



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



MECANISMOS DE AÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA DA NISINA E EM COMBINAÇÕES  
COM ANTIMICROBIANOS TRADICIONAIS SOBRE  
*Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA)  
E *Pseudomonas aeruginosa*

**FERNANDA CRISTINA BÉRGAMO ALVES**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção  
do título de doutor (a) no Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área  
de concentração: *Biologia de parasitas e  
micro-organismos*

*Orientador: Prof. Adj. Ary Fernandes Junior*

*Co-orientadora: Dra. Lidiane Nunes Barbosa*

**BOTUCATU – SP**

**2018**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

MECANISMOS DE AÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA DA NISINA E EM COMBINAÇÕES  
COM ANTIMICROBIANOS TRADICIONAIS SOBRE  
*Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA)  
E *Pseudomonas aeruginosa*

**FERNANDA CRISTINA BÉRGAMO ALVES**

**PROF. ADJUNTO ARY FERNANDES JÚNIOR**

**Dra. LIDIANE NUNES BARBOSA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção  
do título de doutor (a) no Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área  
de concentração: *Biologia de parasitas e  
micro-organismos*

**BOTUCATU – SP**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Alves, Fernanda Cristina Bergamo.

Mecanismos de ação da atividade antibacteriana da nisina e em combinações com antimicrobianos tradicionais sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilia (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* / Fernanda Cristina Bergamo alves. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Ary Fernandes Junior  
Coorientador: Lidiane Nunes Barbosa  
Capes: 20100000

1. Nisina. 2. Sinergismo farmacológico. 3. Antibacterianos. 4. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. 5. *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: Antibacterianos; Nisina; *Pseudomonas aeruginosa*; Sinergismo; *Staphylococcus aureus*.

*Dedico esta tese*

*Aos meus pais **José Sebastião Alves e Ivone Maria Bergamo Alves**,  
por sempre acreditarem e não desistirem desse sonho comigo em nenhum momento,  
obrigada por todo apoio e principalmente por me amar incondicionalmente.  
Eu nunca conseguiria agradecer e descrever o tamanho do meu amor.*

*Ao meu avô **Adelino Alves** por ser minha inspiração diária e meu objetivo de vida.  
Aos meus avós (**Antônio Bergamo e Antônia Bergamo**) que infelizmente não estão  
mais aqui, mas que de certa forma me inspiraram nessa caminhada, e principalmente  
minha avó **Rosa Garbelotti Alves** (in memoriam), minha “professora particular”, e  
responsável por tudo que sou até hoje, além de ser o amor da minha vida.*

*“Avós que cuidam de seus netos deixam marcas em suas almas”*

## *Agradecimentos*

Em primeiro lugar e sempre agradecer a **Deus**, a força que nos move para que possamos alcançar todos nossos objetivos, superar nossas dificuldades. Tudo isso é possível graças a ele!

As minhas amadas amigas do Laboratório de Bacteriologia e Produtos naturais (LABAP): **Bruna**, **Mariana** e **Ana Flávia** que estiveram presente comigo em todo esse ciclo muito, mais que companheiras de trabalho, obrigada pela parceria de sempre, seja no laboratório, em congressos, nas melhores viagens da vida, em casa conversando e jogando conversa fora. Ganhei amigas pra uma vida toda. **Jéssica**, companheira desde graduação e a cada ano se tornando mais e mais importante na minha vida, obrigada por tantos conselhos pessoais e acadêmicos. E claro outros presentes que a vida em Botucatu em me trouxe: **Carolina (Caru)**, **Tarsila** e **Renata** vou levar vocês pra sempre comigo. Eu AMO vocês, Botucatu jamais seria a mesma sem vocês.

Ao meu namorado **Lucas**, por sempre me entender e me incentivar e claro me aguentar nos piores momentos, obrigada por tudo, sem seu apoio essa reta final com certeza teria sido mais difícil. Você é meu melhor presente. Eu te Amo.

A toda minha família, e amigos presentes desde a infância que com certeza são também minha família, obrigada pelo incentivo e apoio de sempre.

A todos os **funcionários, professores e alunos do Departamento de Microbiologia e Imunologia**, em especial a **Prof. Teruê Sadatsune**, **Prof. Vera Lúcia Mores Rall**, **Prof. Sandra de Moraes Gimenes Bosco**, **Luís Severino dos Santos (Lula)**, **Luís Alquati**, **Ivana Castilho**, e **Ana Cláudia Acerra** por toda ajuda e amizade, e claro por todas as risadas e festas de confraternização.

Aos **professores doutores** presentes na banca de defesa da tese por aceitarem o convite e disponibilizarem seu tempo na avaliação do trabalho.

As professoras **Ana Angélica Henrique Fernandes** e **Fabiana Ferreira de Souza**, pelos laboratórios cedidos para realização de parte do trabalho e todo aporte acadêmico concedido e também pela participação ao lado da **Prof. Vera Lúcia Mores Rall** na banca de qualificação.

Ao **Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP)** pela infraestrutura e condições para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial a Prof. **Lucilene Delazari dos Santos**, sempre disposta a ajudar e a nos inspirar com seu amor a pesquisa e principalmente a proteômica.

Ao **Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (LnBio)**, pertencente ao CNPEM, Campinas, SP pelo suporte nas análises de espectrometria de massas, especialmente a **Bianca Alves Pauletti** por toda a atenção e pelo apoio na análise dos dados.

À **FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)** pelo auxílio à pesquisa (2015/14278-6), e a **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pela bolsa de doutorado concedida.

E finalmente agradeço a duas pessoas que foram minha base, força e inspiração na realização deste trabalho:

Minha amiga e co-orientadora **Lidiane Nunes Barbosa**, obrigada por tudo, por ser meu espelho, pela ajuda científica e principalmente pela amizade de sempre. Tenho muito orgulho de ser sua amiga, sua co-orientada. Esse trabalho só foi possível graças ao seu empenho e dedicação em aprender e principalmente em ensinar. Obrigada por acreditar sempre em mim, me incentivar, pelos inúmeros conselhos, artigos, cafés, risadas, e cerveja.

Meu orientador **Ary Fernandes Junior**, por sempre acreditar em mim, desde o mestrado, por todo conhecimento passado, e por ser essa pessoa muito especial que acaba sendo muito mais que um chefe, e sim um amigo e muitas vezes um pai. Obrigada por nos deixar sempre a vontade e nos fazer sentir capaz de realizarmos e conseguirmos nossos objetivos. Obrigada por todas as histórias e conselhos dados nesses anos todos. Sua paixão por ensinar nos **INSPIRA!**

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

*(Madre Teresa de Calcuta)*

*"Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância".*

*(John Fitzgerald Kennedy)*

## Resumo

Combinações entre antimicrobianos, a exemplo de nisina (bacteriocina) e fármacos antibacterianos tradicionais, podem amenizar o problema da resistência bacteriana, pois o possível efeito sinérgico se torna estratégico, possibilitando o uso de doses menores no tratamento de doenças infecciosas com redução nos custos e na toxicidade, além de ter potencial na prevenção do surgimento das linhagens resistentes. No entanto, os mecanismos envolvidos na ação antibacteriana são importantes para pesquisas de novos fármacos. O objetivo do estudo foi investigar como a nisina, alguns fármacos antibacterianos e respectivas combinações interferem no metabolismo de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*, através de ensaios de estresse oxidativo bacteriano, análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise do perfil de proteínas expressas nas bactérias quando expostas aos antimicrobianos e suas combinações em concentrações subletais. Inicialmente foram realizados ensaios visando obter os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração subletal máxima (CSM) para nisina e fármacos como tetraciclina, ciprofloxacina, vancomicina, polimixina B, oxacilina e cefalotina para ambas bactérias. Na sequência, foram realizados ensaios para verificação de sinergismo entre nisina e antibacterianos utilizando metodologia da curva de sobrevivência, sendo escolhidas para ensaios posteriores, as combinações com demonstração de sinergismo (redução na contagem bacteriana final acima de 2 logs de UFC/mL em relação ao inóculo inicial). As combinações entre  $\frac{1}{4}$  CIM de nisina e  $\frac{1}{4}$  CIM de oxacilina e  $\frac{1}{4}$  CIM de nisina e  $\frac{1}{4}$  CIM ciprofloxacina foram escolhidas para o estudo com MRSA e *P. aeruginosa* respectivamente. Nos ensaios sobre estresse oxidativo, a combinação nisina/oxacilina foi capaz de aumentar o estresse oxidativo em MRSA notado pelo aumento significativo das atividades de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase) e de hidróperóxido de lipídeo em comparação aos tratamentos realizados individualmente e ao controle. Quanto a *P.aeruginosa*, a combinação nisina/ciprofloxacina aumentou atividades das enzimas antioxidantes e de hidróperóxido de lipídeo, porém não foi superior ao tratamento com a ciprofloxacina individualmente. As imagens obtidas por MET revelaram os danos na estrutura celular, especialmente na parede bacteriana e membrana plasmática, com conseqüente lise e efluxo dos constituintes citoplasmáticos em ambas bactérias, especialmente quando utilizadas no tratamento com as combinações. A análise do perfil proteico de MRSA mostrou alterações na expressão de 85 proteínas quando comparado controle com os ensaios dos antibacterianos individualmente e na combinação nisina/oxacilina, sendo que nesta combinação destacou-se a modificação na expressão de proteínas relacionadas a síntese de proteínas, diminuição na expressão de proteínas relacionadas ao estresse e na indução de proteína de resistência do *S.aureus* como a beta-lactamase. Para a *P. aeruginosa*, foram expressas 63 proteínas diferentes entre os ensaios controle, tratamentos individuais e na combinação nisina/ciprofloxacina, sendo que na combinação houve maior alteração para as proteínas relacionadas ao metabolismo energético da bactéria, bem como na diminuição significativa de expressão



das proteínas presentes na membrana externa como as porinas. De acordo com esses estudos dos efeitos de antibacterianos sobre metabolismo de patógenos importantes como MRSA e *Pseudomonas aeruginosa*, pôde-se afirmar que as alterações causadas pelos tratamentos utilizando combinações de antibacterianos foram causadas por diferentes processos biológicos nas células bacteriana, o que pode ser uma resposta global aos tratamentos com combinações de antimicrobianos, que apresentam mecanismos de ação distintos. As respostas bacterianas obtidas neste estudo representam um ponto inicial para desenvolvimento de novas opções farmacêuticas, além de contribuir para redução dos problemas decorrentes da resistência bacteriana.

**Palavras chave:** Antibacterianos, Análise proteômica, nisina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).

## Abstract

Combinations of antimicrobials, such as nisin (bacteriocin) and traditional antibacterial drugs, may assuage the problem of bacterial resistance because the possible synergistic effect becomes interesting, allowing the use of smaller doses in the treatment of infectious diseases and reduction in costs and toxicity, besides having potential in the prevention of the emergence of resistant strains. However, the mechanisms involved in antibacterial action are important for research on new drugs. The aim of this study was to investigate how nisin, antibacterial drugs and their combinations interfere in the metabolism of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa*, verified in bacterial oxidative stress assays, morphological analyzes by transmission electron microscopy (TEM) and analysis of the protein profile expressed in bacteria when exposed to antimicrobials and combinations in sublethal concentrations. Initially, assays were performed to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC) and maximum sublethal concentration (MSC) for nisin and drugs such as tetracycline, ciprofloxacin, vancomycin, polymyxin B, oxacillin and cephalothin for both bacteria. Subsequently, assays were performed to verify the synergism between nisin and antibacterials using time kill curve methodology and the combinations with demonstration of synergism (reduction in final bacterial count above 2 logs of CFU / mL in relation to initial inoculum) were chosen for later experiments. The combinations between  $\frac{1}{4}$  nisin MIC and  $\frac{1}{4}$  MIC of oxacillin and  $\frac{1}{4}$  MIC of nisin and  $\frac{1}{4}$  MIC of ciprofloxacin were chosen for the study with MRSA and *P. aeruginosa* respectively. In the oxidative stress assays, the nisin / oxacillin combination was able to increase oxidative stress in MRSA, noted by a significant increase in the activities of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase) and lipid hydroperoxide compared to treatments individually and the bacterial without treatment (control). As to *P. aeruginosa*, the combination of nisin / ciprofloxacin increased activities of antioxidant enzymes and lipid hydroperoxide, but not superior to treatment with ciprofloxacin individually. The images obtained by MET revealed the damages in the cellular structure, especially in the bacterial wall and plasma membrane, with consequent lysis and efflux of the cytoplasmic constituents in both bacteria, especially when using the combinations. The analysis of the protein profile of MRSA showed alterations in the expression of 85 proteins when compared the control with antibacterial assays individually and the nisin / oxacillin combination. In the combination highlighted the expression of proteins related to protein synthesis, decrease the expression of stress-related proteins and induction the of *S. aureus* resistance protein such as beta-lactamase. For *P. aeruginosa*, 63 different proteins were expressed between the control, individual treatments and nisin / ciprofloxacin combination. There was a greater alteration in the combination proteins related to the energetic metabolism of the bacteria, as well as in the significant decrease of expression of the proteins present in the outer membrane such as porins. According to these studies of the effects of antibacterials on metabolism of important pathogens such as MRSA and *Pseudomonas aeruginosa*, it could be claim that the changes caused by treatments using antibacterial combinations were caused by different biological processes in bacterial cells, which may be a response treatment with combinations of antimicrobials, which have different mechanisms of action. These bacterial responses

obtained in this study are important to researches for the development of new antibacterial drugs and contribute to the reduction of problems due to bacterial resistance.

**Key words:** Antibacterials, nisin, proteome analysis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (MRSA).

## Lista de figuras

- Figura 1:** Estrutura química da nisina 23
- Figura 2:** Modo de ação da nisina 24
- Figura 3:** Curvas de sobrevivência para verificação das interações entre nisina e os fármacos antibacterianos: tetraciclina, vancomicina, polimixina B, cefalotina, ciprofloxacina e oxacilina testados isoladamente (CIM) e em combinações ( $\frac{1}{4}$  CIM nisina +  $\frac{1}{4}$  CIM fármaco) sobre MRSA. 38
- Figura 4:** Curvas de sobrevivência para verificação das interações entre nisina e os fármacos antibacterianos: tetraciclina, vancomicina, polimixina B, cefalotina, ciprofloxacina e oxacilina testados isoladamente (CIM) e em combinações ( $\frac{1}{4}$  CIM nisina +  $\frac{1}{4}$  CIM fármaco) sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853. 38
- Figura 5:** Atividades as enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px) e marcador (HL) em *S. aureus* (MRSA) após crescimento em concentrações sub-letais de agentes antimicrobianos testados. 40
- Figura 6:** Atividades as enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px) e marcador (HL) em *P. aeruginosa* após crescimento em concentrações sub-letais de agentes antimicrobianos testados. 40
- Figura 7:** Alterações morfológicas causadas por nisina, oxacilina e combinação em MRSA ATCC 33591 observadas por microscopia eletrônica de transmissão. 41
- Figura 8:** Alterações morfológicas causadas por nisina, ciprofloxacina e combinação em *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 observadas por microscopia eletrônica de transmissão. 42
- Figura 9:** Processos biológicos das proteínas expressas (up e down regulation) de MRSA exposto a aos tratamentos com nisina, oxacilina e na combinação entre nisina e oxacilina em comparação com a bactéria não tratada (controle). 49
- Figura 10:** Função molecular das proteínas expressas (up e down regulation) de MRSA exposto a aos tratamentos com nisina, oxacilina e na combinação entre nisina e oxacilina em comparação com a bactéria não tratada (controle). 49
- Figura 11:** Diagrama de Venn. Proteínas de MRSA expressas diferentemente em cada tratamento em relação ao controle. a= MRSA tratado com nisina, b= MRSA tratado com oxacilina e c=MRSA tratado com nisina e oxacilina 50
- Figura 12:** Rede de interações de proteínas de MRSA do tratamento da combinação entre nisina e oxacilina expressas diferente em relação ao controle e demais tratamentos.

A rede foi obtida no software STRING (<http://string-db.org/>). Imagem foi editada para ressaltar a divisão de acordo com a função biológica. 50

**Figura 13:** Processos biológicos das proteínas expressas (up e down regulation) de *Pseudomonas aeruginosa* exposto a aos tratamentos com nisina, ciprofloxacina e na combinação entre nisina e ciprofloxacina em comparação com a bactéria não tratada (controle). 56

**Figura 14:** Função molecular das proteínas expressas (up e down regulation) de *Pseudomonas aeruginosa* exposto a aos tratamentos com nisina, ciprofloxacina e na combinação entre nisina e ciprofloxacina em comparação com a bactéria não tratada (controle) 56

**Figura 15:** Diagrama de Venn. Proteínas de *Pseudomonas aeruginosa* expressas diferentemente em cada tratamento em relação ao controle. 57

**Figura 16:** Rede de interações de proteínas de *P. aeruginosa* do tratamento da combinação entre nisina e oxacilina expressas diferente em relação ao controle e demais tratamentos. 57

### Lista de tabelas

**Tabela 1:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos e da nisina ( $\mu\text{g/mL}$ ;  $\pm\text{DP}$ ) dos antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus* MRSA e *Pseudomonas aeruginosa*. 37

**Tabela 2:** Concentração Subletal Máxima (CSM) dos antibióticos e da nisina ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus* MRSA e *Pseudomonas aeruginosa*. 37

**Tabela 3:** Proteínas expressas diferentemente de MRSA entre os tratamentos testados ( $p < 0,05$ ) e fold change utilizando a bactéria não tratada (controle) como referência. 45

**Tabela 4:** Proteínas expressas diferentemente de *Pseudomonas aeruginosa* entre os tratamentos testados ( $p < 0,05$ ) e fold change utilizando a bactéria não tratada (controle) como referência. 53

## Sumário

<b>1. Introdução e Justificativa</b>	15
<b>2. Revisão de literatura</b>	17
<b>2.1 Resistência bacteriana e patógenos causadores de infecções</b>	17
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	18
2.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
<b>2.2 Antimicrobianos naturais</b>	20
2.2.1 <i>Bacteriocinas</i>	21
2.2.2 <i>Nisina</i>	22
<b>2.3 Estresse oxidativo em bactérias</b>	26
<b>2.4 Proteômica</b>	27
<b>3. Objetivos</b>	29
<b>4. Materiais e Métodos</b>	30
<b>4.1 Linhagens bacterianas e Antibacterianos</b>	30
<b>4.3 Curva de sobrevivência</b>	31
<b>4.4 Extração de proteínas e quantificação</b>	31
<b>4.5 Análise do estresse oxidativo</b>	32
4.5.1 <i>Determinação da concentração de hidróperóxido de lipídio</i>	32
4.5.2 <i>Determinação da atividade da glutathione peroxidase</i>	32
4.5.3 <i>Determinação da atividade da superóxido dismutase</i>	33
4.5.4 <i>Determinação da atividade da catalase</i>	33
<b>4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</b>	33
<b>4.7 Análise proteômica</b>	34
4.7.1 <i>Extração de proteínas</i>	34
4.7.2 <i>Digestão das proteínas em gel</i>	34
4.7.3 <i>Análise por espectrometria de massas (LC-MS/MS)</i>	35
4.7.4 <i>Processamento dos dados</i>	35
<b>4.8 Análise Estatística</b>	36
<b>5. Resultados</b>	37
<b>5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Subletal Máxima (CSM)</b>	37

<b>5.2 Curva de sobrevivência</b>	37
<b>5.3 Atividade das enzimas antioxidantes</b>	39
<b>5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</b>	41
<b>5.5 Análise Proteômica</b>	42
<b>5.5.1 Análise proteômica de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA) ATCC 33591 submetida a concentrações subletais dos antibacterianos e combinação</b>	42
5.5.1.1 <i>MRSA tratado com nisina</i>	43
5.5.1.2 <i>MRSA tratado com oxacilina</i>	43
5.5.1.3 <i>MRSA tratado com a combinação nisina/oxacilina</i>	44
<b>5.5.2 Análise proteômica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 submetido à concentrações sub-letais dos antibacterianos e combinação</b>	51
5.5.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa tratada com nisina</i>	51
5.5.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa tratada com ciprofloxacina</i>	52
5.5.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa tratada com combinação nisina/ciprofloxacina</i>	52
<b>6. Discussão</b>	58
<b>6.1 Testes de sensibilidade e verificação de sinergismo</b>	58
<b>6.2 Atividade das enzimas antioxidantes</b>	59
<b>6.3 Alterações na morfologia celular</b>	61
<b>6.4 Análise Proteômica</b>	62
<b>6.4.1 Análise proteômica de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA) ATCC 33591 tratado com nisina, oxacilina e combinação</b>	62
<b>6.4.2 Análise proteômica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 tratada com nisina, ciprofloxacina e combinação</b>	66
<b>7. Considerações finais</b>	70
<b>Referências</b>	71

## 1. Introdução e Justificativa

O uso excessivo e indiscriminado de fármacos antimicrobianos resultou na disseminação de bactérias resistentes e se tornou um problema de saúde pública no mundo todo. Além disto, a resistência antimicrobiana tem sido associada ao uso destes antibióticos com redução na eficácia e probabilidade de cura durante o tratamento de doenças bacterianas comuns (CHENG et al., 2016).

Nos Estados Unidos pelo menos dois milhões de pessoas são infectadas todos os anos com bactérias resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, sendo que desse número, ao redor de 23 mil acabam morrendo em decorrência dessas infecções com um custo estimado ao país ao redor de 20 bilhões de dólares por ano. Na Europa em 2007, 25 mil mortes foram atribuídas a essas infecções. As despesas associadas, em termos de custo extra e perdas de produtividade, ultrapassaram 1,5 milhões de euros por ano. Os dados mostraram que a maioria desses casos acontece na comunidade em geral, embora muitas mortes relacionadas à cepas resistentes aos antibióticos ocorreram em hospitais e lares de idosos (BUSH et al., 2011).

No Brasil de acordo com últimos levantamentos, 23 mil pessoas morrem por ano em decorrência de infecções hospitalares, porém, muitos dados ainda não são computados devido a subnotificações em UTI's de hospitais. Em informações divulgadas no último relatório sobre resistência bacteriana, os micro-organismos considerados maiores causadores de infecções em hospitais brasileiros entre 2012-2015 foram a *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus coagulase-negativa* (ECN), *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, a taxa de resistência a antibióticos é alta, sendo que no caso do *S.aureus*, cerca de 60% dos isolados foram resistentes a oxacilina (ANVISA, 2016).

O problema é que o número crescente de linhagens resistentes não é acompanhado de desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos. Em 2004 apenas 1,6% dos medicamentos em desenvolvimento pelas maiores empresas farmacêuticas do mundo foram antibióticos. Este desenvolvimento de antibióticos tem várias causas dentre elas, que os tratamentos com antibióticos são tipicamente com durações muito limitadas, o que acaba os tornando menos lucrativos que os medicamentos para uso em doenças crônicas; os medicamentos recentemente aprovados para a maioria das outras doenças são imediatamente prescritos, enquanto que os novos antimicrobianos geralmente são mantidos em reserva e utilizados no tratamento de doenças infecciosas nas quais os antibióticos tradicionais não podem tratar (ZIEMSKA et al., 2013; FAIR e TOR, 2014).



Visando solucionar o problema da resistência bacteriana, alternativas tem sido pesquisadas para fazer frente ao problema. Desta forma, as bacteriocinas, a exemplo da nisina, são consideradas alternativas potenciais como antibióticos por apresentarem baixa toxicidade e capacidade inibidora conhecida (COTTER et al., 2013; ZIEMSKA et al., 2013).

Combinações entre antimicrobianos, como a nisina e fármacos tradicionais, podem contribuir para redução do problema da resistência bacteriana, pois visam novos alvos de ação de droga, bem como reduzir a toxicidade e as concentrações necessárias. O efeito sinérgico entre dois antimicrobianos se torna interessante, pois a utilização de uma dose mais baixa no tratamento de doenças infecciosas não só reduz o custo e toxicidade, mas também pode retardar o desenvolvimento da resistência aos antibióticos (RISHI et al., 2014; JORGE et al., 2017).

No entanto, a elucidação dos mecanismos de ação desses novos antimicrobianos, e como podem afetar o metabolismo da célula bacteriana, é uma etapa importante para o desenvolvimento de novos fármacos. Estudos mostram que as respostas bacterianas a antimicrobianos não se limitam a alguns alvos moleculares específicos e sim a processos biológicos diferentes na célula. Abordagens proteômica e outros estudos de mecanismos de ação podem potencialmente fornecer uma visão mais abrangente das respostas bacterianas aos estudos com novos antimicrobianos (JIA et al., 2009; LIMA et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi analisar mecanismos de ação de fármacos antibacterianos tradicionais, nisina e combinações sobre linhagens padrões ATCC (American Type Culture Collection) de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* bem como as respostas destas bactérias pela análise da atividade de algumas enzimas antioxidantes, alterações na morfologia das células e a análise comparativa do proteoma dos patógenos expostos a concentrações subletais dos antimicrobianos.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 Resistência bacteriana e patógenos causadores de infecções

Os medicamentos antibacterianos têm sido usados para tratar doenças infecciosas, porém com o uso intenso e/ou indevido, as bactérias responderam aumentando a complexidade de seus mecanismos de resistência. Esta resistência acontece em decorrência da habilidade da população bacteriana de se adaptar, sofrendo um processo seletivo decorrente da conhecida seleção natural (SANTOS, 2004).

Esta resistência bacteriana geralmente também é resultante de falhas no tratamento do paciente como, por exemplo, a prescrição incorreta de um antibacteriano. Isso tem sido associado ao aumento das taxas de mortalidade em pacientes que apresentam especialmente septicemias cujos agentes etiológicos são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp. Bactérias clinicamente importantes são cada vez mais freqüentes nas comunidades, e podem se tornar problemas no controle de doenças infecciosas, não apenas nas instituições de saúde (TENOVER, 2006; BUSH et al., 2011).

Os fármacos antibacterianos existentes de forma geral podem agir interferindo na síntese da parede celular bacteriana, inibindo a síntese de proteínas e outras vias metabólicas, e interferindo na síntese dos ácidos nucleicos (ZIEMSKA et al., 2013).

As bactérias podem desenvolver a resistência aos antibióticos como resultado de vários mecanismos decorrentes de mutação e seleção natural. As cepas de bactérias que possuem genes com mutações relacionadas a resistência são selecionadas através do uso do antibiótico, o qual provoca a morte, ou inibição da multiplicação das cepas susceptíveis mas não as cepas recém-resistentes. As mutações espontâneas provocam resistência por alterar a proteína alvo à qual o agente antibacteriano se liga, modificando ou eliminando o local de ligação, produzindo enzimas que inativam o agente antimicrobiano, minimizando ou alterando um canal de proteína de membrana externa que o medicamento requer para a entrada de células ou ainda aumentando a ação das bombas de efluxo que expulsam a droga do interior das células bacterianas. As bactérias podem também desenvolver a resistência aos antibióticos pela transferência horizontal de genes de resistência, com consequente recombinação genética, ocorridas durante os processos de conjugação, quando a bactéria doadora transfere o plasmídeo contendo os genes de resistência para uma bactéria receptora,

geralmente por pili (Gram-negativas) ou simples contato entre as células (Gram-positivas); transformação, quando uma bactéria incorpora fragmentos de DNA solúvel no meio de outra bactéria que sofreu lise celular ou transdução, quando os genes de resistência são transferidos por bacteriófago (TENOVER, 2006; RODRÍGUEZ-ROJAS et al., 2013).

### 2.1.1 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogênica oportunista, geralmente encontrada na microbiota normal do trato respiratório superior, na pele, e também em alimentos. É um bactéria Gram-positiva de grande importância devido à sua alta incidência bem como a aquisição de resistência aos antibióticos. É responsável por um amplo espectro de doenças, variando de infecções cutâneas locais benignas a infecções mais severas. Infecções estafilocócicas representam desafios para clínicos, particularmente quando se trata de doenças graves, tais como bacteremia, pneumonia e infecções de pele (FRANÇOIS et al., 2010; MADIGAN et al., 2010).

O progresso nas técnicas de biologia molecular permitiu a identificação de genes e proteínas que são responsáveis pela virulência da bactéria e, conseqüentemente, para o aumento a resistência (RAYGADA e LEVINE, 2009).

A resistência à penicilina foi detectada logo após o início de seu uso em de 1940. Essa resistência foi mediada pela aquisição de genes que codificavam enzimas chamadas beta-lactamases. Na década de 50, cepas produtoras de penicilinas passaram a predominar dentre aquelas isoladas de pacientes hospitalizados. Em 1960, a meticilina foi lançada no mercado como alternativa terapêutica para cepas produtoras de penicilinase, uma vez que essa droga não sofre ação dessa enzima. Porém, já em 1961, relatos de cepas também resistentes à meticilina passaram a ser descritos e foram identificados os denominados *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Até o final da década de 70, a prevalência de MRSA era considerada esporádica, porém agora está entre as principais bactérias que causam morbidade e mortalidade em todo o mundo (NAZARI et al., 2015).

O mecanismo de resistência de MRSA está relacionado à alteração de proteínas ligadoras de penicilina (PBP) codificadas pelo gene *mecA* e sem relação com a produção de beta-lactamases. A presença da PBP2a faz com que a meticilina e os compostos penicilinase-resistentes tenham baixa afinidade pelo local de ligação na bactéria (parede celular) e por conseqüência deixem de ser efetivos na parede bacteriana (NAZARI et al., 2015).

MRSA está cada vez mais implicado em infecções potencialmente letais adquiridas em hospital, cepas chamadas HA-MRSA; porém algumas das cepas de MRSA são encontradas em pacientes fora do ambiente hospitalar, em pacientes que não se submeteram a procedimentos médicos como diálise, cirurgia ou cateter. As cepas chamadas comunidade-adquiridas (CA-MRSA) correspondem aquelas cujas doenças ocorrem fora do ambiente hospitalar (DELANEY et al., 2008).

Portanto, novas estratégias terapêuticas são necessárias para diminuição da resistência relacionada a MRSA, pois algumas cepas vêm apresentando resistência ao tratamento com vancomicina, cuja utilização somente ocorre como última alternativa de tratamento. Além disto, a compreensão da fisiologia celular, mecanismo e alvos de ação de fármacos antibacterianos, são necessárias para desenvolvimento de novos antibacterianos (BECHER et al., 2009).

### **2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, oportunista que causa doenças principalmente em indivíduos com baixa resistência, ou ainda que estão imunossuprimidos. Está frequentemente associada a doenças dos trato urinário e respiratório em humanos, podendo causar complicações sistêmicas e pulmonares, especialmente em pacientes com fibrose cística. É normalmente encontrada no ambiente hospitalar podendo facilmente infectar pacientes submetidos a tratamentos para outras doenças, acarretando as chamadas doenças nosocomiais (MADIGAN et al., 2010), sendo responsável por cerca de 10% das infecções hospitalares no mundo todo. De acordo com os últimos relatórios do CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017) foi relatado ocorrência de aproximadamente 51.000 casos anuais de doenças associadas a *P. aeruginosa* nos Estados Unidos dos quais cerca de 6.000 (13%) foram causadas por cepas multirresistentes correspondendo a cerca de 400 mortes.

O aumento de cepas resistentes de *P. aeruginosa* foi avaliado pelo CDC como risco de ameaça grave no relatório de resistência aos antibióticos, devido ao surgimento de cepas resistentes a antibióticos como a colistina (Polimixina E), considerada a última opção de tratamento contra cepas multirresistentes. Estudos mostraram que a resistência à colistina já

foi relatada em vários países como a Dinamarca, Reino Unido e Austrália (DENTON et al., 2002; SABUDA et al., 2008)

Comparado com outros micro-organismos patogênicos, a erradicação de *P. aeruginosa* é muito difícil, pois apresenta alta resistência intrínseca a uma grande variedade de fármacos antibacterianos, incluindo os aminoglicosídeos, as fluoroquinolonas e beta-lactâmicos, devido a baixa permeabilidade da membrana externa da parede bacteriana, o que limita a taxa de penetração de moléculas destes nas células, fazendo com que os mecanismos secundários de resistência adaptativa funcionem de forma mais eficiente (BREIDENSTEIN et al., 2011).

Os seus fatores de virulência, especialmente as exotoxinas e as proteases, causam danos extensivos ao tecido hospedeiro. Outro fator que confere resistência aos antibióticos é a formação de biofilme, que permitem estas bactérias colonizarem dispositivos médicos como cateteres, bem como as vias aéreas de pacientes com fibrose cística. No caso das infecções pulmonares crônicas na fibrose cística, o biofilme está associado a difícil erradicação de *P. aeruginosa*, pois normalmente são resistentes aos antibióticos e aos sistemas de defesa do hospedeiro (CHATTERJEE et al., 2016; SHAFIEI et al., 2017). A resistência dos biofilmes ao tratamento antibiótico está associada a vários mecanismos como a penetração limitada desses compostos no biofilme e crescimento lento de células sésseis (HOIBY et al., 2010).

Considerando os muitos problemas relacionados a resistência de *P.aeruginosa* e a presença de biofilme, são necessários estudos para procura de novos alvos e medicamentos que atuem de forma eficaz e segura na sua dispersão, pois uma vez que um biofilme foi disperso, as bactérias planctônicas tornam-se rapidamente suscetíveis aos antibióticos convencionais (DAVIES, 2003; SHAFIEI et al., 2017).

## **2.2 Antimicrobianos naturais**

A resistência aos muitos fármacos antibacterianos, fez com que aumentasse a procura por opções para o tratamento de doenças infecciosas, visando acrescentar estas novas opções ao arsenal terapêutico. Assim, pesquisas sobre novas substâncias antimicrobianas (peptídeos antimicrobianos, bacteriocinas, bacteriófagos, óleos essenciais, extratos vegetais) se apresentam como opções no tratamento de doenças infecciosas bem como tornando-se alternativas para também amenizar o problema de resistência (COS et al., 2006; ZIEMSKA et al., 2013).

Muitos estudos foram realizados nos últimos anos objetivando desenvolver alternativas para o tratamento de doenças infecciosas em humanos, animais e relacionadas a indústria de alimentos. Essas pesquisas avaliaram a ação antimicrobiana de produtos de origem natural para desenvolvimento de novos fármacos e também de aditivos alimentares (ANDRADE et al., 2014; BARBOSA et al., 2014; FERNANDES JUNIOR et al., 2014; FURTADO et al., 2018).

A terapia combinada de antimicrobianos também se mostra interessante no tratamento de doenças infecciosas e pela tentativa de neutralizar e/ou reverter os mecanismos de resistência, além de possibilitar redução na dose prescrita e amenizar possivelmente os efeitos colaterais do uso do fármaco. Geralmente, as combinações de medicamentos podem ter efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos, dependendo das combinações utilizadas. Os efeitos sinérgicos são os desejáveis (ALEKSHUN e LEVY, 2007). As interações sinérgicas podem ocorrer entre antibióticos, ou entre compostos naturais e fármacos já utilizados e reconhecidos pelo seu potencial na indústria farmacêutica (BETONI et al., 2006; HEMAISWARYA et al., 2008; ALBANO et al., 2016; ALVES et al., 2016).

### 2.2.1 Bacteriocinas

As bacteriocinas são definidas como peptídeos antimicrobianos ribossomicamente sintetizados e secretados por bactérias que inibem ou matam outros micro-organismos (OYSTON et al., 2009). As bacteriocinas foram primeiramente identificadas por Gratia (1925) como uma proteína antimicrobiana produzida por *Escherichia coli* e chamada colicina. O interesse em bacteriocinas produzidas por micro-organismos tem aumentado devido a suas características e espectro de ação (BALCIUNAS et al., 2013).

Os fatores que determinam os mecanismos de ação das bacteriocinas dependem das características da membrana citoplasmática e da natureza físico-química do peptídeo que forma tal bacteriocina (LIANG e KIM, 1999; SUN et al., 2009). Estudos foram realizados com o objetivo de identificar novas bacteriocinas com uso em diversas áreas (ZENDO, 2013).

Alguns antibióticos, assim como as bacteriocinas, também são produzidos por bactérias, porém diferem das bacteriocinas por serem metabólitos secundários sintetizados por enzimas, enquanto as bacteriocinas são ribossomicamente sintetizadas na fase *log* do crescimento bacteriano. Outra diferença é que as bacteriocinas não alteram a microbiota

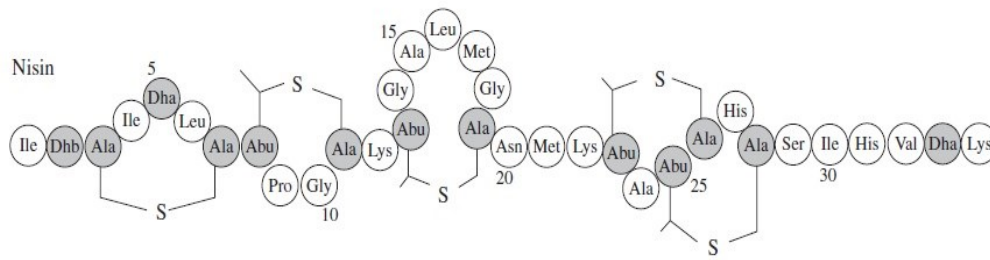
intestinal humana, pois são digeridas por enzimas como pepsina e tripsina (COTTER et al., 2013).

Muitas bacteriocinas têm uma alta especificidade e atividade contra alvos clínicos e apresentam mecanismos de ação, distintos dos antimicrobianos atuais. Embora conhecidas pelo seu amplo espectro de ação, existem também potentes bacteriocinas com espectros estreito que podem controlar patógenos direcionados sem afetar negativamente as populações comensais (REA et al., 2010; COTTER et al., 2013).

### 2.2.2 Nisina

A nisina é uma bacteriocina da classe dos lantibióticos produzida por linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, bactéria amplamente utilizada na indústria de alimentos como cultura *starter* na composição de fermentos lácticos para o processamento de queijos. A introdução da nisina para uso comercial ocorreu na Inglaterra em 1953 e no ano de 1988 foi aprovada pelo Food Drug and Administration (FDA, órgão regulador dos EUA) para o uso como conservante em alimentos e reconhecida como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), tornando-se a primeira bacteriocina aprovada para uso comercial em aplicações alimentares no processamento de leite e derivados. Tem seu uso aprovado em mais de 50 países (WILLIAMS e DELVES-BROUGHTON, 2003; COTTER, 2005; DEEGAN et al., 2006). No Brasil, a nisina teve seu uso aprovado pela ANVISA para uso como conservante natural de produtos de natureza biológica (queijos, carnes) em janeiro de 1996 (ANVISA).

Estruturalmente, a nisina consiste num pequeno polipeptídeo formado por 34 aminoácidos e cinco anéis internos envolvendo pontes dissulfeto intracadeia. Possui os resíduos atípicos de dehidroalanina e dehidrobutirina, além dos anéis de lantionina e  $\beta$ -metil-lantionina já característicos dos lantibióticos (Figura 1) (WILLIAMS e DELVES-BROUGHTON, 2003; COLLINS et al., 2011).



**Figura 1:** Estrutura química da nisina. Fonte: PIPER et al., 2009.

Lantibióticos são peptídeos antimicrobianos policíclicos produzidos por uma variedade de bactérias Gram-positivas contendo aminoácidos incomuns que contém como característica principal a presença de lantionina. (COTTER, 2005; HASPER et al., 2006; DALY et al., 2012). O efeito antibacteriano da nisina se deve as interações com os fosfolipídios que compõem a membrana citoplasmática, ocasionando a formação de poros e consequentemente efluxo de constituintes essenciais da célula como aminoácidos, íons de potássio e ATP, o que provoca paralisação de todos os processos biossintéticos celulares (BONEV et al., 2004; COTTER, 2005).

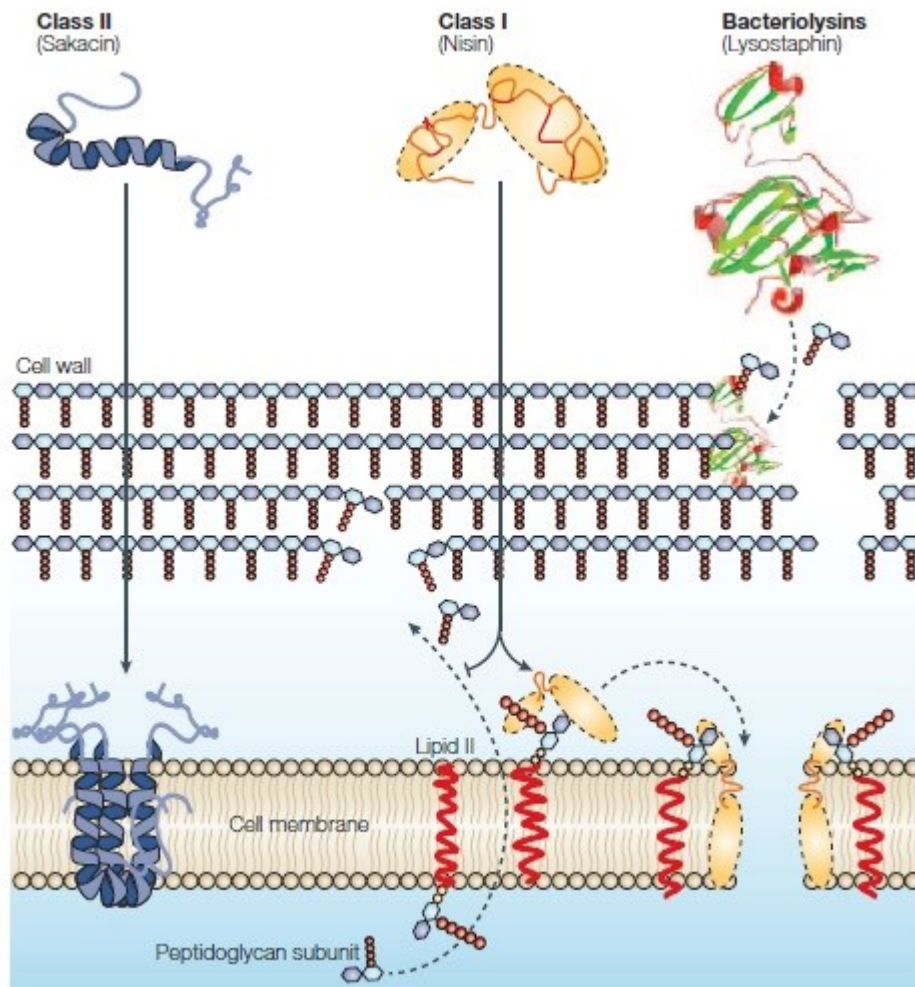
A alta eficiência para a formação destes poros é o resultado de um mecanismo exclusivo envolvendo o precursor da parede celular chamado lipídeo II, o qual aumenta significativamente a afinidade entre nisina e membrana, e forma poros na membrana de maneira integral. A nisina também pode agir nas bactérias inibindo a síntese da parede celular, devido a alta afinidade de nisina pelo lipídeo II (Figura 2) (WIEDEMANN et al., 2001).

As bactérias Gram-negativas são menos sensíveis a ação da nisina devido a sua parede celular atuar como uma barreira impermeável que dificulta a passagem das moléculas da nisina. A superfície normalmente aniônica de bactérias Gram-negativas tem uma tendência natural de ligação com a nisina, a qual é catiônica. Assim, havendo esta ligação da nisina com a membrana externa da parede de Gram-negativas por ligações eletrostáticas, impede o acesso desta substância à membrana plasmática, local de ação da nisina, justificando assim a resistência frente a este peptídeo (HELANDER e MATTILA-SANDHOLM, 2000).

As bactérias Gram-negativas, podem se tornar sensíveis a ação da nisina com a ação conjunta e exposição à agentes quelantes que removem os íons da parede celular tornando-as mais sensíveis a ação da nisina. Um exemplo de agente quelante possível é o uso de EDTA



(ácido etilenodiamínio tetra-acético) num sistema de tampão simples (ELLIASON e TATINI, 1999).



**Figura 2:** Modo de ação da nisina. Fonte: COTTER (2005)

Estudos destacam a importância da nisina como aditivo alimentar, seja quando utilizada sozinha ou em combinações com outros antimicrobianos. Alves et al., (2016) investigaram a atividade antimicrobiana de nisina combinada com compostos isolados de óleos essenciais frente a patógenos alimentares no leite de vaca e verificaram redução na contagem bacteriana de *Listeria monocytogenes* quando o leite recebeu a adição de combinações testadas durante período de seis dias que compreendeu o tratamento realizado. Autores destacaram sinergismo e atividade antibacteriana da combinação entre nisina e o timol (composto fenólico do grupo dos monoterpenos).

Em estudo com *E. coli* O157:H7, Alba et al., (2013) reportaram que a nisina foi capaz de promover redução na contagem desta bactéria quando inoculada em presunto defumado

associado ao processo de conservação por alta pressão (embalagem a vácuo). Os resultados obtidos revelaram que, embora a concentração de nisina a 100 UI/g, isoladamente, não tenha sido capaz de reduzir a contagem bacteriana, quando associada com alta pressão houve redução de 3 unidades logarítmicas.

Quanto aos testes sobre patógenos alimentares utilizando combinações com outros antimicrobianos naturais, a ação antibacteriana da nisina vem sendo estudada com resultados satisfatórios, o que tem estimulado também estudos para verificar a eficácia da nisina sobre patógenos humanos. Assim, Piper et al., (2009) verificaram que a nisina foi especialmente eficaz sobre o crescimento de *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE) e concluindo ser a atividade antimicrobiana da nisina uma alternativa promissora para uso como antibiótico. Em estudo anterior, Severina et al., (1998) mostraram que a nisina apresentou efeito frente a um grande número de patógenos isolados de infecções hospitalares como *Staphylococcus aureus* resistente a metilicilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus* Vancomicina resistente (VRE).

Estudos indicaram também ação das combinações da nisina com antibióticos tradicionais e ocorrência de efeitos sinérgicos quando testadas sobre bactérias de interesse clínico (BRUMFITT et al., 2002; SINGH et al., 2014).

Okuda et al. (2013), relataram atividade antibiofilme da nisina sobre o biofilme produzido por MRSA em dispositivos médicos quando em combinação com antibióticos tradicionais a exemplo da vancomicina e a ciprofloxacina.

No entanto, pesquisas mostram que a ação antibacteriana pode ser eficaz também contra bactérias Gram-negativas (GOLDSTEIN et al., 1998; VAN STADEN et al., 2012; SHIN et al., 2016). Rishi et al., (2014) investigaram a interação entre nisina e beta lactâmicos sobre isolados clínicos de *Salmonella* Typhi utilizando o método de curva de sobrevivência (*time kill curve*) e verificaram interação positiva nas combinações entre a nisina e os fármacos antibacterianos testados, concluindo que esses possivelmente atuaram como agente quelantes de íons metálicos facilitando a ação da nisina frente a uma bactéria Gram-negativa.

### **2.3 Estresse oxidativo em bactérias**

Os fármacos antibacterianos induzem mudanças no metabolismo bacteriano com formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, se não controladas pelo sistema antioxidante, desempenham um papel decisivo na morte celular (DWYER et al., 2009). Os peptídeos antimicrobianos também podem induzir o estresse oxidativo nas bactérias.

Miyamoto et al. (2015), analisaram o proteoma de *Listeria monocytogenes* exposta ao tratamento com nisina e encontraram uma abundância maior de catalase e ferritina em relação à bactéria não tratada. Atribuíram essa maior quantidade de enzimas antioxidantes a capacidade da nisina na indução de poros na membrana e consequente desequilíbrio eletrolítico, o qual desencadeia a reação de elétrons livres com átomos de oxigênio levando a formação das ERO.

Em bactérias, a maioria das ERO é derivada da redução sequencial do oxigênio molecular catalisado pelas enzimas da cadeia respiratória, associadas à membrana plasmática. Na *Escherichia coli*, por exemplo, a cadeia respiratória é responsável por 87% da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CABISCOL et al. 2000).

Respostas ao estresse oxidativo em bactérias podem ser provocadas por alterações nos parâmetros de crescimento celular, mudanças de pH e temperatura e na adição de agentes exógenos como os antibióticos e antimicrobianos que podem ser tóxicos para o micro-organismo, podendo elevar os níveis das ERO e consequentemente causando um aumento das enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) em resposta a esse estresse (ALBESA et al., 2004; BECERRA et al., 2006; PÁEZ et al., 2013).

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante de um organismo devido a uma geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção dos mesmos (CASH et al., 2007).

O oxigênio é essencial para a maioria dos organismos vivos, pois estes utilizam de oxigênio no processo de oxidação de nutrientes para obtenção de energia necessária na forma de ATP durante o processo de fosforilação oxidativa, que reduz O<sub>2</sub> em molécula de água. Os subprodutos reativos do oxigênio (ERO) como radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (OH) são gerados continuamente em células cultivadas em aerobiose em processos como a oxidação de pequenas moléculas e pelo desligamento de elétrons da cadeia transportadora de elétrons.

As ERO podem alterar a estrutura dos componentes celulares como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos se não forem metabolizadas espontaneamente ou através do sistema antioxidante e acabam acumuladas pela célula. As ERO oxidam diretamente os ácidos graxos poliinsaturados na membrana e iniciam um processo chamado de lipoperoxidação. Como consequência da peroxidação lipídica ocorrem transtornos nas funções exercidas pela membrana plasmática alterando suas propriedades como a seletividade, transporte, diminuição

na fluidez, extravasamento do conteúdo citoplasmático e até a formação de produtos tóxicos como o malonaldeído que culmina na morte celular (CABISCOL et al. 2000). Os produtos primários formados da lipoperoxidação são os chamados hidroperóxido de lipídeo (HL) e sua permanência na célula indica a não catalisação pelas enzimas antioxidantes (GRANDGIRA et al., 1999).

## 2.4 Proteômica

A proteômica consiste de estudo sobre um conjunto de dados das proteínas expressas decorrente de um determinado genoma, seja de uma célula, tecido ou organismo. Nesta análise são estudados os níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios de uma amostra complexa. Ao contrário do genoma que é estável, o proteoma de um organismo pode se modificar dependendo das condições e estímulos a qual é exposto, se tornando dinâmico e apresentando seu perfil modificado a cada fase do estudo ou tratamento (PANDEY e MANN, 2000; BARBOSA et al., 2012). Mais de um milhão de diferentes tipos de proteínas estão presentes nas células, nos tecidos e nos fluídos corporais em condições ou momentos distintos (NORREGAARD JENSEN, 2004).

As respostas de bactérias ao estresse causado pela presença de um antibacteriano não se limitam a alguns alvos moleculares exclusivos ou que estejam diretamente relacionados aos mecanismos antimicrobianos de resistência, mas sim por um conjunto mais amplo de respostas transcricionais, desencadeado por um grande número de genes e proteínas envolvidas (LIU et al., 2016). A abordagem de proteômica pode potencialmente fornecer uma visão mais abrangente sobre o mecanismo de ação de antimicrobianos, devido às respostas geradas pelo micro-organismo.

A caracterização de agentes patogênicos bacterianos e de doenças infecciosas utilizando a proteômica comparativa correlacionada com a espectrometria de massa e a bioinformática, já vem sendo realizada inclusive como rotina. Essa nova abordagem molecular pode ser considerada no estudo de micro-organismos patogênicos visando a avaliação dos perfis de proteínas em resposta aos vários mecanismos; para obter informações dos processos de resistência e sensibilidade a antibióticos, bem como as suas vias alvos; para esclarecer quais proteínas estão envolvidas em rotas metabólicas relacionadas a diferentes processos celulares, assim como o processo de estabelecimento e progressão de doenças

infeciosas. Estas informações podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de agentes antimicrobianos (RONCADA et al., 2009; FRANÇOIS et al., 2010).

Na microbiologia clínica, a metodologia de proteômica tem sido utilizada em estudos sobre fatores de patogenicidade, diagnóstico, desenvolvimento de ferramentas sorológicas, vacinas e novos antimicrobianos (FOURNIER e RAOULT, 2011). A identificação das interações entre proteínas não é importante apenas para a compreensão da biologia da infecção, mas também pode apontar novos alvos terapêuticos (JEAN BELTRAN et al., 2017).

Jenkins et al. (2013) investigaram, por análise proteômica, os fatores de virulência de MRSA tratado com um potencial agente antimicrobiano natural, conhecido como mel manuka, e associaram as proteínas diferentemente expressas em relação ao controle com a inibição dos fatores de virulência. Miyamoto et al., (2015) pesquisaram os mecanismos de ação, respostas bacterianas e processos biológicos de *Listeria monocytogenes* tratada e não tratada com concentrações subletais de nisina pela diferenciação da expressão de proteínas e concluíram que a ação da nisina provoca estresse celular e danos nas células bacterianas.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Verificar a atividade antibacteriana de combinações entre nisina e antibióticos tradicionais utilizados nos tratamentos de doenças infecciosas e investigar possíveis alvos e mecanismos de ação em cepas padrão de *Staphylococcus aureus* MRSA e *P.aeruginosa*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Testar a ação antibacteriana e potencial sinérgico entre nisina e seis fármacos antibacterianos: tetraciclina, vancomicina, polimixina B, cefalotina, ciprofloxacina e oxacilina frente a cepas padrão de *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 33591) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) pela metodologia de curva de sobrevivência;
  
- Determinar as atividades de enzimas antioxidantes e perfil protéico das cepas bacterianas padrões mencionadas quando testados individualmente e em combinações dos antibacterianos (nisina/oxacilina para MRSA, nisina/ciprofloxacina para *P. aeruginosa*) em concentrações subinibitórias;
  
- Verificar alterações na morfologia das células por microscopia eletrônica de transmissão das bactérias padrões mencionadas também quando testados individualmente e em combinações dos antibacterianos (nisina/oxacilina para MRSA, nisina/ciprofloxacina para *P. aeruginosa*) em concentrações inibitórias;

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Linhagens bacterianas e Antibacterianos

Foram testadas linhagens padrões American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ATCC 33591) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) 27853. A bacteriocina nisina,(nisin from *Lactococcus lactis*, N5764) foi obtida da empresa Sigma Aldrich®. Os antibióticos: tetraciclina, vancomicina, polimixina B ,cefalotina, ciprofloxacina,e oxacilina, foram obtidos na forma de sais da empresa Farmacêutica Teuto/Pfizer. Os fármacos utilizados foram escolhidos de acordo com a sugestão de uso no tratamento de doenças infecciosas, no caso específico da oxacilina a escolha se deve a resistência de MRSA a oxacilina e como essa poderia agir em combinação com a nisina frente a MRSA.

### 4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Subletal Máxima (CSM)

As cepas de MRSA e *P. aeruginosa*, mantidas em estoque a  $-80^{\circ}$  C, foram inoculadas em Brain Heart Infusion (BHI-Difco), incubadas a  $35^{\circ}$  C/18-24 horas e preparadas suspensões padronizadas na escala 0,5 de MacFarland. Para a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração subletal máxima (CSM) de tetraciclina, vancomicina, polimixina B, cefalotina, ciprofloxacina, oxacilina e nisina, foram realizados os ensaios de sensibilidade de acordo com a metodologia REMA (Resazurin Microtiter Assay) (MARTIN et al., 2003; CLSI, 2015) e microdiluição em microplacas de 96 poços contendo meio de Mueller Hinton Caldo II (MHC II - Difco). Foram preparadas concentrações variando entre 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 2048  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e inóculo bacteriano inicial ao redor de  $10^5$  UFC/mL. Após  $35^{\circ}$  C/18-24 horas, foi realizada a leitura com a adição de 50  $\mu\text{l}$  de resazurina 0,01% nos respectivos *well* das microplacas após 30 minutos. Neste método, a resazurina quando adicionada e há mudança da cor original violeta para vermelha, significa que houve crescimento bacteriano no *well*. Assim, a ultima concentração em que se verificou crescimento bacteriano (cor vermelha) foi considerado como a CSM, enquanto que o primeiro em que não houve crescimento (cor

violeta) foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima (CIM). Os ensaios foram realizados em triplicata, bem como os controles positivos e negativos para cada bactéria.

### 4.3 Curva de sobrevivência

O sinergismo entre nisina e oxacilina foi verificado de acordo com os ensaios de curva de sobrevivência. As linhagens foram padronizadas na escala de 0,5 de MacFarland e incubadas numa concentração ao redor de  $10^5$  UFC/mL em tubos de ensaio contendo 5 mL de MHC II, juntamente com os compostos antimicrobianos testados no seus valores equivalentes de CIM obtidos previamente para cada bactéria testada separadamente, ou seja, para nisina, ciprofloxacina, oxacilina, tetraciclina, vancomicina, cefalotina e polimixina B bem como em combinações nas concentrações de  $\frac{1}{4}$  CIM de nisina +  $\frac{1}{4}$  CIM do fármaco testado.

Foram tomadas alíquotas das culturas durante 24 horas (nos tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 12 e 24) e semeadas em placas de BHI (Brain Heart Infusion-Difco) e incubadas por 24 horas/37° C. Após a incubação foram realizadas contagens das unidades formadoras de colônia (UFC) e os valores transformados nos respectivo log de UFC/mL objetivando constatar sinergismo entre os compostos testados, ou seja, se houve redução de 2 ou mais unidades logarítmicas de UFC/ml em relação ao inóculo inicial) (ROCHON-EDOUARD et al., 2000) bem como se esta interação de sinergismo mostrava ação bactericida ou bacteriostática.

### 4.4 Extração de proteínas e quantificação

Para MRSA, foram extraídas proteínas da bactéria cultivadas sem qualquer adição de antimicrobianos (controle) e cultivadas juntamente com antimicrobianos, sendo estes tratamentos correspondentes as respectivas CSM isoladamente para nisina e oxacilina e em combinação corresponde a valores de  $\frac{1}{4}$  CSM nisina e  $\frac{1}{4}$  CSM oxacilina. No tratamento para *P. aeruginosa*, os ensaios foram semelhantes, porém apenas diferente a droga testada que neste caso foi a ciprofloxacina, ou seja, controle, nisina, e ciprofloxacina nas respectivas CSM e combinação de nisina e ciprofloxacina nas proporções de  $\frac{1}{4}$  de CSM.

As cepas de MRSA e *P. aeruginosa* foram inoculadas em Brain Heart Infusion (BHI), incubadas a 35° C/18-24 horas e padronizadas na escala 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Feita a padronização, as bactérias foram incubadas em frascos Erlenmeyers de



vidro contendo 800 mL de MHCII por 37° C/18 horas nas concentrações subletais máxima (CSM) de cada antimicrobiano testado.

Após o período de incubação, as células foram colhidas por centrifugação por 7 minutos, 10.000 g, à 4° C. Os *pellets* bacterianos foram suspensos e lavados três vezes com tampão fosfato salino (PBS 10 mM, pH 7.4). Na sequência, os *pellets* foram re-suspensos com solução de SDS (1% (w/v) SDS, 100 mM Tris-HCl) para rompimento celular osmótico, enquanto o rompimento celular mecânico foi realizado por sonicação segundo Baker et al. (2002) com modificações (utilizou-se uma probe de 3 mm, numa amplitude de 20% durante 30 segundos em banho de gelo, repetido por 10 vezes, com intervalo de 1 minuto entre as séries - Branson Digital Sonifier). Após a sonicação, foram recolhidos os sobrenadantes pela centrifugação das amostras (14.000 x g, 30 min a 4°C) (Adaptado de GORG et al., 2007). Os extratos proteicos de cada tratamento e controle foram quantificados de acordo com método de Bradford para criação de uma curva através de uma amostra padrão (Bradford, 1976).

#### **4.5 Análise do estresse oxidativo**

A análise do estresse oxidativo foi realizada com as amostras extraídas na etapa anterior (4.4), que foram utilizadas também para os estudos de análise proteômica.

##### ***4.5.1 Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio***

A concentração de hidroperóxido de lipídio (HL) foi determinada de acordo com a oxidação do sulfato ferroso amoniacal ( $Fe^{2+}$ ) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol à temperatura ambiente. O  $Fe^{3+}$  reage com alaranjado de xilenol e forma cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida no espectrofotômetro (JIANG et al., 1991).

##### ***4.5.2 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase***

A atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) foi realizada de acordo com o método descrito por Nakamura et al. (1974) e na presença de peróxido de hidrogênio. A reação foi preparada com tampão fosfato salino, NADPH<sub>2</sub>, azida sódica, EDTA, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona redutase. A atividade da GSH-Px foi determinada através da oxidação do NADPH<sub>2</sub> a 340nm na presença da glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG).

#### **4.5.3 Determinação da atividade da superóxido dismutase**

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela técnica de Ewing e Janero (1995), tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O<sub>2</sub><sup>-</sup> do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra.

#### **4.5.4 Determinação da atividade da catalase**

A atividade da catalase (CAT) foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando peróxido de hidrogênio (30%) (AEBI, 1974). As leituras foram realizadas à 240 nm em leitor de microplaca ( $\mu$ Quant-MQX) com controle através de software Gen5 2.0 (Bio-Tec Instruments, Winooski, Vermont, USA).

### **4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Após crescimento overnight em tubos contendo 4 mL de BHI a 37°C, as culturas bacterianas de MRSA e *P. aeruginosa* foram colocadas em contato com os antimicrobianos nisina, ciprofloxacina e oxacilina e as respectivas combinações (¼ nisina e ¼ oxacilina frente a MRSA e ¼ nisina e ¼ ciprofloxacina frente a *P.aeruginosa*) por um período de 4 horas, usando 1x e 4x o valor total da sua concentração inibitória mínima (CIM). Posteriormente ao período das 4 horas, foi adicionado 1mL de glutaraldeído a 2,5% em cada ensaio realizado (controles e tratamentos) para a pré-fixação das amostras, seguido de centrifugação (1500g/4°C/20min). O sobrenadante então foi descartado e os *pellets* obtidos foram lavados por 3 vezes com tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) (1500g/4°C/10min), e fixados novamente com 1 ml de glutaraldeído a 2,5% e posteriormente armazenados por 24 horas/4°C (Adaptado de Barbosa et al., 2015). A pós-fixação foi realizada utilizando tetróxido de ósmio (1%) em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) em contato com as amostras por duas horas, seguido da desidratação das mesmas por acetona e impregnação em blocos de araldite para a obtenção de cortes ultrafinos. A seguir os cortes foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Por fim as amostras prontas foram analisadas e fotografadas (imagem digital) com microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai Spirit- FEI Company), pertencente ao Centro De Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências de Botucatu.

## 4.7 Análise proteômica

### 4.7.1 Extração de proteínas

As análises proteômicas foram realizadas para as amostras extraídas conforme descrito no item 4.4 separadamente para cada bactéria testada (MRSA e *P. aeruginosa*) e respectivos tratamentos. Para a remoção do detergente, as amostras foram submetidas a eletroforese 1D (SDS-PAGE). 50 µg de proteína total referente a cada tratamento foram colocadas em gel de poliacrilamida a 13%. A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente em duas etapas: em gel de empilhamento, 300 V, 20 mA (10 mA por gel) durante 15 minutos e depois em gel de separação, 200 V, 40 mA (20 mA por gel) por 30 minutos em cuba vertical. O gel foi fixado em 50% [v/v] etanol e 5% [v/v] ácido acético e em seguida corado com solução 0,025% (m/v) Coomassie azul brilhante (50% [v/v] etanol, 5% [v/v] ácido acético) por 60 minutos. Posteriormente, o gel foi incubado com solução descorante (30% [v/v] etanol, 10% [v/v] ácido acético) (troca de solução a cada 10 minutos) e conservado em 7% (v/v) ácido acético (SANTOS et al., 2011).

### 4.7.2 Digestão das proteínas em gel

As proteínas separadas do gel foram recortadas e digeridas com tripsina como descrito em Shevchenko et al., (1996) com modificações. As ligações dissulfeto foram reduzidas utilizando ditioneitol (DTT) em bicarbonato de amônio 100 mM durante 30 minutos em temperatura ambiente e depois alquilado com iodoacetamida (IAA) 50 mM por 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. Posteriormente os lisados foram submetidos a digestão com tripsina (20 ng/µl). A tripsina foi solubilizada em solução de bicarbonato de amônio 50 mM. As proteínas foram digeridas por tripsina durante a noite durante 18 h a 37 ° C e a digestão foi interrompida após a adição de 1%(v / v) ácido fórmico para as amostras (incubação durante 1 h) em relação ao volume da amostra. Depois a dessalinização das amostras foi realizada usando cartuchos Sep-PAK Vac C18 (Waters Corp., Milford, MA, EUA). Os peptídeos extraídos foram secos sob vácuo (SpeedVac™; Thermo Scientific) para serem redissolvidos em 3% de acetonitrila (ACN) contendo 0,1% de solução de ácido fórmico antes das análises.

#### 4.7.3 Análise por espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Os peptídeos foram separados por gradiente de hidrofobicidade em coluna C18 (100  $\mu\text{m}$  x 100 mm) (Waters) por um cromatógrafo tipo nano Acquity Ultra Performance LC (Waters) acoplado a uma interface de ESI nanospray a um espectrômetro de massa do tipo Q-Tof Premier (Waters). Um volume de 4,5  $\mu\text{L}$  dos peptídeos foram injetados automaticamente passando primeiramente por uma coluna de trappig Symmetry C18 (180  $\mu\text{m}$  x 20mm) para dessalinização dos peptídeos a um fluxo de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante 2 min. Em seguida, os peptídeos foram carregados para a coluna analítica e eluídos em um gradiente de 0-90% de acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1% durante 45 min sob fluxo de 0,6  $\mu\text{L}/\text{min}$ . As análises de espectrometria de massas foram realizadas em triplicata no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa em Energias e Materiais (CNPEM).

#### 4.7.4 Processamento dos dados

Os arquivos de dados gerados pelo Q-Tof (raw) foram processados em programa Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.). Para a identificação das proteínas foi utilizado o programa Mascot Server v.2.3.01.0 (Matrix Science Ltda.), tendo como parâmetros uma clivagem perdida pela tripsina, modificação fixa de carbamidometilação, modificação variável de oxidação da metionina e 0,1 Da de tolerância de massas para MS e 0,1 Da de tolerância de massas. As buscas foram realizadas em dois bancos diferentes de acordo com a bactéria analisada; para *P. aeruginosa* utilizando o banco de dados *Pseudomonas* sp. 112016 contendo 362.237 sequências e 114.334.549 resíduos, dados MS / MS foram submetidos à banco de banco de sequência pública de acordo com o algoritmo estatístico de MASCOT quando a identificação da proteína mostrou pontuações superiores a 37; para as análises de MRSA foi utilizado o banco de dados *Saureus\_SProt* contendo 11.077 sequências e 3,754,158 resíduos e dados MS / MS foram submetidos à banco de banco de dados de sequência pública quando a identificação mostrou pontuação superior a 23. Para a quantificação das proteínas os arquivos de cada busca foram transformados em .dat e carregados no programa de análise Scaffold Q+ (versão 4.8.3, Proteome Software) obtendo os valores de contagem de espectros normalizados para cada proteína identificada. A validação da identificação de proteínas foi realizada nos seguintes parâmetros: mínimo de dois peptídeos identificados, probabilidade de identificação de peptídeo a 90%, e 99% de

probabilidade de identificação de proteína, e os dados foram normalizados pelo fator de abundância espectral (NSAF). As diferenças quantitativas entre os grupos foram analisadas estatisticamente por ANOVA, seguindo de teste t para comparação entre pares (tratamento e controle) e *fold change* (utilizando o controle como amostra de referência – bactéria não tratada), considerando-se um nível de significância de  $p \leq 0,05$  e *fold change* (expressão) significativo  $\leq 0,5$  e  $\geq 2,0$ . A ontologia gênica das proteínas diferenciais foi realizada utilizando as ferramentas disponíveis no Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) e Panther (<http://pantherdb.org/>) nas categorias de processo biológico e função molecular. Os interatomos dos tratamentos das proteínas expressas diferencialmente foram confeccionados utilizando-se o software String na taxonomia *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (<http://string-db.org/>).

#### **4.8 Análise Estatística**

As análises estatísticas referentes aos testes de sensibilidade e as análises do estresse oxidativo foram realizadas utilizando teste Tukey's e ANOVA; sendo  $P < 0,05$ , pelo software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

## 5. Resultados

### 5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Subletal Máxima (CSM)

Os valores de CIM e CSM obtidos são apresentados nas Tabelas 1 e 2. A nisina apresentou a melhor ação antibacteriana frente a MRSA do que frente a *P. aeruginosa*. Já o valor obtido da concentração de oxacilina é um dos indicativos de resistência da cepa de *Staphylococcus aureus* (CLSI, 2015). Importante destacar que estes valores obtidos foram utilizados para cálculos nas demais etapas deste estudo.

**Tabela 1:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos e da nisina ( $\mu\text{g/mL}$ ;  $\pm\text{DP}$ ) dos antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus* MRSA e *Pseudomonas aeruginosa*.

	Tet	Van	Pol B	Cef	Oxa	Cip	Nis
<b>MRSA</b>	0,125 $\pm$ 0,03	1 $\pm$ 0,28	16 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	32 $\pm$ 4	0,125 $\pm$ 0	256 $\pm$ 0
<b><i>P.aeruginosa</i></b>	8 $\pm$ 0	1024 $\pm$ 0	0,25 $\pm$ 0,5	1024 $\pm$ 0	512 $\pm$ 0	0,25 $\pm$ 0,1	512 $\pm$ 0

\*tetraciclina (Tet), vancomicina (Van), polimixina B (Pol B), cefalotina (Cef), oxacilina (Oxa), ciprofloxacina (Cip) e nisina (Nis).

**Tabela 2:** Concentração Subletal Máxima (CSM) dos antibióticos e da nisina ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus* MRSA e *Pseudomonas aeruginosa*.

	Tet	Van	Pol B	Cef	Oxa	Cip	Nis
<b>MRSA</b>	0,0625	0,5	8	2	16	0,0625	128
<b><i>P.aeruginosa</i></b>	4	512	0,125	512	256	0,125	256

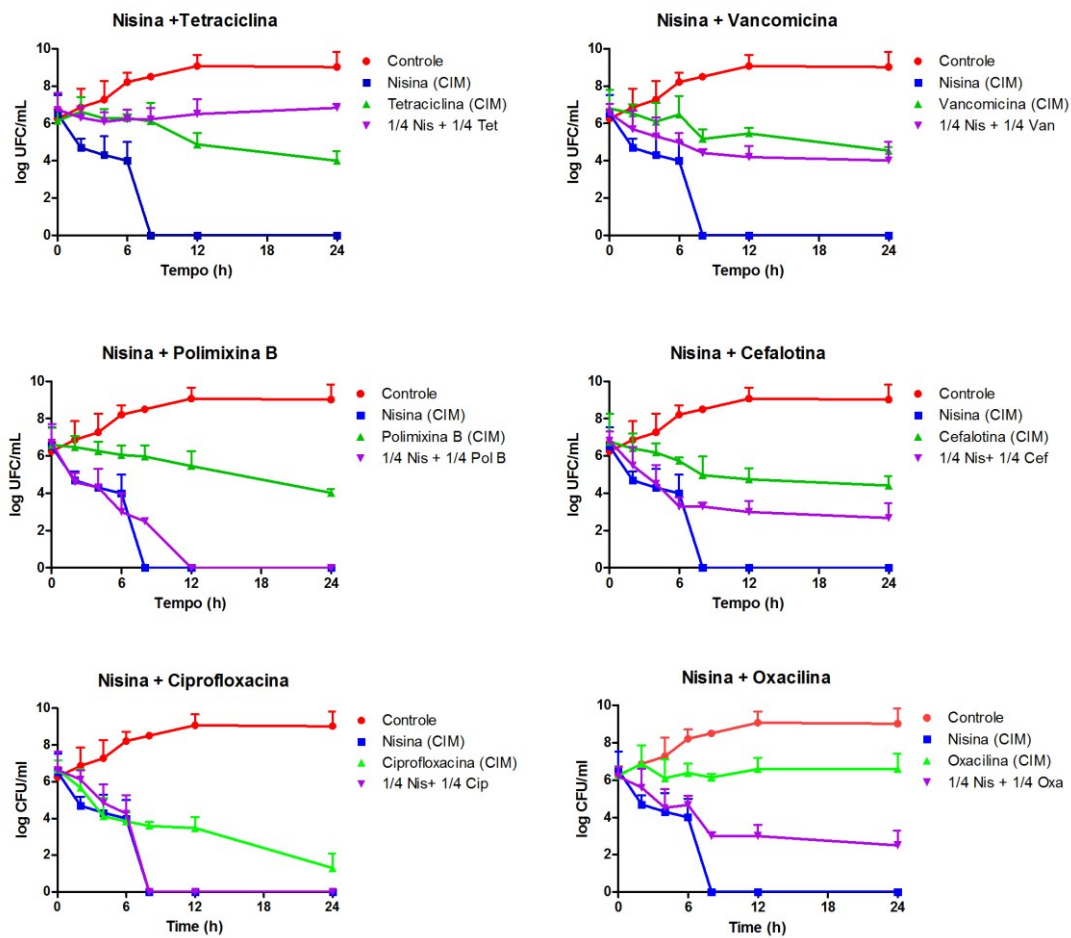
\*tetraciclina (Tet), vancomicina (Van), polimixina B (Pol B), cefalotina (Cef), oxacilina (Oxa), ciprofloxacina (Cip) e nisina (Nis)

### 5.2 Curva de sobrevivência

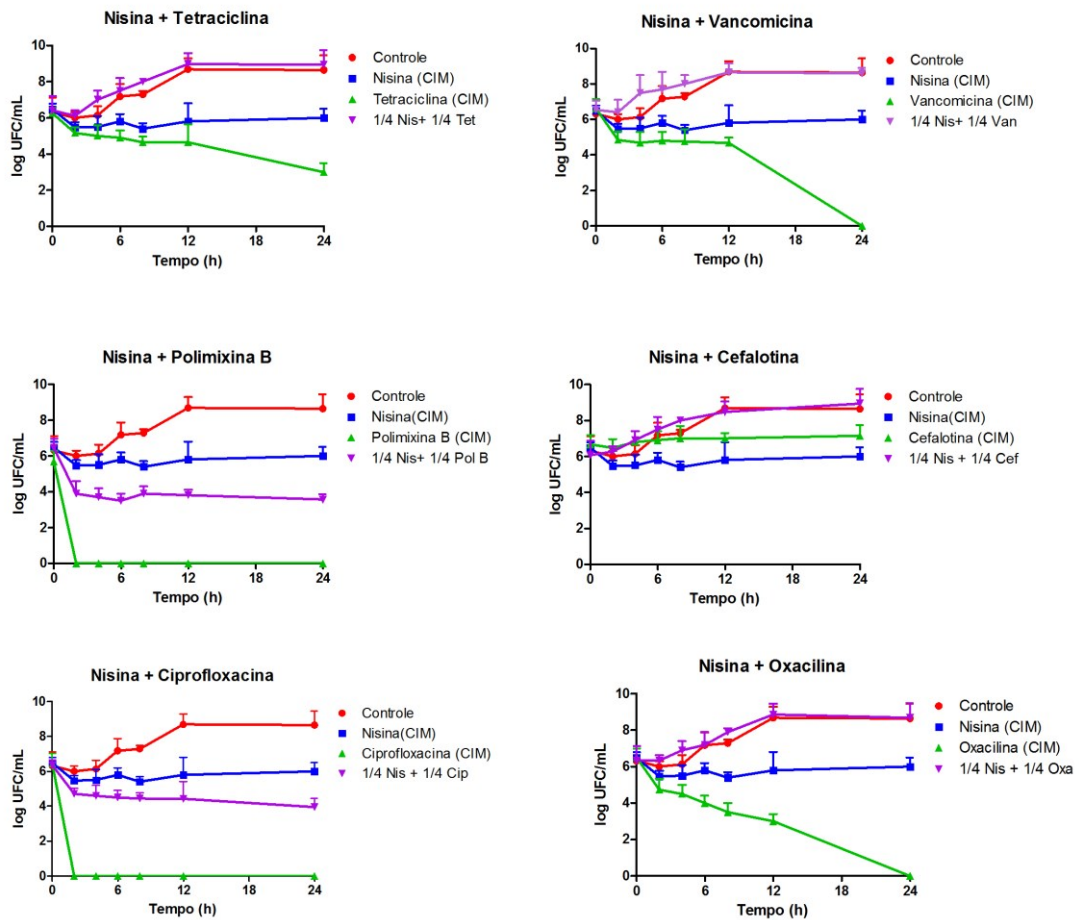
Para os testes realizados com a linhagem de MRSA, a nisina testada individualmente, em valor obtido de CIM, apresentou efeito bactericida tendo zerado a contagem bacteriana de UFC/mL. Todas as combinações entre nisina e antibióticos testadas nas combinações de 1/4 de CIM, apresentaram efeito inibidor, sendo alguns com efeito bactericida ou bacteriostático

(Figura 3), justificando assim a existência de sinergismo, exceto para a combinação de Nis/Tet, cuja redução comparada ao inoculo inicial não foi maior que 2 log da UFC/mL.

Quanto a *P. aeruginosa*, o sinergismo não foi tão eficiente entre a nisina e antibacterianos testados. As combinações de Nis/Tet, Nis/Vanco, Nis/Cefa, Nis/Oxa não apresentaram qualquer efeito sobre a bactéria enquanto as combinações de Nis/Pol B e Nis/Cipro mostraram sinergismo e efeito bactericida durante as 24 horas de experimentação (Figura 4).



**Figura 3:** Curvas de sobrevivência para verificação das interações entre nisina e os fármacos antibacterianos: tetraciclina, vancomicina, polimixina B, cefalotina, ciprofloxacina e oxacilina testados isoladamente (CIM) e em combinações (1/4 CIM nisina + 1/4 CIM antibiótico) sobre *S. aureus* MRSA ATCC 33591

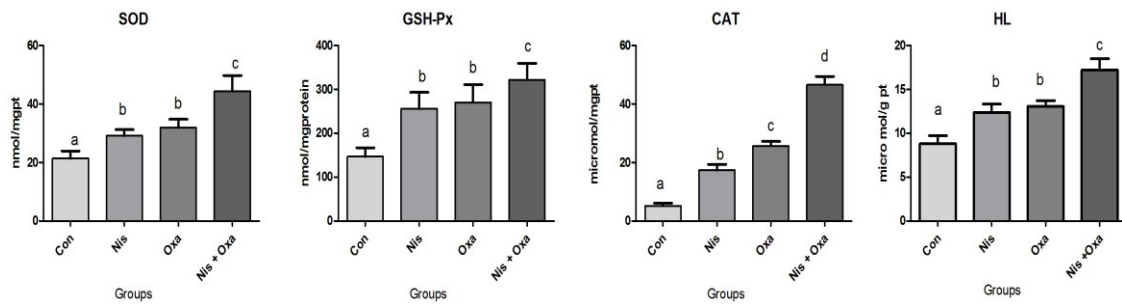


**Figura 4:** Curvas de sobrevivência para verificação das interações entre nisina e os fármacos antibacterianos: tetraciclina, vancomicina, polimixina B, cefalotina, ciprofloxacina e oxacilina testados isoladamente (CIM) e em combinações ( $\frac{1}{4}$  CIM nisina +  $\frac{1}{4}$  CIM antibiótico) sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853.

### 5.3 Atividade das enzimas antioxidantes

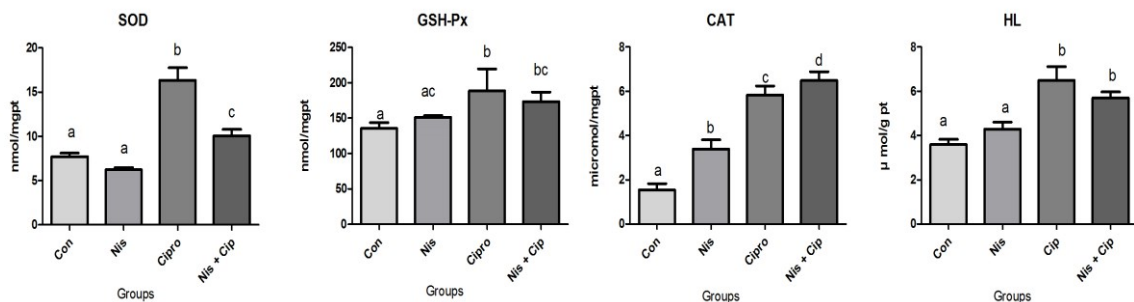
Em relação aos tratamentos frente ao MRSA, todas as enzimas antioxidantes testadas nesse estudo apresentaram maior atividade ( $p < 0,05$ ) quando submetidas aos tratamentos (nisina, antibacteriano e misturas) em relação a amostra controle. Os aumentos nas atividades das enzimas testadas (Figura 5) foram maiores quando testadas na combinação nisina mais oxacilina quando comparado aos tratamentos individuais. Esse aumento pode ser observado também nos níveis de hidroperóxido de lipídio (HL) - um marcador da atividade das enzimas antioxidantes.





**Figura 5:** Atividades as enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px) e marcador (HL) em *S. aureus* (MRSA) após crescimento em concentrações sub-letais de agentes antimicrobianos testados. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Con= controle, Nis= nisina, Oxa= oxacilina e Nis+Oxa = nisina + oxacilina.

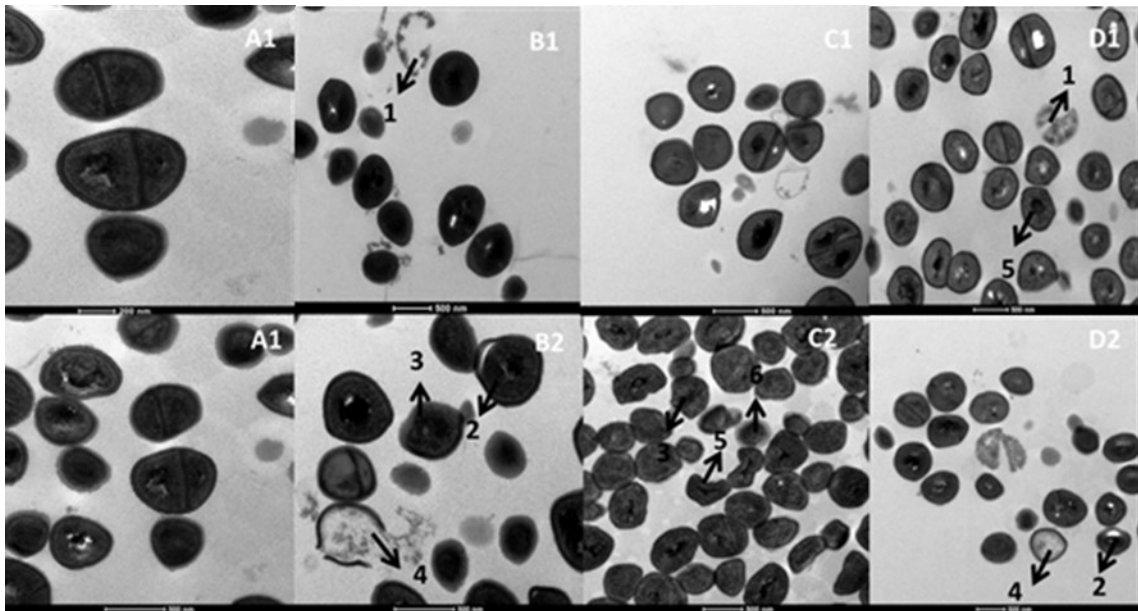
Para as atividades das enzimas de *P. aeruginosa* (Figura 6), nota-se que para os tratamentos realizados com adição de ciprofloxacina e combinação nisina mais ciprofloxacina houve uma maior atividade enzimática em relação ao controle para as três enzimas testadas bem como para os níveis de HL. O tratamento individual com a nisina aumentou a atividade da enzima catalase em relação ao controle, porém não obteve diferença ( $p > 0,05$ ) no aumento da atividade enzimática para as enzimas: SOD e GSH-Px e para o marcador HL.



**Figura 6:** Atividades as enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px) e marcador (HL) em *P. aeruginosa* após crescimento em concentrações sub-letais de agentes antimicrobianos testados. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Con= controle, Nis= nisina, Cip= ciprofloxacina e Nis+Cip = nisina + ciprofloxacina

## 5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

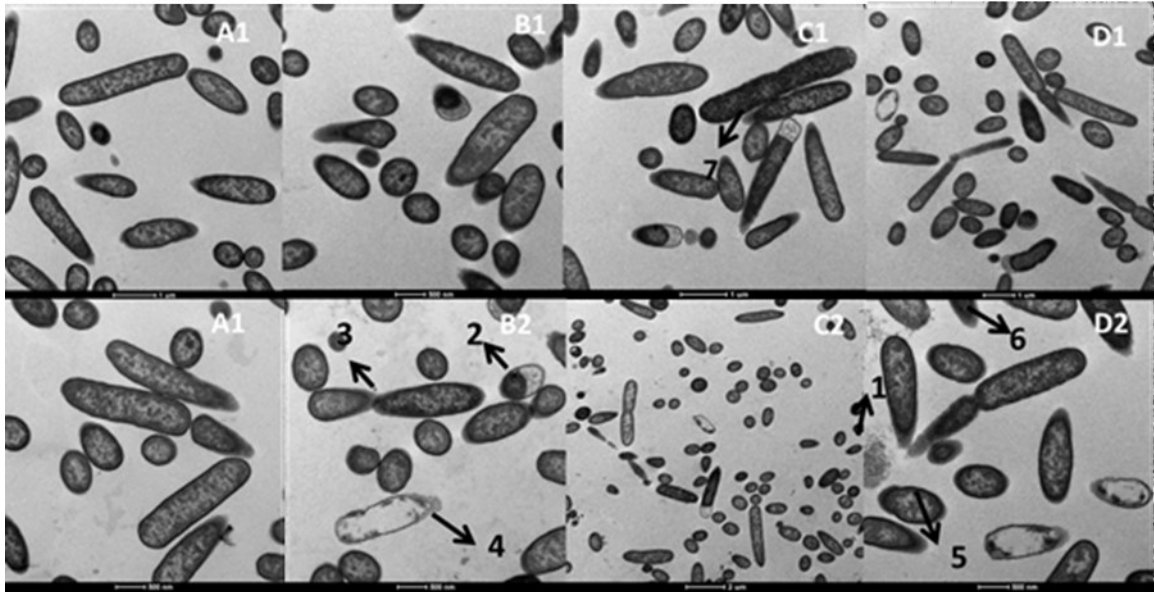
Na MET foi possível visualizar a porção intracelular das bactérias e os danos que as células apresentavam quando os antimicrobianos entravam em contato com a célula bacteriana. A morfologia celular de MRSA dos ensaios controles se mostraram intactas e redondas e com uma organização típica de cocos Gram-positivos com citoplasma, membrana plasmática e parede celular bem definida. Na Figura 7 é possível notar as alterações morfológicas causadas pelos tratamentos sobre as células de MRSA, sendo estas provocadas por danos na parede celular, perda da integridade da membrana plasmática e, conseqüente, perda do conteúdo citoplasmático, distorção na estrutura da célula e lise total da célula.



**Figura 7:** Alterações morfológicas causadas por nisina, oxacilina e combinação em MRSA ATCC 33591 observadas por microscopia eletrônica de transmissão. (A1) Células cultivadas na ausência de compostos (controle). (B1 e B2) Células tratadas com 1X CIM e 4X CIM de nisina respectivamente. (C1 e C2) Células tratadas CIM e 4X CIM oxacilina respectivamente. (D1 e D2) Células tratadas ¼ CIM e 1X CIM da combinação de nisina +oxacilina respectivamente. 1, lise total da célula; 2, polarização do conteúdo citoplasmático; 3, perda da integridade da membrana; 4, perda do conteúdo citoplasmático; 5, distorção na estrutura da célula; 6, danos na parede celular.

A morfologia de *P. aeruginosa* no ensaio controle também se mostrou inalterada com organização típica de bacilos Gram negativos, tais como parede celular intacta, presença de membranas externas e citoplasmáticas bem definidas e conteúdo citoplasmático também com aspecto normal (Figura 8). Porém, foram notadas alterações similares as ocorridas em MRSA

também como perda da integridade da membrana, efluxo dos constituintes citoplasmáticos, distorção na estrutura da célula e lise, além de polarização no conteúdo citoplasmático e uma possível inibição na divisão celular nos tratamentos com ciprofloxacina e na combinação com nisina.



**Figura 8:** Alterações morfológicas causadas por nisina, ciprofloxacina e combinação em *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 observadas por microscopia eletrônica de transmissão. (A1) Células cultivadas na ausência de compostos (controle). (B1 e B2) Células tratadas com 1X CIM e 4X CIM de nisina respectivamente. (C1 e C2) Células tratadas CIM e 4X CIM de ciprofloxacina respectivamente. (D1 e D2) Células tratadas  $\frac{1}{4}$  CIM e 1X CIM da combinação de nisina +ciprofloxacina respectivamente. 1, lise total da célula; 2, polarização do conteúdo citoplasmático; 3, perda da integridade da membrana; 4, perda do conteúdo citoplasmático; 5, distorção na estrutura da célula; 6, danos na parede celular; 7 possível inibição da divisão celular.

## 5.5 Análise Proteômica

### 5.5.1 Análise proteômica de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) ATCC 33591 submetida a concentrações subletais dos antibacterianos e combinação

Em nosso estudo analisamos o perfil proteico da cepa de MRSA ATCC 33591 exposta as concentrações subletais de nisina, oxacilina e combinação nisina/oxacilina, sendo que em estudos preliminares e anteriores mostraram efeito sinérgico para esta combinação apresentando diminuição da contagem bacteriana, e conseqüentemente a concentração inibitória mínima necessária para a mesma ação inibidora de crescimento bacteriano.

Assim, nos dados normalizados pelo Scaffold foram identificadas um total de 135 proteínas distintas referentes aos três tratamentos e ao controle. Oitenta e cinco proteínas foram expressas diferentemente ( $p < 0,05$ ) entre o controle e os tratamentos de acordo com a análise de variância (ANOVA) e fold change em relação ao ensaio controle (Tabela 3). Todos os tratamentos (nisina, oxacilina e a combinação de nisina e oxacilina) modificaram o perfil de proteínas expressas para o MRSA, sendo categorizadas conforme o processo biológico e função molecular. Desta forma, as correlações funcionais das proteínas expressas foram moduladas conforme cada tratamento analisado individualmente comparativo ao controle através da expressão relacionada ao fold change (Figuras 9 e 10).

Assim sendo, notou-se que o processo biológico com mais alterações na expressão de proteínas foi o metabolismo bacteriano, mais especificamente relacionados a síntese de proteínas, pois todos os tratamentos apresentaram grandes alterações nas proteínas ribossômicas relacionadas a transcrição e translação, bem como também as referentes ao metabolismo energético.

#### *5.5.1.1 MRSA tratado com nisina*

O tratamento de MRSA na concentração subletal de nisina após 18 horas provocou alterações na expressão de 47 proteínas, sendo 21 exclusivas ou em maior expressão (up regulation) e 26 (down regulation) em menor expressão, isto quando comparado ao ensaio controle sem tratamento realizado (Figura 11a). Houve aumento na expressão de proteínas de ligação, como por exemplo, a Acyl carrier protein (acpP) (proteína relacionada com o metabolismo de lipídeos) e também aumento na expressão de proteínas ligadas a divisão e organização celular como FtsZ e murA1.

#### *5.5.1.2 MRSA tratado com oxacilina*

O tratamento com oxacilina por 18 horas em concentração subletal, provocou alteração na expressão de 62 proteínas, sendo 28 exclusivas ou em maior abundância (up regulation) e 34 em menor expressão (down regulation) em relação ao ensaio controle sem tratamento (Figura 11b). Notou-se maior expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo energético, como a piruvato quinase (pyk), glicerol fosfato desidrogenase (glpD) e as enzimas da família de ATP sintase (beta, alfa e delta) em relação aos demais tratamentos. Em relação as proteínas relacionadas ao estresse e regulação, também verificou-se aumento significativo na expressão da chaperona DnaK, porém com diminuição da proteína do choque tóxico (cspA) e tiorredoxina (trxA).

### 5.5.1.3 MRSA tratado com a combinação nisina/oxacilina

No ensaio sobre MRSA para a combinação de  $\frac{1}{4}$  da CSM de nisina e  $\frac{1}{4}$  da CSM oxacilina foi observada alteração na expressão de 52 proteínas, sendo 28 exclusivas ou em maior expressão (up regulation) e 24 (down regulation) em menor expressão (Figura 11c). Todos os processos biológicos e metabolismo tiveram proteínas alteradas pela combinação entre os antimicrobianos, porém as proteínas com maiores alterações na expressão foram as relacionadas ao processo de tradução com síntese de proteínas (Figura 12).

Dentre as proteínas exclusivas e/ou expressas em maior ou menor quantidade em relação ao controle e aos demais tratamentos destacam-se a *ftsZ* ligada a divisão celular bacteriana; proteínas do metabolismo de lipídeos como Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (*fabL*); diminuição na expressão da proteína de imunoglobulina (*sbi*); a presença exclusiva da beta-lactamase, a qual é uma importante enzima de resistência aos antibióticos betalactâmicos; além de outras ligadas ao estresse, homeostase e regulação da bactéria como a proteína de estresse universal, arginina deaminase (*arcA*), proteína deglicase (*hchA*) e chaperona.

**Tabela 3:** Proteínas expressas diferentemente de MRSA entre os tratamentos testados ( $p < 0,05$ ) e fold change utilizando a bactéria não tratada (controle) como referência.

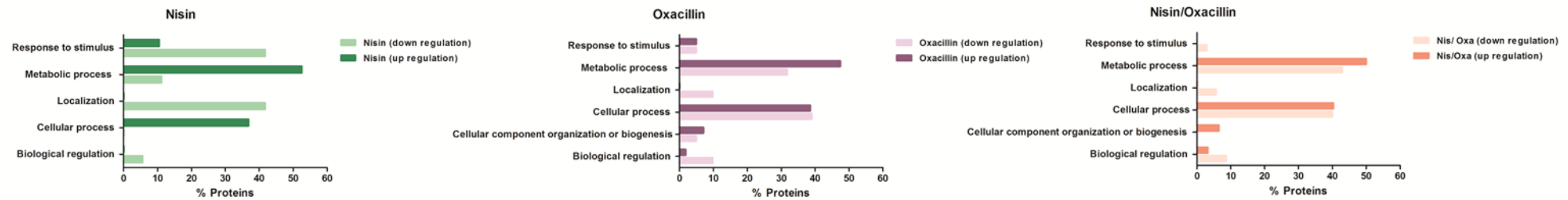
Proteínas	Acesso (Uniprot)	Massa Molecular	Fold Change*			Função Biológica
			Nis/Oxa	Nis	Oxa	
Elongation factor Tu	EFTU_STAA1	43 kDa	1.8	1.4	2.0	Síntese proteínas
Formate acetyltransferase	PFLB_STAA3	85 kDa	0.3	0.5	0.9	Metabolismo energético
ATP synthase subunit beta	ATPB_STAA1	51 kDa	1.4	1.6	3.6	Síntese de ATP, transporte
Cold shock protein CspA	CSPA_STAA3	7 kDa	0.7	3.0	0.3	Resposta ao estresse
Pyruvate kinase	KPYK_STAA3	63 kDa	3.7	3.9	6.8	Glicólise
Elongation factor G	EFG_STAA1	77 kDa	3.5	1.9	3.6	Síntese proteínas
Alcohol dehydrogenase	ADH_STAA3	36 kDa	0.1	0.2	0.3	Metabolismo energético, oxirredutase
Probable malate:quinone oxidoreductase 2	MQO2_STAAC	56 kDa	1.7	1.5	2.7	Metabolismo energético, ciclo TCA
Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GLPD_STAA3	62 kDa	1.9	1.1	6.8	Metabolismo energético
Thioredoxin	THIO_STAA3	11 kDa	0.9	1.3	0.07	Estresse oxidativo
30S ribosomal protein S3	RS3_STAA1	24 kDa	2.7	2.8	2.2	Translação
Probable transglycosylase IsaA	ISAA_STAA1	24 kDa	0.8	16	0.0	Processo metabólico
Cysteine synthase	CYSK_STAAC	33 kDa	0.3	0.2	1.6	Biossíntese de aminoácidos
Chaperone protein DnaK	DNAK_STAA1	66 kDa	6.3	9.2	16	Resposta ao estresse, regulação
L-lactate dehydrogenase 2	LDH2_STAA1	34 kDa	0.2	0.09	0.4	Resposta ao estresse
ATP synthase subunit alpha	ATPA_STAA1	55 kDa	2.0	2.3	6.4	Síntese de ATP, transporte
Ornithine carbamoyltransferase	OTC_STAAC	38 kDa	0	0.0	0.1	Biossíntese de aminoácidos, Metabolismo arginina
50S ribosomal protein L10	RL10_STAA1	18 kDa	2.1	1.5	1.4	Translação
Arginine deiminase	ARCA_STAA1	47 kDa	0.08	0.4	3.6	Metabolismo arginina
Cell division protein FtsZ	FTSZ_STAA8	41 kDa	5.2	4.1	5.1	Divisão celular, Processo metabólico
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	AHPC_STAA3	21 kDa	0.7	0.3	0.9	Resposta ao estresse oxidativo
Pyrimidine-nucleoside phosphorylase	PDP_STAA3	46 kDa	0.4	0.3	2.6	Metabolismo de proteínas
30S ribosomal protein S5	RS5_STAA1	18 kDa	2.0	1.3	1.1	Translação

<b>Proteínas</b>	<b>Acesso (Uniprot)</b>	<b>Massa Molecular</b>	<b>Fold Change*</b>			<b>Função Biológica</b>
Ornithine carbamoyltransferase 2	OTC2_STAAM	38 kDa	0.03	0.0	0.8	Metabolismo arginina
Fructose-bisphosphate aldolase class 1	ALF1_STAA1	33 kDa	0.7	0.04	0.5	Organização celular, Biogênese parede celular
50S ribosomal protein L7/L12	RL7_STAA1	13 kDa	1.1	0.4	0.5	Transporte, Processo biossintético
Phosphocarrier protein HPr	PTHP_STAAC	9 kDa	0.4	1.4	0.07	Transcrição, Transporte, Localização
Glycine cleavage system H protein	GCSH_STAA1	14 kDa	2.0	4.2	1.5	Metabolismo de aminoácidos, Processo metabólico
Carbamate kinase 1	ARCC1_STAA3	34 kDa	0.0	0.03	0.4	Metabolismo de arginina
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	IMDH_STAA3	53 kDa	2.4	4.2	17	Processo metabólico
Bacterial non-heme ferritin	FTN_STAA3	20 kDa	0.09	0.3	0.4	Regulação, Estresse oxidativo
L-threonine dehydratase catabolic	TDCB_STAAM	37 kDa	0.0	0.2	0.6	Metabolismo energético, Metabolismo nitrogênio
Dihydrolipoyl dehydrogenase	DLDH_STAAC	49 kDa	1.6	0.3	0.2	Metabolismo energético
30S ribosomal protein S2	RS2_STAA1	29 kDa	1.2	1.5	0.4	Translação
Glutamine synthetase	GLN1A_STAAC	51 kDa	1.4	0.6	0.2	Transporte, Processo biossintético
Acetate kinase	ACKA_STAA2	44 kDa	0.5	1.5	1.7	Metabolismo energético
Translation initiation factor IF-2	IF2_STAA1	78 kDa	1.8	1.6	2.8	Síntese de proteínas
Elongation factor Ts	EFTS_STAA1	32 kDa	1.7	0.2	0.1	Síntese de proteínas
50S ribosomal protein L15	RL15_STAA1	16 kDa	1.1	1.5	0.0	Translação
Carbamate kinase 2	ARCC2_STAAB	34 kDa	0.0	0.2	1.6	Metabolismo de arginina
UPF0342 protein SA1663	Y1663_STAAN	13 kDa	0.10	0.3	0.2	
Putative universal stress protein SA1532	Y1532_STAAN	18 kDa	0.04	0.1	0.2	Resposta ao estresse
Alkaline shock protein 23	ASP23_STAA3	19 kDa	0.0	0.9	0.9	Resposta ao estresse
UPF0365 protein SA1402	Y1402_STAAN	35 kDa	INF	INF	INF	Componente membrana
Immunoglobulin-binding protein sbi	SBI_STAA1	49 kDa	0.0	1.9	0.0	Virulência
Ribose-phosphate pyrophosphokinase	KPRS_STAAC	35 kDa	INF	INF	INF	Metabolismo energético, Metabolismo de nitrogênio
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpL	CLPL_STAA3	78 kDa	0.0	3.1	0.0	Protease, Resposta ao estresse, Metabolismo de carboidratos
50S ribosomal protein L13	RL13_STAA1	16 kDa	3.2	0.6	1.3	Translação

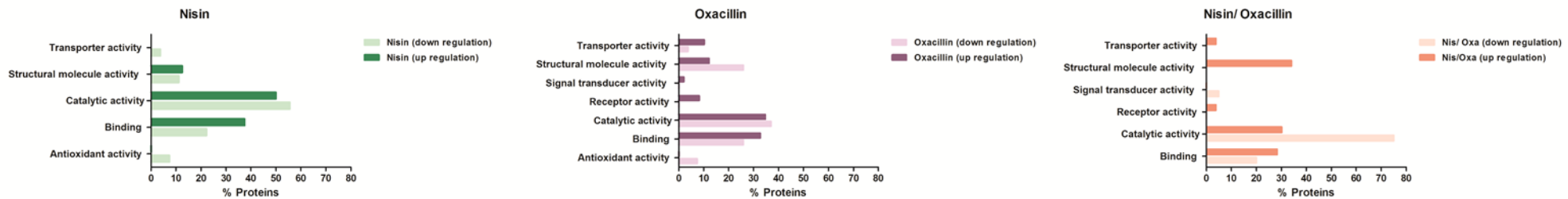
<b>Proteínas</b>	<b>Acesso (Uniprot)</b>	<b>Massa Molecular</b>	<b>Fold Change*</b>			<b>Função Biológica</b>
D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 2	DLTC_STAA1	9 kDa	INF	3.1	1.9	Organização celular, Biogênese parede celular
Acyl carrier protein	ACP_STAA1	9 kDa	0.4	2.3	0.0	Metabolismo de lipídeos
DEAD-box ATP-dependent RNA helicase CshA	CSHA_STAA3	57 kDa	INF	INF	INF	Resposta ao estresse
UDP-N-acetylglucosamine 1- carboxyvinyltransferase 1	MURA1_STAAC	45 kDa	5.7	2.0	19	Divisão celular
Deoxyribose-phosphate aldolase 2	DEOC2_STAAC	23 kDa	0.0	0.0	1.0	Metabolismo primário, Metabolismo energético
Transketolase	TKT_STAAC	72 kDa	2.2	0.0	0.9	Metabolismo energético
UPF0355 protein	UP355_STAAC	15 kDa	0.0	0.9	0.2	
50S ribosomal protein L2	RL2_STAA1	30 kDa	2.9	1.0	3.0	Translação
Immunodominant staphylococcal antigen B	ISAB_STAA3	19 kDa	0.09	0.4	0.2	
Uncharacterized protein SA0829	Y829_STAAN	33 kDa	13	4.1	6.3	
50S ribosomal protein L17	RL17_STAA1	14 kDa	0.6	0.0	0.0	Translação
ATP synthase subunit delta	ATPD_STAA1	20 kDa	0.0	1.0	4.7	Metabolismo de carboidratos
Putative phosphoesterase	Y1009_STAA1	19 kDa	0.0	0.2	0.3	Metabolismo energético
30S ribosomal protein S11	RS11_STAA1	14 kDa	INF	INF	INF	Translação
Pyridoxine kinase	PDXK_STAAC	30 kDa	INF	INF	INF	Co-fator, Metabolismo energético
D-lactate dehydrogenase	LDHD_STAAC	37 kDa	0.0	0.5	3.2	Metabolismo energético
Probable DNA-directed RNA polymerase subunit delta	RPOE_STAA1	21 kDa	INF	INF	INF	Transcrição, Síntese de proteínas
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	RPOA_STAA1	35 kDa	INF	INF	INF	Transcrição, Síntese de proteínas
Aminomethyltransferase	GCST_STAA1	40 kDa	INF	INF	INF	Metabolismo energético
Protein deglycase HchA	HCHA_STAA1	32 kDa	0.0	4.7	2.6	Regulação, Homeostase
50S ribosomal protein L3	RL3_STAA1	24 kDa	13	0.0	2.5	Translação
30S ribosomal protein S13	RS13_STAA1	14 kDa	6.3	0.0	0.0	Translação
Asparagine--tRNA ligase	SYN_STAA1	49 kDa	INF	INF	INF	Síntese de proteínas
50S ribosomal protein L22	RL22_STAA1	13 kDa	6	0.0	0.0	Translação
UPF0473 protein SA1443	Y1443_STAAN	12 kDa	INF	INF	INF	
Glycerol kinase	GLPK_STAA1	56 kDa	INF	INF	INF	Metabolismo energético



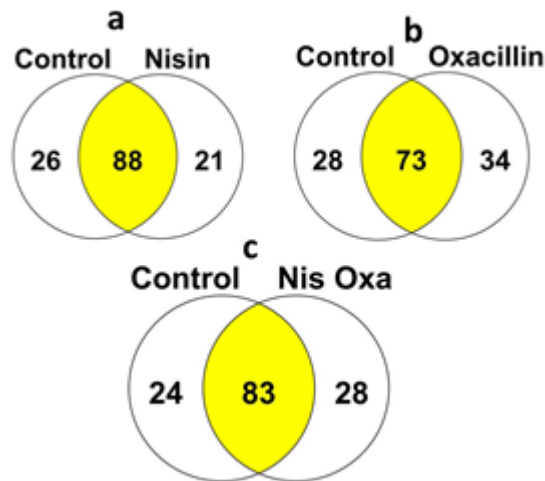
<b>Proteínas</b>	<b>Acesso (Uniprot)</b>	<b>Massa Molecular</b>	<b>Fold Change*</b>			<b>Função Biológica</b>
Alanine dehydrogenase 1	DHA1_STAA3	40 kDa	0.0	0.0	0.4	Metabolismo energético
Phosphate acetyltransferase	PTAS_STAAC	35 kDa	0.0	0.0	0.0	Metabolismo energético
Beta-lactamase	BLAC_STAAU	31 kDa	INF	INF	INF	Resistência a antibióticos
50S ribosomal protein L29	RL29_STAA1	8 kDa	2.2	0.0	0.0	Translação
UDP-N-acetylglucosamine	MURG_STAA1	40 kDa	INF	INF	INF	Organização celular, Biogênese parede celular
Probable quinol oxidase subunit 2	QOX2_STAA3	42 kDa	INF	INF	INF	Metabolismo energético, Metabolismo nitrogênio
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	RPOB_STAA1	133 kDa	INF	INF	INF	Síntese de proteínas
Transcriptional regulator	SARA_STAA3	15 kDa	INF	INF	INF	Síntese de proteínas
Uncharacterized protein	Y1069_STAAN	61 kDa	INF	INF	INF	
Probable transglycosylase	SCED_STAA1	24 kDa	INF	INF	INF	Metabolismo energético
Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	FABI_STAAR	28 kDa	INF	INF	INF	Metabolismo de lipídeos, Estrutura celular



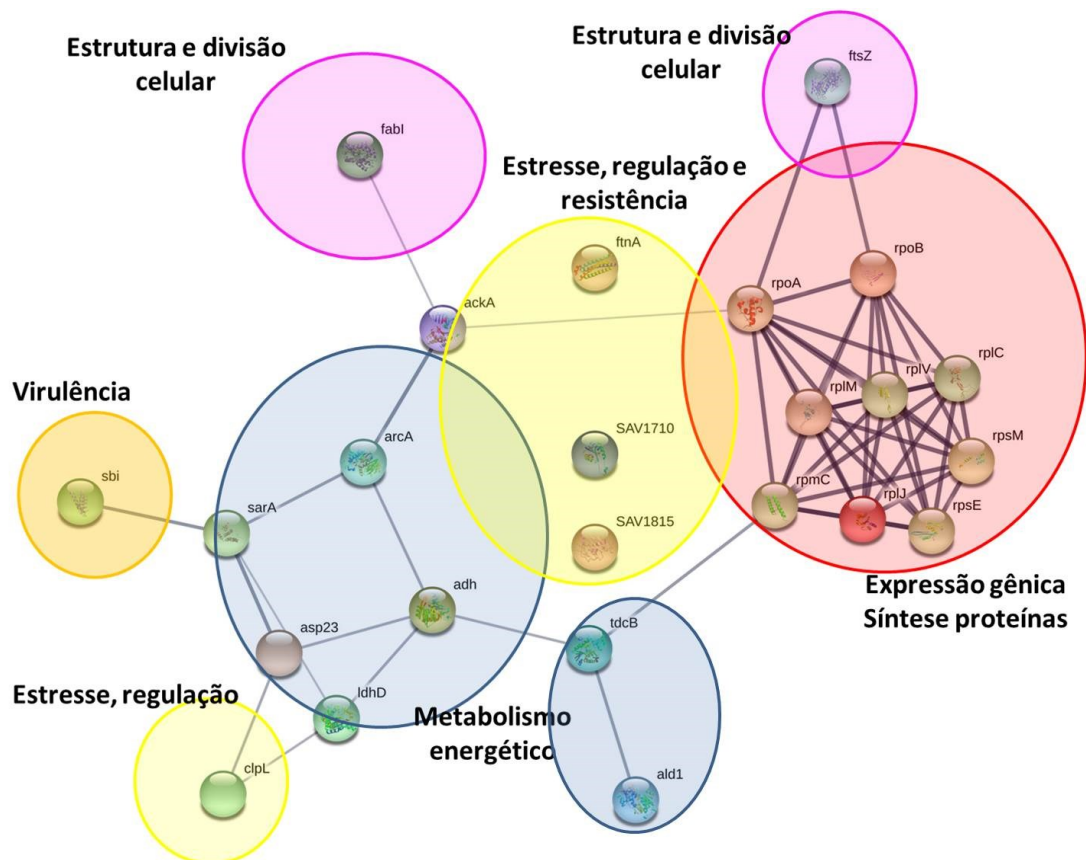
**Figura 9:** Processos biológicos das proteínas expressas (up e down regulation) de MRSA exposto a aos tratamentos com nisina, oxacilina e na combinação entre nisina e oxacilina em comparação com a bactéria não tratada (controle).



**Figura 10:** Função molecular das proteínas expressas (up e down regulation) de MRSA exposto a aos tratamentos com nisina, oxacilina e na combinação entre nisina e oxacilina em comparação com a bactéria não tratada (controle).



**Figura 11:** Diagrama de Venn. Proteínas de MRSA expressas diferentemente em cada tratamento em relação ao controle. a= MRSA tratado com nisina, b= MRSA tratado com oxacilina e c=MRSA tratado com nisina e oxacilina.



**Figura 12:** Rede de interações de proteínas de MRSA do tratamento da combinação entre nisina e oxacilina expressas diferentemente em relação ao controle e demais tratamentos. A rede foi obtida no software STRING (<http://string-db.org/>). Imagem foi editada para ressaltar a divisão de acordo com a função biológica.

### 5.5.2 Análise proteômica de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 submetido à concentrações sub-letais dos antibacterianos e combinação

Em nosso estudo analisamos o perfil proteico da cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 exposta às concentrações subletais de nisina, ciprofloxacina e combinação nisina/ciprofloxacina, sendo que em estudo preliminar e anterior observou-se efeito sinérgico para esta combinação com diminuição da contagem bacteriana, e conseqüentemente a concentração inibitória mínima necessária para a mesma ação inibidora de crescimento bacteriano.

Nos dados normalizados pelo Scaffold foi relacionado um total de 179 proteínas distintas referentes aos três tratamentos e controle. Sessenta e três proteínas foram expressas diferentemente ( $p < 0,05$ ) entre o controle e tratamentos de acordo com a análise de variância (ANOVA) (Tabela 4). Todos os tratamentos (nisina, ciprofloxacina e combinação nisina/ciprofloxacina) modificaram de alguma forma o perfil de proteínas expressas de *P. aeruginosa*, sendo categorizadas conforme o processo biológico e função molecular. Desta forma, as correlações funcionais das proteínas expressas foram moduladas conforme cada tratamento analisado individualmente e comparativo ao controle através da expressão relacionada ao fold change (Figuras 13 e 14).

O processo biológico com mais alterações na expressão de proteínas foi o metabolismo bacteriano, relacionadas ao metabolismo ribossomal de transcrição gênica e síntese de proteínas e proteínas do metabolismo de geração de energia, metabolismo energético da bactéria também foram alteradas.

#### 5.5.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* tratada com nisina

O tratamento na concentração subletal de nisina durante 18 horas, provocou a alteração na expressão de 22 proteínas. Dessas proteínas, 14 estavam em maior expressão (*up regulation*) e 8 (*down regulation*) em menor expressão em relação a bactéria não tratada (Figura 15a). Não houve alteração significativa em algum processo biológico; porém destaca-se aumento na expressão de proteínas relacionadas ao estresse como peroxidase, e proteína de proteção ao DNA (*dps2*), além na diminuição na expressão de fatores de virulência como pílus tipo IV e diminuição de lipídeo A.

### 5.5.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* tratada com ciprofloxacina

No tratamento com ciprofloxacina em concentração subletal, houve alteração na expressão de 32 proteínas, 15 proteínas em maior expressão (*up regulation*) e 17 (*down regulation*) em menor expressão (Figura 15b). No tratamento com o fármaco, destacou-se uma significativa alteração nas proteínas relacionadas ao metabolismo ribossomal da bactéria; especialmente as proteínas ribossomais envolvidas no processo de translação.

### 5.5.2.3 *Pseudomonas aeruginosa* tratada com combinação nisina/ciprofloxacina

No tratamento da bactéria exposta por 18 horas a combinação de antimicrobianos, foram expressas 30 proteínas diferentes. Dessas proteínas, somente 5 foram exclusivas ou em maior expressão (*up regulation*); as demais 25 estavam em menor expressão (*down regulation*) (Figura 15c). No tratamento com a combinação, destaca-se grande aumento na expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo energético da bactéria como pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) (*aceE*), malic enzyme (*maeB*), diferenças nas proteínas relacionadas a resposta estresse como aumento na expressão de chaperona DnaK (*dnaK*) e protease ClpA. Também houve alterações na expressão de proteínas relacionadas a membrana externa da bactéria, como as porinas (*oprG*, *oprH*, *oprD*). Todos os processos biológicos, e de metabolismo, tiveram proteínas alteradas quando usada combinação nisina/ciprofloxacina, porém as proteínas com maiores alterações na expressão foram aquelas relacionadas ao processo de tradução para síntese de proteínas (Figura 16).

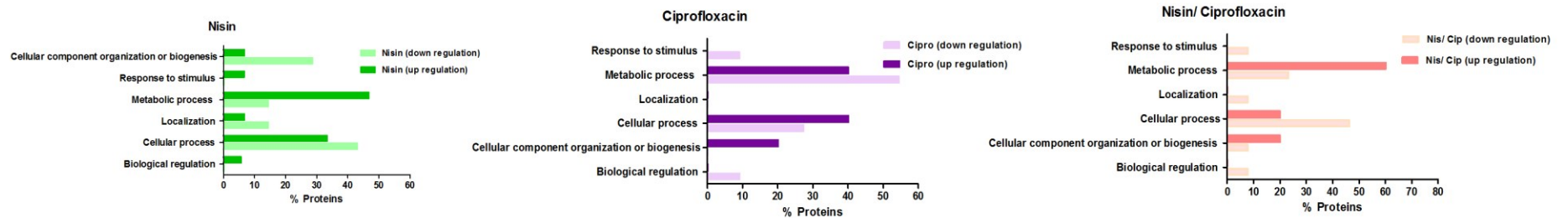
**Tabela 4:** Proteínas expressas diferentemente de *Pseudomonas aeruginosa* entre os tratamentos testados ( $p < 0,05$ ) e fold change utilizando a bactéria não tratada (controle) como referência.

Proteínas	Acesso Uniprot	Massa Molecular	Fold Change			Função Biológica
			NC	Nis	Cip	
Elongation factor Tu	WP_003115146.1 (+7)	43 kDa	1.2	0.5	19	Síntese de proteínas
Molecular chaperone GroEL	WP_003094059.1	57 kDa	5.1	2.0	95	Chaperona, Resposta ao estresse
ATP synthase subunit beta	WP_003097130.1	50 kDa	2.1	0.9	INF↓	Metabolismo energético, Transporte
Elongation factor G	WP_003093741.1 (+3)	78 kDa	4.1	0.2	INF↓	Síntese de proteínas
ATP synthase subunit alpha	WP_003097134.1	55 kDa	1.5	1.1	0.05	Metabolismo energético, Regulação
Arginine deiminase	WP_003100029.1	46 kDa	0.6	0.8	0	Biossíntese de aminoácidos, Metabolismo arginina
Molecular chaperone DnaK	WP_003095212.1 (+2)	68 kDa	47	3.3	INF↓	Resposta ao estresse, regulação
Dihydrolipoyl dehydrogenase	WP_003087422.1 (+1)	50 kDa	1.1	0.9	INF↓	Metabolismo energético
Isocitrate dehydrogenase (NADP(+))	WP_003090436.1	46 kDa	1.9	0.8	0.0	Metabolismo energético, Ciclo TCA
Succinyl-CoA ligase subunit beta	WP_003087425.1	42 kDa	1.2	1.2	2.8	Metabolismo energético, Ciclo TCA
50S ribosomal protein L5	WP_003093703.1	20 kDa	0.3	1.6	2.1	Translação
30S ribosomal protein S1	WP_003091442.1	62 kDa	6.4	0.6	INF↓	Translação
Bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	WP_003085590.1 (+9)	116 kDa	9.6	0.2	INF↓	Metabolismo energético, Regulação transcrição
PhoP/Q and low Mg <sup>2+</sup> inducible outer membrane protein H1	WP_003082431.1	22 kDa	0.3	0	1.4	Componente membrana externa, ligação lipopolissacarídeos
DNA-binding protein HU-beta	WP_002552737.1 (+20)	9 kDa	0.3	4.6	2.9	Organização celular, condensação DNA
Hypothetical protein	WP_003091672.1 (+1)	16 kDa	0.08	0.6	1.0	Resposta ao estresse
50S ribosomal protein L10	WP_003093748.1	18 kDa	0.1	1.9	2.7	Translação
50S ribosomal protein L9	WP_003095627.1	16 kDa	0.7	0.5	3.3	Translação
50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc	WP_003099279.1	22 kDa	0.5	3.1	0.7	Translação
Hypothetical protein	WP_003082056.1	16 kDa	0.7	0.8	2.3	Membrana externa
50S ribosomal protein L6	WP_003093699.1	19 kDa	0.07	0.3	1.2	Translação
50S ribosomal protein L21	WP_003094761.1	12 kDa	0.6	1.1	2.5	Translação
50S ribosomal protein L19	WP_003092637.1	13 kDa	0.5	1.4	3.4	Translação
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	WP_003093675.1	37 kDa	5.4	0.5	0.0	Transcrição, Expressão gênica
30S ribosomal protein S13	WP_003093692.1	13 kDa	0.5	0.4	1.2	Síntese de proteínas

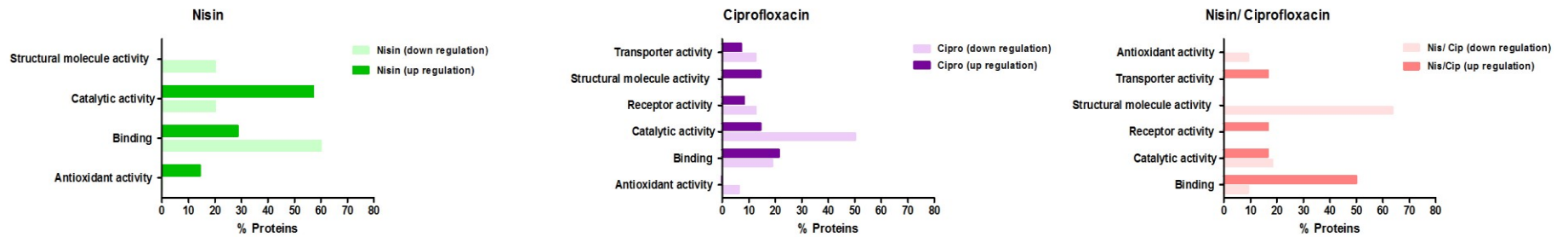
<b>Proteínas</b>	<b>Acesso Uniprot</b>	<b>Massa Molecular</b>	<b>Fold Change</b>			<b>Função Biológica</b>
Ornithine carbamoyltransferase	WP_003096197.1 (+1)	38 kDa	0.4	0.1	INF↓	Biossíntese de aminoácidos, Metabolismo arginina
Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), homodimeric type	WP_003095785.1 (+3)	100 kDa	12.0	3.9	INF↓	Metabolismo energético
Peroxidase	WP_003092073.1	22 kDa	2.2	4.5	0.6	Homeostase, Regulação
Superoxide dismutase [Fe] (SOD)	WP_003094005.1	21 kDa	0.6	1.8	2.7	Resposta ao estresse oxidativo
Outer membrane protein OprG	WP_003093337.1	25 kDa	0.07	0	1.2	Transporte membrana externa
50S ribosomal protein L11	WP_003093751.1 (+3)	15 kDa	0.4	0	2	Translação
30S ribosomal protein S11	WP_002555466.1 (+3)	14 kDa	0.1	0.4	1.0	Translação
30S ribosomal protein S9	WP_003098810.1 (+1)	15 kDa	0.0	0.9	2.5	Translação
50S ribosomal protein L15	WP_003093695.1	15 kDa	0.1	0.7	2	Translação
30S ribosomal protein S10	WP_003103876.1	12 kDa	0.08	0.3	2.3	Translação
30S ribosomal protein S8	WP_003093700.1 (+2)	14 kDa	0	0.2	1.0	Translação
50S ribosomal protein L4	WP_003093737.1	22 kDa	1.1	0.3	2.5	Translação
DNA starvation/stationary phase protection protein	WP_003086103.1	17 kDa	0	3.1	1.4	Resposta ao estresse
50S ribosomal protein L22	WP_002555485.1 (+1)	12 kDa	0.1	0.8	2.5	Translação
50S ribosomal protein L24	WP_003093711.1	11 kDa	0	2.1	1.7	Translação
Malic enzyme	WP_003095842.1 (+3)	45 kDa	6.3	3.1	INF↓	Metabolismo energético, Ciclo TCA
ClpA/B protease ATP-binding subunit	WP_023083185.1	104 kDa	INF↑	INF↑	INF↓	Chaperona, Resposta ao estresse
ATP synthase subunit B	WP_003097137.1 (+1)	17 kDa	1.7	0.0	0.3	Metabolismo energético
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	WP_003114264.1	43 kDa	2.6	0.0	INF↓	Metabolismo energético, Ciclo TCA
30S ribosomal protein S16	WP_003092643.1	9 kDa	0.2	2.0	1.6	Translação
30S ribosomal protein S17	WP_003093717.1 (+1)	10 kDa	0.0	4.2	3.6	Translação
Lipid A deacylase PagL	WP_003094992.1 (+1)	18 kDa	0.9	0	2.0	Metabolismo de lipídeos, lipopolissacarídeos
DNA recombination/repair protein RecA	WP_003092260.1	37 kDa	INF↑	INF↓	INF↓	Resposta ao estresse, Reparação DNA
Porin	WP_003099122.1	47 kDa	0.09	0.3	0	Transporte transmembrana, Transporte de drogas
Cold-shock protein	WP_003084710.1 (+5)	8 kDa	0	0.0	2.5	Resposta ao estresse
Aldehyde dehydrogenase	WP_027906312.1	52 kDa	2.3	0.4	INF↓	Metabolismo energético
Thiol reductase thioredoxin	WP_003096336.1	12 kDa	0	0.3	0.2	Homeostase, Resposta ao estresse oxidativo
Porin	WP_003107743.1 (+4)	48 kDa	2.7	INF↓	INF↓	Transporte transmembrana, Transporte

<b>Proteínas</b>	<b>Acesso Uniprot</b>	<b>Massa Molecular</b>	<b>Fold Change</b>			<b>Função Biológica</b>
30S ribosomal protein S14	WP_003093701.1	12 kDa	0.0	0.0	7.4	Translação
Type IV pilus structural subunit PilA	WP_015503553.1	16 kDa	0.0	0.0	INF↓	Adesão celular, mobilidade
Aspartate ammonia-lyase	WP_003096822.1 (+2)	51 kDa	INF↑	INF↑	INF↓	Metabolismo energético, Ciclo TCA
Heat-shock protein IbpA	WP_003091405.1 (+1)	17 kDa	0.7	15	INF↓	Resposta ao estresse
Hypothetical protein	WP_034070496.1	32 kDa	0.0	2.8	INF↓	
Ferredoxin--NADP(+) reductase	WP_003091832.1	30 kDa	0.0	0.0	0.0	Metabolismo energético
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	WP_003091600.1 (+1)	27 kDa	0.2	0.0	INF↓	Síntese de proteínas
PrkA family serine protein kinase	WP_003085078.1	74 kDa	INF↓	INF↑	INF↓	Metabolismo energético, Resposta a estímulos
ATP synthase epsilon chain	WP_003097128.1	15 kDa	0.0	0.0	12	Metabolismo energético, Transporte
Nitrogen regulatory protein P-II, glnK	WP_003457590.1 (+1)	12 kDa	INF↓	INF↑	INF↓	Metabolismo energético, Regulação

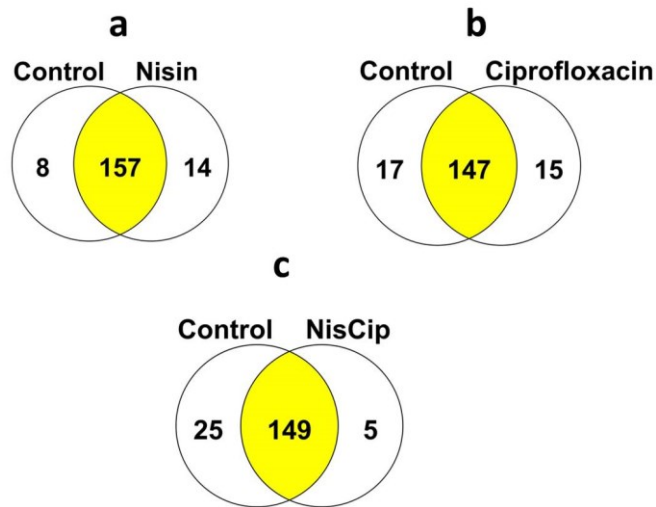




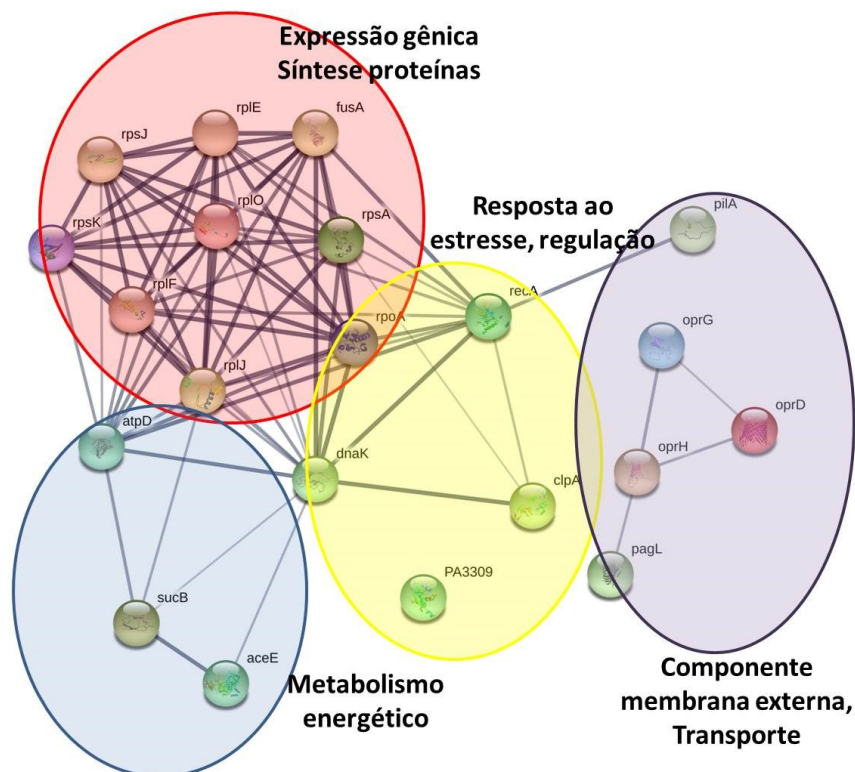
**Figura 13:** Processos biológicos das proteínas expressas (up e down regulation) de *Pseudomonas aeruginosa* exposto a aos tratamentos com nisina, ciprofloxacina e na combinação entre nisina e ciprofloxacina em comparação com a bactéria não tratada (controle).



**Figura 14:** Função molecular das proteínas expressas (up e down regulation) de *Pseudomonas aeruginosa* exposto a aos tratamentos com nisina, ciprofloxacina e na combinação entre nisina e ciprofloxacina em comparação com a bactéria não tratada (controle)



**Figura 15:** Diagrama de Venn. Proteínas de *Pseudomonas aeruginosa* expressas diferentemente em cada tratamento em relação ao controle. a= *P. aeruginosa* tratada com nisina, b= *P. aeruginosa* com ciprofloxacina e c= *P. aeruginosa* com nisina e ciprofloxacina.



**Figura 16:** Rede de interações de proteínas de *P. aeruginosa* do tratamento da combinação entre nisina e oxacilina expressas diferentemente em relação ao controle e demais tratamentos. A rede foi obtida no software STRING (<http://string-db.org>). Imagem foi editada para ressaltar a divisão de acordo com a função biológica.

## 6. Discussão

As combinações de drogas podem ter efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos onde os efeitos sinérgicos são os mais desejáveis, pois pode ser utilizada uma dose, ou concentração, menor dos antimicrobianos quando utilizadas em combinação. Consideramos que isto pode ter uma influência quanto ao custo e toxicidade menores bem como pode contribuir na redução de desenvolvimento da resistência aos antibióticos (ALEKSHUN e LEVY, 2007). A investigação sobre a combinação da nisina com antibacterianos tradicionais foi realizada com o objetivo de verificar como essas combinações poderiam atuar de forma mais efetiva sobre estrutura e fisiologia bacteriana além de verificar se tais combinações poderiam contribuir com o aumento no espectro de ação desta bacteriocina frente a dois patógenos importantes clinicamente.

### 6.1 Testes de sensibilidade e verificação de sinergismo

A atividade antibacteriana da nisina frente as cepas testadas mostrou uma ação antibacteriana melhor sobre MRSA em relação a *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos corroboram com estudos que também reportaram a baixa atividade inibidora da nisina sobre bactérias Gram-negativas em relação as Gram-positivas. De maneira geral, isso se deve ao modo de ação da nisina diretamente na membrana plasmática e na parede celular da bactéria, o que é dificultado pela da membrana externa presente na parede das Gram-negativas e que atua como uma barreira impermeável à molécula da nisina (NAGHMOUCHI et al., 2012; RISHI et al., 2014; FIELD et al., 2016).

Verificou-se também que houve sinergismo entre nisina e oxacilina para MRSA, o que reforça estudos que destacaram o papel promissor da combinação entre nisina e fármacos inibidores da síntese da parede celular para bactérias Gram-positivas. Dentre estes destaca-se os estudos de Brumfitt et al. (2002), que reporta sinergismo entre nisina e ramoplanina frente a MRSA e *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE), e de Tong et al. (2014) que mostraram interação positiva entre nisina e penicilina frente a *Enterococcus faecalis*.

Um aspecto que merece destaque para os resultados obtidos para *P. aeruginosa* é que o sinergismo verificado entre nisina com as drogas antimicrobianas foi mais evidente com aquelas normalmente utilizadas para infecções por Gram-negativas, como por exemplo a polimixina B, bem como para a ciprofloxacina (antibacteriano inibidor da DNA girase (Topoisomerase II) e importante na síntese de DNA na bactéria), que é atualmente um

fármaco utilizado especialmente no tratamento de doenças provocadas por esta bactéria. Sob este aspecto, é possível inferir que no caso de cepas resistentes a estes dois fármacos, a associação destes com a nisina é um resultado que deve ser considerado no futuro, considerando-se evidentemente os ensaios clínicos necessários.

Nossos resultados corroboram com os obtidos por Rishi et al., (2014) que investigaram a interação da nisina com antibacterianos quando testados sobre isolados clínicos de outra Gram-negativa, a *Salmonella Typhi*. Field et al., (2016) avaliaram o potencial sinérgico da combinação nisina com polimixina B sobre a *P.aeruginosa*. Os resultados revelaram que a concentração da polimixina B necessária para a inibição da formação de biofilme nesta bactéria foi reduzida significativamente quando testada em combinação com a nisina, restaurando desta maneira a sensibilidade bacteriana ao fármaco testado.

As bactérias Gram-negativas podem também ter ampliada sua sensibilidade a ação da nisina quando estudado em ação conjunta com agentes quelantes (ELLIASON e TATINI, 1999). A interação positiva entre a nisina e os fármacos testados, reforça o potencial do uso de combinações com nisina e a consequente melhora na ação frente a bactérias Gram-negativas.

Segundo Tong *et al.*, (2014), a nisina age como uma molécula de ancoragem formando poros e inibindo a síntese da parede celular bacteriana, resultando na melhora da ação dos diversos antibacterianos com diferentes mecanismos de ação, pois facilita a penetração destes fármacos nas células bacterianas, resultando em consistente caso de sinergismo entre eles.

## 6.2 Atividade das enzimas antioxidantes

As atividades das enzimas antioxidantes aumentaram quando as bactérias testadas foram incubadas em contato com os antimicrobianos. Para MRSA, a combinação nisina/oxacilina, mesmo em menores proporções, estimulou o estresse oxidativo nas suas células. Por outro lado, sobre *P. aeruginosa*, o tratamento realizado apenas com a nisina não foi capaz de induzir aumento de atividade para as enzimas testadas com exceção da CAT quando comparada ao ensaio controle. Diferente disto, os resultados para todas as enzimas, além do marcador de estresse oxidativo LH, foram significativos comparados ao ensaio controle tanto para a ciprofloxacina como também para a combinação desta com a nisina. Vale destacar que a combinação com nisina mostrou uma atividade inferior comparado a ciprofloxacina, o que pode ter ocorrido devido ao sítio de ação da nisina.

As quinolonas, a exemplo da ciprofloxacina, são capazes de modular o metabolismo do estresse oxidativo de leucócitos e estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (PAEZ et al., 2013). A capacidade inibidora dos antimicrobianos testados em nosso estudo como ciprofloxacina e a oxacilina podem ser aumentada por estímulos das ERO, as quais podem afetar os lipídios, o DNA e outros componentes da célula bacteriana.

Apesar da alta atividade enzimática, nenhuma das duas bactérias foram capazes de reverter o estresse oxidativo causado pelos antimicrobianos em doses subletais. Essa condição pode ser confirmada com a marcação de hidroperóxido de lipídio (HL), o qual mesmo com a alta atividade das enzimas endógenas continuou com níveis elevados dentro da célula bacteriana, não havendo sinal de redução na quantidade em relação ao ensaio controle. Em estudo anterior, Becerra e Albesa (2002) investigaram *S.aureus* tratado com ciprofloxacina e relataram alterações como aumento na produção de ânion superóxido e também na atividade da SOD sendo que, igualmente neste estudo e apesar da grande atividade desta enzima, não houve reversão do estresse oxidativo ocorrido nesta bactéria.

A ação das ERO em ambas as bactérias pôde ser confirmado com o aumento dos níveis de HL, o qual pode ter causado uma lipoperoxidação na célula ocasionando transtornos principalmente na função da membrana plasmática, causando a lise e morte celular. O mecanismo de ação da nisina ocorre com o precursor lipídio II na membrana, impedindo a síntese de peptidoglicano, ocasionando poros e consequente perda do equilíbrio eletrolítico e efluxo dos constituintes citoplasmáticos (Islam et al., 2012; Cotter et al., 2013). Quando combinada a nisina com os antibióticos, a ação conjunta, pode ter elevado a produção das ERO, facilitando a ação da nisina na membrana da célula causando à lise, o que foi confirmada com a análise de morfologia das células utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET).

### **6.3 Alterações na morfologia celular**

De acordo com as análises de MET, observou-se que as células de MRSA tratadas com nisina apresentaram perda da integridade da membrana plasmática com consequente efluxo dos constituintes do citoplasma bacteriano, ou mesmo a polarização desse conteúdo. A estrutura da membrana plasmática foi alterada provavelmente devido a perda da sua força próton motora como resultado da ação da nisina. Essas alterações visualizadas por MET também foram relatadas por Sivarooban et al., (2008) sobre danos da nisina na morfologia de células de *Listeria monocytogenes* tendo concluído que isso pode ocorrer por dois

mecanismos: formação de poros na membrana celular e inibição da biossíntese da parede celular por inibição do precursor de lipídios II.

Quando o MRSA foi tratado somente com oxacilina verificou-se alterações na morfologia das células e na parede celular bacteriana, já que os beta lactâmicos (ex. oxacilina) agem na biossíntese da parede bacteriana (WILKE et al., 2005) . Já quando a oxacilina estava em combinação com a nisina, a morfologia das células apresentou tanto alterações na membrana plasmática, quanto na parede bacteriana e consequente lise celular. A ação em conjunto dos antimicrobianos pode se dar pelas alterações e desorganização da parede celular pela oxacilina, possivelmente facilitando e intensificando a ação da nisina sobre membrana plasmática da bactéria facilitando a lise e consequente morte celular.

As células de *P. aeruginosa* observadas em MET mostravam lise total das células, perda do conteúdo citoplasmático e possível inibição da divisão celular. Apesar da dificuldade de ação da nisina frente a bactérias Gram-negativas, quando tratada com 4 vezes o valor de sua CIM, notou-se danos na membrana de *P. aeruginosa* enquanto que nos ensaios com ciprofloxacina individualmente e combinada com a nisina, verificou-se que os danos foram mais severos na célula bacteriana. Pattanayaiying et al. (2014) analisaram o efeito de nisina combinada com substância surfactante sobre *E.coli* tendo notado efeito sinérgico entre tais substâncias e concluíram que o agente surfactante afetou a membrana externa da parede bacteriana fazendo uso de cargas positivas de arginina para interagir com cargas negativas da superfície desta estrutura da bactéria levando a sua desestabilização.

As quinolonas, a exemplo da ciprofloxacina, além de atuarem na DNA-girase e topoisomerase, quando estão presentes em altas concentrações, podem também desintegrar membranas externas e internas das bactérias (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2015). Devido a essa característica na combinação coma nisina, a ciprofloxacina pode ter agido como um agente quelante e facilitado a ação da nisina sobre às células de *P. aeruginosa*.

O uso, portanto, dos antimicrobianos naturais em sinergia com os tradicionais podem acarretar mudanças estruturais na célula bacteriana facilitando a entrada dos antibióticos além de também atuar bloqueando enzimas inibitórias e interferirem nos respectivos mecanismos de ação (HEMAISWARYA et al., 2008; MATHUR et al., 2017).

#### **6.4 Análise Proteômica**

As mudanças observadas na bactéria exposta a concentrações sub-inibitórias dos antimicrobianos, como diferenças na expressão de proteínas e consequentemente alterações

no metabolismo, podem ser um reflexo do mecanismo de ação do antimicrobiano ao tentar inibir o crescimento bacteriano e/ou uma resposta da adaptação bacteriana a esses compostos (FAJARDO e MARTÍNEZ, 2008).

#### **6.4.1 Análise proteômica de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) ATCC 33591 tratado com nisina, oxacilina e combinação**

Os mecanismos de ação da nisina e oxacilina, além de resistência bacteriana de MRSA a oxacilina já são estabelecidos (WILKE et al., 2005; STAUB e SIEBER, 2009); porém apesar de não ser o objetivo principal do nosso estudo, destacam-se algumas proteínas que se destacaram por super ou sub expressão e também relacionadas ao estresse no tratamento com nisina e oxacilina analisados individualmente.

No tratamento realizados sobre o MRSA com a nisina e oxacilina isoladamente, destaca-se a maior expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo energético da bactéria, como a piruvato quinase (pyk), glicerol fosfato desidrogenase (glpD) e as enzimas da família de ATP sintase (beta, alfa e delta), as quais segundo um estudo de (BALEMANS et al., 2012) indicam um processo da necessidade de ganho de energia pela célula bacteriana para sobrevivência, sendo a expressão de ATP sintase também um importante alvo bacteriano.

Quanto aos resultados obtidos para a análise proteômica utilizando o tratamento correspondente a mistura de nisina e oxacilina, isto foi testado, nas respectivas proporções em que já havia sido detectado sinergismo nos ensaios anteriores de nisina e oxacilina quando testadas combinadas e em concentrações bastante reduzidas ( $\frac{1}{4}$  dos respectivos valores de CSM obtidos para ambos antimicrobianos) nos ensaios de curva de sobrevivência quando verificou-se redução significativa na contagem bacteriana de MRSA. Para verificar as proteínas relacionadas ao efeito sinérgico da combinação entre os antimicrobianos, a análise subsequente direcionou as observações àquelas relacionadas ao conhecido mecanismo de resistência à oxacilina, e a resposta ao estresse além das proteínas que foram alteradas significativamente comparando-as aos tratamentos individuais feitos com a nisina e oxacilina, e conseqüentemente as que estão relacionadas a elas.

Vários processos biológicos revelaram proteínas alteradas no tratamento de combinação entre os antimicrobianos, porém, as proteínas que tiveram maiores alterações nas respectivas expressões foram aquelas relacionadas ao processo de tradução com síntese de proteínas. Os mecanismos pelos quais os antibacterianos desencadeiam respostas transcricionais ainda são desconhecidos, mas sabe-se que o dano ocorrido no DNA bacteriano

desencadeia uma resposta ao estresse que provoca mudanças em vários outros genes. Os antibacterianos que interferem no metabolismo são da família das quinolonas, porém também foi descrito que alguns betalactâmicos podem desencadear essa resposta ao estresse sendo que a síntese não realizada de forma correta da parede bacteriana pode gerar estímulos extracelulares sobre a resposta transcricional bacteriana (MILLER et al., 2004; FAJARDO e MARTÍNEZ, 2008).

Houve diminuição na expressão das proteínas relacionadas aos mecanismos de respostas ao estresse, como a proteína do estresse universal (putative universal stress) e a ATP protease dependente (ClpI). Segundo Kvint et al. (2003), a chamada proteína do estresse é normalmente induzida em resposta a condições de estresse bacteriano durante a fase estacionária da bactéria. A diminuição na expressão foi relatada também em estudos anteriores com patógenos testados em condições subinibitórias, como na ação de mel Manuka sobre MRSA e da tetraciclina em *Escherichia coli*. Concluíram que o tratamento com os antimicrobianos em concentrações subletais afetam o ciclo celular da bactéria e consequentemente impedindo a expressão da proteína do stress e consequentemente tornando a bactéria vulnerável à ação dos antibacterianos (KVINT et al., 2003; JENKINS et al., 2011).

O proteoma de MRSA tratado também repressão na expressão de ClpI. Em estudo de Sianglum et al., (2011), foi relatado que ClpI pode ser um novo alvo a ser estudado, pois desempenha papéis significativos na regulação de muitas funções celulares como a replicação do DNA, o controle de expressão gênica, tolerância ao estresse térmico, atuando como chaperona, bem como estar relacionada com alguns processos biológicos a exemplo da divisão celular (SQUIRES e SQUIRES, 1992; SIANGLUM et al., 2011).

As proteínas Clp são candidatas a compreensão da patogenicidade do organismo e tratamento de infecções estafilocócicas. A contribuição das proteínas Clp para a virulência ocorre em múltiplos níveis, pois são proteínas centrais e regulatórias de respostas ao estresse, sendo que num estudo recente (FREES et al., 2014) a inativação dessa protease, diminuiu a virulência de *Staphylococcus*. Em nosso estudo houve uma diminuição significativa da proteína relacionada a virulência de *Staphylococcus*: sbi (*Staphylococcal binder of immunoglobulin*) que modifica ligação molecular entre respostas imunes inatas e adaptativas da bactéria durante um episódio de infecção (SMITH et al., 2011).

A combinação de antibacterianos também provocou diminuição nas proteínas relacionadas ao processo de oxidação-redução, no controle das espécies reativas de oxigênio, e consequente indução de estresse celular como a bacterial non-heme ferritin (FtnA), alkaline shock protein (asp23), arginine deiminase (arcA) e alcohol dehydrogenase (adh). A FtnA



controla a presença de íons de ferro livres na célula bacteriana, os quais se não forem regulados promovem a geração de radicais livres. Com a diminuição de Ftna, e outras proteínas envolvidas na desintoxicação das células como a asp23, provavelmente os danos causados pelo estresse oxidativo são acentuados na célula bacteriana (DOSSELLI et al., 2012).

O metabolismo da arginina, além da geração de energia para célula bacteriana é responsável pela manutenção da homeostase e regulação durante um estresse metabólico e nitrosativo da célula. A arginina é hidrolisada por arcA para gerar citrulina e amônia. A citrulina é então convertida em ornitina e carbamoilfosfato através da ornitina carbamoiltransferase (ArcB). Finalmente, a carbamato quinase (ArcC) transfere um fosfato de carbamoilfosfato para ADP, produzindo ATP (ANGELIS et al., 2002; GRISWOLD et al., 2004). Os resultados do ensaio para combinação nisina e oxacilina mostraram também repressão na expressão da arginina deiminase e conseqüentemente de outras proteínas relacionadas a esse processo como a ornithine carbamoyltransferase (argF) e a carbamato quinase (arcC), que também pode ter provocado aumento no estresse bacteriano.

Dentre as proteínas expressas em maior quantidade em relação ao controle e demais tratamentos, destacam-se proteínas relacionadas à divisão e estrutura celular bacteriana. A expressão diferencial observada de enoyl- (acyl carrier protein) redutase (fabI) e ftsZ é um indicador de possíveis mudanças em MRSA na estrutura celular e divisão em resposta à exposição aos antimicrobianos.

A proteína fabI é responsável pela última etapa do ciclo de extensão de diversos ácidos graxos e pode estimular a divisão celular mediada pelo aumento da síntese de membrana plasmática relacionada aos ácidos graxos. Este mecanismo de divisão alternativa poderia explicar a capacidade demonstrada desta bactéria para continuar dividindo ou pelo menos produzindo proteínas relacionadas à divisão quando submetidas às concentrações subletais de antibacterianos (WOLF et al., 2012; MIYAMOTO et al., 2015).

No estágio final da divisão celular bacteriana, uma proteína de interação é necessária para a formação do septo da divisão, a FtsZ, além de uma GTPase, que desempenha papel central na polimerização da estrutura de anel na célula (YAN et al., 2000; LOCK e HARRY, 2008). Assim, a alteração no potencial de membrana causado por certos antibacterianos, que assim como a nisina agem na membrana plasmática da bactéria, poderiam alterar o mecanismo de divisão celular bacteriana (STRAHL e HAMOEN, 2010). Com a perda do potencial de membrana e conseqüentemente perda de energia, a célula bacteriana apesar de

umentar a quantidade de proteína ligada a divisão (*ftsZ*), conforme observado neste estudo, não teria disponível a energia suficiente para finalização do processo de divisão celular.

Desta forma, as proteínas relacionadas ao processo de divisão celular se mostram importantes para estudos como alvos para novos antibacterianos, pois são essenciais para a multiplicação e viabilidade das células bacterianas, além de possuírem genes conservados nas bactérias (LOCK e HARRY, 2008).

Dois principais mecanismos de resistência foram desenvolvidos por bactérias para resistir aos betalactâmicos: a produção de betalactamase, enzima predominantemente extracelular é sintetizada quando os estafilococos são expostos aos antibióticos beta-lactâmicos (BENNETT e CHOPRA, 1993; LOWY, 2003), e que pode inativar ou degradar os antibacterianos beta-lactâmicos antes que alcancem seus alvos, e o outro, como no caso do MRSA, é a produção da proteína 2a de ligação à penicilina (PBP2a) que tem baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos. A betalactamase, relacionada ao estresse e resistência a antibacterianos, somente teve sua produção induzida na combinação nisina/oxacilina.

Em estudo de Cho et al. (2014) foi relatado que os antibióticos betalactâmicos podem não apenas inibir seus alvos, como as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), mas também induzem um mau funcionamento da via biossintética, envolvendo um ciclo fútil de síntese do peptidoglicano e degradação da parede celular ao mesmo tempo com gasto energético significativo.

Essas análises do perfil proteico de MRSA tratado com combinação nisina/oxacilina indicaram que o mecanismo sinérgico não só está relacionado à interferência com os mecanismo de resistência à oxacilina, como é o caso da indução na produção de beta lactamase, ou ligada somente a um único alvo específico da célula. A interferência na estrutura celular (membrana plasmática e parede) foi desencadeando mudanças na síntese de proteínas e transcrição com consequentes alterações em proteínas relacionadas ao estresse e homeostase da célula, o que indica a interferência de diferentes processos biológicos em uma resposta global ao tratamento.

#### **6.4.2 Análise proteômica de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tratada com nisina, ciprofloxacina e combinação**

Os mecanismos de ação de nisina e ciprofloxacina frente à patógenos Gram-negativos são bem exemplificados na literatura. A ciprofloxacina é uma quinolona utilizada para

tratamento de doenças provocadas por bactérias Gram-negativas e que possui mecanismo de ação conhecido por atuar na síntese do DNA das proteínas mais especificamente na síntese da DNA girase (Topoisomerase II), sendo que a resistência destas bactérias para as quinolonas é principalmente devido mutações na região determinante que codificam DNA girase e topoisomerase (HOOPER et al., 1987; VINGOPOULOU et al., 2018).

Apesar da não ação em concentração inibitória, o tratamento com nisina provocou alterações significativas na expressão de algumas proteínas. A diminuição de Type IV pilus structural subunit PilA, indica uma diminuição da virulência da bactéria, bem como diminuindo a motilidade bacteriana (HAHN, 1997). Em relação ao componente da membrana externa, lipídeo A (PagL), presente no LPS (lipopolissacarídeo), houve diminuição na expressão. Assim, bactérias patogênicas modificam a estrutura da porção lipídica A em resposta a mudanças ambientais, sendo que algumas destas modificações em lipídios A são importantes para a virulência e alteram a susceptibilidade bacteriana para alguns agentes antimicrobianos, como as polimixinas por exemplo (GELLATLY e HANCOCK, 2013).

O tratamento somente com nisina, também ocasionou mudanças na expressão de proteínas relacionadas à membrana plasmática da bactéria, porém, essas mudanças foram mais significativas quando a bactéria foi tratada com a combinação nisina/ ciprofloxacina.

O tratamento com a concentração subletal de ciprofloxacina, provocou alteração especialmente em grande quantidade de proteínas relacionadas ao processo de transcrição, em consequência ao possível dano causado no DNA, tendo como consequência alteração de proteínas relacionadas à síntese proteica, como a alta expressão do elongation factor Tu (tuf), a qual já foi relatada superexpressa em *Pseudomonas fluorescens* em condições de estresse (SHARMA et al, 2006), bem como de proteínas relacionadas a resposta ao estresse como a superexpressão de quase 100 vezes mais de chaperona GroEl, maior expressão de superóxido dismutase (sodB) em resposta ao estresse oxidativo da célula e a ausência na expressão da proteína reparadora de DNA (recA) (KOHANSKI, DWYER e COLLINS 2010).

Com o objetivo de verificar as proteínas relacionadas ao efeito sinérgico da combinação nisina/ciprofloxacina previamente determinado em nosso estudo, a análise subsequente direcionou as observações àquelas relacionadas ao conhecido mecanismo de resistência de *P. aeruginosa* como alterações ocasionadas na membrana externa da parede da bactéria e respostas ao estresse.

O efeito sinérgico da combinação nisina/ciprofloxacina foi bacteriostático, ou seja, inibiu o crescimento da bactéria. A combinação entre os antimicrobianos, provocou alterações

em proteínas relacionadas à resposta SOS da bactéria, ou seja respostas ao estresse e de controle da produção de ERO que levam a mutações gênicas (Vranakis et al., 2014).

Destaca a expressão exclusiva da proteína DNA recombination/repair protein, uma polimerase especializada responsável pelo reparo no dano ao DNA bacteriano (Vranakis et al., 2014). Houve um aumento tanto na expressão de proteases clpA, e da chaperona dnaK. O sistema de chaperonas DnaK é conhecido por proteger células contra o estresse térmico e oxidativo e a thioredoxin redutase (trxAt) possui uma atividade de chaperona *in vitro*, protegendo também a bactéria do estresse oxidativo. A alta expressão de dnaK (47 vezes) e de protease (clpA) indica um aumento na resposta ao estresse sofrido pela bactéria durante exposição a combinação nisina/ciprofloxacina. A expressão dessas proteínas acontece em resposta a diversos fatores de estresse ambiental; tais como agentes oxidantes, temperaturas, diferentes valores de pH, variabilidade osmótica, anaerobiose e falta de nutrientes, porém, houve uma baixa expressão de thioredoxin redutase (trxAt) (KILIÇ et al., 2010).

Ainda quanto ao tratamento com a combinação nisina/ciprofloxacina, observou-se grande alteração nas proteínas responsáveis pelo metabolismo de carboidratos e metabolismo energético. A elevada expressão de proteínas relacionadas ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) como a pyruvate dehydrogenase e malic enzyme e a consequente produção de energia, influencia na susceptibilidade aos antimicrobianos. A ativação da cadeia de transporte de elétrons estimula a produção de ERO e possível estresse oxidativo da bactéria, levando à formação de radicais hidroxila os quais danificam DNA, lipídios e proteínas (Martínez e Rojo, 2011).

Em relação a membrana externa de *P. aeruginosa*, houve alterações nas proteínas de membrana, as chamadas porinas, que são canais na membrana externa da bactéria que permitem a difusão de nutrientes, metabólitos e tóxicos. Ouve significativamente repressão da expressão de OprD, uma porina específica para aminoácidos básicos e pequenos metabólitos, sendo o canal de entrada de alguns antibióticos como os carbapenems (LI et al., 2012). A repressão de OprD é alguns dos mecanismos utilizados pela bactéria para a resistência aos antibióticos.

A deficiência de OprD nem sempre resulta em resistência, pois houve também a repressão na expressão de OprH (SÁNCHEZ-GÓMEZ et al. 2011). A porina OprH (PhoP/Q and low Mg<sup>2+</sup> inducible outer membrane protein H1) garante estabilidade na membrana externa de *P. aeruginosa* e, dependendo das condições de estresse, se torna a principal constituinte na membrana externa quando há limitações por exemplo de íons de magnésio no

meio de crescimento bacteriano (MACFARLANE et al., 1999). Segundo estudos, a alta expressão de OprH leva a resistência a polimixina B, um antibiótico que age diretamente na membrana externa das bactérias Gram-negativas (BELL, BAINS e HANCOCK, 1991).

As alterações nas proteínas de membrana causada pelo tratamento subletal das combinações de antimicrobianos, podem ter causado instabilidade na membrana externa da bactéria, o que pode facilitar a entrada e ação dos inibidores em conjunto.

A cepa de *P. aeruginosa* tratada com a combinação nisina/ciprofloxacina, apresentou considerável alteração na expressão de proteínas relacionadas à resistência bacteriana. Foram alteradas proteínas que aumentaram e diminuíram os mecanismos que levam a resistência, como as proteínas presentes na membrana externa, e as proteínas relacionadas ao estresse bacteriano. Isso pode ter ocorrido devido ao tratamento ser aplicado em concentração subletal provocando nas bactérias respostas visando a sua sobrevivência frente tratamento.

Como ocorrido nas análises de MRSA, também houve uma resposta conjunta de vários mecanismos regulatórios de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos e não somente através de uma via específica.

## 7. Considerações finais

O efeito sinérgico da nisina com os fármacos testados sugere uma alternativa potencial na busca de fármacos e novos alvos antimicrobianos que visam diminuir ou amenizar o problema de resistência bacteriana, tornando-se terapias importantes no tratamento das doenças infecciosas para as bactérias estudadas.

O estudo do metabolismo da bactéria implica diferentes vias e mecanismos de ação no tratamento de doenças infecciosas. Foi analisado como os antibacterianos testados, e suas combinações, afetam estruturalmente o micro-organismo, como podem influenciar no aumento do estresse oxidativo e produção das ERO, como podem provocar a inibição do crescimento bacteriano ou mesmo induzir sua morte, e finalmente como ativam mecanismos de respostas ao estresse por afetar a expressão gênica e conseqüentemente, causar distúrbios nas mais diversas rotas metabólicas da bactéria.

Através das análises do perfil protéico de patógenos importantes como *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*, pôde-se afirmar que as alterações causadas pelos tratamentos com a combinação de antimicrobianos indicaram interferência nos diferentes processos biológicos e sendo como uma resposta global ao tratamento utilizando combinações de antimicrobianos com mecanismos de ação distintos.

O sinergismo entre antimicrobianos pode ter um enorme valor, em termos de redução na probabilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana devido a utilização de dois mecanismos distintos de ação antimicrobiana, pois como visto em nosso estudo, por mais que a bactéria expresse algumas proteínas relacionadas a resistência, ou na tentativa de inibição do antimicrobiano, ele pode agir através de outra via e/ou mecanismo. Além disso, as terapias combinatórias com bacteriocinas podem ampliar os espectros antibacterianos, reduzir a concentração de um antibiótico necessário para tratamentos eficazes na medida em que os efeitos colaterais potencialmente tóxicos ou adversos podem ser reduzidos ou minimizados.

As vantagens das bacteriocinas incluem natureza peptídica e síntese ribossômica a partir de outro micro-organismo, o que as tornam acessível a estratégias de biotecnologia e bioengenharia. Opções terapêuticas alternativas, como o uso de antimicrobianos em combinação com bacteriocinas devem ser explorados.

## Referências

- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037-1050, 2007.
- ALBA, M.; BRAVO, D.; MEDINA, M. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in dry-cured ham by high-pressure treatments combined with biopreservatives. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 508-513, 2013.
- ALBANO, M. et al. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 38, p. 83-90, 2016.
- ALVES, F. C. B. et al. Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 3, p. 1831-1836, 2016.
- ANDRADE, B. F. M. T. et al. Antimicrobial activity of essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 1, p. 34-40, 2014.
- ANDRADE, B. F.M.T et al. The antibacterial effects of *Melaleuca alternifolia*, *Pelargonium graveolens* and *Cymbopogon martinii* essential oils and major compounds on liquid and vapor phase. **Journal of Essential Oil Research**, v. 28, n. 3, p. 227-233, 2016.
- ANGELIS, M. et al. Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6193-6201, 2002.
- ANVISA. **Agência nacional de vigilância sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Portaria%20n%2029%20de%2022%20de%20janeiro%20de%201996.pdf/8b0c3906-aa5b-4f16-ad1c-544b7c9e2586>>. Acesso em 30 de Novembro de 2017.
- ANVISA. **Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA)**: Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14. Brasil, 2016.
- BALEMANS, W. et al. Novel antibiotics targeting respiratory ATP synthesis in Gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4131-4139, 2012
- BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134-142, 2013.
- BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.
- BARBOSA, L. N. et al. Effects of *Ocimum basilicum* Linn Essential Oil and Sodium Hexametaphosphate on the Shelf Life of Fresh Chicken Sausage. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 6, p. 981-986, 2014.

- BECHER, D. et al. A proteomic view of an important human pathogen—towards the quantification of the entire *Staphylococcus aureus* proteome. **PLoS One**, v. 4, n. 12, 2009.
- BELL, A., BAINS, M., e HANCOCK, R. E. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH: expression from the cloned gene and function in EDTA and gentamicin resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n.21, p.6657–6664, 1991.
- BETONI, J.E.C. et al. Synergism between plants extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n. 4, p. 387-390, 2006.
- BONEV, B. B. et al. Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. **Faseb journal**, v. 18, n. 15, p. 1862-9, 2004.
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419-426, 2011.
- BRUMFITT, W.; SALTON, M. R. J.; HAMILTON-MILLER, J. M. T. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 731-734, 2002.
- BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894-896, 2011.
- CABISCOL CATALÀ, Elisa; TAMARIT SUMALLA, Jordi; ROS SALVADOR, Joaquim. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 3-8, 2000.
- CASH, T. P.; PAN, Y.; SIMON, M. C. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 9, p. 1219-1225, 2007.
- CASSONE, M.; OTVOS JR, L. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 6, p. 703-716, 2010.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC): Antibiotic/Antimicrobial Resistance; 2017 (Acesso em 30 de junho de 2017). Disponível em <https://www.cdc.gov/drugresistance/resistance-bank.html>
- CHATTERJEE, M. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 1, p. 48-58, 2016.
- CHENG, G. et al. Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 470.,2016.
- CHO, H.; UEHARA, T.; BERNHARDT, T. G. Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. **Cell**, v. 159, p. 1300-1311, 2014.



CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

COLLINS, B. et al. The impact of nisin on sensitive and resistant mutants of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 6, p. 1509-14, 2011.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?. **Nat Rev Microbiol. : Nature Publishing Group**, v. 11, n. 2, p. 95-105, 2013.

COTTER, P. D. H., COLIN ROSS, R. PAUL. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat Rev Micro :Nature Publishing Group**, v. 3, n.10, p. 777-788, 2005.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114, 2003.

DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DELANEY, J. A. C. et al. Mortality after infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) diagnosed in the community. **BMC Medicine**, v. 6, n. 1, p. 2, 2008/01/31 2008.

DENTON, M. et al. Transmission of colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* between patients attending a pediatric cystic fibrosis center. **Pediatric Pulmonology**, v. 34, n. 4, p. 257-261, 2002.

DOSLER, S.; GERCEKER, A. A. In vitro activities of nisin alone or in combination with vancomycin and ciprofloxacin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. **Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 511-6, 2011.

DOSSELLI, R. et al. Molecular targets of antimicrobial photodynamic therapy identified by a proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v. 77, p. 329-343, 2012.

DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; COLLINS, J. J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 482-489, 2009. ISSN 1369-5274.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25, 2014.

FERNANDES JUNIOR, A. et al. Medicinal plants from the Brazilian savanna with antibacterial properties. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 1-13, 2014.

FIELD, D. et al. Synergistic Nisin-Polymyxin Combinations for the Control of *Pseudomonas* Biofilm Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1713, 2016.

FOURNIER, P.-E.; RAOULT, D. Prospects for the future using genomics and proteomics in clinical microbiology. **Annual review of microbiology**, v. 65, p. 169-188, 2011.

FURTADO, F. B et al. Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oil from *Blepharocalyx salicifolius*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n.1, p. 33, 2018.

FRANÇOIS, P. et al. Proteomic approaches to study *Staphylococcus aureus* pathogenesis. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 4, p. 701-708, 2010. ISSN 1874-3919.

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

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and disease**, v. 67, n.3,p. 159-173, 2013.

GIACOMETTI, A. et al. In-vitro activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, n. 2, p. 115-118, 2000.

GRISWOLD, A. et al. Characterization of the arginine deiminase operon of *Streptococcus rattus* FA-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1321-1327, 2004.

GOLDSTEIN, B. P. et al. Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae*, in vitro, and in a mouse infection model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 277-8,1998.

GÖRG et al. Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis: *A laboratory manual*. **Technische Universität München**, 2007.

HAN, M.-J.; LEE, S. Y. The *Escherichia coli* Proteome: Past, Present, and Future Prospects. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 362-439, 2006.

HAHN, H. P. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*—a review. **Gene**, v. 192, n.1,p. 99-108, 1997.

HARTMANN, M. et al. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3132-3142, 2010.

HASPER, H. E. et al. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. **Science**, v. 313, n. 5793, p. 1636-1637, 2006. ISSN 0036-8075.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 153-161, 2000

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytochemistry**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1663-1674, 2010.

HOOPER, D. C. et al. Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. **The American Journal of Medicine**, v. 82, n. 4, p. 12-20, 1987.

JEAN BELTRAN, P. M. et al. Proteomics and integrative omic approaches for understanding host-pathogen interactions and infectious diseases. **Molecular Systems Biology**, v. 13, n. 3, p. 922, 2017.

JENKINS, R.; BURTON, N.; COOPER, R. Proteomic and genomic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) exposed to manuka honey in vitro demonstrated down-regulation of virulence markers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 603-615, 2013

KILIÇ, N. K. et al. Proteomic changes in response to chromium (VI) toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresource Technology**, v.101, n.7,p. 2134-2140, 2010.

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

Li, H. et al. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n.2, 2012.

LIANG, J. F.; KIM, S. C. Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. **The Journal of Peptide Research**, v. 53, n. 5, p. 518-22, 1999.

LIU, X. et al. Proteomic response of methicillin-resistant *S. aureus* to a synergistic antibacterial drug combination: a novel erythromycin derivative and oxacillin. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19841, 2016.

LOCK, R. L.; HARRY, E. J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 4, p. 324-338, 2008.

LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, n. 5, p. 476-489, 2001.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 175-190, 2011.

MACFARLANE, E. L. et al. PhoP–PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. **Molecular Microbiology**, v. 34, n.2, p.305-316, 1999.

MDALY, K. et al. Lantibiotic production by pathogenic microorganisms. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, n. 6, p. 509-523, 2012.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia De Brock. 12<sup>a</sup> edição, editora Artmed. **Porto Alegre**, 2010.

- MATHUR, H. et al. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1205, 2017.
- MIYAMOTO, K. N. et al. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 exposed to a sublethal concentration of nisin. **Journal of Proteomics**, v. 119, p. 230-7, 2015.
- NAGHMOUCHI, K. et al. Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 101-108, 2012.
- NAZARI, M. R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a systematic review. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 1-7, 2015.
- NORREGAARD JENSEN, O. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 33-41, 2004.
- OKUDA, K. et al. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5572-9, 2013.
- OYSTON, P. C. et al. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 977-987, 2009.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837-846, 2000.
- PIPER, C. et al. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. 546-551, 2009.
- RAYGADA, J. L.; LEVINE, D. P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a growing risk in the hospital and in the community. **American Health & Drug Benefits**, v. 2, n. 2, p. 86, 2009.
- REA, M. C. et al. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 20, p. 9352-9357, 2010.
- RISHI, P. et al. Evaluation of nisin-beta-lactam antibiotics against clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhi. **The Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 67, n. 12, p. 807-11, 2014.
- RODRÍGUEZ-ROJAS, A. et al. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6, p. 293-297, 2013.
- RONCADA, P. et al. Proteomic study of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains. **Veterinary research communications**, v. 33, n. 1, p. 157-160, 2009.
- SABUDA, D. M. et al. Utilization of colistin for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 413-418, 2008.

- SÁNCHEZ-GÓMEZ, S. et al. Structural features governing the activity of lactoferricin-derived peptides that act in synergy with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.1,p. 218-228, 2011.
- SANTOS, L.D. et al. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Proteomics**. v. 11, p.1403-1412, 2011.
- SANTOS, N. D. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004.
- SEVERINA, E.; SEVERIN, A.; TOMASZ, A. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 341-347, 1998.
- SHAFIEI, M. et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm Protein Profile After Exposure to n-Butanolic Cyclamen coum Extract Alone and in Combination with Ciprofloxacin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-14, 2017.
- SHARMA , S. et al. Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. **Journal of biotechnology**, v.126, n.3, p.374-382, 2006.
- SHEVCHENKO, Andrej et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.
- SHIN, J. M. et al. Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1449-65, 2016.
- SINGH, A. P.; PREET, S.; RISHI, P. Nisin/ $\beta$ -lactam adjunct therapy against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: a mechanistic approach. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 7, p. 1877-1887, 2014.
- SUN, Z. et al. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1964-73,2009.
- STRAHL, H.; HAMOEN, L. W. Membrane potential is important for bacterial cell division. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 27, p. 12281-12286, 2010.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 6, p. S3-S10, 2006.
- TONG, Z. et al. An In Vitro Study on the Effects of Nisin on the Antibacterial Activities of 18 Antibiotics against *Enterococcus faecalis*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89209, 2014
- VAN STADEN, A. D.; BRAND, A. M.; DICKS, L. M. Nisin F-loaded brushite bone cement prevented the growth of *Staphylococcus aureus* in vivo. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 4, p. 831-40,2012.
- VINGOPOULOU, E. I. et al. Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolates recovered from dogs suffering from otitis in Greece. **Veterinary Microbiology**, v. 213, p. 102-107, 2018.

VRANAKIS, I. et al. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 88-99, 2014.

WIEDEMANN, I. et al. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 3, p. 1772-1779, 2001.

WILLIAMS, G. C.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, v. 2, p. 4128-4135, 2003.

WOLF, D. et al. Cell envelope stress response in cell wall-deficient L-forms of *Bacillus subtilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5907-5915, 2012.

WOLSKA, K. I.; GRZES, K.; KUREK, A. Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics or bacteriocins. **Polish Journal of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 95-104, 2012.

YAN, K.; PEARCE, K. H.; PAYNE, D. J. A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in *Staphylococcus aureus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, n. 2, p. 387-392, 2000.

ZENDO, T. Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 5, p. 893-9, 2013.

ZHOU, H. et al. Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. **Annals of Microbiology**, 2013.

ZIEMSKA, J.; RAJNISZ, A.; SOLECKA, J. New perspectives on antibacterial drug research. **Central European Journal of Biology**, v. 8, n. 10, p. 943-957, 2013.

