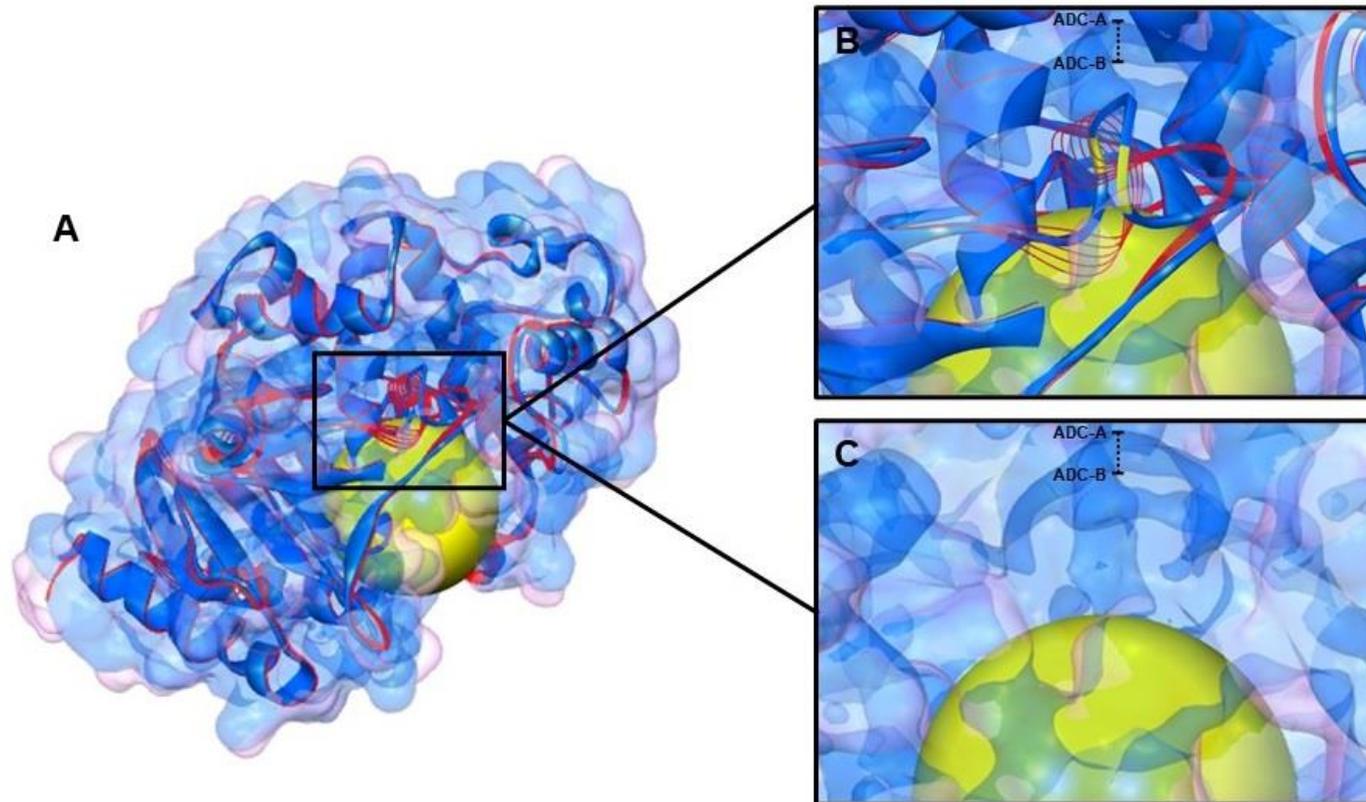
Tabela 6 - Predição do tamanho médio da cavidade do sítio ativo enzimático entre as diferentes variantes de ADC

Variante enzimática ADC	Tamanho estimado da cavidade (Å)	Energia ¹ (kcal/mol)	Coordenadas (X;Y;Z)
A	537	-6,8	-19,622; 9,612; 33,345
A (T179I)	531	-6,6	-20,610; 8,972; 33,691
A P194A	524	-6,3	-16,431; 13,244; 30,491
A (T179I/P194A)	523	-5,7	-14,492; 13,512; 28,420
B	353	-5,8	-8,480; -16,365; 1,572
B (T179I)	352	-5,5	-9,316; -12,203; 3,660
B P194A	348	-5,5	-9,137; -12,190; 3,616
B (T179I/P194A)	347	-5,3	-9,106; -12,190; -3,478
A G320R	272	-4,6	-10,202; -13,009; 5,285
A D220G/G320R	229	-5,4	-10,237; -12,771; 10,744
A D220G	227	-4,4	-11,064; -12,683; 5,908
B D220G	214	-4,2	-8,150; -12,790; 10,893
B G320R	199	-4,6	7,912; -16,309; -1,723
B (D220/G320R)	196	-5,1	-8,672; -14,052; 2,0542

Fonte: O autor.

Nota: Tamanho médio da cavidade enzimática predito a partir do algoritmo *CB-dock* após identificação das coordenadas espaciais mais prováveis de ligação entre os modelos proteicos *.pdb* preditos por algoritmo *Swiss-Model* e a molécula de imipenem (DB01598), considerando os complexos de menor energia livre e classificados como de mais provável ocorrência, determinados em *AutoDock Vina* (<http://vina.scripps.edu/>). ¹ - energia livre de ligação, considerando o modelo de estrutura molecular predita que apresentou interação mais favorável com a molécula de imipenem.

Figura 14 - Sobreposição das estruturas e superfícies proteicas de ADC-A e ADC-B.



Fonte: O autor.

Legenda: **A:** sobreposição geral das estruturas terciárias e superfícies proteicas das variantes enzimáticas ADC-A (em azul) e ADC-B (em vermelho). **B:** sobreposição das estruturas e superfícies proteicas de ADC-A e ADC-B com destaque para a inserção de Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS) em ADC-A (localizada entre aminoácidos destacados em amarelo) e variação conformacional da cavidade formada. **C:** sobreposição das superfícies proteicas de ADC-A e ADC-B com destaque para variação conformacional da cavidade formada. Esfera amarela representa cavidade do sítio ativo enzimático.

5.11.2 Ensaios *in silico* de interação molecular de ADC-A e ADC-B com carbapenêmicos

Os resultados dos ensaios de interação *in silico* predizem um padrão de diferentes estabelecidas de forma distinta entre os resíduos presentes nas variantes enzimáticas de ADC-A e -B em relação ao meropenem e imipenem, considerando os modelos receptor-ligante com menor energia livre de ligação preditos para cada uma destas.

A inserção de Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS) na região do Ω -loop da variante enzimática ADC-A apresentou-se como responsável por alterações significativas em sua estrutura proteica tridimensional. Para esta variante, foi observado que a presença adicional de Pro-Ala-Ser causa a interrupção de formação da hélice $\alpha 9$, resultando em uma ampliada conformação da cavidade de seu sítio ativo e favorecendo a interação de diferentes aminoácidos com a molécula dos carbapenêmicos imipenem e meropenem aqui testados, quando comparada à ADC-B, que difere de ADC-A pela ausência dessa inserção de aminoácidos (Figura 15 A e B).

Observa-se que a molécula de imipenem interage com ADC-A através da formação de sete possíveis ligações de hidrogênio envolvendo Ser66, Gln122, Asn154, Asn215, Asp220, Thr319, Arg342 (Figura 15 C). O resíduo Asp220 demonstrou carga molecular atrativa ao radical R2, enquanto Arg342 estabeleceu ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico, alvo para o ataque nucleofílico pela Ser64 desprotonada de acordo com o mecanismo canônico de hidrólise do anel betalactâmicos o mediada por serino-betalactamases. As demais interações observadas incluem a ligação entre o radical R1 do imipenem e Gln122, além de interações do tipo van der Waals preditas para importantes resíduos como Lys69, Leu121, Val214, Pro216, Gly217, Tyr152 e Ser317 (Figura 16).

Diferenças entre resíduos de interação foram evidenciados em ADC-A contendo as modificações T179I e P194A isolada ou simultaneamente. A ligação de hidrogênio entre o resíduo Ser66 e a molécula de imipenem manteve-se conservada em ADC-A T179I, ADC-A P194A e ADC-A T179I/P194A. Alterações no perfil de interação foram observadas em relação ao resíduo Arg342, para o qual, em ADC-A contendo as modificações T179I e P194A isoladas ou simultâneas, o mesmo perde interação com o oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico e passa a formar

ligação de hidrogênio com os átomos de oxigênio ligados ao carbono 3 da molécula de imipenem.

Em ADC-A D220G, Glu291 apresentou-se como o principal resíduo de interação com o sítio R2 de imipenem, enquanto Arg342, assim como predito para ADC-A T179I e P194A, é posicionado distante do oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico que possivelmente perde essa interação e passa a formar ligação com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 3 da molécula de imipenem. Ligações convencionais de hidrogênio foram observadas unicamente para o resíduo Ser317 com o oxigênio ligado ao carbono 6 da molécula de imipenem. Demais resíduos como Ser66, Gln122, Tyr152 e Asn154 foram observados exercendo ligação de van der Waals. A substituição simultânea de D220G e G320R em ADC-A reduziu significativamente o número e intensidade de ligações estabelecidas entre esta variante enzimática e a molécula de imipenem. Ligações de hidrogênio foram observadas exclusivamente para Arg342 com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 3 da molécula de imipenem, enquanto Glu346 apresentou-se como único resíduo de interação com a porção R2 do antimicrobiano, conforme observado também em ADC-A G320R.

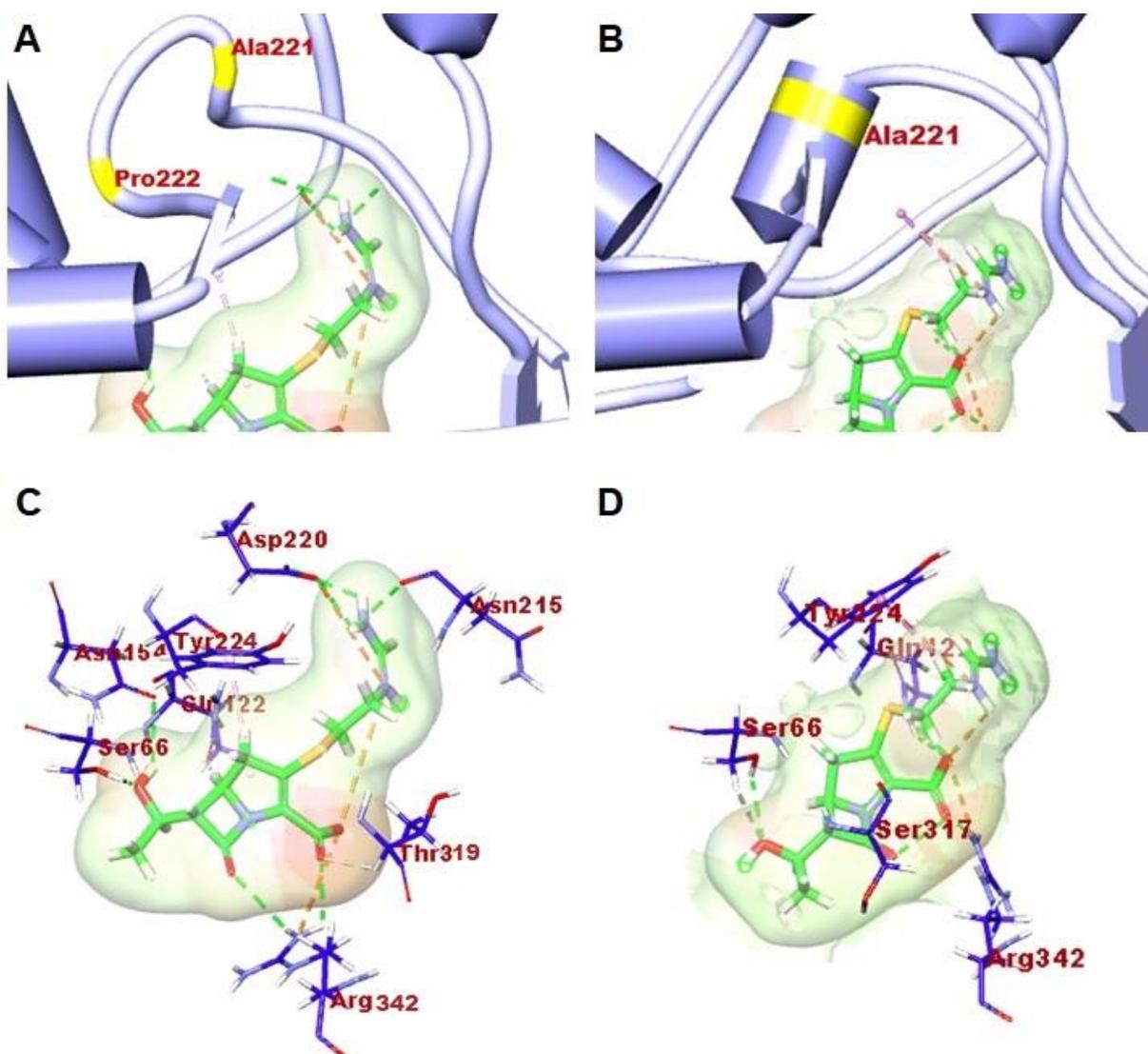
Em ADC-B, os resultados da simulação de interação molecular com o imipenem sugerem que esta interage com a molécula de imipenem através da formação de cinco ligações de hidrogênio principais formadas por Ser66, Gln122, Tyr224, Arg342 e Ser317, sendo este último estabelecendo interação com o oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico (Figura 15 D). O resíduo Tyr244 apresentou-se como resíduo de interação com a cadeia R2 do imipenem. Gly65, Lys69, Tyr152 e Asn154 demonstraram interação a partir de ligações de hidrogênio em diferentes regiões da molécula do antimicrobiano. Adicionalmente, interações do tipo van der Waals foram observadas nos resíduos Gly65, Lys69, Tyr152, Asn154, Thr319, dentre outros, conforme representado na Figura 16.

Em ADC-B T179I, ligações de hidrogênio foram preditas para o modelo de menor energia livre em Ser66, Gln122, Asn154 e Glu291, estando este último interagindo com o radical R2 do antimicrobiano e Gln122 estabelecendo interação com o oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico de imipenem. Diferentemente do observado em ADC-B T179I, em ADC-B P194A o resíduo Asn154 exerce interação com a molécula de imipenem através ligações de van der Waals. Em ambos os modelos ADC-B T179I e P194A, Ser317 aparece estabelecendo ligação de

hidrogênio com o carbono 5, de localização oposta ao carbono 3. Os principais resíduos de interação entre imipenem e ADC-B contendo ambas as modificações T179I e P194A foram Ser66, Tyr152, Asn154, Ser317 e Arg342, para os quais foram preditas interações a partir de diferentes ligações de hidrogênio, estando Ser317 estabelecendo interação com o oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico.

Em ADC-B D220G, ligações de hidrogênio foram observadas para Arg342 com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 3 da molécula de imipenem, enquanto, em ADC-B G320R, este mesmo resíduo foi predito com possível interação com o oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico. Os resíduos conservados de Ser66, Asn154 demonstraram-se exercendo interações de van der Waals, enquanto Ser317 foi predita como realizando ligação com o oxigênio relacionado ao carbono 6 da molécula de imipenem. Em ADC-B contendo ambas as substituições D220G/G320R citadas, Tyr152 e Asn289 foram os únicos resíduos que apresentaram interação com o radical R2 de imipenem. Resíduos catalíticos conservados como Ser66 e Asn154 apresentaram as mesmas interações preditas e descritas para ADC-B G320R.

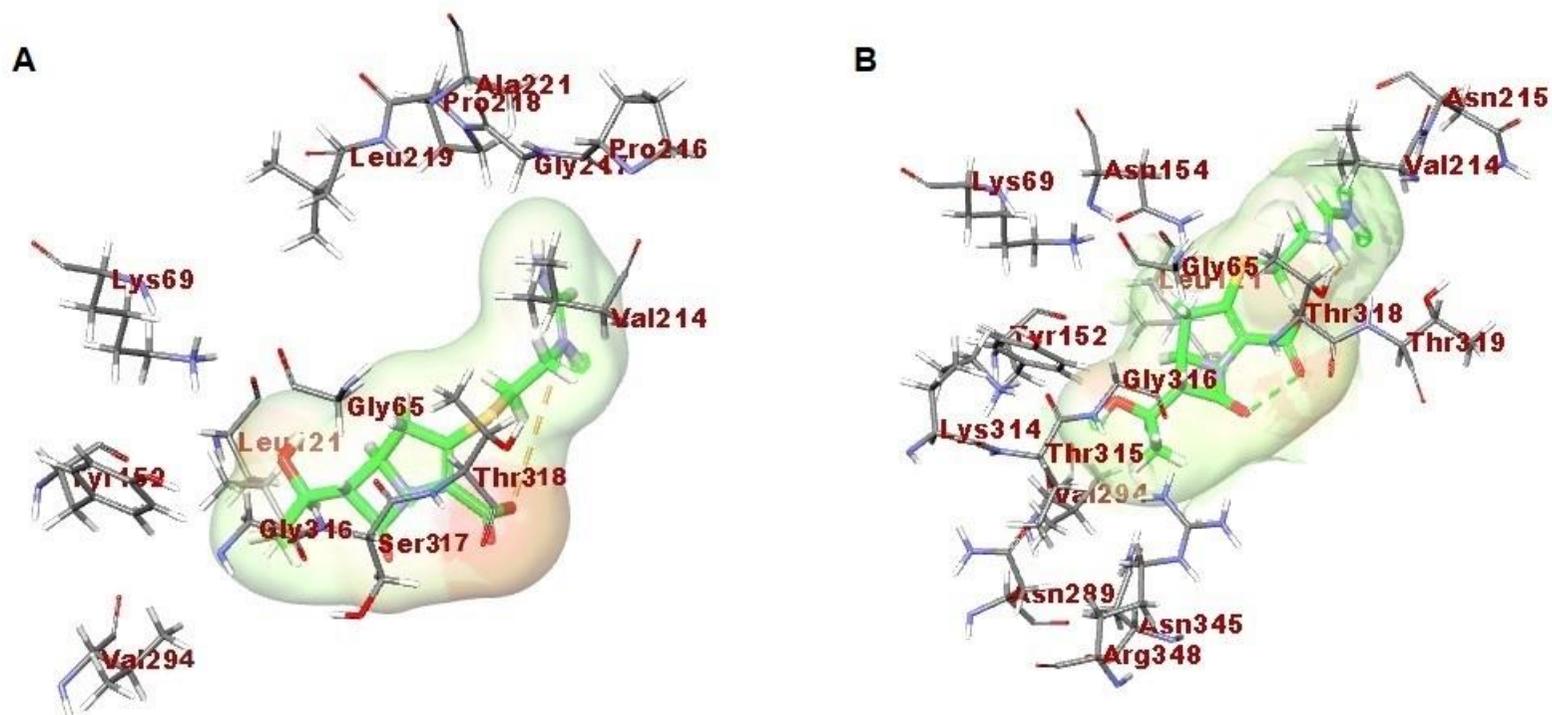
Figura 15 - Representação gráfica das características estruturais do sítio ativo de ADC-A e ADC-B.



Fonte: O autor.

Legenda: Comparação entre as características estruturais do sítio ativo de ADC-A e ADC-B demonstrando as diferenças significativas previstas para estas variantes enzimáticas. **A:** Representação gráfica do Ω -loop de ADC-A (lilás) em *docking* realizado com molécula de imipenem. Aminoácidos Ala221 e Pro222 destacados em amarelo demonstrando ponto de inserção de Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS). **B:** Representação gráfica do Ω -loop de ADC-B (lilás) em *docking* contendo molécula de imipenem. Aminoácido Ala221 destacado na cor amarela. Os principais aminoácidos que apresentam interação direta com a molécula de imipenem em ADC-A e ADC-B estão destacados em azul e demonstrados em **C** e **D**, respectivamente. Molécula de imipenem ($C_{12}H_{17}N_3O_4S$) representada em bastões verdes, com destaque para os átomos de oxigênio (vermelho), hidrogênio (branco-acinzentado), nitrogênio (lilás) e enxofre (amarelo). Interações eletroquímicas entre os respectivos aminoácidos e a molécula de imipenem representadas por linhas pontilhadas. Ligações de hidrogênio destacadas em verde, cargas atrativas em laranja, ligações do tipo hidrogênio-carbono destacadas em azul claro e ligações pi-álquil em rosa.

Figura 16 - Principais aminoácidos determinantes da formação de complexos proteína-ligante localizados no sítio ativo de ADC-A e ADC-B.



Fonte: O autor.

Legenda: Comparação entre as características estruturais do sítio ativo de ADC-A e ADC-B demonstrando os principais resíduos de aminoácidos que estabelecem interações eletroquímicas de van der Waals, determinantes da formação de complexos proteína-ligante, destacados em cinza. Representações gráficas dos aminoácidos de ADC-A e ADC-B em *docking* realizado com imipenem ($C_{12}H_{17}N_3O_4S$) estão detalhadas em **A** e **B**, respectivamente. Molécula de imipenem representada em bastões verdes, com destaque para os átomos de oxigênio (vermelho), hidrogênio (branco-acinzentado), nitrogênio (lilás) e enxofre (amarelo).

Com relação ao meropenem, observa-se que a molécula do antimicrobiano interage com ADC-A através da formação de cinco possíveis ligações de hidrogênio envolvendo Gln122, Tyr224, Asn289, Thr319, Arg342. Os resíduos Gln122, Tyr224 e Thr318 interagem com o radical R2, enquanto Arg342 estabeleceu ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 5 do anel betalactâmico. Resíduos como Ser66, Tyr152, Asn154, Val214, Ser317 e Thr319 foram preditos realizando interações do tipo van der Waals.

Diferenças entre resíduos de interação foram evidenciados em ADC-A contendo as modificações T179I e P194A isolada ou simultaneamente. Em ADC-A T179I, Ser66, Gln122, Tyr152, Ser317 e Arg342 foram preditos realizando ligações de hidrogênio com a molécula de meropenem, sendo Ser66 estabelecendo ligação com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico, enquanto para ADC-A P194A, os principais resíduos preditos realizando ligações de hidrogênio foram Gln122, Tyr224 e Arg342, sendo este último com o carbono 7 do anel betalactâmico de meropenem. Para ADC-A T179I/P194A, Asn154, Asp220, Ser66 e Gln122 foram preditos formando ligações de hidrogênio, sendo os dois últimos com o grupo OH ligado ao carbono 6.

Em ADC-A D220G, ligações de hidrogênio foram preditas para Asp130, Gln128, Pro216 e Pro222, no entanto, nenhuma interação foi evidenciada em relação ao oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico, local típico de hidrólise molecular do antimicrobiano quando mediada por betalactamases. Interações do tipo Van der Waals foram preditas para Gly217, Ala221 e Pro225.

A substituição simultânea de D220G e G320R em ADC-A reduziu o número e intensidade de ligações preditas entre esta variante enzimática e a molécula de meropenem. Ligações de hidrogênio foram observadas para Glu346, Asn345 e Arg342, estando este último, assim como predito para ADC-A G320R, interagindo com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 3 da molécula de meropenem. Demais resíduos como Leu121, Val294 e Ser317 foram observados exercendo ligação de van der Waals.

Em ADC-B, ligações de hidrogênio foram preditas para Gln122, Tyr224, Ser317, Arg342 e Asn345. Neste modelo, Gln122 foi predita realizando ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico, enquanto Arg342 parece interagir com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 3 da

molécula de meropenem. Ser317 e Asn345 foram os principais resíduos de interação da enzima com o radical R2 da molécula de antimicrobiano.

Diferenças entre resíduos de interação foram evidenciados em ADC-B contendo as modificações T179I e P194A isolada ou simultaneamente. Em ADC-B T179I, Gln122, Ser317, Arg342 e Asn345 foram os principais resíduos para os quais ligações de hidrogênio foram preditas, sendo Gln122, assim como em ADC-B, realizando ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico, enquanto em ADC-B P194A, Arg342 foi predito realizando esta ligação ao anel betalactâmico. Gln122, Asn289, Arg342 foram os principais resíduos com predição de ligações de hidrogênio em ADC-B T179I/P194A.

Diferenças entre resíduos de interação foram preditas também em ADC-B contendo a substituição simultânea de D220G e G320R em ADC-B e a molécula de meropenem. Ligações de hidrogênio foram observadas para Gln122, Ser317, Arg342 e Asn345, no entanto, o resíduo Gln122 perde interação com o oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico e passa a formar ligação de hidrogênio com os átomos de oxigênio ligados ao carbono 3 da molécula de meropenem, conforme observado individualmente também em ADC-B D220G e G320R.

O Quadro 7 mostra a comparação entre o número e resíduos de interação que formam ligações de hidrogênio entre as variantes de ADC e as moléculas dos carbapenêmicos imipenem e meropenem.

Quadro 7 - Comparação entre o número e resíduos de interação que formam ligações de hidrogênio entre as variantes de ADC e diferentes carbapenêmicos.

Variante enzimática	Imipenem	Meropenem
ADC-A	7 Ser66, Gln122, Asn154, Asn215, Asp220, Thr319, Arg342	5 Gln122, Tyr224, Asn289, Thr318, Arg342
ADC-A T179I	4 Ser66, Asn154, Asp220, Arg342	5 Ser66, Gln122, Tyr152, Ser317, Arg342
ADC-A P194A	5 Ser66, Gln122, Asp220, Ser317, Arg342	3 Gln122, Tyr224 e Arg342
ADC-A T179I/P194A	5 Ser66, Gln122, Asn154, Asp220, Arg342	4 Ser66, Gln122, Asn154, Asp220
ADC-A D220G	3 Ser66, Arg342, Ser317	4 Asp130, Gln128, Pro216, Pro222
ADC-A G320R	3 Gln122, Glu291, Arg342	4 Gln122, Gln128, Pro218, Arg342
ADC-A D220G/G320R	3 Arg342, Glu346	3 Arg342, Glu346, Asn345
ADC-B	5 Ser66, Gln122, Tyr224, Ser317, Arg342	5 Gln122, Tyr224, Ser317, Arg342, Asn345
ADC-B T179I	4 Ser66, Gln122, Asn154, Glu291	4 Gln122, Ser317, Arg342, Asn345
ADC-B P194A	4 Glu177, Pro182, Leu186, Tyr190	4 Gln122, Ser317, Thr319, Arg342
ADC-B T179I/P194A	5 Ser66, Tyr152, Asn154, Ser317, Arg342	3 Gln122, Asn289, Arg342
ADC-B D220G	3 Ser317, Arg342, Arg348	3 Gln122, Ser317, Arg342
ADC-B G320R	3 Glu177, Leu186, Arg342	3 Gln122, Thr318, Arg342
ADC-B D220G/G320R	3 Glu177, Lys178, Leu186	4 Gln122, Ser317, Arg342, Asn345
ADC-68	7 Ser66, Gln122, Tyr152, Asn289, Thr315, Ser317, Asn345	6 Gln122, Tyr224, Thr318, Ser317, Asn319, Arg342

Fonte: O autor

Legenda: Em negrito, número de interações que formam ligações de hidrogênio entre as variantes de ADC e diferentes carbapenêmicos.

6 DISCUSSÃO

As enzimas da classe C são as mais frequentes entre as betalactamases e representam importantes problemas terapêuticos uma vez que conferem resistência às cefamicinas (cefotaxima e cefotetan), penicilinas e cefalosporinas, além de não serem significativamente inibidas pelos principais inibidores clinicamente disponíveis, como o ácido clavulânico (LEE *et al.*, 2015).

De maneira geral, esta classe de enzimas pertence a um grupo mais homogêneo no que diz respeito ao comportamento cinético quando comparadas às da classe A, sendo capazes de reconhecer uma vasta gama de antimicrobianos, mas normalmente descritas como cefalosporinases (GUTKIND *et al.*, 2013), possuindo elevada afinidade para cefalosporinas (baixos valores de Km), mas também baixos valores de eficiência catalítica (kcat), sendo menos eficientes na desacilação, etapa limitante da reação de hidrólise (GALLENI; FRÈRE, 1988; GUTKIND *et al.*, 2013).

A disseminação de *A. baumannii* multidroga resistentes (MDR) é impulsionada principalmente pela disseminação de linhagens clonais. Elevadas frequências de *A. baumannii* MDR são relatadas na América do Sul, sendo os complexos clonais CC1, CC15, CC79 e CC25 predominantes (CAMARGO *et al.*, 2020).

O perfil de complexos clonais observado nos isolados de *A. baumannii* do presente estudo agrupam-se em STs e CCs previamente associados a cepas com perfil de multirresistência relacionadas a infecções hospitalares em diversos países (GIRLICH *et al.*, 2014; KARAH *et al.*, 2012; VILLALÓN *et al.*, 2011; VILLAR *et al.*, 2014), ressaltando a importância que estes isolados possuem no contexto clínico e epidemiológico nacional e internacional.

O alelo *bla*_{ADC-A} (*bla*_{ADC-182}) se apresentou como o mais amplamente distribuído nas cepas utilizadas como referência no presente estudo, estando presente em cinco dos seis STs de *A. baumannii* identificados, incluindo ST1 e ST881 (CC1), ST15 (CC15), ST79 (CC79) e ST113 (CC113), sendo o único alelo descrito entre esses isolados do ST113 e ST881. No Brasil, a ocorrência de *A. baumannii* MDR é considerada endêmica e os mais importantes complexos clonais (CCs) disseminados no país e relacionados à resistência aos carbapenêmicos são CC1, CC15, CC25 e CC79, sendo o este último descrito também na Croácia, Canadá, Espanha e Estados Unidos, e o CC15 identificado em pelo menos nove Estados brasileiros, incluindo Pernambuco, São Paulo, Sergipe e Espírito Santo, além de países como Argentina,

Turquia e República Tcheca, estando ambos os CCs relacionados a elevadas taxas de mortalidade (AZEVEDO *et al.*, 2019; CHAGAS *et al.*, 2014; KURIHARA *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, o alelo *bla*_{ADC-B} foi o segundo mais frequente observado entre os isolados clínicos analisados, sendo encontrado principalmente em cepas pertencentes à ST1 e ST15 (LEAL, *et al.*, 2020; ROCHA *et al.*, 2017), comumente identificadas na América do Sul e frequentemente isoladas no Brasil.

A resistência aos carbapenêmicos, tem sido identificada cada vez mais em hospitais em todo o mundo, comprometendo as opções disponíveis para o tratamento das infecções bacterianas (INGTI *et al.*, 2020; KYRIAKIDIS *et al.*, 2021), desta maneira, a disseminação de diferentes CCs de *A. baumannii* com perfil de multirresistência, como as do presente estudo, atenta para a possível evolução que as linhagens clonais epidêmicas de *A. baumannii* possam ter sofrido, se tornando linhagens resistentes aos carbapenêmicos pela aquisição dos vários genes de resistência antimicrobiana durante ou após sua disseminação.

De maneira geral, as ADCs não são consideradas como possuidoras de atividade de carbapenemase, sendo a resistência aos carbapenêmicos geralmente atribuída como derivada da capacidade de cepas que combinam permeabilidade de membrana reduzida (ocasionada por perda de porinas ou mutações) com a superexpressão dessas enzimas de classe C, que atuam no sequestro dos carbapenêmicos presentes no espaço periplasmático destes microrganismos antes que possam atingir seus alvos (GOESSENS *et al.*, 2013; TOOKE *et al.*, 2019).

Por outro lado, diversas substituições de aminoácidos em enzimas do tipo ADC foram descritas previamente (JEON *et al.*, 2014; PÉREZ *et al.*, 2014; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2010; TIAN *et al.*, 2011) e, com o passar dos anos, novas variantes enzimáticas com atividade ampliada de hidrólise para as diversas gerações de cefalosporinas e carbapenêmicos têm sido continuamente identificadas (JEON *et al.*, 2014; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2010; TIAN *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2012).

Embora na maioria das vezes a resistência às cefalosporinas e carbapenêmicos em *A. baumannii* seja atribuída às enzimas que compreendem o grupo OXA (classe D), a capacidade de ADC em hidrolisar os principais carbapenêmicos disponíveis na prática clínica foi recentemente reportada, como observado em ADC-68 em relação ao imipenem, ertapenem e meropenem (JEON *et al.*, 2014), possivelmente em ADC-57, cuja hidrólise de ertapenem foi prevista com

base no cálculo da energia livre de ligação em experimentos de *docking* molecular (ZHOU *et al.*, 2012), e mais recentemente em ADC-30, que confere resistência não apenas às cefalosporinas, mas também aos carbapenêmicos e sulbactam (KUO *et al.*, 2015), ressaltando a importância e contribuição de ADC para o desenvolvimento e manutenção da resistência contra cefalosporinas de espectro estendido e carbapenêmicos em *A. baumannii*.

A expressão do gene *bla*_{ADC-68} em linhagens isogênicas de *E. coli* TOP10 foi capaz de elevar a concentração inibitória mínima (CIM) de imipenem e meropenem para essa cepa de 0,5 e 0,015 µg/mL para 8 e 4 µg/mL, respectivamente, em sua transformante *E. coli* TOP10 pHSG398-*bla*_{ADC-68} (JEON *et al.*, 2014). Em nosso estudo, embora a atividade contra os carbapenêmicos tenha sido evidenciada em todas as variantes enzimáticas de ADCs naturalmente expressas pelos isolados clínicos de *A. baumannii* pelo teste *CIMplus*, apenas elevações sutis da concentração inibitória mínima para imipenem foram observadas nas cepas transformadas com as construções pET28a(+)-*bla*_{ADC-A} e -68, cuja CIM de *E. coli* BL21 (DE3) expressando estas enzimas aumentou de ≤0,0625 para 0,125 µg/mL. Estudos semelhantes realizados em *E. coli* DH5α abrigando pBGS18-pCTX e expressando *bla*_{ADC-5} (portadora dos mesmos motivos G220D e R320G identificados em ADC-68 em relação à ADC-1) demonstraram também um discreto aumento do valor da CIM para imipenem de 0,125 µg/mL em comparação à *E. coli* DH5α abrigando pBGS18-pCTX sem qualquer gene *bla*_{ADC} (PÉREZ *et al.*, 2014), fato possivelmente associado às diferenças de permeabilidade de membrana existentes entre as diferentes linhagens laboratoriais de *E. coli* ou ainda em decorrência dos diferentes níveis e condições de expressão proteica existentes entre os diferentes plasmídeos comumente utilizados em experimentos dessa natureza.

No presente estudo, as substituições de aminoácidos que mais alteraram a atividade de ADC em relação às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e carbapenêmicos testados foram D220G e G320R e, embora todas as mutações realizadas de maneira isolada ou simultânea tenham alterado a velocidade de suas respectivas variantes enzimáticas em relação ao imipenem, as substituições D220G e G320R, localizadas respectivamente no Ω -loop e relativamente próxima do sítio ativo e do motivo KTG, foram suficientes por si só para reverter ou diminuir a atividade enzimática em relação à penicilina de largo espectro, cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e carbapenêmicos testados.

Curiosamente, as modificações D220G e G320R introduzidas em ADC-A, -B e suas derivadas, cujas interações eletroquímicas foram preditas por *docking* molecular, resultaram na diminuição do número de ligações de hidrogênio entre estas variantes enzimáticas e as moléculas de imipenem e meropenem, sugerindo que os resíduos de Asp220 e Arg320 influenciam, ainda que de maneira indireta, na afinidade de ADC aos carbapenêmicos e demais betalactâmicos.

Estudos anteriores realizados em ADC-5 reportaram os mutantes D220G e G320R como os mais afetados em relação à hidrólise de cefoxitina e, embora demais mutações únicas levassem a uma diminuição geral na CIM da cefoxitina, a substituição G320R foi suficiente por si só para reverter a resistência à cefoxitina (PÉREZ *et al.*, 2014), enquanto uma ligeira diminuição nas CIMs de ceftazidima foi observada para todos os mutantes, exceto para D242G e G342R, que foram os menos afetados. Curiosamente, a substituição do resíduo D240G foi previamente associada à hidrólise de ceftazidima também em enzimas do tipo CTX-M (CARTELLE *et al.*, 2004), pertencente ao grupo de betalactamases da classe A.

As substituições T179I e P194A realizadas isolada ou simultaneamente foram capazes de reduzir significativamente a velocidade de hidrólise de imipenem por ADC, bem como os valores de CIM determinados para cefotaxima e ceftazidima em todas as cepas transformadas com as construções pET28a(+):*bla*_{ADC} de nosso estudo, sugerindo a influência destes aminoácidos, ainda que indiretamente, na atividade de ADC frente às cefalosporinas e carbapenêmicos. Interessantemente, variações consideráveis nos valores de CIM para cefotaxima e ceftazidima foram também observadas em *E. coli* TOP10 pHSG398-*bla*_{ADC-68}, cuja variante enzimática expressa possui naturalmente ambas as substituições referidas (JEON *et al.*, 2014), reiterando a importância dos aminoácidos Thr179 e Pro194 na atividade de ADC, ainda que estes estejam distribuídos ao longo da sequência de aminoácidos e não localizados em *hotspots*.

Além das substituições T179I e P194A, a ADC-158 difere de ADC-68 também pela presença de Gly77 e Thr248, localizadas na hélice α 3 e α 11, respectivamente e, embora potenciais alterações funcionais provocadas por estas modificações de aminoácidos não tenham sido preditas pelo PROVEAN (score maior que -2.5), a possibilidade destas em influenciar indiretamente os parâmetros cinéticos de ADC não deve ser descartada.

Embora a elucidação dos mecanismos das betalactamases da classe C permaneça incompleta, avanços recentes na área têm explorado as várias estruturas cristalizadas de alta qualidade para aplicar algoritmos computacionais na avaliação de possíveis mecanismos moleculares de resistência (TOOKE *et al.*, 2019).

A estrutura das betalactamases da classe C é semelhante à de outras serino betalactamases e DD-peptidases, sendo aproximadamente 100 vezes maior que seus substratos. De maneira geral, a atividade das betalactamases AmpC é mediada por aminoácidos com grupos polares não carregados tais como Ser, Thr e Asn, e aminoácidos com grupos alifáticos não polares como Gly, Ala e Val, possuindo cavidade capaz de acomodar a volumosa cadeia lateral das cefalosporinas e sítio ativo enzimático localizado na posição 64 (Ser64), além de outros resíduos importantes para a atividade catalítica como Ser66, Lys67, Lys69, Tyr152, Asn154, Lys315 e Ala318 (BHATTACHARYA *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2006; VERMA *et al.*, 2016).

Embora as estruturas gerais de ADC sejam relativamente conservadas, mudanças na atividade catalítica de ADC são geralmente associadas a substituições e/ou deleções/inserções de aminoácidos em regiões estruturais específicas apresentadas por essas enzimas (JEON *et al.*, 2014; NORDMANN, MAMMERI, 2007). Diferenças estruturais perceptíveis já foram determinadas no sítio ativo enzimático e hélices H2 e H10 de variantes ADC, no entanto, as principais existentes entre enzimas com perfil de carbapenemase em relação a exemplares não-carbapenemase se concentram especialmente no Ω -loop e no C-loop (JEON *et al.*, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2016), conforme observado nas variantes enzimáticas do presente estudo.

Substituições adicionais de aminoácidos localizadas no P2-loop de diferentes enzimas da classe C foram previamente descritas e capazes de alterar a função de ADC (CRICHLLOW *et al.*, 2001; JACOBY, 2009; KIM *et al.*, 2006). Dessa maneira, embora as substituições F261R e G265N, identificadas em nosso estudo em ADC-158 e -D, respectivamente, não tenham sido avaliadas de forma aprofundada, estas podem estar relacionadas a importantes funções em ADC.

Análises realizadas a partir da superposição de diferentes enzimas da classe C mostram que as maiores variações estruturais entre elas ocorrem nas regiões N e C terminais, P-loop, P2-loop e Ω -loop, além dos loops compreendidos entre as hélices α 8, α 9 e α 10. Adicionalmente, mudanças estruturais em Ω -loop resultam no aumento da atividade destas enzimas da classe C em relação também às cefalosporinas de

espectro estendido (BHATTACHARYA *et al.*, 2014; CRICHLLOW *et al.*, 2001; JACOBY, 2009; KIM *et al.*, 2006; SANTIAGO *et al.*, 2016).

A sequência de aminoácidos predita para ADC-A varia da ADC-B exclusivamente pela inserção de Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS) na região do Ω -loop enzimático da primeira, sendo esta responsável por alterações significativas em sua estrutura proteica tridimensional através da interrupção de formação da hélice $\alpha 9$ e resultando em uma ampliação do volume de seu sítio ativo.

Os resultados obtidos a partir do *docking* molecular sugerem que a ampliação da cavidade ativa em ADC-A permite uma melhor flexibilização e acomodação da cadeia lateral R2 da molécula de imipenem, facilitando a interação de diferentes e mais numerosos aminoácidos a partir de uma série de ligações de hidrogênio entre os grupos amina carregados positivamente e os grupos hidroxila negativos, favorecendo o mecanismo de hidrólise.

O processo de acoplamento e hidrólise molecular envolve uma série de importantes interações químicas, incluindo a ligação de diversos grupos hidroxila com uma variedade de grupos funcionais, geralmente aminas, dentro do sítio ativo enzimático (MEDEIROS, 1997), devendo o substrato betalactâmico ser mantido no lugar para que a serina do sítio ativo realize a quebra dessa ligação amida com sucesso. Dessa maneira, modificações na estrutura do sítio ativo são de grande importância e podem resultar em ampliação, redução ou perda de atividade desta frente a um determinado antimicrobiano.

Inserções de aminoácidos no Ω -loop de representantes enzimáticos da classe C foram inicialmente identificadas e reportadas na betalactamase GC1 de *Enterobacter cloacae* (CRICHLLOW *et al.*, 1999). Estudos posteriores demonstraram que a inserção do tripeptídeo Ala211-Val212-Arg213 contribui para uma maior flexibilidade conformacional e expansão do Ω -loop, permitindo que diferentes substratos ou inibidores de betalactamases com radicais mais volumosos sejam mais bem acomodados, como previamente observado em relação à cefuroxima, ceftazidima e aztreonam (BHATTACHARYA *et al.*, 2014; CRICHLLOW *et al.*, 2001; NUKAGA *et al.*, 2003; NUKAGA *et al.*, 2004).

Análises comparativas realizadas a partir dos valores obtidos nos ensaios de avaliação da capacidade de hidrólise do imipenem e determinação dos valores de concentração inibitória mínima entre as cepas de *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+) expressando cada uma destas variantes em questão, sugerem que a inserção de Pro-

Ala-Ser (A221_P222insPAS) na região do Ω -loop de ADC-A está diretamente relacionada também a mudanças significativas nos parâmetros cinéticos e valores de CIM estabelecidos em sua correspondente desprovida desta inserção, exercendo influência positiva na velocidade de hidrólise e afinidade enzimática relativa ao imipenem, além de uma possível otimização do processo hidrolítico mediado por esta variante enzimática também em relação às demais cefalosporinas e penicilinas de largo espectro avaliadas.

Cabe ressaltar que as variantes enzimáticas ADC-A (A221_P222insPAS) contendo as diferentes substituições T179I e P194A testadas apresentaram atividade enzimática mais elevada que suas correspondentes em ADC-B. Além disso, as variantes ADC-A contendo pelo menos uma das duas substituições isoladas de G320R ou D220G, consideradas deletérias e suficientes por si só para reverter ou diminuir a atividade em relação à penicilina de largo espectro, cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações e carbapenêmicos testados, apresentaram maior variação na absorbância relativa ao imipenem do que aqueles observados em ADC-68 contendo ambas as substituições D220G/G320R, ADC-B T179I/P194A, ADC-A D220G/G320R, ADC-68 D220G e ADC-68 G320R, reiterando a importância que esta inserção possui no comportamento bioquímico de ADC.

Comparado com Arg320 em ADC-1, as variantes enzimáticas descritas no presente estudo possuem um resíduo muito menor no C-loop: Gly320. Em ADC-1, o resíduo mais volumoso Arg320 interfere com a formação estável do C-loop devido ao impedimento estérico, causando deslocamento do C-loop para o sítio R2 da enzima e criando uma região abaulada e sobressalente, impedindo a acomodação da molécula de imipenem no sítio ativo enzimático de ADC-1 (LEE *et al.*, 2015). Desta maneira, a presença de Gly320 em nossas variantes enzimáticas e, a presença simultânea de Gly320 e Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS) na região do Ω -loop enzimático de ADC-A, podem explicar a atividade de carbapenemase dessas variantes, além de uma possível maior afinidade ao imipenem.

Os resultados de *docking* molecular para ADC-A-imipenem sugerem a interação de diferentes resíduos com a molécula de antimicrobiano, estando Arg342 formando ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico em ADC-A e suas variantes T179I, P194A e T179I/P194A, cuja hidrólise molecular de imipenem foi evidenciada por espectrofotometria. Para meropenem, os principais resíduos de interação de ADC-A compreenderam Gln122, Tyr224, Asn289,

Thr318 e Arg342, estando este último também interagindo com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico. Interações entre carbapenêmicos e ADC-1 foram previamente sugeridas para Gln122, Asn154, Asn289, Asn319 e Glu274, no entanto, nenhuma destas parece exercer ligação com o átomo de oxigênio do carbono 7 do anel betalactâmico e a atividade contra os carbapenêmicos ertapenem, meropenem e imipenem testados não foi evidenciada (BHATTACHARYA *et al.*, 2014; JEON *et al.*, 2014; VERMA *et al.*, 2016). Nossos resultados sugerem, portanto, que a participação de Arg342 pode ser fundamental para a atividade desta variante contra imipenem e meropenem. Em ADC-68, embora o ataque nucleofílico ao carbono 7 do anel betalactâmico de imipenem pareça ser mediado por Ser66 e Ser317 (JEON *et al.*, 2014), resultados de *docking* molecular realizados com meropenem sugerem que o resíduo Arg342 também participa da reação de hidrólise deste antimicrobiano.

Para ADC-B, os resultados de *docking* molecular com meropenem sugerem ligações de hidrogênio para Gln122, Tyr224, Ser317, Arg342 e Asn345, sendo Gln122 predita realizando interação com o átomo de oxigênio ligado ao carbono 7 do anel betalactâmico, a medida em que perde esta interação nas variantes contendo a substituições isoladas e simultânea de D220G e G320R. Em ADC-1, Gln122 foi previamente reportado como elemento constituinte do sítio ativo de betalactamases da Classe C. Para esta variante, estima-se que Gln122 interaja com Asn154 e, juntamente com os resíduos da fita B8 e do Ω -loop, participem da formação do subsítio R1, ancorado por ligações de hidrogênio às cadeias laterais de Gln122 (BHATTACHARYA *et al.*, 2014).

A participação do resíduo de Gln122 em ADC-1 foi previamente observada também através de ligações de hidrogênio em interação com penicilina, ceftazidima e imipenem (HARGIS *et al.*, 2014; VERMA *et al.*, 2016).

Conforme descrito, diversos modelos têm sido desenvolvidos e aprimorados como tentativa de elucidar os mecanismos relacionados à resistência mediada por ADC em *A. baumannii*, incluindo tanto modelos genéticos baseados em análises das variantes alélicas quanto aqueles realizados a partir de estruturas moleculares complexas através de cristalografia de alta resolução por raios-X, espectroscopia por ressonância magnética nuclear e *docking* molecular (INGTI *et al.*, 2020; JEON *et al.*, 2014; KUO *et al.*, 2015; KYRIAKIDIS *et al.*, 2021).

Recentemente, estudos de fosfoproteômica demonstraram que a fosforilação do resíduo ativo de Ser de AmpC regula negativamente a atividade da betalactamase

e a capacidade de neutralizar os efeitos antibióticos do imipenem em ADC, ocasionando resistência em isolados clínicos de *A. baumannii*, enquanto a AmpC apresentando Ser desfosforilada está relacionada à maior atividade enzimática, exibindo valores de atividade quase duas vezes maior em comparação à primeira (LAI *et al.*, 2016).

De maneira geral, a reação hidrolítica catalisada por AmpC inclui duas etapas básicas de acilação e desacilação. Inicialmente, o resíduo de Ser ataca o carbono do anel betalactâmico e forma um complexo acil-enzima covalente. Posteriormente, na etapa de desacilação, a água reage com a ligação covalente no complexo, levando à liberação do produto hidrolisado (JEON *et al.*, 2015; LAI *et al.*, 2016).

Em betalactamases da classe C, o imipenem atua como inibidor enzimático a partir da formação de um complexo covalente AmpC-imipenem. Após a formação do complexo acil-enzima, a volumosa cadeia lateral do antimicrobiano força seu centro eletrofílico a girar para o lado oposto ao ponto de ataque nucleofílico, reduzindo simultaneamente a atividade destas e a eficácia do antimicrobiano (BEADLE; SHOICHET, 2002; LAI *et al.*, 2016). Assim, sugere-se que as modificações relatadas no Ω -loop das variantes enzimáticas de ADC do presente estudo, sobretudo a inserção de Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS) em ADC-A, possam também exercer influência na estabilidade do complexo ADC-imipenem através da formação de maior número de resíduos de interação que formam interações com a molécula de antimicrobiano, contribuindo simultaneamente para uma melhor acomodação da droga e favorecendo a atividade enzimática contra este antimicrobiano, ou ainda o sequestro da molécula do antimicrobiano, covalentemente ligado a esta.

Os resultados obtidos a partir da expressão proteica das variantes enzimáticas de ADC do presente estudo demonstraram que as substituições e/ou inserções de aminoácidos são responsáveis por alterações na atividade desta aos diversos betalactâmicos testados, no entanto não estão relacionadas a alterações significativas do ponto isoelétrico destas proteínas, sugerindo que a interação destas com o meio aquoso, bem como os mecanismos de protonação e desprotonação na estrutura geral dessas variantes enzimáticas, permaneçam conservados.

Estudos de determinação do ponto isoelétrico foram largamente empregados nas últimas décadas e apresentavam-se bastante úteis na detecção e identificação presuntiva do tipo de enzima presente (BRADFORD, 2001). Até meados de 1980, estimativas razoáveis do número de betalactamases produzidas e informações sobre

suas identidades presuntivas eram realizadas utilizando-se como base os dados de focalização isoelétrica (BUSH, 2018). No entanto, as diversas variantes de ADCs descritas na atualidade e incluídas nas análises do presente estudo, apresentam ponto isoelétrico idênticos ou pouco variáveis em relação a betalactamases de mesma classe ou classes distintas e previamente descritas em *Acinetobacter* sp., como CTX-M e diversos exemplares da classe D, resultando a determinação do tipo enzimático presente apenas pela focalização isoelétrica um processo pouco preciso (BUSH, 2018; GARCIA *et al.*, 2010; NOGUEIRA, 2011).

Apesar dos extensos relatos de resistência de *A. baumannii* aos betalactâmicos, a natureza complexa dos sistemas regulatórios e de seus diversos mecanismos de adaptação dificulta a exploração completa e detalhada do que diz respeito à resistência aos carbapenêmicos.

Na maioria dos casos, a presença isolada de *bla*_{ADC} e de genes codificadores de betalactamases da classe D por si só não são suficientes para conduzir à resistência às cefalosporinas ou carbapenêmicos nos isolados de *A. baumannii*, no entanto, a presença de elementos de inserção (IS) em regiões gênicas específicas pode atuar como promotores fortes e adicionais, facilitando a superexpressão destes genes e conduzindo a resistência às cefalosporinas e carbapenêmicos em *A. baumannii* (POIREL *et al.*, 2011; SARANATHAN *et al.*, 2017; TURTON *et al.*, 2006).

Embora os isolados de *A. baumannii* avaliados no presente estudo sejam portadores de importantes genes codificadores de betalactamases não-AmpC, a presença de IS*Aba1/bla*_{ADC} foi detectada na totalidade destes microrganismos e pode estar relacionada à superexpressão de *bla*_{ADC} nestes isolados, ocasionando consequentemente resistência às cefalosporinas de espectro estendido e também aos carbapenêmicos. A cepa de *A. baumannii* ATCC® 19606™ da *American Type Culture Collection* apresentou-se como o único isolado no qual essa correlação entre IS*Aba1/bla*_{ADC} não foi detectada pelos testes no presente estudo. Embora a presença de genes codificadores de betalactamases como *bla*_{OXA-98} (OXA-51-like) e *bla*_{ADC} tenham sido previamente identificada neste isolado (ZHU *et al.*, 2020), os baixos valores de CIM estabelecidos para os diferentes betalactâmicos testados sugerem que estas betalactamases conferem apenas uma resistência de baixo nível a betalactâmicos ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefazolina e cefoxitina, provavelmente devido à ausência de um promotor forte para conduzir a expressão

desses genes (SARANATHAN *et al.*, 2017; TSUBOUCHI *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020).

Além de ISAb_a1, diversos elementos de inserção têm sido identificados e associados à hiperexpressão gênica de variadas classes de betalactamases em *A. baumannii*, incluindo ISAb_a4, ISAb_a10, ISAb_a16, ISAb_a18, ISAb_a125 e ISAb_a825, desempenhando desta maneira um importante papel na manutenção e disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos nestes isolados (HAMIDIAN *et al.*, 2013; SARANATHAN *et al.*, 2017; TURTON *et al.*, 2006).

Estudos de comparação da expressão gênica de *bla*_{ADC} mediada por diferentes elementos de inserção demonstram que esta é cerca de seis vezes maior quando mediada por ISAb_a125 em comparação ao mesmo gene expresso em condições basais, sem elementos de inserção presentes à montante e de duas vezes maior em comparação aos níveis de expressão mediado por ISAb_a1 (LOPES; AMYES, 2012). Embora ISAb_a125 possua melhores promotores quando comparado ao ISAb_a1 (LOPES; AMYES, 2012), a capacidade deste último em regular positivamente a expressão gênica de *bla*_{ADC} também representa um fator importante na resistência de *A. baumannii* às cefalosporinas e carbapenêmicos (CORVEC *et al.*, 2003; CORVEC *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Ensaio conduzidos a fim de verificar a indução da expressão gênica de *bla*_{ADC} após exposição aos principais antimicrobianos betalactâmicos evidenciaram aumento da expressão de ADC-30 mediada por ISAb_a1 em resposta à exposição *in vitro* à ticarcilina, ceftazidima e com o inibidor de betalactamases sulbactam, além de promover o aumento dos valores da CIM estabelecidos para ceftazidima, ampicilina, imipenem, meropenem, ticarcilina, e de até 16 vezes dos valores de CIM previamente estabelecidos para sulbactam em *A. baumannii* ATCC[®] 15151[™] (pYMAb2::ISAb_a1/*bla*_{ADC-30}) (KUO *et al.*, 2015), desempenhando importante papel para a resistência aos antimicrobianos nesta espécie bacteriana.

Demais estudos realizados a partir de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* revelaram a superexpressão de betalactamases da classe C também conferiu, ainda que fracamente, atividade de hidrólise de carbapenemase e, portanto, contribuiu para a resistência aos carbapenêmicos em isolados com deficiência de porina (LIVERMORE, 1992; ROSTAMI *et al.*, 2018). No entanto, embora tais estudos tenham sugerido relação entre a superexpressão de AmpC a resistência aos carbapenêmicos, os mecanismos regulatórios permanecem desconhecidos (ROSTAMI *et al.*, 2018).

Embora testes fenotípicos de hidrólise como o *CarbAcineto* sejam amplamente utilizado como teste de *screening* para a produção de carbapenemases por isolados Gram negativos inclusive na prática clínica, alguns estudos relataram dificuldades na detecção de carbapenemases especialmente quando este método de detecção é realizado a partir de isolados mucóides ou produtores de carbapenemases fracas (VAN DER ZWALUW *et al.*, 2015), além de se apresentar como um método eficiente para detecção de carbapenemases da classe A e B, mas com sensibilidade reduzida de detecção de carbapenemases das classes C e D (MOREY *et al.*, 2017; ÖSTERBLAD *et al.*, 2014; TIJET *et al.*, 2013).

Os isolados de *A. baumannii* representantes dos principais grupos de ADC do presente estudo são portadores de importantes genes codificadores de betalactamases que, quando hiperexpressas, conferem resistência às cefalosporinas de espectro estendido e carbapenêmicos. No entanto, cabe ressaltar que o elemento de inserção *ISAba1/bla_{ADC}* foi detectado na totalidade dos isolados clínicos avaliados no presente estudo, fato este que pode estar relacionado à uma hiperexpressão de *bla_{ADC}*, ocasionando não apenas resistência às cefalosporinas de espectro estendido, mas também aos carbapenêmicos, positivando, ainda que discretamente, o teste *CarbAcineto* desses isolados. Desta maneira, para uma melhor avaliação da capacidade hidrolítica destas variantes enzimáticas a estes betalactâmicos, testes de inativação de carbapenêmicos (do inglês, *Carbapenem Inactivation Method* - CIM) são também empregados, sobretudo em ensaios colorimétricos aparentemente negativos para a detecção de carbapenemases na prática clínica (CAMÉLÉNA *et al.*, 2018).

Este estudo apresenta algumas limitações. Embora a metodologia utilizada nos ensaios de avaliação da degradação enzimática do imipenem não tenha permitido cálculos da estimativa do número de eventos catalíticos (kcat) ou eficiência catalítica enzimática (kcat/Km), as variações observadas na velocidade de decaimento dos valores de absorvância nos ensaios sugerem diferenças no comportamento bioquímico destas variantes enzimáticas em relação ao imipenem.

Discrepâncias ocorridas entre os valores de CIM e dados provenientes da avaliação da cinética enzimática de ADC foram previamente descritos e alertam para as limitações presentes nos testes de identificação de resistência enzimática fenotípica nos variados isolados (BECEIRO *et al.*, 2009; DRAWZ *et al.*, 2010; ENDIMIANI *et al.*, 2010; SKALWEIT *et al.*, 2013, 2015), assim, apesar não terem sido observadas diferenças exacerbadas nos valores de CIM estabelecidos para imipenem

e meropenem entre as linhagens isogênicas de *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+) expressando as diferentes variantes enzimáticas de ADC deste estudo, as diferentes substituições presentes em suas respectivas sequências de aminoácidos revelaram diferenças nos parâmetros cinéticos avaliados e devem ser consideradas.

Assim, embora determinadas alterações de aminoácidos aparentem ter caráter de variação fenotipicamente neutro, elas podem estar associadas a mudanças na eficiência catalítica ou nos parâmetros bioquímicos de ADC.

A resistência aos antimicrobianos se desenvolve como consequência natural da habilidade de uma determinada população bacteriana de se adaptar (WISTRAND-YUEN *et al.*, 2018) e, embora o grau de resistência bacteriana seja dependente de uma série de fatores (BLANCO *et al.*, 2018; SILVEIRA, 2018), a exposição contínua e o uso indiscriminado de antimicrobianos no contexto clínico mundial favorece a pressão seletiva e acelera o surgimento de microrganismos MDR pelo desenvolvimento dos mais variados mecanismos.

As variações observadas entre as sequências de aminoácidos preditas para ADC e aqui detalhadas, podem ser derivadas de complexos e interrelacionados processos adaptativos e mutacionais, surgindo provavelmente como consequência de anos de exposição aos mais variados betalactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a gerações, cefamicinas e os carbapenêmicos.

Desta maneira, espera-se que os resultados aqui expressos acrescentem no conhecimento dos mecanismos envolvidos no estabelecimento de *A. baumannii* como patógeno emergente de sucesso no cenário clínico atual, bem como que estudos adicionais sobre a bioquímica, atividade catalítica e potencial de inibição de ADC e demais betalactamases sejam continuamente conduzidos de modo que contribuam para o desenvolvimento de novas drogas inibidoras de betalactamases de uso clínico, reduzindo o impacto ocasionado pela propagação e manutenção de bactérias multirresistentes no cenário clínico mundial.

7 CONCLUSÃO

- a) As variantes alélicas de ADC expressas pelos isolados clínicos de *A. baumannii* desse estudo possuem atividade de ESBL e contra os carbapenêmicos, sendo ativas contra penicilina de largo espectro, cefalosporinas de 1^a, 3^a e 4^a gerações, imipenem e meropenem;
- b) A inserção de Pro-Ala-Ser (A221_P222insPAS), na região do Ω -loop de ADC-A contribui para expansão significativa da cavidade do sítio ativo enzimático e pode estar relacionada a uma maior afinidade enzimática pelo imipenem e maior atividade contra o mesmo;
- c) Os resíduos de Arg342 e Ser317 em ADC-A e -B, respectivamente, participam como elementos-chave para a interação destas com o carbono 7 do anel betalactâmico de imipenem, enquanto Gln122 parece desempenhar tal interação de ADC-B ao meropenem;
- d) As substituições isoladas e simultânea dos aminoácidos T179I e P194A alteram a velocidade de hidrólise de ADC em relação ao imipenem, embora não alterem por si só o espectro de hidrólise das variantes enzimáticas expressas;
- e) As substituições isoladas e simultânea dos aminoácidos D220G e G320R causam grande influência no perfil de hidrólise de ADC, revertendo o perfil de hidrólise para penicilina de largo espectro, cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações e carbapenêmicos para todas as variantes testadas;
- f) As variações de aminoácidos presentes nas ADC expressas pelos isolados clínicos de *A. baumannii* desse estudo, bem como as substituições isoladas e combinada de T179I e P194A e D220G e G320R produzem apenas sutis variações no ponto isoelétrico enzimático (pI);

- g) O perfil de ESBL/carbapenemase observado nas variantes alélicas de ADC presentes nos isolados clínicos desse estudo parecem ser dependentes de superexpressão mediada por *ISAba1*.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Investigação e Controle de Bactérias Multirresistentes**. Brasília, DF: Anvisa, 2007.

ABRAHAM, E.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, London, v. 146, n. 3713, p. 837, Dec. 1940. Disponível em: <http://nature.com/nature/journal/v146/n3713/pdf/146837a0.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2021.

ADAMS, M. D. *et al.*, Quantitative assessment of insertion sequence impact on bacterial genome architecture. **Microbial genomics**, Boston, v. 2, n. 7, p. e000062, July 2016.

ADNAN, S. *et al.*, Ampicillin/sulbactam: its potential use in treating infections in critically ill patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 42, n. 5, p. 384-9, Nov. 2013.

AGODI, A. *et al.*, Spread of a carbapenem- and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 86, n. 4, p. 260-266, Apr. 2014.

AGUILAR, M. A. P. **Análise molecular da expressão do fenótipo multi-droga resistente (MDR) em enterobactérias isoladas de amostras clínicas após exposição *in vitro* ao imipenem**. 2013. 132f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences**, London, v. 289, n. 36, p. 321-331, May 1980.

ANTÔNIO, C. S. **Ocorrência de genes codificadores de carbapenemases em isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* recuperados de amostras clínicas de hospitais do Sudeste e Sul do Brasil**. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ARDEBILI, A. *et al.*, Association between mutations in *gyrA* and *parC* genes of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and ciprofloxacin resistance. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, Mashhad, v. 18, n. 6, p. 623-626, June 2015.

AZEVEDO, F. K. S. F. *et al.*, New Sequence Types of *Acinetobacter baumannii* in Two Emergency Hospitals in the Central-West Region of Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF. v. 52, n. 1, p. e20190077, July 2019.

BANIN, E. *et al.*, Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 450-452, May 2017.

BARLETTA, R. C. F. *et al.*, *Acinetobacter baumannii* multirresistente: un reto para la terapéutica actual. **MediSur**, Havana, v. 16, n. 2, p. 322-34, Apr. 2018.

BEADLE, B.; SHOICHET, B. K. Structural Basis for Imipenem Inhibition of Class C β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC. v. 46, n. 12, p. 3978–3980, Dec. 2002. Disponível em: <http://DOI.org/10.1128/AAC.46.12.3978-3980.2002>. Acesso em: 25 mar. 2021.

BECEIRO, A., *et al.*, Genetic Variability among AmpC Genes from *Acinetobacter* Genomic Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 53, n. 3, p. 1177-84, Mar. 2009. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.00485-08>. Acesso em: 21 mar. 2021.

BECEIRO, A. *et al.*, Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC., v. 26, n. 2, p. 185-230, Apr. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3623377/>. Acesso em: 14 jan. 2021.

BEESELEY, T. *et al.*, The inhibition of class C β -lactamases by boronic acids. **Biochemical Journal**, Portland, v. 209, n. 1, p. 229-33, Oct. 1983.

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre Metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 577-599, Dec. 2008.

BHATTACHARYA, A. *et al.*, Structure of the extended-spectrum class C β -lactamase ADC-1 from *Acinetobacter baumannii*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, Copenhagen, v. 70, n. 3, p. 760-771, Feb. 2014.

BITENCOURT, G. F.; AZEVEDO, W. F. Docking with SwissDock. *In*: AZEVEDO Jr. W. **Docking screens for drug discovery: methods in molecular biology**. New York: Ed. Humana, 2019. v. 1. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_12. Acesso em: 28 abr. 2021.

BLANCO, N. *et al.*, Risk factors and outcomes associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* upon intensive care unit admission. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 62, n. 1, p. e01631-17, Nov. 2018.

BONFIGLIO, G.; RUSSO, G.; NICOLETTI, G. Recent developments in carbapenems. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 529-544, Apr. 2002.

BOU, G., MARTÍNEZ-BELTRÁN, J. Cloning, Nucleotide Sequencing, and Analysis of the Gene Encoding an AmpC β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 44, n. 2, p. 428–32, Feb. 2000. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.44.2.428-432.2000>. Acesso em: 13 jan. 2021.

BRADFORD, Patricia A. *et al.*, Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-

lactamase, and the loss of an outer membrane protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 41, n. 3, p. 563-569, Mar. 1997.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical and Microbiology Review**, Washington, DC., v. 14, n. 4, p. 933-51, Oct. 2001.

BROWN, S.; AMYES, S. G. The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 11, p. 326-329, Apr. 2005.

BUSH, K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 62, n. 10, p. e01076-18, July 2018. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.01076-18>. Acesso em: 31 mar. 2021.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: the role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram negative infections. **Critical Care**, London, v. 14, n. 3, p. 224, June 2010. Disponível em: <http://pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2911681&tool>. Acesso em: 26 jan 2021.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 295-301, May. 2019.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, New York, v. 6, n. 8, p. a025247, May. 2016.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 54, n. 3, p. 969-976, Dec. 2010

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 39, n. 6, p. 1211-1233, June 1995.

CAMARGO, C, *et al.*, Genomic and phenotypic characterization of antimicrobial resistance in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* hyperendemic clones CC1, CC15, CC79 and CC25. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 56, n. 6, p. 1061-9, Dec. 2020.

CAMÉLÉNA, F. *et al.*, Within-a-day detection and rapid characterization of carbapenemase by use of a new carbapenem inactivation method-based test, CIMplus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC., v. 56, n. 9, p. e00137-18, 2018.

CAMP, C.; TATUM, O.L. A review of *Acinetobacter baumannii* as a highly successful pathogen in times of war. **Lab Medicine**, Oxford, v. 41, n. 11, p. 650-7, 2010.

- CAMPANA, H. C. **Freqüência de Enterobactérias Produtoras de β -Lactamases AmpC Plasmidiais Isoladas em Infecção de Corrente Sangüínea**. 2009. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- CARTELLE, M. *et al.*, High-Level Resistance to Ceftazidime Conferred by a Novel Enzyme, CTX-M-32, Derived from CTX-M-1 through a Single Asp240-Gly Substitution. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 48, n. 6, p. 2308-13, June 2004
- CARVALHO, K. R. **Estudo da diversidade genética, caracterização fenotípica e molecular de mecanismos de resistência a antimicrobianos e virulência em *Acinetobacter baumannii* isolados em hospitais do Rio de Janeiro**. 2013. 163f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.
- CASTANHEIRA, M., RHOMBERG, P. R., FLAMM, R. K.; JONES, R. N. Effect of the β -lactamase inhibitor vaborbactam combined with meropenem against serine carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 60, n. 9, p. 5454–8, Sep. 2016.
- CHAGAS, T. P. V. *et al.*, Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): Countrywide Spread of OXA-23–Producing Clones (CC15 and CC79). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 468–72. Aug. 2014.
- CHEN, Y. *et al.*, The Deacylation Mechanism of AmpC β -Lactamase at Ultrahigh Resolution. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC., v. 128, n. 9, p. 2970–76. Mar. 2006. Disponível em: <http://doi:10.1021/ja056806m>. Acesso em: 28 abr. 2021.
- CHOI, Y. A Fast Computation of Pairwise Sequence Alignment Scores between a Protein and a Set of Single-Locus Variants of Another Protein. Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, **Computational Biology and Biomedicine**, New York, v. 1, n.1, p. 414-17, Oct. 2012. Disponível em: <http://doi:10.1145/2382936.2382989>. Acesso em: 21 abr. 2021.
- CHOI, Y., CHAN, A. P. PROVEAN Web Server: A Tool to Predict the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. **Bioinformatics**, Oxford, v. 31, n. 16, p. 2745-47, Aug. 2015. Disponível em: <http://doi:10.1093/bioinformatics/btv195>. Acesso em 12 mar. 2021.
- CLÍMACO, E. C. **Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp.** 2011. 76f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE (Pennsylvania). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 10th ed. Wayne, 2015. CLSI supplement M07-A10.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE (Pennsylvania). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed. Wayne, 2018. CLSI supplement M100.

CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem resistance: a review. **Medical Sciences**, Paris, v. 6, n. 1, p. 1, Mar. 2018.

COLLINS, V. L. *et al.*, Efficacy of Ertapenem for Treatment of Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum-B-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 12, n. 4, p. 2173-7, Jan. 2012.

CORVEC, S. AmpC Cephalosporinase Hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, DC., v. 52, n. 4, p. 629–35, Sept. 2003. Disponível em: <http://doi:10.1093/jac/dkg407>. Acesso em: 10 fev. 2021.

CORVEC, S., *et al.*, Genetics and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 51, n. 4, p. 1530-33, Apr. 2007. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.01132-06>. Acesso em 28 jan. 2021.

CRAIG, W. A.; ANDES, D. R. In vivo activities of ceftolozane, a new cephalosporin, with and without tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae, including strains with extended-spectrum β -lactamases, in the thighs of neutropenic mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 57, n. 4, p. 1577-1582, Apr. 2013.

CRICHLLOW, G.V. *et al.*, Structure of the Extended-Spectrum Class C β -Lactamase of *Enterobacter cloacae* GC1, a Natural Mutant with a Tandem Tripeptide Insertion. **Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 32, p. 10256–61, Aug. 1999. Disponível em: <http://doi:10.1021/bi9908787>. Acesso em: 12 dez. 2020.

CRICHLLOW, G.V., *et al.*, Inhibition of Class C β -Lactamases: Structure of a Reaction Intermediate with a Cephem Sulfone. **Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 21, p. 6233–39, May 2001. Disponível em: <http://doi:10.1021/bi010131s>. Acesso em: 31 dez. 2020.

DALLA-COSTA, L. M. *et al.*, Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC., v. 41, n. 7, p. 3403-3406, July 2003.

D'COSTA, V.; WRIGHT, G. D. Biochemical Logic of Antibiotic Inactivation and Modification. *In*: MAYERS, D. L. **Antimicrobial Drug Resistance**. 1. Ed. Nova York: Humana Press, 2009. cap 8, v. 1. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59745-180-2_8. Acesso em: 01 fev 2021.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 11, p. 939–951, Dec. 2007.

DOI, Y.; CHAMBERS, H. F. Other β -lactam Antibiotics. *In*: DOI, Y.; CHAMBERS, H. F. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 8. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2015. cap 22, v. 1.p. 293-297. Disponível em: <https://pure.fujita-hu.ac.jp/en/publications/other-%CE%B2-lactam-antibiotics>. Acesso em: 28 abr. 2020.

DORTET, L. *et al.*, CarbAcineto NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter* sp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC., v. 52, n. 7, p. 2359-2364, July 2014.

DORTET, L. *et al.*, Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* sp. by using a biochemical test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 56, n. 12, p. 6437-6440, Dec. 2012.

DRAWZ, S.M., *et al.*, Inhibition of the Class C Beta-Lactamase from *Acinetobacter* sp.: Insights into Effective Inhibitor Design. **Biochemistry**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 329–40. Jan. 2010. Disponível em: <http://doi:10.1021/bi9015988>. Acesso em: 14 abr. 2021.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, Boston, v. 23, n. 1, p. 160-201, Jan. 2010.

DUPLESSIS, C.; CRUM-CIANFLONE, N.F. Ceftaroline: A New Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Clinical Medicine Reviews in Therapeutics**, Auckland, v. 10, n. 3, p. 2-24, Feb. 2011.

DURAND-RÉVILLE, T. F. *et al.*, ETX2514 is a broad-spectrum β -lactamase inhibitor for the treatment of drug-resistant Gram-negative bacteria including *Acinetobacter baumannii*. **Nature microbiology**, London, v. 2, n. 9, p. 17104, June 2017.

ELLIS, D. *et al.*, Risk factors for hospital-acquired antimicrobial-resistant infection caused by *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 40, Oct. 2015.

ELSHIKH, M. *et al.*, Resazurin-Based 96-Well Plate Microdilution Method for the Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Biosurfactants. **Biotechnology Letters**, Zurich, v. 38, n. 6, p. 1015–19. June 2016. Disponível em: <http://doi:10.1007/s10529-016-2079-2>. Acesso em: 21 dez. 2020.

ENDIMIANI, A. *et al.*, Enhancing Resistance to Cephalosporins in Class C Beta-Lactamases: Impact of Gly214Glu in CMY-2. **Biochemistry**, Oxford, v. 49, n. 5, p. 1014–23. Feb. 2010. Disponível em: <http://doi:10.1021/bi9015549>. Acesso em: 21 jan 2021.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. Oxa β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC., v. 27, n. 2, p. 241-263, Apr. 2014.

FERNANDES, R. *et al.*, β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**, Boston, v. 24, n. 1, p. 7-17, Jan. 2013.

FERREIRA, M. V. C. *et al.*, Penicilina: oitenta anos. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 87, n. 4, p. 272-276, Dec. 2008.

FERRI, M. *et al.*, Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 57, n. 13, p. 2857-2876, Sep. 2017.

FIGUEIREDO, S., *et al.*, In Vivo Selection of Reduced Susceptibility to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii* Related to ISAba1-Mediated Overexpression of the Natural *bla*_{OXA-66} Oxacillinase Gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 53, n. 6, p. 2657–59, June 2009. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.01663-08>. Acesso em: 21 abr. 2020.

FONSECA, E. L. *et al.*, Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of *carO* alleles expression and *bla*_{OXA-23} gene. **BioMed Central Microbiology**, London, v. 13, n. 245, p. 1-7, Nov. 2013.

FORSBERG, K.J. *et al.*, The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science**, New York, v. 337, n. 6098, p. 1107–11, June 2012. Disponível em: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4070369&tool=pmcentrez&rende](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4070369&tool=pmcentrez&rend). Acesso em: 28 abr. 2021.

FRIERI, M. *et al.*, Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 369-378, Aug. 2017.

GAIBAIN, P. *et al.*, Epidemiology of Meropenem/Vaborbactam Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Causing Bloodstream Infections in Northern Italy, 2018. **Antibiotics**, Basel, v. 10, n. 5, Apr. 2021.

GALLENI, M.; FRÈRE, J. M. A Survey of the Kinetic Parameters of Class C β -Lactamases. Penicillins. **Biochemical Journal**, Oxford, v. 255, n. 1, p. 119–22, Oct. 1988. Disponível em: <http://doi:10.1042/bj2550119>. Acesso em: 21 jan. 2021.

GANDRA, S. *et al.*, The mortality burden of multidrug-resistant pathogens in India: a retrospective observational study. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 1-30, Nov. 2018.

GARCIA, C. S.; DE LA GANDARA, M. P.; GARCIA, F. J. Extended-spectrum β -lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 28, n. 1, p. 12-8, Jan. 2010.

GENTELUCI, G. L. *et al.*, Emergence of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 2, p. 91-95, Apr. 2016.

GIRLICH, D. *et al.*, OXA-253, a Variant of the Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 58, n. 5, p. 2976-2978, May 2014.

GOGOU, V. *et al.*, Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** [Internet], v. 66, n. 12, p. 2762-72, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21933784>. Acesso em: 14 nov. 2020.

GRALHA, R. E. F. **Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas - estudo de revisão**. 2011. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Fernando Pessoa, Porto, 2011.

GOESSENS, W.H.F., *et al.*, Antibiotic Trapping by Plasmid-Encoded CMY-2 β -Lactamase Combined with Reduced Outer Membrane Permeability as a Mechanism of Carbapenem Resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 57, n. 8, p. 3941–49. Aug. 2013. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.02459-12>. Acesso em: 17 out. 2020.

GUTKIND, G. O. *et al.*, β -lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. **Current Pharmaceutical Design**, New York, v. 19, n. 2, p. 164–208, Dec. 2013.

HAMIDIAN, M., *et al.*, Horizontal Transfer of an ISAb125-Activated AmpC Gene between *Acinetobacter baumannii* Strains Leading to Cephalosporin Resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, DC., v. 68, n. 1, p. 244–45, Jan. 2013. Disponível em: <http://doi:10.1093/jac/dks345>. Acesso em: 31 mar. 2021.

HAMIDIAN, M.; HALL, R. M. Tn6168, a transposon carrying an ISAb1-activated ampC gene and conferring cephalosporin resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 69, n. 1, p. 77-80, Aug. 2014.

HARGIS, J. *et al.*, Identification and Characterization of Noncovalent Interactions That Drive Binding and Specificity in DD-Peptidases and β -Lactamases. **Journal of Chemical Theory and Computation**, New York, v. 10, n. 2, p. 855-64, Feb. 2014.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, n. 1, p. i3-i10, Sep. 2009.

HECKER, S. J. *et al.*, Discovery of a cyclic boronic acid β -lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases. **Journal of Medicinal Chemistry**, Kansas, v. 58, n. 9, p. 3682-92, Mar. 2015.

HERITIER, C. *et al.*, Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAb1 in *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Microbiology and Infection**, Philadelphia, v. 12, n. 2, p. 123-130, Jan. 2006.

HUJER, K. M. *et al.*, Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 β -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Philadelphia, v. 49, n. 7, p. 2941-2948, July 2005.

INGTI, B. *et al.*, Distribution of Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* with *bla*_{ADC-30} and Induction of ADC-30 in Response to Beta-Lactam Antibiotics. **Research in Microbiology**, Oxford, v. 171, n. 3–4, p. 128–33. Apr. 2020. Disponível em: <http://doi:10.1016/j.resmic.2020.01.002>. Acesso em: 10 jan 2021.

ISLER, B. *et al.*, New treatment options against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Philadelphia, v. 63, n. 1, p. e01110-18, Jan. 2019.

JACOBY, G. A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC., v. 22, n. 1, p. 161–82. Jan. 2010. Disponível em: <http://doi:10.1128/CMR.00036-08>. Acesso em: 22 nov. 2020.

JEON, J. *et al.*, Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 5, p. 9654-9692, Dec. 2015.

JEON, J. H. *et al.*, Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum β -lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, Copenhagen, v. 70, n. 11, p. 2924-2936, Oct. 2014.

JONES, R.N. *et al.*, Doripenem (S4661), A novel carbapenem: Comparative activity against contemporary pathogens including bactericidal action and preliminary in vitro methods evaluations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, DC., v. 54, n. 1, p.144-54, Oct. 2004.

JUNI, E.. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto, v. 32, n. 1, p. 349-371, 1978.

KARAH, N. *et al.*, Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem nonsusceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. **Drug Resistance Updates**, Edinburgh, v. 15, n. 4, p. 237-237, June 2012.

KIM, J. Y. *et al.*, Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C β -lactamase. **Molecular Microbiology**, New York, v. 60, n. 4, p. 907-916, Nov. 2006.

KOZLOWSKI, L. P. IPC – Isoelectric Point Calculator. **Biology Direct**, v. 11, n. 1, p. 55. Dec. 2016. Disponível em: <http://doi:10.1186/s13062-016-0159-9>. Acesso em: 28 out. 2020.

KUHN, D. *et al.*, Beta-lactams and their potential use as novel anticancer chemotherapeutic drugs. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 1, n. 9, p. 2605-17, Nov. 2004.

KUMAR, P. Pharmacology of specific drug groups: antibiotic therapy. *In*: DOWD, F. J.; JOHNSON, B. S.; MARIOTTI, A. J. **Pharmacology and Therapeutics for Dentistry**. 7. ed. Amsterdam: Elsevier, 2017. cap 33, p. 457-487.

KUO, S., *et al.*, Contribution of *Acinetobacter*-Derived Cephalosporinase-30 to Sulbactam Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 1, Mar. 2015. Disponível em: <http://doi:10.3389/fmicb.2015.00231>. Acesso em: 16 jan 2021.

KURIHARA, M. N. L. *et al.*, Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Outbreaks: A Global Problem in Healthcare Settings. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 53, n.1, May 2020. Disponível em: <http://doi:10.1590/0037-8682-0248-2020>. Acesso em: 16 jan 2021.

KURIYAMA, T. *et al.*, Antimicrobial chemotherapy: significance to healthcare. *In*: PERCIVAL, S. L.; WILLIAMS, D. W.; RANDLE, J.; COOPER, T. **Biofilms in Infection Prevention and Control**. 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2014. cap 13, p. 209-244.

KYRIAKIDIS, I., *et al.*, *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. **Pathogens**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 373. Mar. 2021,. Disponível em: <http://doi:10.3390/pathogens10030373>. Acesso em: 19 dez. 2020.

LAI, J., *et al.*, Comparative Phosphoproteomics Reveals the Role of AmpC β -Lactamase Phosphorylation in the Clinical Imipenem-Resistant Strain *Acinetobacter baumannii* SK17. **Molecular and Cellular Proteomics**, Maryland, v. 15, n. 1, Jan. p. 12–25. July 2016. Disponível em: <http://doi:10.1074/mcp.M115.051052>. Acesso em: 14 out. 2020.

LAPUEBLA, A. *et al.*, Activity of imipenem with relebactam against Gram-negative pathogens from New York City. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 59, n. 8, p. 5029-31, Aug. 2015.

LEAL, N. C., *et al.*, Comparative Genomics of *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains From Brazil Reveals Polyclonal Dissemination and Selective Exchange of Mobile Genetic Elements Associated With Resistance Genes. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, n. 1, June 2020. Disponível em: <http://doi:10.3389/fmicb.2020.01176>. Acesso em 28 abr. 2021.

LEE, J. H. *et al.*, Dissemination of transferable AmpC-type β -lactamase (CMY-10) in a Korean hospital. **Microbial Drug Resistance**, New York, v. 10, n. 3, p. 224-230, Sep. 2004a.

LEE, J.H.; Lee, S.H. Carbapenem resistance in gram-negative pathogens: Emerging non-metallo-carbapenemases. **Research Journal of Microbiology**, Dubai, v.1, n. 1, p. 1–22, 2006.

LEE, K. *et al.*, Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 β -lactamases co-mediated by

porin loss. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 201-206, 2007.

LEE, S. J. *et al.*, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analyses of CMY-1 and CMY-10, plasmidic class C β -lactamases with extended substrate spectrum. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, Copenhagen, v. 60, n. 2, p. 382-384, July 2004eon.

LIN, W. R. *et al.*, Rapid control of a hospital-wide outbreak caused by extensively drugresistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii*. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, Kaohsiung, v. 27, n. 6, p. 207-214, June 2011.

LINEWEAVER, H.; BURK, D.. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC., v. 56, n. 3, Mar. p. 658–66, July 1934. Disponível em: <http://doi:10.1021/ja01318a036>. Acesso em: 28 fev. 2021.

LIU, Y. *et al.*, Development of an immunoaffinity solid phase microextraction method for the identification of penicillin binding protein 2a. **Journal of Chromatography**, New York, v. 1364, p. 64-73, Out. 2014.

LIU, Y. *et al.*, **CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking**. *Acta Pharmacologica Sinica*, London, p. 138-44, v. 41, n. 1, July 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41401-019-0228-6>. Acesso em: 11 mar 2021.

LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC., v. 8, n. 4, p. 557-584, Oct. 1995.

LIVERMORE, D. M. *et al.*, Activities of NXL104 combinations with ceftazidime and aztreonam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 55, n. 1, p. 390-4, Jan. 2011.

LIVERMORE, D.M. Interplay of Impermeability and Chromosomal Beta-Lactamase Activity in Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 36, n. 9, P. 2046–48, Sept. 1992. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.36.9.2046>. Acesso em: 30 abr 2021.

LIVERMORE, D. M. *et al.*, In vitro activity of cefepima/zidebactam (WCK 5222) against Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, DC., v. 72, n. 5, p. 1373-85, Feb. 2017.

LIVERMORE, D. M. *et al.*, Interactions of OP0595, a novel triple-action diazabicyclooctane, with β -lactams against OP0595-resistant Enterobacteriaceae mutants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 60, n. 1, p. 554-60, Jan. 2016.

LIVERMORE, D. M. *et al.*, Activity of MK-7655 combined with imipenem against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, DC., v. 68, n. 10, p. 2286-90, May 2013.

LOPES, B. S.; AMYES, S.G.B. Role of ISAb₁ and ISAb₁₂₅ in Governing the Expression of *bla*_{ADC} in Clinically Relevant *Acinetobacter baumannii* Strains Resistant to Cephalosporins. **Journal of Medical Microbiology**, Florida, p. 1103–08, v. 61, n. 8, Aug. 2012. Disponível em: <http://doi:10.1099/jmm.0.044156-0>. Acesso em: 27 jun 2020.

MACEDO, M. L. A. P. *et al.*, Mechanisms of resistance and detection of beta-lactamases. **Unopar Científica**, Londrina, v. 7, n. 1, p. 59-63, Oct. 2005.

MAHILLON, J.; CHANDLER, Michael. Insertion sequences. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 725-774, Sep. 1998.

MARAKI, S. *et al.*, Ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam, and imipenem-relebactam in combination with aztreonam against multidrug-resistant, metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Paris, v. 2, n. 1, p. 37-43, Feb. 2021.

MARTÍNEZ, P.; MATTAR, S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAb₁-*bla*_{OXA-23}, ₅₁ and ISAb₁-*bla*_{ADC-7} genes in Monteria, Colombia. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1274-1280, Dec. 2012.

MARTINS, A. F. *et al.*, Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. **Infection**, Munich, v. 37, n. 5, p. 474-476, Oct. 2009.

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

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

MEDEIROS, A. A. B-lactamases: quality and resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, vol. 3, n. 4, p. 2-9, Feb. 1997.

MEHTA, D.; SHARMA, A. K. Cephalosporins: A review on imperative class of antibiotics. **Molecular Pharmacology**, Minal Residency, v. 1, p. 1-6, Mar. 2016.

MENDES, R. E. *et al.*, Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 2, p. 103-113, abr. 2006.

MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1, p. 25-31, Feb. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442011000100003>. Acesso em: 08 jan. 2019.

MOREY, K. E. *et al.*, Evaluation of the Carba NP Test in Oregon, 2013. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 61, n. 1, Jan. 2017. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.03005-15>. Acesso em: 12 set. 2020.

MORINAKA, A. *et al.*, OP0595, a new diazabicyclooctane: mode of action as a serine β -lactamase inhibitor, antibiotic and β -lactam 'enhancer'. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, DC., v. 70, n. 10, p. 2779-86, June 2015.

MOSTACHIO, A. K. *et al.*, Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* sp. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 58, n. 11, p. 1522-1524, Nov. 2009.

MU, X. *et al.*, Loop-mediated isothermal amplification: rapid and sensitive detection of the antibiotic resistance gene IS*Aba1-bla*_{OXA-51-like} in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 121, p. 36-40, Feb. 2016.

MUSHTAQ, S. *et al.*, of cefepima by the boronate VNRX-5133 versus gram-negative bacteria with known β -lactamases [abstract P1536]. *In: EUROPEAN CONGRESS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES*, 28., 2018, Madrid. **Abstracts of European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. Madrid: Ed. European, 2018.

MUSHTAQ, S. *et al.*, Activity of imipenem/relebactam against *Pseudomonas aeruginosa* producing ESBLs and carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, DC., v. 76, n. 2, p. 434-42, Feb. 2021.

MUSHTAQ, S. *et al.*, Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* spp. with characterized β -lactamases, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 48, n. 1, p. 1313-9, Mar. 2004.

NARCISO, A. R. C. **Mecanismos de resistência à fosfomicina em bactérias uropatogênicas**. 2011. 41f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

NICOLETTI, A. G. **Caracterização genética e bioquímica da BKC-1, uma nova carbapenemase da classe A de Ambler, isolada de amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae***. 2014. 145f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

NOGUEIRA, K. S. **Prevalência e caracterização molecular de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) em enterobactérias isoladas no hospital de clínicas de Curitiba**. 2011. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.

NORCIA, B. M. M. *et al.*, Pacientes pediátricos portadores de enterobactéria resistente aos carbapenêmicos em um hospital escola do Sul do Brasil. **Journal of Infection Control**, St. Louis, v. 4, n. 1, p. 11-15, Oct. 2015.

NORDMANN, P. *et al.*, How to detect NDM-1 producers. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC., v. 49, n. 2, p. 718-721, Feb. 2011.

NORDMANN, P.; MAMMERI, H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. **Future Microbiology**, London, v. 2, n.1, p. 297-307, June 2007.

NUKAGA, M.S.K. *et al.*, Hydrolysis of Third-Generation Cephalosporins by Class C β -Lactamases. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, DC., v. 279, n. 10, p. 9344–52. Mar. 2004. Disponível em: <http://doi:10.1074/jbc.M312356200>. Acesso em: 27 jan. 2021.

NUKAGA, M.S.K. *et al.*, Inhibition of Class A and Class C β -Lactamases by Penems: Crystallographic Structures of a Novel 1,4-Thiazepine Intermediate. **Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 45, p. 13152–59, Nov. 2003. Disponível em: <http://doi:10.1021/bi034986b>. Acesso em: 31 mar. 2021.

OLIVEIRA, K. R. P. **β -lactamases na família Enterobacteriaceae: métodos de detecção e ocorrência**. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Genebra: OMS; 2017 [acesso em 22 mar 2019]. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 20 mar. 2021.

ÖSTERBLAD, M. *et al.*, Evaluation of the Carba NP Test for Carbapenemase Detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 58, n. 12, p. 7553–56. Dec. 2014. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.02761-13>. Acesso em: 31 ago. 2020.

OTTER, J. A. *et al.*, The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, New Jersey, v. 32, n. 7, p. 687-699, July 2011.

PAGE, M. G. P. β -Lactamase inhibitors. **Drug Resistance Updates**, Edinburgh, v. 3, n. 1, p. 109-25, June 2000.

PALZKILL, T. Metallo- β -lactamase structure and function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1277, n. 1, p. 91-104, Jan. 2013.

PAPP-WALLACE, K. M. *et al.*, Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Philadelphia, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, Nov. 2011.

PATERSON, D. L.; DE PESTEL, D. D. Doripenem. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 291-98, July 2009.

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC., v. 21, n. 3, p. 538-82, July 2008.

PÉREZ, A. *et al.*, New mutations in ADC-type β -lactamases from *Acinetobacter* sp. affect cefoxitin and ceftazidime hydrolysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** [Internet], v. 69, n. 9, p. 2407-11, Jan 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24845871>. Acesso em: 12 dez. 2020.

PHAM, P. P. Ertapenem (INVANZ): A New Once a Day Carbapenem. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 1, p. 30-31, Jan. 2002.

PICÃO, R. C. **Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***. 2009. 121f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

POIREL, L. *et al.*, Genetic Basis of Antibiotic Resistance in Pathogenic *Acinetobacter* Species. **IUBMB Life**, London, v. 63, n. 12, p. 1061–67, Dec. 2011. Disponível em: <http://doi:10.1002/iub.532>. Acesso em: 30 abr. 2021.

POIREL, L. *et al.*, OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 49, p. 202-208, Jan. 2005.

POIREL, L. *et al.*, Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 54, n. 1, p. 24-38, Ago. 2010.

POIREL, L. *et al.*, Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 14, p. 75-81, Dec. 2008.

POLSFUSS, S. *et al.*, Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, Boston, v. 49, n. 8, p. 2798-803, Aug. 2011.

POSADA, D. JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 7, p. 1253-56, Apr. 2008.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC., v. 20, n. 3, p. 440-458, July 2007.

QURESHI, Z. A. *et al.*, Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 60, n. 9, p. 1295-1303, May. 2015.

RAMOS, P. I. P. *et al.*, Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. **BioMed Central Genomics**, London, v. 15, n. 54, p. 1-16, Jan. 2014.

REZAEI, D. *et al.*, Correlation between ISAb1 upstream ampC gene and resistance to cefotaxime in *Acinetobacter baumannii*: a serious threat to nosocomial infections.

Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection, Hamedan, v. 3, p. e32417, Jan. 2016.

RINCÓN, C. *et al.*, Elevada proporción de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes aislados en pacientes atendidos en un servicio ambulatorio dermatológico de referencia nacional: cohorte 2010 a 2019." **Infectio**, Bogotá, v. 25, n. 2, p. 101–07, June 2021.

ROCHA, I. V. **Identificação de mecanismos de resistência antimicrobiana de bactérias Gram negativas prevalentes em superfícies e hemoculturas de unidades de terapia intensiva em Caruaru-PE**. 2017. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

ROCHA, I.V. *et al.*, Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones persist on hospital inanimate surfaces. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Rio de Janeiro , v. 22, n. 5, p. 438-441, Sep. 2018.

ROCHA, I.V. *et al.*, Resistance of bacteria isolated from equipment in an intensive care unit. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 433-439, Oct. 2015.

RODRÍGUEZ, I. *et al.*, Chromosomal location of *bla*_{CTX-M} genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, the Netherlands and the UK. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 43, n. 6, p. 553-557, June 2014.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M. *et al.*, Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 54, n. 8, p. 3484-3488, Aug. 2010.

ROSTAMI, S. *et al.*, Investigating of Four Main Carbapenem-Resistance Mechanisms in High-Level Carbapenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Patients. **Journal of the Chinese Medical Association**, Tóquio, v. 81, n. 2, p. 127–32, Feb. 2018. Disponível em: <http://doi:10.1016/j.jcma.2017.08.016>. Acesso em: 31 jan. 2021.

RUPPÉ, É. *et al.*, Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**, Heidelberg, v. 5, n. 1, p. 21, Aug. 2015.

SHAH, P. M.; ISAACS, R. D. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, DC., v. 52, n. 4, p. 538-42, Oct. 2003.

SADER, H. S. *et al.*, Antimicrobial activity of CXA-101, a novel cephalosporin tested in combination with tazobactam against Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacteroides fragilis* strains having various resistance phenotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 55, n. 5, p. 2390-2394, May. 2011.

SALIM, D. K. *et al.*, Assessment of bacteria exposure in vitro activity to 1st, 2nd, 3rd and 4th generation-cephalosporins and Comparison effects. **Tikret Journal of Pharmaceutical Sciences**, Tikrit, v. 12, n. 1, p. 48-55, Oct. 2017.

SANTIAGO, G. S. *et al.*, Revisão: Produção de β -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 17-30, Dec. 2016.

SARANATHAN, R., *et al.*, Detection of ISAb₁ in Association with a Novel Allelic Variant of the β -Lactamase ADC-82 and Class D β -Lactamase Genes Mediating Carbapenem Resistance among the Clinical Isolates of MDR *A. baumannii*. **Journal of Medical Microbiology**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 103–11, Feb. 2017. Disponível em: <http://doi:10.1099/jmm.0.000395>. Acesso em: 03 mar. 2021.

SAUBERAN, J. B.; BRADLEY, J. S. Antimicrobial Agents. *In*: LONG, S. S.; PROBER, C. G.; FISCHER, M. **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**. 5 ed. Amsterdam: Elsevier, 2018. cap 292, p. 1499-1531.

SHAIKH, S., *et al.*, Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 22, n. 1, p. 90-101, Jan. 2015.

SHIELDS, R. K. *et al.*, Verification of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam susceptibility testing methods against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, Hamedan, v. 56, n. 2, p. e01093-17, Jan. 2018.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 91-99, Apr. 2012.

SILVEIRA, M. **Fatores de risco, clonalidade, sazonalidade e prognóstico de colonização e/ou infecção por *Acinetobacter baumannii* em hospitais públicos na cidade de Bauru/SP**. 2018. 116f. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

SKALWEIT, M.J. *et al.*, Effect of Asparagine Substitutions in the YXN Loop of a Class C β -Lactamase of *Acinetobacter baumannii* on Substrate and Inhibitor Kinetics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 59, n. 3, p. 1472–77, Mar. 2015. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.03537-14>. Acesso em: 01 abr. 2021.

SKALWEIT, M. J. *et al.*, N152G, -S, and -T Substitutions in CMY-2 β -Lactamase Increase Catalytic Efficiency for Cefoxitin and Inactivation Rates for Tazobactam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 57, n. 4, p. 1596–602, Apr. 2013. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.01334-12>. Acesso em: 03 mar. 2021.

STOVER, K. R. *et al.*, Allergic reactions and cross-reactivity potential with beta-lactamase inhibitors. **Pharmacy**, Philadelphia, v. 7, n. 3, p. 77, June 2019.

TAKAGI, E., H. **Caracterização molecular e fenotípica de amostras bacterianas pertencentes ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii***. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TAKEUCHI, D. *et al.*, Establishment of a Dual-Wavelength Spectrophotometric Method for Analysing and Detecting Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. **Scientific Reports**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 15689, Dec. 2018. Disponível em: <http://doi:10.1038/s41598-018-33883-0>. Acesso em: 03 dez. 2020.

TEIXEIRA, B. B. *et al.*, First report of carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* isolates harboring ISAbA1-*bla*_{OXA-23} genes in Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**, Hamedan, v. 51, n. 8, p. 2739-2741, Aug. 2013.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. **Journal of Clinical Microbiology**, Boston, v. 48, n. 4, p. 1019-25, apr. 2010.

TIAN, G.B. *et al.*, Extended-Spectrum AmpC Cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 Confers Resistance to Cefepima. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 55, n. 10, p. 4922-5, July 2011.

TIJET, N. *et al.*, Evaluation of the Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC., v. 57, n. 9, p. 4578–80, Sept. 2013. Disponível em: <http://doi:10.1128/AAC.00878-13>. Acesso em: 04 jan 2020.

TOOKE, C. L., *et al.*, β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, La Jolla, v. 431, n. 18, p. 3472–500. Aug. 2019. Disponível em: <http://doi:10.1016/j.jmb.2019.04.002>. Acesso em: 30 abr. 2021.

TSUBOUCHI, T. *et al.*, Complete Genome Sequence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T, a Model Strain of Pathogenic Bacteria Causing Nosocomial Infection. **Microbiology Resource Announcements**, Washington, DC., v. 9, n. 20, p. e00289-20, May 2020, Disponível em: <http://doi:10.1128/MRA.00289-20>. Acesso em: 03 dez. 2020.

TURCK, M. *et al.*, Clinical studies with cloxacillin: a new antibiotic. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 192, n. 11, p. 961-963, June 1965.

TURTON, J. F. *et al.*, The Role of ISAbA1 in Expression of OXA Carbapenemase Genes in *Acinetobacter baumannii*: Role of ISAbA1 in Expression of OXA Carbapenemase Genes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 258, n. 1, p. 72–77, May 2006. Disponível em: <http://doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x>. Acesso em: 13 abr. 2020.

TYAGI, R; DUGGLEBY, R. L. A. I. A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. **BMC Biotechnology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 2, 2004.

VAN DER ZWALUW, K. *et al.*, The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. **PloS One**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0123690, July 2015.

VANDECRAEN, J. *et al.*, The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. **Critical Reviews in Microbiology**, Cham, v. 43, n. 6, p. 709-730, Nov. 2017.

VENTOLA, C. L.. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, Philadelphia, v. 40, n. 4, p. 277, Apr. 2015.

VERMA, P. *et al.*, In-Silico Approach Explains Evolution of Beta-Lactamases from Penicillin Binding Proteins. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, Amsterdam, v. 9, n. 10, p. 248-54, Oct. 2016.

VILLAR, M. *et al.*, Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection. **Medicine**, Baltimore, v. 93, n. 5, p. 202-210, July 2014.

VILLALÓN, P. *et al.*, Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC., v. 49, n. 3, p. 875- 882, Mar. 2011.

VISCA, P. *et al.*, *Acinetobacter* infection - An emerging threat to human health. **IUBMB Life**, London, v. 63, n. 12, p. 1048-54, Dec. 2011.

VISWANATHAN, V. K. Off-label abuse of antibiotics by bacteria. **Gut Microbes**, Washington, DC., v. 5, n. 1, p. 3-4, Jan. 2014.

WANG, D. Y. *et al.*, The road to avibactam: the first clinically useful non- β -lactam working somewhat like a β -lactam. **Future Medicinal Chemistry**, New York, v. 8, n. 10, p. 1063-84, July 2016.

WEI, H. *et al.*, Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection among Neonates in a Neonatal Intensive Care Unit at a Medical Center in Central Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, v. 48, n. 5, p. 531–39, Oct. 2015.

WISTRAND-YUEN, E. *et al.*, Evolution of High-Level Resistance during Low-Level Antibiotic Exposure. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1599, Dec. 2018.

WOOLHOUSE, M. *et al.*, Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, United Kingdom, v. 370, n. 1670, p. 20140083, June 2015.

YANG, T. *et al.*, Activities of imipenem-relebactam combination against carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, v. 5, n. 1, p. 1-9, Feb. 2021.

ZAHRA, S. W.; NAQVI, M. A. R. Carbapenems: A Short Review about their Current Status. **International Journal of Current Science Research and Review**, Hamdard, v. 4, n. 1, p. 18-22, Jan. 2021.

ZAVASCKI, A.P. *et al.*, Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, Ottawa, v. 8, n. 1, p. 71-93, Jan. 2010.

ZHANEL, G. G. *et al.*, Comparative review of the carbapenems. **Drugs**, London, v. 67, n. 7, p. 1027-1052, July 2007.

ZHANEL, G. G. *et al.*, Imipenem–Relebactam and Meropenem–Vaborbactam: Two Novel Carbapenem- β -Lactamase Inhibitor Combinations. **Drugs**, Paris, v. 78, n. 1, p. 65-98, Dec. 2017.

ZHOU, J. *et al.*, Molecular evolution and binding free energy analysis of substrates of cephalosporinase ADC-57. **Chinese Journal of Clinical and Infectious Diseases**, Zhejiang, v. 5, n. 2, p.77-80, Aug. 2012.

ZHU, Y. *et al.*, Complete Genome Sequence and Genome-Scale Metabolic Modelling of *Acinetobacter baumannii* Type Strain ATCC 19606. **International Journal of Medical Microbiology**, Washington, DC., v. 310, n. 3, p. 151-412, Apr. 2020. Disponível em: <http://doi:10.1016/j.ijmm.2020.151412>. Acesso em: 03 mar. 2021.

APÊNCICE A – ARTIGOS PUBLICADOS

Artigos científicos relacionados à tese e publicados em revistas indexadas

1. Leal Nilma C., Campos Túlio L., Rezende Antônio M., Docena Cássia, Mendes-Marques Carina L., de Sá Cavalcanti Felipe L., Wallau Gabriel L., Rocha Igor V., Cavalcanti Carmelita L. B., Veras Dyana L., Alves Lilian R., Andrade-Figueiredo Mariana, de Barros Maria P. Silva, de Almeida Alzira M. Paiva, de Moraes Marcia M. Camargo, Leal-Balbino Tereza C., Xavier Danilo E., de-Melo-Neto Osvaldo P. **Comparative Genomics of *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains From Brazil Reveals Polyclonal Dissemination and Selective Exchange of Mobile Genetic Elements Associated With Resistance Genes.** *Frontiers in Microbiology*, v. 11, n. 1, June 2020. Disponível em: <http://doi:10.3389/fmicb.2020.01176>.
2. Rocha Igor V., Xavier Danilo E., Rissele Karoline H., de Oliveira, Sibebe R., Leal Nilma C. **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones persist on hospital inanimate surfaces.** *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Rio de Janeiro , v. 22, n. 5, p. 438-441, Sep. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.08.004>.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Declaração de dispensa de Comitê de Ética em Pesquisa e Comissão de Ética no Uso de Animais



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

DECLARAÇÃO

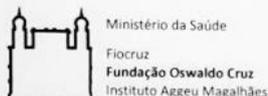
Declaro, para fins acadêmicos, que o projeto intitulado “**Estudo de variantes de β -lactamases ADC de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. na resistência aos β -lactâmicos**”, do discente **Igor Vasconcelos Rocha**, do curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE), sob a orientação da pesquisadora **Dra. Nilma Cintra Leal** e coorientação do pesquisador **Dr. Danilo Elias Xavier**, não envolve seres humanos e/ou animais, seja de forma direta ou indireta, portando o mesmo não necessita ser avaliado criteriosamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Recife, 24 de janeiro de 2019

Dr. Danilo Elias Xavier
Pesquisador em Saúde Pública
Instituto Aggeu Magalhães

ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO DE BIOSSEGURANÇA

Parecer da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Instituto Aggeu Magalhães



PARECER PRÉVIO

DADOS GERAIS DO PROJETO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo de variantes de Beta lactamases ADC de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp na resistência aos Beta-lactêmicos
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Danilo Elias Xavier
LABORATÓRIO ONDE SERÁ REALIZADO O PROJETO: Laboratório de Microbiologia, Bloco B, Térreo, Instituto Aggeu Magalhães
 Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Recife-PE
DATA DE APRESENTAÇÃO A CIBio: 19/03/2018
REGISTRO NA CIBio: 03 /2018
NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA DO LABORATÓRIO: NB-1 e NB-2, conforme DOI N° 132, terça-feira, 14 de julho de 2015.
MICRORGANISMOS MANIPULADOS (OGM):
 Bactérias:
 Isolados clínicos de *Acinetobacter* spp
Escherichia coli DH5a, BL21

MICRORGANISMOS MANIPULADOS (NÃO OGM):
 Isolados clínicos de *Acinetobacter* spp

I – ITENS A SEREM ANALISADOS

Declaração de Adequação da Infraestrutura Laboratorial
 CONFORME NÃO CONFORME

Termo de Responsabilidade
 CONFORME NÃO CONFORME

Plantas
 CONFORME NÃO CONFORME

Qualificação da Equipe
 CONFORME NÃO CONFORME

II – ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA

Adequação de EPCs e EPIs utilizados no projeto
 CONFORME. NÃO CONFORME

Descontaminação / Descarte de Resíduos
 CONFORME NÃO CONFORME

Classificação do NB para o OGM manipulado

ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO DE BIOSSEGURANÇA

Parecer da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Instituto Aggeu Magalhães



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

CONFORME

Vide item comentários

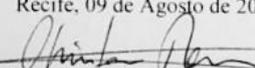
NÃO CONFORME

III – PARECER

A CIBio/IAM, no uso de suas atribuições, em conformidade com a Resolução Normativa nº 1, de 20 de junho de 2006, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), avaliou o projeto acima descrito e destaca alguns pontos para esclarecimento do pesquisador:

- 1) O projeto prevê que seja desenvolvido em NB-2. Como prevê Resolução Nº 18, de 23 de março de 2018 Capítulo II Art.4 § 2º Para atividades com OGM das Classes de Risco 2, 3 e 4, a CIBio deverá obter da CTNBio autorização para cada projeto e as informações apresentadas deverão estar de acordo com o Requerimento de Autorização para Atividades em Contenção com OGM e seus derivados. Todavia, não está descrito no resumo do projeto (item 9) se o Pesquisador vai apenas expressar em *Escherichia coli* seqüências de *Acinetobacter baumannii*, que parece ser o objetivo uma vez que menciona o primeiro organismo como receptor (item 10a). Se o objetivo do projeto é apenas usar *E.coli*, o trabalho poderá ser conduzido em NB-1.
- 2) No item 19a informa que os OGMs serão descartados em hipoclorito de sódio a 2% e em seguida autoclavados. Ajustar informando que os OGMs serão acondicionados em experimentos adequados e submetidos a autoclavação por 121°C por 30 minutos.
- 3) O projeto deverá ser encaminhado à CTNBio para análise, se for o caso (vide item 1).
- 4) Em virtude do atraso da avaliação do projeto submetido a esta Comissão, os próximos trâmites serão imediatos.

Recife, 09 de Agosto de 2018.


Christian Robson de Souza Reis
Presidente da CIBio

Christian R. de Souza Reis
Presidente da CIBio
Mat. Slppe 1630643
IAM / Fiocruz