



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

STEPHANIE WAGNER GALLO

**AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE PERSISTÊNCIA EM ISOLADOS
NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii***

Porto Alegre

2017

STEPHANIE WAGNER GALLO

**AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE PERSISTÊNCIA EM ISOLADOS
NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade
de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira
Coorientador: Carlos Alexandre Sanchez Ferreira

Porto Alegre
2017

Ficha Catalográfica

G172a Gallo, Stephanie Wagner

Avaliação do fenótipo de persistência em isolados nosocomiais de *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* : Persistência em *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* / Stephanie Wagner Gallo . – 2017.

157 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Dias De Oliveira.

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira.

1. Persistência. 2. Infecções crônicas. 3. Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*. 4. meropenem. 5. polimixina B. I. De Oliveira, Sílvia Dias. II. Ferreira, Carlos Alexandre Sanchez. III. Título.

STEPHANIE WAGNER GALLO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aprovado em 27 de março de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Beatriz Meurer Moreira

Luiz Augusto Basso

Rodrigo da Silva Galhardo

Porto Alegre

2017

Dedico esta tese aos meus pais, irmãos, familiares e amigos, que sempre apoiaram e incentivaram o meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira agradeço pela amizade, confiança e carinho, bem como pela dedicação demonstrada durante toda minha carreira acadêmica. Também agradeço pela oportunidade de ter trabalhado em seu laboratório, por todo incentivo e apoio, e por ter dividido comigo importantes experiências e conhecimentos, os quais contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira pelo incentivo em todos os momentos, pelos conselhos e compartilhamento de ideias, os quais contribuíram de maneira significativa para que esta pesquisa fosse finalizada com êxito.

Ao Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro e ao Dr. Antonio Frederico Michel Pinto, agradeço pela colaboração, suporte e conhecimentos compartilhados, os quais foram de grande valia para a execução e elaboração deste trabalho.

Agradeço de forma muito especial aos meus pais, Nelma Odete Wagner Gallo e Vito Mário Mandarino Gallo, pelo apoio incondicional durante toda minha trajetória acadêmica, por toda a força, conforto e coragem recebidos diariamente, os quais foram de extrema importância para a conclusão deste trabalho. Aos meus irmãos Marcus Vinicius Wagner Gallo e Bárbara Wagner Gallo, pela amizade, companheirismo e paciência, e por nunca terem medido esforços para me auxiliar em mais esta conquista.

Ao meu noivo, Fábio Bertuol Palma, pela dedicação, companheirismo, amor, carinho e compreensão, assim como por estar ao meu lado em todos os momentos me apoiando para que esta etapa fosse concluída com sucesso.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunologia e Microbiologia, pelo apoio e conhecimentos compartilhados, de maneira especial a Bruna Ferreira Leal, Valdir

Cristóvão Barth Jr., Bruna Kern Donamore, Belisa Ávila Rodrigues e Samara Paula Mattiello, por todo o suporte e auxílio prestado para a realização deste trabalho, pelos conselhos e pela amizade. Também agradeço a Maria Cláudia Rosa Garcia, técnica do Laboratório de Ensino em Microbiologia, por todo o apoio e auxílio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

RESUMO

Os patógenos pertencentes ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) são considerados oportunistas e emergentes, responsáveis por ocasionar diversas enfermidades, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos e internados em unidades de tratamento intensivo. As opções terapêuticas para o tratamento de infecções ocasionadas por estes patógenos são restritas, uma vez que estes apresentam frequentemente resistência à maioria dos antimicrobianos. Além disso, essas bactérias podem ainda formar células *persisters*, que constituem uma pequena população de células suscetíveis capazes de tolerar concentrações letais de antimicrobianos bactericidas e outros agentes estressores. Este fenótipo está associado a falhas na terapia antimicrobiana, especialmente nas infecções crônicas e recorrentes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de células *persisters* formadas por isolados do complexo ACB frente à exposição ao meropenem e/ou à polimixina B, na condição de biofilme e em cultivo planctônico, assim como analisar estas células morfológicamente e identificar padrões de expressão de proteínas que pudessem estar envolvidos na formação e manutenção da persistência. Para tanto, 20 isolados clínicos foram caracterizados quanto à capacidade em formar biofilme em superfície de poliestireno, e à suscetibilidade ao meropenem e à polimixina B, que foi avaliada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) a estes fármacos. Todos os isolados foram submetidos à exposição ao meropenem em diferentes concentrações acima da CIM, enquanto que cinco foram expostos à polimixina B para a avaliação da presença de células *persisters*. Para todos os experimentos, a fim de estimar a fração de células remanescentes, alíquotas foram removidas em tempos determinados, efetuando-se diluições decimais seriadas e semeadura pela técnica da gota em ágar nutriente. Células *persisters*, em diferentes frações, foram encontradas nos cultivos de todos os isolados, tanto em biofilmes como na condição planctônica, após a exposição por 48 h ao meropenem e à polimixina B, sendo as frações mais elevadas encontradas na condição de biofilme para ambos os antimicrobianos. As diferentes concentrações de meropenem avaliadas não influenciaram os níveis de células *persisters*; entretanto, frente à exposição à polimixina B, a fração de células mostrou-se dependente da concentração empregada. Após exposição à polimixina B por 24 h, foi observada retomada de crescimento das células sobreviventes, que foram avaliadas novamente quanto à suscetibilidade a este antimicrobiano, mantendo-se suscetíveis com

CIM de 1 µg/mL, bem como foi verificada a integridade do antimicrobiano no sobrenadante destes cultivos por ensaios cromatográficos, demonstrando que o mesmo não sofre degradação após 48 h de exposição. Entretanto, quando se associou meropenem à polimixina B em diferentes concentrações, além de não ter sido observada a retomada de crescimento das células remanescentes, ocorreu a erradicação das células *persisters* de um isolado de *A. baumannii* (Acb-1) cultivado em fase exponencial tardia. Além disso, a técnica de Nano-Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem foi empregada para a identificação e quantificação relativa de proteínas possivelmente associadas à persistência em *A. baumannii*, após a exposição ao meropenem. Diferentes padrões de expressão foram identificados entre as células *persisters* presentes em cultivo planctônico e em biofilme, sugerindo que a regulação da persistência possa ser realizada por mecanismos diferentes. Observou-se expressão aumentada de proteínas envolvidas nos processos de divisão celular e replicação de DNA, especialmente no cultivo planctônico, em concordância com a presença de divisão celular observada nas imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura nesta condição de cultivo. O aumento de expressão da glicose desidrogenase (GDH), NADH desidrogenase (NDH-1), succinato desidrogenase e ATP sintase indicam a transferência de elétrons a partir da reação catalisada por GDH para a cadeia de transporte de elétrons como uma possível fonte de energética para as *persisters*, corroborando a observação da presença de divisão celular observada no cultivo planctônico. Em contraste, proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, bem como os principais fatores de alongação apresentaram expressão diminuída em células *persisters* de Acb-1, sugerindo que a síntese proteica esteja reduzida, mesmo que muitas proteínas tenham sido identificadas com expressão aumentada. Muitas proteínas relacionadas à membrana apresentaram a sua expressão aumentada, indicando possíveis alterações em sua composição e função, embora proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos tenham apresentado expressão diminuída. A análise proteômica das células *persisters*, sobretudo, mostrou que estas células podem ser fisiologicamente distintas quando cultivadas em condições diferentes, bem como ao longo do tempo em uma mesma condição. Desta forma, considerando os distintos comportamentos do Acb-1 quando exposto isoladamente ao meropenem ou à polimixina B, bem como quando exposto a estes fármacos ao mesmo tempo, pode-se concluir que cada antimicrobiano pode ter atuado como um diferente estressor, possivelmente, levando a e/ou

selecionando mecanismos de tolerância diferentes entre as *persisters*, o que possibilitou a sua erradicação quando os fármacos foram combinados.

Palavras-chave: persistência; infecções crônicas; complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*; biofilme; meropenem; polimixina B.

ABSTRACT

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii (ACB) complex comprises opportunistic and emerging pathogens that are responsible for several diseases, mainly affecting immunocompromised patients and those hospitalized in intensive care units. Therapeutic options for ACB infections are restricted, since these microorganisms are often resistant to most antimicrobials. In addition, these bacteria may also form persister cells, which constitute a small population of susceptible cells able to survive lethal concentrations of bactericidal antimicrobials and other stressors. This phenotype is associated with failure in antimicrobial therapy, especially in chronic and recurrent infections. Therefore, the aim of this study was to evaluate the presence of persister cells from ACB complex isolates exposed to meropenem and/or polymyxin B, in biofilm and planktonic cells, as well as to analyze these cells regarding their morphology and identify expression patterns of proteins possibly involved in the formation and maintenance of persistence. For this, 20 clinical isolates were characterized for the ability to form biofilm on polystyrene surface, and for meropenem and polymyxin B susceptibility, by the assessment of Minimum Inhibitory Concentration (MIC). All isolates were exposed to meropenem at different concentrations above the MIC, while five isolates were exposed to polymyxin B for the assessment of the persisters presence. For all experiments, in order to estimate the fraction of remaining cells, aliquots were removed at determined time points, followed by serial decimal dilutions and drop plating technique on nutrient agar. All isolates presented persisters at different proportions, in both culture conditions when exposed to meropenem or polymyxin B after 48 h. The higher fractions were verified in biofilm for both antimicrobials in comparison with planktonic cultures. Meropenem concentrations did not influence persisters levels. However, after polymyxin B exposure, persister cells fractions were dependent on the concentration employed. After 24 h polymyxin B exposure, a growth resumption of surviving cells was observed. These cells were again evaluated for susceptibility to this antimicrobial, remaining susceptible with MIC of 1 µg/ mL. Moreover, integrity of polymyxin B in the supernatant of the cultures was verified by chromatographic assay, demonstrating that polymyxin B is not significantly degraded after 48 h exposure. On the other hand, when meropenem and polymyxin B were associated at different concentrations, no resumption of cell growth was observed, as well as this combination was able to eradicate persister cells from *A. baumannii*

(Acb-1) cultured in late exponential phase. Furthermore, Nano-Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry was employed for the identification and relative quantification of proteins possibly associated with persistence in *A. baumannii*, after exposure to meropenem. Different patterns of expression were identified between persister cells present in planktonic and biofilm cultures, suggesting that persistence may be regulated by different mechanisms. Proteins involved in the cell division and DNA replication were overexpressed in planktonic persisters, in agreement with the electron scanning microscopy images that presented dividing cells in this culture condition. Overexpression of glucose dehydrogenase (GDH), NADH dehydrogenase 1 (NDH-1), succinate dehydrogenase and ATP synthase indicates the electron transfer from the GDH-catalyzed reaction to the electron transport chain as a possible energy source for persisters, supporting the presence of cell division observed in planktonic culture. Conversely, proteins involved in amino acid metabolism, as well as major elongation factors were underexpressed in Acb-1 persister cells, suggesting that protein synthesis is reduced, even though many proteins were overproduced. Increased expression of several membrane-related proteins has also been observed, indicating possible changes in its composition and function, although proteins related to lipid metabolism were underexpressed. Overall, proteomic analysis of the persister cells showed that these cells could be physiologically distinct when cultured under different conditions, as well as overtime in the same condition. Therefore, considering the different behaviors of Acb-1 when exposed alone to meropenem or polymyxin B, as well as when exposed to these drugs in combination, it was concluded that each antimicrobial might act as a different stressor, possibly leading and/or selecting distinct tolerance mechanisms among persisters, which enabled their eradication when the drugs were combined.

Keywords: persistence; chronic infections; *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex; biofilm; meropenem; polymyxin B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curvas de morte de *Acinetobacter baumannii* após a exposição a diferentes concentrações de polimixina B em cultivo planctônico.....54

Figura 2 - Curvas de morte de *Acinetobacter baumannii* após a exposição a diferentes concentrações de polimixina B em condição de biofilme.....55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Caracterização dos isolados de *Acinetobacter baumannii* quanto ao material clínico de origem, à Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a polimixina B e à intensidade de biofilme formado.....52
- Tabela 2 - Frações de células *persisters* apresentadas por isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* após 48 h de exposição a 15 µg/mL de polimixina B, em cultivo planctônico e biofilme.....52
- Tabela 3 - Determinação da concentração de polimixina B por cromatografia de ultra eficiência, logo após a adição do antimicrobiano ao cultivo (0 h), bem como após a exposição por 6, 12, 18, 24 e 48 h a 15 µg/mL, em fase exponencial tardia de *Acinetobacter baumannii* (Acb-1).....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB – *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii*

ATP – trifosfato de adenosina

DNA – ácido desoxirribonucleico

ADEP4 – acyldepsipeptide antibiotic

CAT – catalase

CIM – concentração inibitória mínima

CSP – *competence-stimulating peptide*

ERO – espécies reativas de oxigênio

ERN – espécies reativas de nitrogênio

FMN – flavina mononucleotídeo

GDH – glicose desidrogenase

LB – Lysogeny Broth

LPS – lipopolissacarídeo

MDR – multirresistente

NDH-1 – NADH desidrogenase 1

ppGpp – guanosina tetrafosfato

(p)ppGpp – guanosina pentafosfato

QS – *quorum sensing*

RNA – ácido ribonucleico

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

RNA_r – ácido ribonucleico ribossômico

RNA_t – ácido ribonucleico transportador

SOD – superóxido dismutase

TA – toxina-antitoxina

UTI – unidade de tratamento intensivo

µg/mL – microgramas por mililitro

SUMÁRIO

Capítulo 1	19
1.1 Introdução.....	20
1.2 Objetivos.....	37
1.2.1 Objetivo Geral.....	37
1.2.2 Objetivos Específicos.....	37
1.3 Aspectos Éticos.....	39
 Capítulo 2	 40
Artigo científico 1: <i>Effects of meropenem exposure in persister cells of Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>	41
 Capítulo 3	 42
Resultados preliminares: <i>Persistência em Acinetobacter baumannii após exposição à polimixina B</i>	43
 Capítulo 4	 56
Artigo científico 2: <i>Combination of polymyxin B and meropenem eradicates Acinetobacter baumannii persister cells</i>	56
 Capítulo 5	 57
Artigo científico 3: <i>Proteins differentially expressed in Acinetobacter baumannii persists after exposure to meropenem</i>	57
 Capítulo 6	 58
6.1 Considerações Finais.....	59
 Referências	 64

Capítulo 1

Introdução

Objetivos

Aspectos éticos

1.1 Introdução

Bactérias do gênero *Acinetobacter* se apresentam como cocobacilos Gram negativos usualmente dispostos em pares. Estes microrganismos são caracterizados como não fermentadores de açúcares, aeróbios estritos, imóveis, catalase positivos e oxidase negativos (1). Este gênero é constituído por 51 espécies (2) comumente isoladas de amostras de solo, água e de humanos. As espécies *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* (anteriormente denominada genoespécie 3) e *A. nosocomialis* (anteriormente denominada genoespécie 13TU) apresentam elevada similaridade genética e fenotípica, sendo agrupadas em um complexo denominado *A. calcoaceticus–baumannii* (ACB) (3, 4). Espécies deste complexo estão comumente envolvidas em infecções respiratórias, além de estarem frequentemente associadas a quadros de bacteremia, meningite e infecções de feridas operatórias, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos e internados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) (5-8). Cepas pertencentes ao complexo ACB constituem grande preocupação para a comunidade médica, uma vez que têm apresentado frequentemente resistência a diversas classes de fármacos antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e tetraciclinas (9, 10). Devido às restritas opções disponíveis para o tratamento de infecções ocasionadas pelo complexo ACB, o sucesso terapêutico torna-se bastante difícil, fazendo com que estes patógenos sejam responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade em hospitais e em outras unidades de saúde (11-13). A resistência simultânea a inúmeros antimicrobianos encontrada em isolados hospitalares de *A. baumannii* pode ser atribuída à rápida capacidade deste patógeno em acumular e transmitir múltiplos mecanismos de

resistência. Aliada a esta característica, a utilização de agentes antimicrobianos de amplo espectro exerce pressão seletiva constante, auxiliando o surgimento de isolados multirresistentes (MDR), os quais possuem grande relevância clínica para as unidades hospitalares (14-16), sendo responsáveis por taxas superiores a 80% das infecções ocasionadas por *A. baumannii* (17, 18). Na região Sul do Brasil, estudo realizado durante o primeiro semestre de 2011 demonstrou que isolados de *A. baumannii* MDR foram responsáveis por 34,5% dos casos de pneumonia, 17,3% das bacteremias e 10,6% de infecções de sítio cirúrgico (19). Além disso, Martins e colaboradores (20) relataram elevada incidência de *A. baumannii* MDR em 12 hospitais públicos na cidade de Porto Alegre, no período entre 2007 e 2008.

Os carbapenêmicos, antimicrobianos bactericidas que possuem atividade *in vitro* contra diferentes bactérias de interesse clínico, geralmente são considerados terapia de escolha para o tratamento de infecções ocasionadas por *A. baumannii* (21, 22). Estes antimicrobianos proporcionam a morte de células bacterianas em crescimento, uma vez que atuam inibindo a síntese de parede celular. De maneira mais específica, estes antimicrobianos atuam introduzindo um grupamento de radical acila em proteínas de ligação à penicilina, o que leva à desestabilização do peptidoglicano e, por consequência, ao rompimento da parede celular bacteriana em decorrência da pressão osmótica (23). Entretanto, a resistência a esses fármacos tem sido amplamente descrita (24-28), sendo principalmente mediada pela expressão de beta-lactamases (29-33). Dessa forma, outros fármacos, como polimixinas (polimixina B e colistina) e tigeciclina, têm sido amplamente empregados para o tratamento de infecções ocasionadas por cepas de *A. baumannii* MDR resistentes também aos carbapenêmicos (34-36).

As polimixinas são caracterizadas como polipeptídeos catiônicos, capazes de interagir com o lipídeo A do lipopolissacarídeo (LPS) por meio de ligações eletrostáticas. Assim, atuam desestabilizando as membranas interna e externa da célula bacteriana, proporcionando a ruptura das mesmas e, conseqüentemente, levando à morte celular (37). Outro mecanismo proposto para a ação das polimixinas é a indução da produção de radicais hidroxila a partir da reação de Fenton (38). Esta reação ocorre quando o superóxido é convertido em peróxido pela ação da superóxido dismutase (SOD) presente na célula. Dessa forma, o peróxido é capaz de interagir com o ferro ferroso (Fe^{2+}), oxidando o ferro e formando radicais hidroxila. A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode ocasionar danos ao DNA, proteínas e lipídeos da célula bacteriana, levando-a à morte (39). Estudo empregando análise proteômica em *A. baumannii* demonstrou que elevados níveis de ferro no meio podem propiciar aumento na formação de ERO e, conseqüentemente, dos danos celulares, assim como maior atividade de proteínas detoxificantes, incluindo a SOD (40). Entretanto, o mecanismo que leva à produção de radicais hidroxila não foi completamente elucidado em *A. baumannii* (38). Já outros fármacos bactericidas são associados com indução de resposta ao estresse em *E. coli*, alterando a produção de NADH por inibir o ciclo do ácido tricarboxílico e, por conseqüência, levando a uma cadeia respiratória anômala. A alteração na cadeia de transporte de elétrons estimula a produção de superóxido e, por conseqüência, de radicais hidroxila (41, 42). Adicionalmente, foi demonstrado que as polimixinas podem atuar inibindo de maneira não competitiva a atividade da NADH-quinona oxidoreductase tipo II (NDH-2) na membrana interna de bactérias Gram-negativas, sugerindo que a inibição de importantes enzimas da cadeia respiratória pode representar um dos mecanismos de ação secundários das polimixinas (43).

No entanto, relatos de resistência às polimixinas vêm se tornando cada vez mais frequentes (44-49). Mutações nos genes *pmrA* e *pmrB* são responsáveis por resistência a estes fármacos por proporcionarem modificações no LPS devido à adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A. Essas modificações reduzem a carga negativa da membrana celular externa, diminuindo a afinidade do antimicrobiano pelo seu sítio de ligação (50, 51). Mais recentemente, as fosfoetanolamina transferases MCR-1 e MCR-2 foram relatadas como conferindo resistência à colistina. Similarmente ao efeito observado pelas mutações em PmrAB, estas enzimas catalisam a transferência da fosfoetanolamina à glucosamina do lipídeo A do LPS, reduzindo a carga negativa do lipídeo A e, conseqüentemente, a afinidade da colistina pelo LPS. Os genes *mcr-1* e *mcr-2* foram detectados em plasmídeos carregados por membros da família Enterobacteriaceae provenientes de diferentes origens, incluindo animais, alimentos de origem animal e vegetal, bem como de humanos (52-54), o que implica na possibilidade de transferência deste mecanismo horizontalmente, e possível seleção de resistência pelo uso da colistina. Adicionalmente, a perda total do LPS ocasionada por mutações nos genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD*, que codificam para enzimas envolvidas na síntese do lipídeo A, também é descrita como mecanismo de resistência às polimixinas (55).

Embora a resistência aos antimicrobianos constitua grande preocupação pela dificuldade imposta ao tratamento das infecções, outro importante fenótipo relacionado à ineficácia dos fármacos antimicrobianos, porém menos conhecido e estudado, é a persistência. Esse fenótipo é determinado pela presença de células *persisters*, as quais são caracterizadas como uma pequena fração da população bacteriana formada estocasticamente (56, 57), assim como em resposta a indutores, com o objetivo de adaptação a diversas condições ambientais (58). Essas células são capazes de sobreviver ao tratamento com doses elevadas de antimicrobianos, aos quais são fenotipicamente

suscetíveis, e à ação de outros agentes estressores, tais como alteração de pH, temperatura e dessecação (59-61). Além disso, o fenótipo de persistência é caracterizado como transitório e não herdável, diferenciando-o de resistência, que é determinada pela presença de modificações genéticas específicas, tais como alteração na molécula alvo e síntese de enzimas que inativam os fármacos antimicrobianos, permitindo a multiplicação bacteriana na presença dos mesmos.

A persistência foi descrita pela primeira vez na década de 40 por Bigger (1944) (59) em um estudo que expôs células de *Staphylococcus aureus* (anteriormente denominado *Staphylococcus pyogenes*) a doses elevadas de penicilina. O número de células *persisters* identificadas como capazes de sobreviver à penicilina era menor do que 0,001% da população inicial inoculada (59). A persistência tem despertado cada vez mais interesse entre a comunidade científica, tendo sido identificada em diferentes espécies de microrganismos, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* e *A. baumannii* (62-68), frente a diversos antimicrobianos, sendo caracterizada como fenótipo de tolerância a múltiplos fármacos (63, 69, 70). Estudos demonstraram heterogeneidade na formação de células *persisters* em um mesmo isolado de *E. coli* ou de *A. baumannii* expostos a antimicrobianos diferentes (68, 71), indicando não existir relação entre a magnitude da fração de células *persisters* e os fármacos antimicrobianos aos quais foram expostas (68, 71). Adicionalmente, tem sido verificada significativa variabilidade no tamanho da fração de *persisters* formada entre diferentes isolados de uma mesma espécie (68, 71, 72). A presença de células *persisters* pode implicar em falha na terapia antimicrobiana, especialmente em infecções crônicas, tais como tuberculose, infecções pulmonares relacionadas à fibrose cística e infecções recorrentes do trato urinário, uma vez que as células tolerantes permanecem no

organismo do hospedeiro após o tratamento. Dessa forma, esse fato torna-se preocupante, pois à medida que ocorre redução dos níveis do antimicrobiano nos sítios de infecção, as *persisters* são capazes de retomar o crescimento, permitindo que a infecção seja restabelecida (73, 74). As infecções crônicas são tratadas por meio de exposição periódica dos pacientes a elevadas concentrações de antimicrobianos bactericidas, o que pode levar à seleção de células mutantes, capazes de produzirem níveis mais elevados de células *persisters*, sendo estas consideradas altamente persistentes (*high persisters*) (75-77), ou ainda proporcionar a aquisição de mecanismos de resistência, promovendo a geração de populações mutantes resistentes (78). Além disso, evidências demonstram que a terapia antimicrobiana utilizada de maneira contínua poderia implicar na tolerância a múltiplos fármacos, uma vez que a exposição contínua e prolongada aos antimicrobianos ocasionaria seleção de mutantes altamente persistentes (73).

Levando em consideração a relação entre o fenótipo de persistência e as infecções recalcitrantes, a presença de células *persisters* é especialmente importante em biofilmes. Biofilmes compreendem uma associação de células bacterianas inclusas em uma matriz extracelular complexa, organizada e agregada a superfícies bióticas e abióticas, tais como diferentes tecidos biológicos, cateteres, próteses e outros materiais médicos (79, 80). A matriz extracelular é composta predominantemente por água e polissacarídeos, e, em proporções menores, por proteínas e ácidos nucleicos, conferindo estabilidade e auxiliando na aderência do biofilme, o que permite a sobrevivência do microrganismo em condições adversas, como as possivelmente encontradas no ambiente hospitalar (79, 81).

A condição de biofilme pode não restringir a difusão de fármacos antimicrobianos (82); entretanto, impede a entrada de alguns componentes do sistema

imune (83, 84), protegendo e mantendo as células *persisters*, que podem atuar como possível fonte de novas contaminações (77, 85). Estudos realizados com *P. aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis* mostraram que a população de *persisters* é significativamente maior na condição de biofilme quando comparada ao cultivo de células planctônicas em fase logarítmica (62, 86). Essa relação pode ocorrer devido à proteção física proporcionada pela matriz extracelular presente em biofilme (62, 77, 85, 86), bem como pelo fato desta condição de crescimento implicar na ativação de uma ação citoprotetora relacionada à regulação da expressão gênica, denominada *stringent response*. A *stringent response* ocorre em decorrência da privação de nutrientes, ativando genes que codificam proteínas antioxidantes e inibindo genes codificantes de proteínas pró-oxidantes (87). Além disso, considerando que a formação de células *persisters* possa estar relacionada com a fase de crescimento microbiano, estando mais presentes no final da fase logarítmica, bem como na fase estacionária e em biofilme, alguns estudos indicaram a participação de sinalizações *quorum sensing* (QS) na formação dessas células, demonstrando que em condições de superpopulação, a participação mais significativa do sistema QS pode regular a formação das células *persisters* (88, 89). Em *P. aeruginosa*, observou-se aumento significativo na fração de *persisters* em decorrência da adição de moléculas envolvidas na sinalização QS, como a piocianina e as acil-homosserina-lactonas, a um cultivo em fase logarítmica (88). Da mesma forma, em *A. baumannii*, a adição de piocianina associada a antimicrobianos proporcionou o aumento de 3 a 4 vezes na fração de *persisters* quando comparada somente com a exposição à carbapenicolina e à amicacina (90). Em *Streptococcus mutans*, o peptídeo CSP (*Competence-Stimulating Peptide* – peptídeo estimulador de competência), outro sinalizador do sistema QS, também demonstrou associação com a

manifestação do fenótipo de persistência, uma vez que apresenta expressão elevada neste estado, influenciando positivamente a formação de células *persisters* (89).

Até o momento, os mecanismos moleculares relacionados à persistência não foram totalmente elucidados. Entretanto, acredita-se que a formação de células *persisters* não envolva um único mecanismo genético, mas sim que este fenótipo esteja associado a uma série de mecanismos moleculares, os quais atuam de maneira independente e paralela, ou até mesmo sobrepostos (84). Evidência de tal poligenia foi sugerida a partir de estudos que empregaram técnicas de mutagênese por transposons, os quais falharam na produção de isolados completamente tolerantes e da observação de heterogeneidade de resposta de um mesmo isolado frente a diferentes antimicrobianos (72, 91). Estes resultados indicaram que muitos genes relacionados à persistência são considerados reguladores genéticos globais, que podem afetar a expressão de outros genes de maneira simultânea, conduzindo à formação de células *persisters* (77). A avaliação de uma biblioteca de *knockout* de regiões de fase aberta de leitura construída a partir de isolados de *E. coli* permitiu a identificação de alguns possíveis reguladores globais: DksA, DnaK, DnaJ, YgfA e YigB (92). A DksA atua como moduladora da RNA polimerase dependente de guanosina tetrafosfato (ppGpp), e a deleção do gene *dksA* implica no decréscimo dos níveis de *persisters* (92). O ppGpp é formado em resposta à escassez de carbono e aminoácidos, acarretando a reprogramação transcricional caracterizada pela inibição da transcrição de RNAr e RNAt e pelo direcionamento da transcrição de genes envolvidos na síntese e transporte de aminoácidos (93, 94). Desta forma, o aumento nos níveis de DksA e/ou ppGpp contribuiria para a dormência (92), o que tem sido associado à persistência em alguns estudos (95-97). A chaperona DnaK é responsável pelo dobramento de proteínas recém-sintetizadas e necessita de ATP e de outras chaperonas (DnaJ e GrpE) para exercer sua

função (98). A DnaK também é capaz de regular genes que induzem a resposta ao estresse e ao choque térmico por meio da regulação da atividade e estabilidade de fatores sigma alternativos (99, 100). A redução da fração de células *persisters* foi verificada em um isolado de *E. coli knockout* para o gene *dnaK*, sugerindo envolvimento deste gene na manutenção da persistência (92). As proteínas YgfA e YigB são consideradas as mais importantes dentre os reguladores globais pelo fato de sua deleção implicar em uma maior redução nos níveis de células *persisters*, sugerindo que eles estejam diretamente relacionados à formação e à manutenção da tolerância a antimicrobianos (92). A YgfA está envolvida na inibição da síntese de nucleotídeos, enquanto a YigB é responsável por bloquear o metabolismo através da redução nos níveis celulares do co-fator flavina mononucleotídeo (FMN).

A produção de (p)ppGpp tem sido relacionada à formação de *persisters* em diversos organismos, onde mutantes incapazes de produzir (p)ppGpp formam níveis reduzidos destas células tolerantes (57, 87, 101, 102). Como mencionado anteriormente, em *E. coli*, a carência de aminoácidos leva à síntese de ppGpp, assim como o choque térmico, via ativação da (p)ppGpp sintetase RelA. Já a escassez de carbono, nitrogênio, fosfato, ferro e ácidos graxos ativam a atividade (p)ppGpp sintetase da enzima bifuncional SpoT (sintetase e hidrolase) (103). O (p)ppGpp, uma vez produzido, parece modular a fisiologia bacteriana reprogramando a transcrição do estado de crescimento para a homeostasia metabólica e função de sobrevivência (104, 105). Entretanto, a base molecular da contribuição deste mensageiro para a persistência ainda carece de elucidação e, provavelmente, sinalizações complementares tenham papéis importantes no direcionamento da formação de *persisters* (104-106).

As proteínas HU e IHF também foram identificadas como reguladores globais em *E. coli*. A deleção da subunidade HupB ocasionou diminuição da fração de

persisters, sendo esta mais acentuada após a deleção das duas subunidades da proteína, HupAB (92). Efeito contrário foi verificado após mutação da proteína IHF, o que proporcionou níveis elevados de *persisters* (92). A IHF interage especificamente com sequências de DNA e, diretamente ou indiretamente, é capaz de regular a transcrição de mais de 100 genes relacionados com diferentes funções, incluindo biossíntese de aminoácidos, catabolismo de compostos de carbono, replicação de DNA e resposta ao estresse (107). Por outro lado, a ligação da HU ao DNA é inespecífica, e esta proteína atua como um regulador promovendo e inibindo a ligação de diversos fatores de transcrição ao DNA (108). Avaliação similar foi realizada por De Groot e colaboradores (109) em uma biblioteca contendo 5.000 mutantes de *P. aeruginosa*. Neste estudo, duas proteínas foram identificadas como possíveis reguladores globais, AlgR e PilH. Isolados mutantes para essas proteínas apresentaram fração elevada de *persisters* quando comparados ao controle. AlgR é considerado um importante regulador de transcrição requerido para a expressão de diversos fatores de virulência em *P. aeruginosa*, incluindo formação de biofilme, produção de ramnolipídeos e conversão ao fenótipo mucoide, a partir da superprodução de alginato (110), enquanto PilH é responsável pelo controle da síntese do pili tipo IV, que está envolvido na motilidade do tipo *twitching* (111).

Além da relação de *persisters* com a resposta ao estresse via DnaK, como supracitado, a deleção do gene *rpoS*, que codifica para um fator sigma alternativo, bem como dos genes controlados por este em *E. coli*, proporcionou um aumento drástico nas frações de células *persisters* (112). Adicionalmente, a análise transcriptômica em isolados de *E. coli* demonstrou expressão aumentada de muitos genes associados à resposta SOS e ao choque térmico na condição de persistência (63). Da mesma forma, Wu e colaboradores (113) observaram que mutantes de *E. coli* que não possuem genes

de resposta ao estresse ou resposta SOS apresentaram níveis reduzidos de células *persisters* frente a diferentes antimicrobianos, demonstrando que a resposta ao estresse parece estar intimamente relacionada com persistência.

A produção de ERO e, conseqüentemente, os danos celulares ocasionados pelas mesmas também têm sido associados ao aumento na formação de *persisters*, indicando que a proteção proporcionada por enzimas antioxidantes, tais como catalase (CAT) e SOD são importantes para a sobrevivência dessas células (65, 90). Este mecanismo foi observado em isolados do complexo *B. cepacia* em condição de biofilme expostos à tobramicina, nos quais os genes *kata* e *katB* foram deletados, impossibilitando a produção CAT, ou ainda, inibindo a ação de SOD. Essas modificações resultaram em menor proteção contra ERO, e dessa forma, taxas menores de células sobreviventes (65). Já em *A. baumannii*, a adição de piocianina a biofilmes induziu a produção de ERO, resultando no aumento da atividade de CAT e SOD e, assim, proporcionando níveis mais altos de *persisters* (90). Além disso, uma provável relação entre os fenótipos de resistência e persistência, é sugerida em estudo que apresenta a superexpressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC em isolados de *E. coli*, a qual atua reduzindo a concentração intracelular de ERO, e proporcionando uma maior fração de células sobreviventes (114). A expressão aumentada de bombas de efluxo como mecanismo capaz de contribuir para a tolerância a múltiplos antimicrobianos também é descrita em *persisters* de *E. coli* frente à exposição a beta-lactâmicos e quinolonas (115).

Os sistemas toxina-antitoxina (TA) estão entre os principais fatores associados com a formação e manutenção de *persisters*, sendo descritos em importantes patógenos, incluindo *E. coli* e *M. tuberculosis* (113, 116). Estes sistemas foram inicialmente descritos em plasmídeos, onde são bastante conhecidos pelo seu papel de perpetuação plasmidial na célula bacteriana (117, 118). Posteriormente, verificou-se que os sistemas

TA também são difundidos em cromossomos bacterianos; entretanto, diferentemente dos sistemas descritos em plasmídeos, o papel fisiológico destes é assegurar a sobrevivência da população bacteriana em resposta ao estresse (118-120).

Os sistemas TA são classificados em seis tipos de acordo com a natureza da antitoxina e a interação toxina-antitoxina (121). A toxina é responsável pela inibição de importantes funções celulares, tais como a replicação e a tradução, formando um complexo inativo quando acoplada à antitoxina, que é facilmente degradada (77). Em todos os sistemas, a toxina é uma proteína estável, enquanto a antitoxina é caracterizada como RNA nos sistemas I e III, ou como proteína nos sistemas II, IV, V e VI (121-123). Nos sistemas TA II, classe mais associada à regulação de células *persisters*, a toxina forma um complexo inativo com a antitoxina, onde a degradação da antitoxina via proteólise acarreta em menores quantidades dessa, e assim, permite que a toxina possa atuar em seus alvos. Essa ação leva à morte ou inibição do crescimento e propagação celular, devido à inibição dos processos de tradução (clivagem do RNAm, inativação dos fatores de alongação do ribossomo e inativação da glutamil-RNAt sintetase) e replicação (inibição da DNA girase), bem como em decorrência da clivagem de regiões específicas de RNA de fita simples (124-126).

A toxina HipA, que compõe o sistema TA HipAB, foi a primeira associada à persistência (75). Esta toxina atua diretamente sobre a tradução, impedindo a ligação do fator de alongação Tu, o que leva à redução do metabolismo (127, 128). Estudos também demonstraram que níveis elevados de transcritos das toxinas RelE e MazF, pertencentes aos sistemas TA RelEB e MazFE, respectivamente, estão associados com células *persisters* de *E. coli* (129, 130). Estas toxinas são responsáveis pela redução dos níveis de RNA, podendo constituir um importante fator no estabelecimento do fenótipo de persistência (131, 132). Por outro lado, a deleção dos genes *relE* e *mazF* não

demonstrou redução nas frações de *persisters*, o que indica a possibilidade de redundância existente entre os mecanismos reguladores do fenótipo de persistência (77). Entretanto, a deleção de um único *locus* TA, como *mqsR* do sistema MqsRA ou *yafQ* do sistema DinJ-YafQ em *E. coli*, foi capaz de influenciar a formação de células *persisters* (133, 134).

Em *A. baumannii*, Jurenaite e colaboradores (135) demonstraram por meio de ferramentas computacionais a ocorrência de pelo menos 15 sistemas TA tipo II. Dentre estes, cinco foram classificados como funcionais, RelEB, HicAB, HigBA, SplTA e CheTA, sendo os dois últimos identificados unicamente em *A. baumannii*. Os sistemas RelEB, HicAB e CheTA foram classificados como cromossômicos, enquanto os sistemas HigBA e SplTA foram encontrados em plasmídeos. As toxinas de todos os sistemas TA detectados em *A. baumannii*, quando expressas em *E. coli*, foram capazes de inibir o processo de tradução, ocasionando degradação do RNAm em diferentes níveis. Entretanto, para nenhum dos módulos foi estabelecido vínculo direto com persistência. Além disso, a prevalência dos sistemas HigBA, RelEB e MazEF foi determinada em estudo realizado com 85 isolados clínicos de *A. baumannii* MDR, sendo o último módulo identificado em todos os isolados (136).

De uma maneira geral, a regulação da persistência mediada pelos sistemas TA pressupõem a inibição de importantes processos metabólicos (77, 125, 132). Entretanto, discrepâncias são encontradas na literatura em relação ao estado metabólico das células *persisters*. Muitos estudos sustentam a ideia de que estas células são metabolicamente inativas, ditas dormentes, corroborando com a descoberta inicial descrita por Bigger (1944) (59) em *S. aureus*, uma vez que a interrupção do crescimento celular devido à redução da temperatura de cultivo, assim como devido à remoção de nutrientes do meio de cultura proporcionou uma maior fração de células *persisters* frente à exposição à

penicilina. Fortalecendo esses achados, Shah e colaboradores (95) separaram as células de *E. coli* metabolicamente ativas daquelas com metabolismo drasticamente reduzido após exposição à ofloxacina, utilizando um promotor ribossômico acoplado a uma molécula *green fluorescence protein* (GFP) por meio da análise de *fluorescence activated cell sorting* (FACS). A partir deste experimento, estes autores sugeriram que as células *persisters*, que foram tolerantes à ofloxacina, são metabolicamente inativas ou possuem metabolismo muito reduzido, pelo fato destas apresentarem baixa taxa de síntese proteica quando expostas ao agente estressor. Neste mesmo contexto, Kwan e colaboradores (96) também verificaram interrupção da síntese proteica em células *persisters* de *E. coli* através do pré-tratamento com três diferentes compostos: rifampicina (atua interrompendo o processo de transcrição), tetraciclina (atua interrompendo o processo de tradução), e o composto químico cianeto de carbonila m-clorofenil hidrozona (interrompe a síntese de ATP). O resultado da utilização desses pré-tratamentos foi o aumento de 10.000 vezes nos níveis de *persisters*, quando comparados à fração inicial destas células, demonstrando que estes foram capazes de induzir a conversão de 80% da população bacteriana inicial em *persisters*.

Em contraste a estes achados, outros estudos propõem que as células *persisters* possuem metabolismo ativo, sugerindo que a persistência é extremamente complexa para ser definida somente como um estado de dormência, necessitando estudos adicionais que auxiliem na caracterização e entendimento pleno das células *persisters*. Wakamoto e colaboradores (137), utilizando cultura microfluida de *Mycobacterium smegmatis* associada à microscopia, reportaram a presença de *persisters* em divisão na presença da pró-droga isoniazida. Além disso, Orman e Brynildsen (138) sugerem que o estado de dormência não é necessário ou suficiente para determinar o fenótipo de persistência em *E. coli* a partir da utilização de FACS para separar as células com

metabolismo ativo daquelas com metabolismo inativo ou drasticamente reduzido, após exposição à ampicilina ou ofloxacina.

Recentemente, Conlon e colaboradores (139) demonstraram que a formação de *persisters* em *S. aureus* está associada à redução nos níveis de ATP. Essa diminuição pode influenciar a atividade de alvos antimicrobianos dependentes de ATP, tais como topoisomerase, RNA polimerase e DNA girase, proporcionando o aumento na fração de células *persisters*. Dessa forma, os autores sugerem que os níveis celulares de ATP são determinantes na eficácia dos antimicrobianos bactericidas e, possivelmente, explicaria a tolerância bacteriana a esses agentes estressores.

Outro importante aspecto a ser considerado na determinação da regulação da formação e manutenção do estado de persistência é a herança epigenética, ou seja, a transmissão de fatores não genéticos, tais como níveis de expressão de genes, RNA e outras biomoléculas, da célula mãe para as células descententes. A partir de um modelo matemático, Day (2016) (140) sugeriu que as *persisters* possam resultar de uma combinação de herança epigenética com ruído celular, representando um dos exemplos mais bem estudados de evolução sob herança epigenética (140).

Tendo em vista a multiplicidade de possíveis mecanismos que podem estar envolvidos na persistência bacteriana, bem como a dificuldade para o sucesso no tratamento das infecções crônicas imposta pela tolerância aos antimicrobianos, a erradicação das *persisters* tem se tornado um desafio. A busca por novos compostos e o emprego da associação de antimicrobianos já existentes são algumas das alternativas encontradas para garantir a eliminação dessas células. A estratégia terapêutica utilizando simultaneamente elevadas concentrações de tobramicina e daptomicina foi capaz de eliminar células *persisters* de *S. aureus* após poucas horas de exposição aos fármacos (70). A terapia combinada pode constituir uma alternativa interessante e eficaz

na erradicação de *persisters*, uma vez que muitos estudos demonstram heterogeneidade nas frações de células *persisters* frente à exposição a diferentes antimicrobianos, incluindo fármacos de uma mesma classe (68, 71, 141). Além disso, a utilização de antimicrobianos convencionais em regime de dose pulso, empregando concentrações elevadas, constitui outra estratégia importante, conforme verificado para *Borrelia burgdorferi*, agente da doença de Lyme, após tratamento com ceftriaxona (142). Neste estudo, após quatro exposições repetidas do microrganismo a 3 µg/mL do antimicrobiano (300 vezes a concentração inibitória mínima - CIM - do isolado), não foi possível verificar células sobreviventes (142). Também estão sendo avaliados compostos antimicrobianos experimentais como monoterapia ou em associação a fármacos amplamente utilizados na clínica, visando eliminar células *persisters*. O pró-fármaco ACD112, análogo do tilbroquinol, foi capaz de eliminar *persisters* de *E. coli* em cultivo estacionário (143). Além disso, a combinação do derivado sintético do antimicrobiano natural acil-depsipeptídeo (ADEP4) e rifampicina foi capaz de erradicar *persisters* de *S. aureus* em biofilme, o que não foi observado quando utilizado somente o ADEP4 (141). O ADEP4 ativa uma protease da família Clp que atua em polipeptídeos nascentes. Este fato indica que o complexo ADEP4/ClpP tem como alvo células em crescimento, as quais apresentam síntese proteica ativa (144). Estudo indicou que a proteína FtsZ, responsável pela formação do anel de divisão celular, é o principal alvo de ADEP4/ClpP (145). Em *A. baumannii*, até o momento, não existem relatos de estratégias capazes de erradicar células *persisters*.

A importância da elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na formação e manutenção do fenótipo de persistência em *A. baumannii* é justificada pela relevância das células *persisters* nas infecções crônicas e sua estreita relação com a falha na terapia antimicrobiana, bem como pela escassez de dados relacionados à

persistência em *A. baumannii*. Desta forma, a partir do conhecimento sobre a fisiologia das células *persisters* é possível o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que tenham como objetivo a erradicação destas células, proporcionando assim, o sucesso do tratamento antimicrobiano e, por conseguinte, a redução das taxas de morbidade e mortalidade nos hospitais e demais unidades de tratamento devidas a infecções causadas por este microrganismo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de isolados nosocomiais de *A. calcoaceticus-baumannii* em apresentar o fenótipo de persistência em células planctônicas e em condição de biofilme, frente à exposição ao meropenem e/ou à polimixina B, bem como analisar a expressão diferencial de proteínas em células *persisters* oriundas de cultivos planctônicos e de biofilmes expostos a meropenem.

1.2.2 Objetivos Específicos

1.2.2.1 Determinar a suscetibilidade à polimixina B e meropenem em isolados de *A. calcoaceticus-baumannii*;

1.2.2.2 Verificar a capacidade dos isolados de *A. calcoaceticus-baumannii* suscetíveis à polimixina B e meropenem em formar biofilme;

1.2.2.3 Avaliar a presença de células *persisters* em cultivos planctônicos de isolados nosocomiais de *A. calcoaceticus-baumannii* frente à exposição à polimixina B e ao meropenem;

1.2.2.4 Avaliar a presença de células *persisters* em biofilmes formados por isolados nosocomiais de *A. calcoaceticus-baumannii* frente à exposição à polimixina B e ao meropenem;

1.2.2.5 Avaliar a influência da combinação de polimixina B com meropenem, em diferentes concentrações, na erradicação de células *persisters* de *A. calcoaceticus-baumannii* em cultivo planctônico;

1.2.2.6 Verificar possíveis alterações na morfologia nas células *persisters* de *A. calcoaceticus-baumannii* por meio de microscopia eletrônica de varredura em condição de biofilme e em cultivo planctônico, frente à exposição ao meropenem;

1.2.2.7 Identificar padrões de expressão de proteínas possivelmente envolvidos na formação e manutenção do fenótipo de persistência por meio de análise proteômica de um isolado nosocomial de *A. calcoaceticus-baumannii* em condição de biofilme e células planctônicas mediante a exposição ao meropenem.

1.3 Aspectos Éticos

O presente estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS em 22 de novembro de 2013, tendo sido aprovado para execução sob o número de protocolo 483.469.

Capítulo 2

Artigo Científico 1

Effects of meropenem exposure in persister cells of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

Artigo científico publicado no periódico *Future Microbiology* em fevereiro de 2017.

Fator de impacto: 3.637 (JCR 2015)

RESEARCH ARTICLE

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Effects of meropenem exposure in persister cells of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

Stephanie Wagner Gallo¹, Bruna Kern Donamore¹, Vany Elisa Pagnussatti², Carlos Alexandre Sanchez Ferreira¹ & Sílvia Dias de Oliveira*¹

Aim: To evaluate the influence of meropenem in the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) persister levels. **Methods:** Persister levels in planktonic and biofilm cultures from ACB isolates were evaluated after exposure to different meropenem concentrations. **Results:** A high variability of persister fractions was observed among the isolates cultured under planktonic and biofilm conditions. Meropenem concentration did not influence persister fractions, even when far above the MIC. No correlation was found between persister levels and biofilm biomass. **Conclusion:** The magnitude of persister levels from ACB planktonic and, particularly, biofilm cultures exposed to meropenem was independent of the antibiotic concentration, dosing regimen and biofilm biomass. These findings, in a context of meropenem failure to treat chronic infections, strengthen the importance of understanding persister behavior.

First draft submitted: 12 June 2016; Accepted for publication: 23 September 2016; Published online: 23 January 2017

The *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) complex has been considered an important public health concern responsible for several infections in intensive care unit patients [1]. Nowadays, ACB healthcare-associated infections can be even aggravated by the raising antimicrobial resistance levels that increased the difficulty imposed on their treatment, including resistance to carbapenems – which have been widely used against these infections [2]. However, the ineffectiveness of antimicrobial treatments, especially in the avoidance of recalcitrance of chronic infections, may also be due to the bacterial phenotype of tolerance to antimicrobials determined by the presence of persister cells [3].

Persisters comprise a small subpopulation of cells able to survive lethal doses of bactericidal antimicrobials to which they are susceptible, as well as to other stressors [4,5]. These cells can be stochastically formed in a bacterial population as a strategy for the adaptation to environmental variations that may result in persistence of bacterial infections [6]. On the other hand, the transient persistence phenotype may also be derived from the induction by stressor agents, which has been assigned to several molecular mechanisms and global regulators that can operate independently and in parallel, or even overlapped [7], including the SOS response and toxin–antitoxin modules [8–10].

Persister cells are especially important in biofilms [11], as even antimicrobials that are able to diffuse in biofilms do not act on these tolerant cells, hindering the treatment of the infection [5,12]. This scenario is additionally worsened since biofilm blocks the entry of large immune system components.

KEYWORDS

• carbapenems • chronic infections • persistence • therapeutic failure

¹Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

²Departamento de Microbiologia, Laboratório de Patologia Clínica, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

*Author for correspondence: Tel: +55 51 33534953; Fax: +55 51 33203568; silviadias@pucrs.br

Capítulo 3

Resultados Preliminares

Persistência em *Acinetobacter baumannii* após exposição à polimixina B

Resultados preliminares que irão compor um artigo a ser submetido a um periódico científico.

Persistência em *Acinetobacter baumannii* após exposição à polimixina B

Introdução

A persistência bacteriana é determinada pela presença de células *persisters*, as quais são caracterizadas como uma pequena fração da população capaz de permanecer viável após a exposição a elevadas concentrações de antimicrobianos bactericidas, mesmo sendo fenotipicamente suscetíveis a estes fármacos (1,2). A presença destas células está relacionada à falha na terapia antimicrobiana, especialmente em infecções crônicas e recorrentes, visto que estas são capazes de retomar o crescimento após a redução dos níveis do antimicrobiano, o que pode levar à recidiva do quadro infeccioso (3,4). A persistência já foi reportada em diferentes microrganismos, incluindo *Acinetobacter baumannii* (5-7), frente a diversas classes de antimicrobianos. *A. baumannii* é responsável por ocasionar importantes infecções associadas à assistência em saúde, acometendo especialmente pacientes debilitados e internados em unidades de tratamento intensivo, e frequentemente apresenta resistência a múltiplos fármacos, dificultando o sucesso do tratamento antimicrobiano, sendo necessária a utilização de terapias de última escolha, tais como as polimixinas (8-10). Embora a resistência às polimixinas em *A. baumannii* não seja ainda amplamente descrita (11,12), foram reportadas células *persisters* a partir de cultivos deste microrganismo em fase estacionária após a exposição a 15 µg/mL de polimixina B por 6 h, tendo sido observada grande heterogeneidade entre as frações de *persisters* (5). Levando em consideração este estudo prévio, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de células *persisters* em isolados nosocomiais de *A. baumannii* após a exposição à polimixina B por tempo mais prolongado, 48 h, e em outras duas condições de cultivo,

fase exponencial tardia e em biofilme, bem como verificar a influência da concentração deste antimicrobiano na fração de *persisters* presente em ambas as condições de cultivo.

Material e Métodos

Isolados bacterianos

Cinco isolados clínicos do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) foram cedidos pelo Departamento de Microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário São Lucas – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil. Estes isolados foram previamente identificados por meio do sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux Inc., Hazelwood, MO) e, posteriormente, o gênero *Acinetobacter* confirmado a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR) tendo como alvo o gene RNAr 16S (13). Todos os isolados foram identificados como *A. baumannii* por meio de PCR multiplex empregando o gene *gyrB* como alvo (14), e previamente caracterizados como capazes de formar biofilme em superfície de poliestireno em diferentes intensidades (7) (Tabela 1).

Suscetibilidade à polimixina B

A suscetibilidade dos isolados de *A. baumannii* à polimixina B (Sigma-Adrich, St. Louis, EUA) foi avaliada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando o método de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações descritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (15). Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com as diretrizes do CLSI 2014 (16).

Análise da presença de células persisters em cultivo planctônico

Cultivos em final da fase exponencial de todos os isolados de *A. baumannii* suscetíveis à polimixina B foram avaliados quanto à presença de células *persisters* frente à exposição a este antimicrobiano. Para tanto, os isolados foram cultivados por 18 h a 37°C em caldo LB. Após, fez-se a diluição 1:30 em LB estéril, sendo novamente incubados a 37°C por 3 h a fim de atingir o final da fase logarítmica. A concentração inicial de células, em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), foi determinada por meio da técnica da gota em ágar nutriente (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) a partir de diluições decimais seriadas. Os cultivos foram expostos a 15 µg/mL de polimixina B por 48 h. Alíquotas de 1 mL foram removidas dos cultivos após 6, 24 e 48 h de exposição ao antimicrobiano, com o objetivo de determinar a fração de células *persisters*. As alíquotas foram centrifugadas por 7 min a 12.000 rpm e lavadas com solução salina a 0,85% (Nuclear, Diadema, Brasil) para remoção de resíduos do antimicrobiano e obtenção dos precipitados celulares. Os mesmos foram ressuspensos em 1 mL de solução salina a 0,85%, diluídos até 10⁻⁵ e semeados através da técnica da gota ou espalhamento por superfície em ágar nutriente, em triplicata técnica. Os cultivos foram incubados por 24 h a 37°C para a contagem das colônias. O experimento foi realizado utilizando três replicatas biológicas independentes.

Análise da presença de células persisters em biofilme

Os isolados de *A. baumannii* previamente identificados como capazes de formar biofilme e suscetíveis à polimixina B foram novamente cultivados sob esta condição (7), com o intuito de avaliar a presença de células *persisters*. Após 48 h, as células não aderentes foram removidas utilizando lavagens com tampão salina fosfato (PBS), e a

concentração inicial de células foi determinada em UFC/mL por meio da técnica da gota em ágar nutriente a partir de diluições decimais seriadas. Posteriormente, 200 µL de caldo LB estéril suplementado com 15 µg/mL de polimixina B foram adicionados aos poços da microplaca de poliestireno contendo as células aderentes. Nos intervalos de 6, 24 e 48 h após a exposição ao antimicrobiano, a polimixina B foi removida, as células lavadas com solução salina estéril a 0,85% para a remoção dos resíduos do antimicrobiano e, posteriormente, dissociadas utilizando banho de ultrassom Ultra Cleaner 1400 A (Unique, Indaiatuba, Brasil) por 10 min. Assim como no cultivo planctônico, a contagem do número de células remanescentes foi realizada por meio da técnica da gota em ágar nutriente, em triplicata, a partir de diluições decimais seriadas. Os cultivos foram incubados por 24 h a 37°C para a contagem das colônias. O experimento foi realizado utilizando três replicatas biológicas independentes.

Influência da concentração de polimixina B na fração de células persisters

Com o intuito de verificar a existência de uma possível relação entre a fração de células *persisters* após 48 h de exposição e a concentração de polimixina B, o isolado Acb-1 foi cultivado até o final da fase exponencial, assim como na condição de biofilme, e exposto a 10 µg/mL, 15 µg/mL ou 30 µg/mL do antimicrobiano, bem como a condição de biofilme também foi exposta a 100 µg/mL. A fração de células remanescentes foi determinada conforme protocolo descrito anteriormente, nos intervalos de 2, 4, 6, 12, 18, 24 e 48 h para a fase logarítmica, e 6, 24 e 48 h para biofilme, após a exposição às diferentes concentrações de polimixina B. O experimento foi realizado utilizando triplicata biológica.

Confirmação da presença do fenótipo de persistência e exclusão da seleção de mutantes resistentes

Com o objetivo de confirmar a presença do fenótipo de persistência, e que não houve modificação do fenótipo de suscetibilidade dos isolados testados após a exposição à polimixina B, em ambas as condições de cultivo, as células remanescentes de todos os isolados de *A. baumannii*, obtidas após 48 h de tratamento foram cultivadas novamente na presença do antimicrobiano, na mesma concentração utilizada no ensaio de persistência, bem como a suscetibilidade à polimixina B foi novamente avaliada por meio da determinação da CIM empregando microdiluição. Além disso, o sobrenadante do cultivo de fase logarítmica de Acb-1 após 48 h de exposição a 15 µg/mL de polimixina B foi obtido através de múltiplas centrifugações e utilizado para determinação da CIM deste mesmo isolado, com o objetivo de verificar possível degradação do antimicrobiano durante o ensaio de persistência.

Avaliação da integridade da polimixina B

A cromatografia de ultra eficiência foi empregada com o objetivo de verificar a integridade da polimixina B durante o ensaio de persistência, de acordo com método descrito previamente (17). Para isso, o isolado Acb-1 foi submetido ao ensaio em fase exponencial, como descrito anteriormente. Alíquota de 1 mL do cultivo bacteriano foi removida imediatamente após a adição de 15 µg/mL do antimicrobiano, bem como após 6, 12, 18, 24 e 48 h de exposição. As alíquotas foram estocadas a -20°C até o término do ensaio. Posteriormente, as alíquotas referentes a cada tempo de exposição à polimixina B foram filtradas (membrana de PVDF com poro de 0,22 µm e diâmetro de 13 mm) e 1µL deste filtrado foi injetado no equipamento UHPLC 1290/MS 6460

TQQQ — Agilent (todos os componentes e o *software* MassHunter utilizados foram da Agilent Technologies®). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna SB-C18 x 50 mm 1,8 µm. A velocidade de fluxo de ácido fórmico a 0,1% em água (solvente A): ácido fórmico a 0,1% em fase móvel de acetonitrila (solvente B) foi de 0,3 mL/ min com uma temperatura de coluna de 40°C. O gradiente linear passou de 5% de solvente B para 100% a 2,5 min. A detecção foi realizada utilizando ionização positiva por eletropulverização e monitorização de reações múltiplas dos íons de transição. O tempo de retenção da polimixina B foi de 1,4 min e a energia de colisão utilizada foi de 10 V para as transições 402> 101 (quantificador) e 402> 241 (qualificador).

Resultados

Todos os isolados de *A. baumannii* foram caracterizados como suscetíveis à polimixina B (Tabela 1) e apresentaram células *persisters* após 48 h de exposição à polimixina B (15 µg/mL), em cultivo planctônico e biofilme. O tratamento com polimixina B foi capaz de eliminar a maior parte da população em fase exponencial, onde as frações encontradas variaram de 0,0025% a 0,1251% da população inicial viável; em biofilme, as frações de sobreviventes foram mais expressivas, variando de 9,2654% a 17,4657% (Tabela 2).

Também foi observada uma possível relação entre a fração de células *persisters* obtida após 48 h de exposição e a concentração de polimixina B empregada. Em fase logarítmica tardia, após a exposição a 10 µg/mL, 15 µg/mL e 30 µg/mL de polimixina B, o isolado Acb-1 apresentou frações de células remanescentes de 0,0045%, 0,0041% e 0,0005%, respectivamente (Figura 1). Por outro lado, assim como observado na

exposição à concentração única de polimixina B, as frações obtidas na condição de biofilme foram maiores quando comparadas às frações encontradas no cultivo planctônico, compreendendo 16,1272%, 11,1382%, 0,9196% e 0,4231 % da população inicial viável após a exposição a 10 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente (Figura 2).

Interessantemente, foi verificada a retomada de crescimento bacteriano em todos os isolados após 24 h de exposição a 15 µg/mL de polimixina B, em ambas as condições de cultivo, assim como do isolado Acb-1 após exposição também a 10 µg/mL de polimixina B em cultivo planctônico, e após o tratamento com todas as concentrações em biofilme. A partir desta observação, a integridade do antimicrobiano foi avaliada por meio de ensaio cromatográfico, o qual demonstrou que a polimixina B não sofreu degradação após 48 h em caldo LB (Tabela 3). A concentração mínima para inibir o crescimento do isolado Acb-1 utilizando o sobrenadante do cultivo de 48 h após a exposição a 15 µg/mL não apresentou alteração em relação ao valor inicial, também demonstrando não haver degradação do antimicrobiano. O fenótipo de persistência foi confirmado para todos os isolados, visto que as células remanescentes obtidas após 48 h de exposição à polimixina B, tanto em cultivo planctônico quanto em biofilme, não apresentaram alteração da CIM, permanecendo suscetíveis ao antimicrobiano quando cultivadas na presença da polimixina B.

Levando em consideração a importância da compreensão da persistência em *A. baumannii*, aliada aos resultados encontrados após a exposição de *A. baumannii* à polimixina B, o isolado Acb-1 foi submetido à análise proteômica por meio de nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Para tanto, o Acb-1 foi analisado em ambas as condições de cultivo após a exposição a 15 µg/mL de polimixina, com o intuito de verificar possíveis mecanismos moleculares envolvidos na

formação e manutenção deste fenótipo. Entretanto, a análise dos dados referentes a este ensaio ainda não foi completamente concluída.

Referências

1. Bigger J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet*. 1944;244(14):497-500.
2. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:357-72.
3. Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol*. 2010;192(23):6191-9.
4. Fauvart M, De Groote VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol*. 2011;60(6):699-709.
5. Barth VC, Rodrigues BÁ, Bonatto GD, Gallo SW, Pagnussatti VE, Ferreira CAS, et al. Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2013;8(12):e84361.
6. Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Pyocyanin stimulates quorum sensing-mediated tolerance to oxidative stress and increases persister cell populations in *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun*. 2014;82(8):3417-25.
7. Gallo SW, Donamore BK, Pagnussatti VE, Ferreira CA, de Oliveira SD. Effects of meropenem exposure in persister cells of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*. *Future Microbiol*. 2017;12:131-40.
8. Hagihara M, Housman ST, Nicolau DP, Kuti JL. *In vitro* pharmacodynamics of polymyxin B and tigecycline alone and in combination against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):874-9.
9. Cheah SE, Li J, Tsuji BT, Forrest A, Bulitta JB, Nation RL. Colistin and polymyxin B dosage regimens against *Acinetobacter baumannii*: differences in activity and the emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(7):3921-33.
10. Razavi Nikoo H, Ardebili A, Mardaneh J. Systematic review of antimicrobial resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates in Iran: an update. *Microb Drug Resist*. 2017; doi: 10.1089/mdr.2016.0118.

11. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):2070-4.
12. Giamarellou H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(6):614-21.
13. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, et al. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3074-82.
14. Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbial Infect.* 2007;13(12):1199-1201.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI document M07-A9 (2012).
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100-S24 (2014).
17. Tsai IL, Sun HY, Chen GY, Lin SW, Kuo CH. Simultaneous quantification of antimicrobial agents for multidrug-resistant bacterial infections in human plasma by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2013;116:593-603.

Tabela 1. Caracterização dos isolados de *Acinetobacter baumannii* quanto ao material clínico de origem, à Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a polimixina B e à intensidade de biofilme formado.

Isolado	Material clínico	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Intensidade de biofilme
Acb-1	Aspirado traqueal	1	Fraca
Acb-4	Urina	1	Fraca
Acb-8	Escarro	0,5	Fraca
Acb-13	Hemocultura	0,5	Moderada
Acb-20	Aspirado traqueal	1	Forte

Tabela 2. Frações de células *persisters* apresentadas por isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* após 48 h de exposição a 15 $\mu\text{g/mL}$ de polimixina B, em cultivo planctônico e biofilme.

Isolado	Fração de células <i>persisters</i> (%)	
	Cultivo planctônico	Biofilme
Acb-1	0,0041	11,1382
Acb-4	0,0257	10,3597
Acb-8	0,0025	9,2654
Acb-13	0,0414	14,4673
Acb-20	0,1251	17,4657

Tabela 3. Determinação da concentração de polimixina B por cromatografia de ultra eficiência, logo após a adição do antimicrobiano ao cultivo (0 h), bem como após a exposição por 6, 12, 18, 24 e 48 h a 15 µg/mL, em fase exponencial tardia de *Acinetobacter baumannii* (Acb-1).

Tempo de exposição (h)	Concentração (µg/mL)
0	16,2
6	13,8
12	14,9
18	14,9
24	18,9
48	18,4

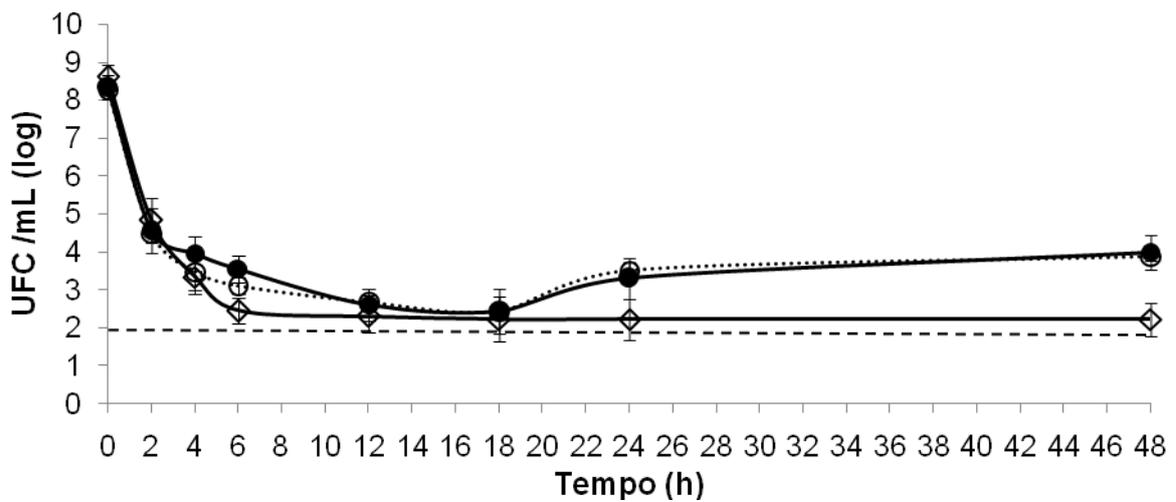


Figura 1. **Curvas de morte de *Acinetobacter baumannii* após a exposição a diferentes concentrações de polimixina B em cultivo planctônico.** Acb-1 foi cultivado até o final da fase exponencial e exposto a 10 µg/mL (●), 15 µg/mL (○) e 30 µg/mL (◇) de polimixina B (10, 15 e 30 vezes a MIC, respectivamente) por 48 h. Nos intervalos de 2, 4, 6, 12, 18, 24 e 48 h, alíquotas foram removidas para a determinação da fração de células sobreviventes.

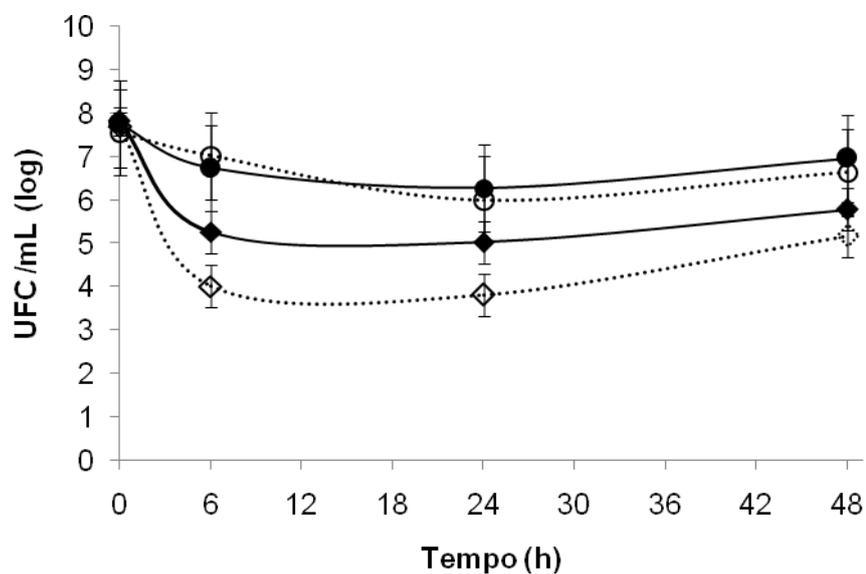


Figura 2. **Curvas de morte de *Acinetobacter baumannii* após a exposição a diferentes concentrações de polimixina B em condição de biofilme.** Acb-1 foi cultivado como biofilme e exposto a 10 µg/mL (●), 15 µg/mL (○), 30 µg/mL (◆) e 100 µg/mL (◇) de polimixina B (10, 15, 30 e 100 vezes a MIC, respectivamente) por 48 h. Nos intervalos 6, 24 e 48 h, alíquotas foram removidas para a determinação da fração de células sobreviventes.

Capítulo 4

Artigo Científico 2

Combination of polymyxin B and meropenem eradicates *Acinetobacter baumannii* persister cells

Stephanie W. Gallo,¹ Carlos Alexandre S. Ferreira¹ and Sílvia Dias de Oliveira^{1*}

¹PUCRS, Faculdade de Biociências, Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author: silviadias@pucrs.br

Artigo científico submetido ao periódico *Journal of Medical Microbiology* (fator de impacto: 2.269 - JCR 2015, publicado pela *Microbiology Society*).

Capítulo 5

Artigo Científico 3

Proteins differentially expressed in *Acinetobacter baumannii* persists after exposure to meropenem

Stephanie W. Gallo,[†] Antonio F. M. Pinto,[‡] Diógenes Santiago Santos,[‡] Cristiano V. Bizarro,[‡] Carlos Alexandre S. Ferreira,[†] and Sílvia D. de Oliveira^{*†}

[†]Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

[‡]Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* Corresponding author: silviadias@pucrs.br

Artigo científico a ser submetido ao periódico *Journal of Proteome Research* (fator de impacto: 4.173 - JCR 2015), publicado pela *American Chemical Society*.

Capítulo 6

Considerações finais

6.1 Considerações finais

Patógenos pertencentes ao complexo ACB estão comumente associados a severas infecções (5-8), as quais tem proporcionado elevadas taxas de morbidade e mortalidade em hospitais e outras unidades de saúde (11-13). A presença de células *persisters* pode estar associada ao insucesso da terapia destas infecções, principalmente as crônicas e recorrentes (73, 74), sendo especialmente importantes em biofilmes (62, 86). Desta forma, este trabalho avaliou a capacidade de isolados clínicos de ACB em apresentar células *persisters* em cultivos planctônicos e em biofilmes, frente à exposição ao meropenem e/ou à polimixina B, bem como buscou a compreensão dos mecanismos moleculares possivelmente envolvidos na persistência neste patógeno frente à exposição ao meropenem por meio de análise proteômica.

Os ensaios de persistência mostraram que todos os isolados de ACB apresentaram células *persisters* após a exposição a diferentes concentrações de meropenem, em ambas as condições de cultivo. Células *persisters* em *A. baumannii* já haviam sido descritas previamente após exposição a outros antimicrobianos (68), sugerindo que a capacidade de apresentar estas células está amplamente disseminada entre os isolados nosocomiais do complexo ACB, podendo ser formadas estocasticamente ou em decorrência ao estresse ocasionado pela exposição aos antimicrobianos proporcionada pelo ambiente hospitalar, o que constitui uma estratégia de sobrevivência destes microrganismos (56, 58).

Além disso, elevada heterogeneidade nas frações de *persisters* foi observada entre os isolados quando cultivados em biofilme e em fase exponencial tardia. As frações encontradas na condição de biofilme foram mais elevadas quando comparadas

às obtidas em cultivo planctônico, o que corrobora com dados reportados em outras espécies bacterianas (62, 86). Entretanto, esta relação nunca havia sido verificada em ACB. Estes achados podem estar associados à menor eficácia do meropenem em atuar em biofilme, uma vez que as células nesta condição de cultivo encontram-se, em sua maioria, em estado de não replicação ou com baixa taxa de multiplicação (23). Assim como podem estar relacionados com a presença de moléculas sinalizadoras do sistema *quorum sensing* (88-90) ou a outras moléculas e/ou substâncias poliméricas extracelulares, as quais podem participar na regulação positiva da formação de células *persisters* em condições de superpopulação, uma vez que não foi observada correlação entre os níveis de células *persisters* e a biomassa dos biofilmes.

Os resultados obtidos neste trabalho também demonstraram que o aumento na concentração de meropenem não influenciou a fração de *persisters* após 48 h de exposição, assim como o emprego do regime de dose pulso não foi capaz de alterar os níveis de *persisters* quando comparado com uma única exposição ao antimicrobiano, indicando que o aumento nas concentrações de meropenem testadas pode não ser capaz de proporcionar maior eficácia ao tratamento. Além disso, não foi observada correlação entre os valores de CIM e as frações de *persisters*, corroborando com dados já reportados em *A. baumannii* frente à exposição à polimixina B e tobramicina (68).

Assim como observado após a exposição ao meropenem, elevada variabilidade nas frações de *persisters* foi verificada entre os isolados de *A. baumannii* expostos à polimixina B em condição de biofilme e em fase exponencial tardia, o que também foi descrito por Barth Jr. e colaboradores (68) após a exposição de cultivos de *A. baumannii* em fase estacionária, a este mesmo antimicrobiano. Entretanto, o tratamento com polimixina B foi capaz de eliminar a maior parte da população celular em fase exponencial, apresentando níveis mais baixos quando comparado aos obtidos após

exposição ao meropenem. Da mesma forma como reportado para o outro antimicrobiano, frações mais expressivas de *persisters* foram detectadas em biofilme após exposição à polimixina B. Diferentemente do que foi observado com a exposição ao meropenem, foi verificada uma possível relação entre a fração de células *persisters* obtida após 48 h de tratamento e a concentração empregada, uma vez que a exposição a concentrações mais elevadas proporcionou redução nos níveis de *persisters*. O fenótipo de persistência após a exposição à polimixina B foi confirmado para todos os isolados e a possibilidade de presença de mutantes resistentes foi excluída, bem como a polimixina B mostrou estar ainda íntegra após 48 h em caldo LB. Entretanto, foi observada a retomada de crescimento bacteriano a partir de 24 h de exposição, indicando possíveis alterações celulares que possam implicar na tolerância ao antimicrobiano associada à multiplicação celular. Neste contexto, com o intuito de verificar possíveis mecanismos moleculares envolvidos na formação e manutenção do fenótipo de persistência em *A. baumannii*, bem como compreender os motivos relacionados à retomada de crescimento observada após exposição à polimixina B, *persisters* oriundas do cultivo do isolado Acb-1 em fase exponencial e biofilme foram submetidas à análise proteômica. Entretanto, os resultados deste experimento ainda não foram completamente analisados.

A dificuldade imposta pela presença de células *persisters* para o sucesso no tratamento antimicrobiano, a variabilidade de mecanismos possivelmente envolvidos na persistência bacteriana e a heterogeneidade observada nas frações de células *persisters* obtidas em isolados de uma mesma espécie frente à exposição a um determinado antimicrobiano, têm tornado a erradicação das células *persisters* bastante desafiadora, o que tem levado à busca de novas estratégias que atendam a este objetivo (141-143). Neste contexto, este trabalho também avaliou o efeito da combinação de polimixina B e meropenem em diferentes concentrações na erradicação de células *persisters* de *A.*

baumannii, demonstrando que as combinações compostas por concentrações mais elevadas, assim como as combinações em que a concentração de polimixina B era maior que a concentração de meropenem, foram capazes de erradicar as células *persisters* de *A. baumannii* em fase exponencial tardia, o que não foi observado quando estes antimicrobianos foram utilizados individualmente, destacando o efeito bactericida sinérgico destes antimicrobianos. A partir destes resultados, também se pode observar que a combinação destes dois antimicrobianos, em todas as concentrações testadas, não permitiu a retomada de crescimento bacteriano observada após 24 h de exposição somente à polimixina B.

A análise proteômica apresentou diferentes padrões de expressão entre as *persisters* de *A. baumannii* provenientes de cultivo planctônico e de biofilme, após a exposição ao meropenem, bem como ao longo do tempo em uma mesma condição, sugerindo que a regulação do fenótipo de tolerância antimicrobiana neste patógeno seja mediada por mecanismos distintos. A superexpressão de proteínas envolvidas nos processos de divisão celular e replicação de DNA foi especialmente observada em *persisters* oriundas de cultivos em fase exponencial tardia, corroborando com as imagens da microscopia eletrônica de varredura obtidas para condição de cultivo, que apresentaram células em divisão após diferentes tempos de exposição ao meropenem. Dentro do contexto de *persisters* serem metabolicamente ativas, propusemos que pelo menos parte da energia necessária para a célula seja oriunda da transferência de elétrons da reação catalisada por GDH para a cadeia respiratória, uma vez que foi verificado o aumento de expressão de GDH, NDH-1, succinato desidrogenase e ATP sintase. Da mesma forma, o processo de transcrição parece estar aumentado nas *persisters* de Acb-1, possivelmente relacionada à reprogramação celular para formação e/ou manutenção do fenótipo de persistência. Por outro lado, a síntese protéica parece estar reduzida, uma

vez que muitas proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, assim como os principais fatores de alongação apresentaram expressão diminuída em células *persisters*, mesmo que muitas proteínas tenham sido identificadas com expressão aumentada. Além disso, os dados obtidos também demonstraram aumento na expressão de várias proteínas relacionadas à membrana, embora proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos tenham apresentado expressão reduzida. Estes resultados sugerem possíveis alterações na composição e função das membranas entre células *persisters* regulares, bem como entre as *persisters* obtidas dentre os diferentes tempos de exposição ao meropenem e às diferentes condições de cultivo.

Os resultados obtidos a partir da realização deste trabalho mostraram a capacidade dos isolados de ACB em apresentar células *persisters* após a exposição ao meropenem e à polimixina B, especialmente em condição de biofilme, o que pode contribuir para a falha do tratamento de infecções crônicas e recorrentes. Entretanto, também pode-se observar que Acb-1 apresentou comportamentos distintos quando exposto isoladamente ao meropenem ou à polimixina B, bem como quando exposto concomitantemente a estes fármacos. Assim, conclui-se que cada antimicrobiano pode ter atuado como um diferente estressor, possivelmente, levando à ativação de mecanismos de tolerância diferenciados entre as *persisters*, o que possibilitou a sua erradicação quando os fármacos foram combinados. Desta forma, estes dados fortalecem a necessidade de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na formação e manutenção do fenótipo de persistência em ACB, bem como de conhecer mais aprofundadamente a fisiologia das células *persisters* de isolados pertencentes a este complexo, a fim de facilitar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes, capazes de eliminarem as células *persisters*, proporcionando sucesso no tratamento antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21:538-82.
2. Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. [s.d.]. <http://www.bacterio.net/acinetobacter.html> (acessado em 24 de fevereiro de 2017).
3. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Urisng J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol. 1991;29:277-82.
4. Hsieh WS, Wang NY, Feng JA, Weng LC, Wu HH. Types and prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in Northern Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:201-4.
5. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect. 2005;11:868-73.
6. Moon C, Kwak YG, Kim BN, Kim ES, Lee CS. Implications of postneurosurgical meningitis caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Infect Chemother. 2013;19:916-9.
7. Quartin AA, Scerpella EG, Puttagunta S, Kelt DH. A comparison of microbiology and demographics among patients with healthcare-associated, hospital-acquired, and ventilator-associated pneumonia: a retrospective analysis of 1184 patients from a large, international study. BMC Infect Dis. 2013;13:561-6.
8. Simonetti A, Ottaiano E, Diana MV, Onza C, Triassi M. Epidemiology of hospital-acquired infections in an adult intensive care unit: results of a prospective cohort study. Ann Ig. 2013;25:281-9.
9. Murray CK, Hospenthal DR. Treatment of multidrug resistant *Acinetobacter*. Curr Opin Infect Dis. 2005;18:502-6.
10. De Vos D, Pirnay J-P, Bilocq F, Jennes S, Verbeken G, Rose T, et al. Molecular epidemiology and clinical impact of *Acinetobacter calcoaceticus*-*baumannii* complex in a Belgian burn wound center. PLoS One. 2016;11:e0156237.
11. Perez F, Ponce-Terashima R, Adams MD, Bonomo RA. Are we closing in on an “elusive enemy”? The current status of our battle with *Acinetobacter baumannii*. Virulence. 2011;2:86-90.
12. Davis JS, McMillan M, Swaminathan A, Kelly JA, Piera KE, Baird RW, et al. A 16-year prospective study of community-onset bacteremic *Acinetobacter* pneumonia: low mortality with appropriate initial empirical antibiotic protocols. Chest. 2014;146:1038-45.

13. Martins N, Picão RC, Adams-Sapper S, Riley LW, Moreira BM. Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:698-701.
14. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter-baumannii*. *PLoS Genet.* 2006;2:e7.
15. Park YK, Choi JY, Jung SI, Park KH, Lee H, Jung DS, et al. Two distinct clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64:389-95.
16. Post V, White PA, Hall RM. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1162-70.
17. Maraki S, Mavros MN, Kofteridis DP, Samonis G, Falagas ME. Epidemiology and antimicrobial sensitivities of 536 multi-drug-resistant Gram-negative bacilli isolated from patients treated on surgical wards. *Surg Infect (Larchmt).* 2012;13:326-31.
18. Stefani S, Dowzicky MJ. Assessment of the activity of tigecycline against gram-positive and Gram-negative organisms collected from Italy between 2012 and 2014, as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T). *Pharmaceuticals (Basel).* 2016;9: pii:E74.
19. Toledo PVM, Arend LN, Pilonetto M, Costa Oliveira JC, Luhm KR. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. *J Hosp Infect.* 2012;80:351-3.
20. Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control.* 2012;40:108-12.
21. Gilad J, Carmeli Y. Treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter* species. *Drugs.* 2008;68:165-89.
22. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis.* 2010;51:79-84.
23. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4943-60.
24. He C, Xie Y, Zhang L, Kang M, Tao C, Chen Z, et al. Increasing imipenem resistance and dissemination of the ISAbal-associated *bla*-OXA23 gene among *Acinetobacter baumannii* isolates in an intensive care unit. *J Med Microbiol.* 2011;60:337-41.

25. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39:105-14.
26. Lee YT, Fung CP, Wang FD, Chen CP, Chen TL, Cho WL. Outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex harboring different carbapenemase gene-associated genetic structures in an intensive care unit. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012;45:43-51.
27. Huang G, Yin S, Xiang L, Gong Y, Sun K, Luo X, et al. Epidemiological characterization of *Acinetobacter baumannii* bloodstream isolates from a Chinese burn institute: a three-year study. *Burns*. 2016;42:1542-47.
28. Warner WA, Kuang SN, Hernandez R, Chong MC, Ewing PJ, Fleischer J, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from two hospitals outbreaks in Los Angeles County, California, USA. *BMC Infect Dis*. 2016;16:194-206.
29. Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH. Molecular characterisation of the metallo-beta-lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32:475-80.
30. Peymani A, Nahaei MR, Farajnia S, Hasani A, Mirsalehian A, Sohrabi N, et al. High prevalence of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Tabriz, Iran. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64:69-71.
31. Jiang W, Liu H, Zhong M, Yang YC, Xiao DW, Huang WF. Study on the resistant genes to carbapenems and epidemiological characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Microb Drug Resist*. 2013;19:117-23.
32. Al Atrouni A, Hamze M, Jisr T, Lemarié C, Eveillard M, Joly-Guillou ML, et al. Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. *Int J Infect Dis*. 2016;52:29-36.
33. Maspi H, Mahmoodzadeh Hosseini H, Amin M, Imani Fooladi AA. High prevalence of extensively drug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing clinical *Acinetobacter baumannii* in Iran. *Microb Pathog*. 2016;98:155-9.
34. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1333-41.
35. Al-Sweih NA, Al-Hubail MA, Rotimi VO. Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. *J Chemother*. 2011;23:13-6.
36. Hagihara M, Housman ST, Nicolau DP, Kuti JL. In vitro pharmacodynamics of polymyxin B and tigecycline alone and in combination against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:874-9.

37. Clausell A, Garcia-Subirats M, Pujol M, Busquets MA, Rabanal F, Cajal Y. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. *J Phys Chem B*. 2007;111:551-63.
38. Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM, Weiss DS. Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:5642-9.
39. Cornelis P, Wei Q, Andrews SC, Vinckx T. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics*. 2011;3:540-9.
40. Nwugo CC, Gaddy JA, Zimble DL, Actis LA. Deciphering the iron response in *Acinetobacter baumannii*: a proteomics approach. *J Proteomics*. 2011;74:44-58.
41. Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, Collins JJ. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*. 2007;3:91-105.
42. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 2007;130:797-810.
43. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 2014;67:147-51.
44. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung SI, Park KH, Kang CI, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:1163-7.
45. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:351-2.
46. Haeili M, Ghodousi A, Nomanpour B, Omrani M, Feizabadi MM. Drug resistance patterns of bacteria isolated from patients with nosocomial pneumonia at Tehran hospitals during 2009-2011. *J Infect Dev Ctries*. 2013;7:312-7.
47. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41:11-9.
48. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, et al. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *MBio*. 2014;5:e00963-13.

49. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45:568-85.
50. Beceiro A, Moreno A, Fernández N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:518-26.
51. Girardello R, Visconde M, Cayô R, Figueiredo RC, Mori MA, Lincopan N, et al. Diversity of polymyxin resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87:37-44.
52. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:161-8.
53. Xavier BB, Lammens C, Ruhul R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill*. 2016;21: doi: 10.2807/1560-7917.
54. Zurfluh K, Poirel L, Nordmann P, Nüesch-Inderbilen M, Hächler H, Stephan R. Occurrence of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in river water and imported vegetable samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:2594-5.
55. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:4971-7.
56. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004;305:1622-5.
57. Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*. 2013;154:1140-50.
58. Kussell E, Kishony R, Balaban NQ, Leibler S. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics*. 2005;169:1807-14.
59. Bigger J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet*. 1944;244:497-500.
60. Lebeaux D, Chauhan A, Létoffé S, Fischer F, de Reuse H, Beloin C, et al. pH-mediated potentiation of aminoglycosides kills bacterial persisters and eradicates *in vivo* biofilms. *J Infect Dis*. 2014;210:1357-66.

61. Gayoso CM, Mateos J, Méndez JÁ, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, et al. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* 2014;13:460-76.
62. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol.* 2001;183:6746-51.
63. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2004;186:8172-80.
64. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3839-46.
65. Van Acker H, Sass A, Bazzini S, De Roy K, Udine C, Messiaen T, et al. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. *PLoS One.* 2013;8:e58943.
66. Keren I, Minami S, Rubin E, Lewis K. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. *MBio.* 2011;2:e00100-11.
67. Ren H, He X, Zou X, Wang G, Li S, Wu Y. Gradual increase in antibiotic concentration affects persistence of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:3267-72.
68. Barth VC, Rodrigues BÁ, Bonatto GD, Gallo SW, Pagnussatti VE, Ferreira CAS, et al. Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One.* 2013;8:e84361.
69. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:48-56.
70. Lechner S, Lewis K, Bertram R. *Staphylococcus aureus* persisters tolerant to bactericidal antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2012;22:235-44.
71. Hofsteenge N, van Nimwegen E, Silander OK. Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 2013;13:25-35.
72. Stewart B, Rozen DE. Genetic variation for antibiotic persistence in *Escherichia coli*. *Evolution.* 2012;66:933-9.
73. Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol.* 2010;192:6191-9.
74. Fauvart M, De Groote VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol.* 2011;60:699-709.

75. Moyed HS, Bertrand KP. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol.* 1983;155:768-75.
76. Wolfson JS, Hooper DC, McHugh GL, Bozza MA, Swartz MN. Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:1938-43.
77. Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010;64:357-72.
78. Levin BR, Rozen DE. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:556-62.
79. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:167-93.
80. Pavithara D, Doble M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants-issues and prevention. *Biomed Mater.* 2008;3:034003.
81. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:95-108.
82. Walters MC 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:317-23.
83. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.* 2004;279:54881-6.
84. Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;211:121-33.
85. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:107-31.
86. Shapiro JA, Nguyen VL, Chamberlain NR. Evidence for persisters in *Staphylococcus epidermidis* RP62a planktonic cultures and biofilms. *J Med Microbiol.* 2011;60:950-60.
87. Nguyen D, Joshi-datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science.* 2011;334:982-6.
88. Möker N, Dean CR, Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J Bacteriol.* 2010;192:1946-55.

89. Leung V, Lévesque CM. A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *J Bacteriol.* 2012;194:2265-74.
90. Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Pyocyanin stimulates quorum sensing-mediated tolerance to oxidative stress and increases persister cell populations in *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun.* 2014;82:3417-25.
91. Spoering AL, Vulic M, Lewis K. GlpD and PlsB participate in persister cell formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2006;188:5136-44.
92. Hansen S, Lewis K, Vulic M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2718-26.
93. Paul BJ, Barker MM, Ross W, Schneider DA, Webb C, Foster JW, et al. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell.* 2004;118:311-22.
94. Paul BJ, Berkmen MB, Gourse RL. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:7823-8.
95. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. Persister: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 2006;6:53-61.
96. Kwan BW, Valenta JA, Benedik MJ, Wood TK. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:1468-73.
97. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. *App Environ Microbiol.* 2013;79:7116-21.
98. Szabo A, Langer T, Schröder H, Flanagan J, Bukau B, Hartl FU. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:10345-9.
99. Muffler A, Traulsen DD, Lange R, Hengge-Aronis R. Posttranscriptional osmotic regulation of the sigma(s) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1996;178:1607-13.
100. Yura T, Nakahigashi K. Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:153-8.
101. Viducic D, Ono T, Murakami K, Susilowati H, Kayama S, Hirota K, et al. Functional analysis of *spoT*, *relA*, and *dksA* genes on quinolone tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under nongrowing condition. *Microbiol Immunol.* 2006;50:349-57.

102. Verstraeten N, Knapen WJ, Kint CI, Liebens V, van den Bergh B, Dewachter L, et al. O₂ and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance. *Mol Cell*. 2015;59:9-21.
103. Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*. 2016;354:pii:aaf4268.
104. Mechold U, Potrykus K, Murphy H, Murakami KS, Cashel M. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:6175-89.
105. Hauryliuk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13:298-309.
106. Kanjee U, Ogata K, Houry WA. Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. *Mol Microbiol*. 2012;85:1029-43.
107. Arfin SM, Long AD, Ito ET, Toller L, Riehle MM, Paegle ES, et al. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J Biol Chem*. 2000;275:29672-84.
108. Preobrajenskaya O, Boullard A, Boubrik F, Schnarr M, Rouvière-Yaniv J. The protein HU can displace the LexA repressor from its DNA-binding sites. *Mol Microbiol*. 1994;13:459-67.
109. De Groote VN, Verstraeten N, Fauvart M, Kint CI, Verbeeck AM, Beullens S, et al. Novel persistence genes in *Pseudomonas aeruginosa* identified by high-throughput screening. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;297:73-9.
110. Gooderham WJ, Hancock RE. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33:279-94.
111. Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol*. 2008;10:2331-43.
112. Hong SH, Wang X, O'Connor HF, Benedik MJ, Wood TK. Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microb Biotechnol*. 2012;5:509-22.
113. Wu N, He L, Cui P, Wang W, Yuan Y, Liu S, et al. Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Front Microbiol*. 2015;6: e01003.
114. Wu Y, Vulic M, Keren I, Lewis K. Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:4922-6.

115. Pu Y, Zhao Z, Li Y, Zou J, Ma Q, Zhao Y, et al. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. *Mol Cell*. 2016;62:284-94.
116. Sala A, Bordes P, Genevoux P. Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxins (Basel)* 2014;6:1002-20.
117. Hayes CS, Sauer RT. Toxin-antitoxin pairs in bacteria: killers or stress regulators? *Cell*. 2003;112:2-4.
118. Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Rev Microbiol*. 2005;3:371-82.
119. Dörr T, Lewis K, Vulic M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet*. 2009;5:e1000760.
120. Dörr T, Vulic M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol*. 2010;8:e1000317.
121. Page R, Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol*. 2016;12:208-14.
122. Van Melderen L. GhoSTly bacterial persisters. *Nat Chem Biol*. 2012;8:812-3.
123. Schuster CF, Bertram R. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;340:73-85.
124. Zhang J, Zhang Y, Inouye M. Characterization of the interactions within the mazEF addiction module of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2003;278:32300-6.
125. Jørgensen MG, Pandey DP, Jaskolska M, Gerdes K. HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J Bacteriol*. 2009;191:1191-9.
126. Tripathi A, Dewan PC, Siddique SA, Varadarajan R. MazF-induced growth inhibition and persister generation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2014;289:4191-205.
127. Correia FF, D'Onofrio A, Rejtar T, Li L, Karger BL, Makarova K, et al. Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2006;188:8360-7.
128. Schumacher MA, Piro KM, Xu W, Hansen S, Lewis K, Brennan RG. Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science*. 2009;323:396-401.
129. Vázquez-Laslop N, Lee H, Neyfakh AA. Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *J Bacteriol*. 2006;188:3494-7.

130. Kasari V, Mets T, Tenson T, Kaldalu N. Transcriptional cross-activation between toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 2013;13:45-57.
131. Christensen SK, Pedersen K, Hansen FG, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J Mol Biol.* 2003;332:809-19.
132. Pedersen K, Zavialov AV, Pavlov MY, Elf J, Gerdes K, Ehrenberg M. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell.* 2003;112:131-40.
133. Harrison JJ, Wade WD, Akierman S, Vacchi-Suzzi C, Stremick CA, Turner RJ, et al. The chromosomal toxin gene *yafQ* is a determinant of multidrug tolerance for *Escherichia coli* growing in a biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2253-8.
134. Kim Y, Wood TK. Toxins Hha and CspD and small DNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391:209-13.
135. Jurenaite M, Markuckas A, Suziedeliene E. Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2013;195:3165-72.
136. Ghafourian S, Good L, Sekawi Z, Hamat RA, Soheili S, Sadeghifard N, et al. The mazEF toxin-antitoxin system as a novel antibacterial target in *Acinetobacter baumannii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:502-5.
137. Wakamoto Y, Dhar N, Chait R, Schneider K, Signorino-Gelo F, Leibler S, et al. Dynamic persistence of antibiotic-stress *mycobacteria*. *Science.* 2013;339:91-5.
138. Orman MA, Brynildsen MP. Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:3230-9.
139. Conlon BP, Rowe SE, Gandt AB, Nuxoll AS, Donegan NP, Zalis EA, et al. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat Microbiol.* 2016;16051: doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.51.
140. Day T. Interpreting phenotypic antibiotic tolerance and persister cells as evolution via epigenetic inheritance. *Mol Ecol.* 2016;25:1869-82.
141. Conlon BP, Nakayasu ES, Fleck LE, LaFleur MD, Isabella VM, Coleman K, et al. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature.* 2013;503:365-70.
142. Sharma B, Brown AV, Matluck NE, Hu LT, Lewis K. *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme Disease, forms drug-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:4616-24.

143. Fleck LE, North EJ, Lee RE, Mulcahy LR, Casadei G, Lewis K. A screen for validation of prodrug antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:1410-9.
144. Kirstein J, Hoffmann A, Lilie H, Schmidt R, Rübsamen-Waigmann H, Brötz-Oesterhelt H, et al. The antibiotic ADEP reprogrammes ClpP, switching it from a regulated to an uncontrolled protease. *EMBO Mol Med.* 2009;1:37-49.
145. Sass P, Josten M, Famulla K, Schiffer G, Sahl HG, Hamoen L, et al. Antibiotic acyldepsipeptides activate ClpP peptidase to degrade the cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:17474-9.