

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 24/02/2020.



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

1. Introdução e Justificativa	15
2. Revisão de literatura	17
2.1 Resistência bacteriana e patógenos causadores de infecções	17
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	18
2.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.2 Antimicrobianos naturais	20
2.2.1 <i>Bacteriocinas</i>	21
2.2.2 <i>Nisina</i>	22
2.3 Estresse oxidativo em bactérias	26
2.4 Proteômica	27
3. Objetivos	29
4. Materiais e Métodos	30
4.1 Linhagens bacterianas e Antibacterianos	30
4.3 Curva de sobrevivência	31
4.4 Extração de proteínas e quantificação	31
4.5 Análise do estresse oxidativo	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
4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	33
4.7 Análise proteômica	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
4.8 Análise Estatística	36
5. Resultados	37
5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Subletal Máxima (CSM)	37

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

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%2Bn%2B29%2Bde%2B22%2Bde%2Bjaneiro%2Bde%2B1996.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^a 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/ β -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.

