

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
ACINETOBACTER BAUMANNII E PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES
ENVOLVIDOS NESSE PROCESSO.**

CHRISTINE GARCIA BIERHALS

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Dezembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
ACINETOBACTER BAUMANNII E PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES
ENVOLVIDOS NESSE PROCESSO.**

CHRISTINE GARCIA BIERHALS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente
como um dos requisitos para a
obtenção do Grau de Mestre em
Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Dezembro de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Bierhals, Christine Garcia

Avaliação da capacidade de formação de biofilme por *Acinetobacter baumannii* e perfil transcricional de genes envolvidos nesse processo. / Christine Garcia Bierhals. -- 2012.

101 f.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Coorientador: Jeverson Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. biofilme. 3. qRT-PCR. 4. expressão gênica. I. Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. Frazzon, Jeverson, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram para a realização desse trabalho. Em especial aos meus pais, Bel e Renato, que sempre incentivaram minha educação, me encorajando quando o cansaço e o desânimo prevaleciam e me ajudando a definir e a atingir as metas profissionais e por sempre confiarem em mim. Pelos sacrifícios empregados em minha educação. Agradeço também, todo amor, todos os conselhos, todos os ensinamentos de vida e por todo exemplo, de pessoas batalhadoras, corretas e justas, que ajudaram a formar meu caráter.

Ao Dr. Gustavo P. Riboldi, meu namorado, que me ajudou em todos os passos desse trabalho me passando seus conhecimentos com muita paciência, me dando todo o suporte necessário. Agradeço também por todo amor, apoio, companheirismo, dedicação, compreensão e por torcer pelo meu sucesso. Ao Gustavo o meu muito obrigado, sem ele esse trabalho dificilmente se realizaria.

A toda família Pelicioli Riboldi, pelo carinho nessa etapa e ao Dr. João Riboldi, pelas ajudas estatísticas.

À minha orientadora Prof. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon, pela disponibilidade, paciência e por todos os ensinamentos passados. Ao meu co-orientador Prof. Dr. Jeverson Frazzon que me guiou nos primeiros passos na pesquisa, me passando os conhecimentos necessários, agradeço por toda confiança, incentivo e compreensão.

Agradeço a todos participantes dos laboratórios Bioquímica de Microrganismos (ICTA), LBMV (CBiot), 164 da microbiologia (ICBS) e LCGP (UFCSPA), principalmente aos professores, Dr. Giancarlo Pasquali e Dr. Pedro D'Azevedo por cederem suas instalações e equipamentos. Um muito obrigada, às minhas colegas de todos os laboratórios pela ajuda e por tornarem o mestrado muitas vezes mais divertido.

Aos bioquímicos dos laboratórios dos hospitais HCPA e HPS que cederam gentilmente as amostras para a realização desse trabalho.

À Dra. Jozi Fagundes de Mello pela ajuda nos passos iniciais desse projeto, à Dra. Luiza Abruzzi pelos ensinamentos moleculares e à minha colega e amiga querida Jaqueline Bequer Pinto.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul ao ICTA, ao Centro de Biotecnologia e ao Departamento de Microbiologia, pela estrutura e por oportunizar a realização desta pesquisa. Aos funcionários, professores e colegas da UFRGS. Ao CNPq, pelos recursos fomentados para a realização deste estudo.

Por fim, mas não menos importante, pela paciência de todas minhas amigas e família, pela compreensão de minha ausência e pelo apoio, carinho e palavras de conforto e incentivo transmitidas.

AValiação DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *ACINETOBACTER BAUMANNII* E PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES ENVOLVIDOS NESSE PROCESSO ¹

Autor: Christine Garcia Bierhals
Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon
Coorientador: Jeverson Frazzon

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista, geralmente resistente a muitos antimicrobianos, que causa surtos de infecções hospitalares. Assim, a sua habilidade de formar biofilme pode explicar a capacidade de sobreviver no ambiente hospitalar e em utensílios médicos. O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de duas cepas clínicas de *A. baumannii* obtido de hospitais de Porto Alegre, Brasil (abC e abH) e uma cepa controle ATCC 19606 (abA) formar biofilme e realizar a análise transcricional dos genes possivelmente envolvidos na produção e manutenção do biofilme: *bap*, *abal*, *ompA*, *bfmRS*, *csuAB*, *pgaA*, *pilZ*, *wspR*, *eal*, *eagg*, *IscRSU* e *csdA*. A capacidade de formação de biofilme foi avaliada pelo método cristal violeta em superfície plástica a 25°C e 37°C nos meios LB, LB + 1% glicose, urina pura e LB + 10% sangue de carneiro. A análise transcricional foi feita por *real time* PCR. As cepas AbH, AbC e AbA foram fortes formadoras de biofilme em LB e LB+glicose à 25 e 37°C. Em LB+sangue, as cepas AbH e AbA foram fortes formadoras e AbC foi fraca formadora de biofilme. Em urina, a cepa AbH foi moderadamente formadora, AbC e AbA foram fracas formadoras de biofilme. Os genes *wspR*, *pgaA*, *ompA*, *bap*, *abal* de AbA, *csdA* de AbH e o operon *IscRSU* foram superexpressos em biofilme; os genes *eagg* de AbH, *pilZ* e *csuAB* foram inibidos e os genes *bfmRS*, *eal*, *eagg* de AbA, *csdA* de AbA e *abal* de AbH não possuíram uma variação significativa na expressão durante o biofilme. Portanto, a regulação positiva dos genes *wspR*, *pgaA*, *ompA*, *bap*, *csdA* e do operon *IscRSU* é um indício de sua importância na formação e manutenção do biofilme por esse patógeno.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101 p.) Dezembro, 2012.

EVALUATION OF THE CAPACITY TO FORM BIOFILM BY *ACINETOBACTER BAUMANNII* AND TRANSCRIPTIONAL PROFILING OF GENES INVOLVED ON THIS PROCESSES ²

Author: Christine Garcia Bierhals

Supervisor: Ana Paula Guedes Frazzon

Co-supervisor: Jeverson Frazzon

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen which causes a wide range of nosocomial infections, being usually multiresistant to drugs. Their ability to form biofilm can explain the feature of surviving inside hospital environment and on medical devices. The aim of the present study was to evaluate the ability of two clinically isolated MDR *A. baumannii* strain, obtained from a general hospital of Porto Alegre, RS, Brazil (AbH and AbC), and the reference ATCC 19606 strain (AbA), to form biofilm and to analyze the relative expression of genes putatively involved in biofilm formation: *bap*, *abal*, *ompA*, *bfmRS*, *csuAB*, *pgaA*, *pilZ*, *wspR*, *eal*, *eagg*, *IscRSU* e *csdA*. The biofilm formation capability was evaluated by the crystal-violet staining method on plastic surfaces at 25°C and 37°C using the broth LB, LB + 1% glucose, pure urine and LB + 10% sheep blood. The transcriptional profiling of the genes was analyzed through real time PCR methodologies. The strains AbH, AbC e AbA were strong biofilm producers in LB e LB+glucose at 25 and 37°C. In the broth LB+blood, the strains AbH and AbA were strong biofilm producers and AbC was weak biofilm producer. In urine, the strain AbH was moderate producer, AbC and AbA were weak biofilm producers. The genes *wspR*, *pgaA*, *ompA*, *bap*, *abal* from AbA, *csdA* from AbH and the operon *IscRSU* were overexpressed in biofilm; the genes *eagg* de AbH, *pilZ* e *csuAB* were suppressed and the genes *bfmRS*, *eal*, *eagg* from AbA, *csdA* from AbA e *abal* from AbH did not vary their expression significantly during the biofilm condition. In conclusion, the factors *wspR*, *pgaA*, *ompA*, *bap*, *csdA* and of the operon *IscRSU*, that were positively regulated, appear to have an important role during the process of biofilm formation by *A. baumannii*.

²Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (101 p.) December, 2012.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Objetivo Geral	3
1.2 - Objetivos Específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 - Gênero <i>Acinetobacter</i>	4
2.2- Importância Clínica	5
2.3 - Biofilme	8
2.4 - Formação de biofilme por <i>A. baumannii</i>	12
2.5 - Regulação da formação de biofilme em <i>A. baumannii</i>	14
2.5.1 - Proteína Bap	15
2.5.2 - Proteína Abal	16
2.5.3 - Proteína OmpA	16
2.5.4 - Proteínas CsuABCDE e BfmRS	18
2.5.5 - Proteínas PgaABCD	20
2.5.6 - Proteínas ferro-enxofre (IscR, IscS, IscU e CsdA)	21
2.5.7 - Proteínas responsáveis pelo metabolismo da guanosina monofosfato dimérica cíclica (c-di-GMP)	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 - Amostras Bacterianas	28
3.2 - Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	29
3.3 - Ensaio de biofilme em microplaca de poliestireno	29
3.3.1 - Suspensão Bacteriana	29
3.3.2 - Ensaio de biofilme	30
3.4 - Análise transcricional dos genes envolvidos na formação de biofilme	31

3.4.1 - Extração de RNA Total	31
3.4.2 - Síntese de cDNA	33
3.4.3 - PCR quantitativo em tempo real (<i>real time</i> PCR)	33
3.4.4 - Análise das expressões relativas	36
3.5 - Análise estatística	37
3.6 - Extração DNA Total	37
3.7 - Amplificação e clonagem do gene <i>wspR</i>	38
3.8 - Sequenciamento	40
4. RESULTADOS	41
4.1 - Caracterização das cepas de <i>Acinetobacter</i>	41
4.2 - Perfil de Suscetibilidade	42
4.3 - Formação de Biofilme	42
4.4 - Análise Transcricional	43
4.5 - Análise genotípica do gene <i>wspR</i>	49
5. DISCUSSÃO	52
5.1 - Amostras Bacterianas	52
5.2 - Biofilme	54
5.3 - Análise transcricional dos genes envolvidos na formação e manutenção do biofilme de <i>A. baumannii</i>	57
5.3.1 - Proteínas responsáveis pelo metabolismo da guanosina monofosfato dimérica cíclica (c-di-GMP)	57
5.3.2 - Proteínas responsáveis pelo pili, CsuAB e sistema de transdução de sinal com dois componentes BfmRS	60
5.3.3 - Proteínas PgaA, Bap e Abal	62
5.3.4 - Fator de virulência OmpA	64
5.3.5 - Proteínas ferro-enxofre (IscR, IscS e IscU)	65
6. CONCLUSÕES	68
7. PERSPECTIVAS	70
8. REFERÊNCIAS	71
9. ANEXO	90

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Sequência dos <i>primers</i> utilizados na análise transcricional por RT-qPCR com os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação.....	34
TABELA 2 Sequência dos <i>primers</i> testados como normalizadores para a análise transcricional por RT-qPCR com os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação.....	35
TABELA 3 Sequência dos <i>primers sense</i> e <i>antisense</i> utilizados para amplificar o gene <i>wspR</i> de <i>Acinetobacter</i>	39
TABELA 4 Análise de suscetibilidade aos antimicrobianos analisados de acordo com o CLSI (2012) das amostras de <i>A. baumannii</i>	43
TABELA 5 Valores de estabilidade dos genes testados como constitutivos analisado pelo programa NormFinder.....	46

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Estágios da formação de biofilme bacteriano.....	9
FIGURA 2	BfmR/S regula o início da maturação do biofilme	20
FIGURA 3	Sistema Regulador IscR	22
FIGURA 4	Modelo de associação do grupamento Fe-S na proteína IscU e transferência do cofator para apoproteínas	24
FIGURA 5	Estrutura e funções fisiológicas de c-di-GMP	26
FIGURA 6	Mapa do plasmídio pCR-Blunt	40
FIGURA 7	Produto da amplificação por PCR dos cDNAs produzidos utilizando os <i>primers</i> do gene <i>16SrRNA</i> em gel agarose 1% corado com brometo de etídio.....	45
FIGURA 8	Perfil transcricional dos genes <i>wspR</i> , <i>eal</i> , <i>eagg</i> , <i>pilZ</i> , <i>pgaA</i> , <i>ompA</i> , <i>bap</i> , <i>abal</i> , <i>bfmRS</i> , <i>csuAB</i> , <i>iscRSU</i> e <i>csdA</i> durante a formação de biofilme bacteriano	49
FIGURA 9	Produto de amplificação do gene <i>wspR</i> (1,23 Kb) de <i>Acinetobacter baumannii</i> em gel agarose 1% corado com brometo de etídio.....	50
FIGURA 10	Clivagem do recombinante pCRBlunt:: <i>wspR</i> clivado com as endonucleases de restrição <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> em gel agarose 1% corado com brometo de etídio.....	51
FIGURA 11	Alinhamento do fragmento seqüenciado e traduzido com a sequência de aminoácidos do gene <i>wspR</i> de <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978.....	52
FIGURA 12	Domínio conservado da proteína WspR – putative two-component response regulator, uma diguanilato ciclase de <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AbA: cepa ATCC 19606
AbC: cepa de *A. baumannii* fornecida pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre
AbH: cepa de *A. baumannii* fornecida pelo Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre
AHL: lactona N-acil-homosserina
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC: “American Type Culture Collection”
CDC: “Centers for Disease Control and Prevention”
c-di GMP: Guanosina monifosfato dimérica cíclica
cDNA: DNA complementar
CIP: ciprofloxacina
CRO: ceftriaxone
Ct: *threshold cycles*
CTAB: brometo de cetiltrimetilamonio
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DO: Densidade óptica
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPS: Substância Polimérica Extracelular
gene 16SrRNA: Gene da subunidade 16S do RNA ribossômico
gene abal: Gene da lactona N-acil-homosserina
gene bap: Gene da proteína associado ao biofilme
gene bfmR: Gene do regulador de resposta
gene bfmS: Gene da quinase sensora
gene csdA: Gene da proteína dessulfurase CsdA
gene CsuAB: Gene dos components do pili
gene eagg: Gene da possível proteína diguanilato ciclase e fosfodiesterase.
gene eal: Gene da possível proteína fosfodiesterase
gene gyrB: Gene da subunidade B da DNA girase
gene iscR: Gene do regulador da formação do cofactor [Fe-S]
gene iscS: Gene da dessulfurase da maquinaria Isc
gene iscU: Gene do arcabouço envolvido na formação do cofator [Fe-S]
gene ompA: Gene da proteína da membrana externa A
gene pgaA: Gene da poli-beta-N-acetilglicosamina
gene pilZ: gene da proteína efetora pilZ
gene rpoB: gene da RNA polimerase
gene rpoD: gene da RNA polimerase
gene wspR: gene da possível proteína regulado amplamente distribuída diguanilato ciclase
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPS: Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre
UTI: Unidade de Terapia Intensiva
Kb: Kilobases

M: marcador
MDR: resistência a multiplas drogas
mg: miligrama
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
mL: mililitros
mM: milimolar
ng: Nanogramas
pb: Pares de Bases
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico
PNAG: poli-N-acetilglicosamina
QS: *quorum sensing*
RNA: Ácido Ribonucleico
rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossomal
RS: Rio Grande do Sul
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
Tab.: Tabela
TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq polimerase: Enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*
TE: Tampão Tris-EDTA
TSI: Meio Triple Sugar Iron
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
µg: micrograma
µL: microlitro
µm: micrômetro
µM: micromolar
v.: Volume

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter spp. é um cocobacilo Gram negativo, que nas últimas décadas tem sido caracterizado como um importante patógeno nosocomial (Bergogneberezin & Towner, 1996). Infecções adquiridas em ambientes hospitalares causadas por *Acinetobacter* spp. envolvem principalmente o trato respiratório, trato urinário e feridas podendo progredir para septicemia. Este patógeno atinge especialmente pacientes severamente doentes internados em UTIs (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Possivelmente, uma das principais razões para a difusão e persistência dos surtos é a contaminação do ambiente hospitalar (Joseph *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, tem sido reportados inúmeros surtos de infecções hospitalares envolvendo *Acinetobacter* spp. multi-resistentes a antibióticos em diversas partes do mundo (D'Arezzo *et al.*, 2009; Dent *et al.*, 2010; Livermore *et al.*, 2010; Rosenthal *et al.*, 2010), e em alguns lugares cepas pan-resistentes tem sido identificadas (Valencia *et al.*, 2009), sendo o *Acinetobacter baumannii* a principal espécie associada. Na cidade de Porto Alegre, os primeiros relatos aconteceram no ano de 2004, e em 2008 foi constatado um surto causado por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (Breier & Martins, 2008; Ferreira AE *et al.*, 2011). *Acinetobacter baumannii* possui capacidade de sobreviver na maioria das superfícies ambientais (Jawad *et al.*, 1998; Schreckenberger *et al.*,

2007; Dijkshoorn *et al.*, 2007). A habilidade potencial desse patógeno de formar biofilme, pode explicar sua proeminente resistência a antibióticos e propriedades de sobrevivência (Tomaras *et al.*, 2003).

Os estudos sobre a formação de biofilme e sobre os genes responsáveis pela sua regulação têm aumentado, mas ainda pouco é conhecido. As proteínas até então identificadas e relacionadas com a formação de biofilme em *A. baumannii* são: Bap, Abal, Bla-_{PER1}, OmpA, CsuABCDE, BfmRS e PgaABCD (Gaddy & Actis, 2009).

Analisando o genoma de *A. baumannii*, foi verificada presença dos genes *wspR*, *eal*, *eagg* e *pilZ*. A proteína WspR, que possui domínio GGDEF com atividade diguanilato ciclase, forma um mensageiro secundário c-di-GMP que interfere nas funções de virulência aguda e inibe várias formas de motilidade, controlando a troca entre estilo de vida planctônico para a forma sésil em biofilme (D'Argenio *et al.*, 2002; Hengge, 2009). As proteínas com domínio EAL tem atividade de fosfodiesterase que clivam a molécula de c-di-GMP, cessando os sinais que influenciam na formação de biofilme, aumentando a motilidade das células, além de aumentar a virulência de bactérias patogênicas (Hisert *et al.*, 2005; Hengge, 2009; Branchu, *et al.*, 2012). A proteína EAGG, faz parte do grupo de proteínas que possui ambos os domínios EAL e GGDEF, provavelmente influenciando tanto na formação quanto na clivagem de c-di-GMP (Hengge, 2009). As proteínas com domínio PilZ interagem com c-di-GMP, sendo ativadas por essa molécula, e assim vão interagir com outras proteínas relacionadas com a motilidade e expressão de exopolissacarídeos (Hengge, 2009; Pratt *et al.*, 2007).

Além disso, *A. baumannii* possui o operon *iscRSU* e o gene *csdA* em seu genoma. As proteínas IscRSU são responsáveis pela formação do cofator [Fe-S], importante nas reações de oxirredução da célula. IscR é responsável pela regulação do operon, IscS é a cisteína dessulfurase que fornece enxofre para a formação do cofator - mesmo papel desempenhado por CsdA – e IscU realiza a união do ferro com o enxofre (Py & Barras, 2010). Ainda, a importância de IscS e IscU para formação de biofilme já foi verificada em *Escherichia coli* (Yun & Outten, 2008).

1.1 – Objetivo geral

Avaliar a capacidade de formação de biofilme por amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. em diferentes condições de crescimento, bem verificar a expressão dos genes envolvidos no processo.

1.2 – Objetivos específicos

A – Avaliar a capacidade de formação de biofilme de cepas de *Acinetobacter* spp. obtidas em hospitais da cidade de Porto Alegre, realizando experimentos *in vitro* em placas de poliestireno testando diferentes meios crescimento e temperaturas de 25 e 37°C;

B – Observar a diferença na expressão dos genes *wspR*, *eal*, *eagg*, *pilZ*, *bap*, *abal*, *ompA*, *csuAB*, *bfmRS*, *pgaABCD*, *iscR*, *iscS*, *iscU* entre as células de vida livre e as células do biofilme por PCR em tempo real (*real time* PCR).

C – Verificar a presença do gene *wspR* pela amplificação do gene, utilizando a técnica de PCR e posterior clonagem do produto da amplificação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Gênero *Acinetobacter*

O gênero *Acinetobacter* spp. é um cocobacilo Gram-negativo, aeróbio estrito, não-móvel, catalase positivo, oxidase negativo e não fermentador. São bactérias mesófilas, apresentando crescimento ótimo entre temperaturas de 20 e 35°C e crescem em meios de culturas complexos, como ágar nutriente e ágar triptona de soja, sem a necessidade da adição de fatores de crescimento. Geralmente apresentam colônias pequenas, às vezes mucóides, de forma arredondada, lisas, opacas e com coloração de amarelas pálidas a brancas acinzentadas (Bergogneberezin & Towner, 1996; Schreckenberger *et al.*, 2007).

As espécies de *Acinetobacter* spp. estão amplamente distribuídas na natureza. Podem formar parte da microbiota cutânea, podendo também ser encontradas na cavidade oral de adultos saudáveis, embora sua presença em pessoas não hospitalizadas seja normalmente baixa (Somervil & Noble, 1970; Griffith *et al.*, 2006).

No gênero *Acinetobacter* spp. há 25 genomoespécies (grupos com DNA homólogos), porém, somente 11 espécies foram nomeadas, entre elas o *Acinetobacter baumannii* (Schreckenberger *et al.*, 2007). Algumas espécies de

Acinetobacter spp. têm sido associadas em surtos de infecções adquiridas em ambientes hospitalares (IAAH) como *Acinetobacter* espécie genômica 3, *Acinetobacter* espécie genômica 13TU e *A. baumannii* (Dijkshoorn *et al.*, 1993; Dijkshoorn *et al.*, 2007; Tjernberg & Ursing, 2007; Wisplinghoff *et al.*, 2008; Van Den Broek *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010).

2.2 – Importância clínica

Acinetobacter spp. é geralmente considerado um microrganismo não patogênico em indivíduos saudáveis, mas pode causar infecções graves em indivíduos imunocomprometidos (Dijkshoorn *et al.*, 2007). A manifestação clínica causada por *A. baumannii* mais importante é a infecção respiratória em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (UTIs). A pneumonia adquirida na comunidade, fora do ambiente hospitalar, embora incomum, também ocorre atingindo principalmente pacientes idosos, com alguma doença crônica. Esse patógeno também pode causar bacteremia, meningites, infecções urinárias e infecções em feridas. Ainda há relatos de neonatos internados em UTIs que adquiriram infecção por *A. baumannii* resultando em bacteremia (Litzow *et al.*, 2009; Howard *et al.*, 2012). O uso de cateteres, tubos endotraqueais, ventilação mecânica, a presença de doenças malignas, traumas e queimaduras, parecem estar entre os fatores de predisposição (Cisneros e Rodriguez-Bano, 2002; Ressler *et al.*, 2008; Romanelli *et al.*, 2009).

Até o momento, existem poucos fatores de virulência conhecidos para *Acinetobacter* spp. Dentre os quais podemos citar: a) a presença de uma cápsula polissacarídica formada de L-ranose, D-glicose, e D-manose que torna a superfície das linhagens mais hidrofílicas; b) fímbrias, que permitem a

bactéria se aderir às células epiteliais humanas; c) a produção de endotoxina *in vivo*, sendo esta possivelmente responsável pelos sintomas da doença observados durante septicemia e d) a presença da proteína OmpA na membrana externa com efeito citotóxico (Smith *et al.*, 1990; Echenique *et al.*, 1992; Actis *et al.*, 1993; Bergogneberezin & Towner, 1996; Leone *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2011; Howard *et al.*, 2012).

Na ocasião da ocorrência de surtos, por exemplo, os pacientes infectados com *Acinetobacter* spp. geralmente apresentam colonização da pele, possuindo um papel importante na contaminação das mãos da equipe hospitalar durante a manipulação do paciente, e assim contribuindo com a difusão e persistência dos surtos pela co-transmissão entre os indivíduos (Markogiannakis *et al.*, 2008; Barchitta *et al.*, 2009; Joseph *et al.*, 2010). Além disso, uma das características deste gênero, que tem chamado atenção, é a sua capacidade de sobreviver na maioria das superfícies ambientais, uma vez que este tem sido isolado de surtos a partir de diversos locais no ambiente hospitalar, incluindo cama, cortina, mobília e equipamentos hospitalares (Roberts *et al.*, 2001; Van Den Broek *et al.*, 2006; Barchitta *et al.*, 2009; Kohlenberg *et al.*, 2009). Uma provável explicação para sua persistência ambiental e para a reincidência das infecções pode estar vinculada à sua capacidade de formação de biofilme.

A capacidade que esse microrganismo possui de adquirir resistência aos antimicrobianos usualmente utilizados na terapêutica é um sério problema de saúde pública, pois torna o tratamento das infecções extremamente difícil. A resistência aos agentes antimicrobianos pode ser mediada por diferentes

mecanismos como: modificações dos sítios alvos, inativação enzimática (β -lactamases, oxacilinases), bombas de efluxo ativo e diminuição do influxo de drogas (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Antes da década de 70, as infecções causadas por *A. baumannii* eram tratadas com os antibióticos aminoglicosídeos, β -lactâmicos e tetraciclina. Com o aumento das cepas resistentes a esses antimicrobianos, os carbapenêmicos têm sido a terapia de escolha para o tratamento. Atualmente há o surgimento de cepas resistentes aos carbapenêmicos (AbMDR), restando poucas opções terapêuticas como colistina e polimixina B (Kempf, *et al.* 2012).

Numerosos estudos descrevem a ocorrência de AbMDR em todo mundo (Dent *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Kulah *et al.*, 2010; Livermore *et al.*, 2010; Wadl *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2012; Landman *et al.*, 2012; Mataseje *et al.*, 2012) e em alguns lugares cepas pan-resistentes (resistentes a todos antimicrobianos) foram identificadas (Valencia *et al.*, 2009; Kempf *et al.*, 2012; Marais *et al.*, 2012). As infecções por AbMDR estão associadas com o aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes internados (Falagas & Karveli, 2007; Lee *et al.*, 2012).

No Brasil, as infecções começaram a ser relatadas a partir da década de 90. Atualmente diversos surtos de infecções hospitalares envolvendo AbMDR têm sido descritas, causando grande preocupação aos profissionais de saúde ao redor do país e ocasionando a interdição de algumas UTIs (Levin *et al.*, 1996; Sader *et al.*, 2001; Furtado *et al.*, 2011; Toledo *et al.*, 2012). Em Porto Alegre, o primeiro relato de caso de infecção por AbMDR ocorreu em 2004, e até o ano de 2008 mais de 500 casos foram detectados,

envolvendo surtos em 16 hospitais (Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2012). Em 2010, o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) fechou por 72 horas, a UTI Neonatal devido à presença da bactéria *Acinetobacter* spp. (<http://www.radioguaiba.com.br/Noticias/?Noticia=231305>).

2.3 – Biofilme

Biofilmes são populações bacterianas inclusas em uma matriz, aderidas umas às outras e/ou às superfícies (Costerton *et al.*, 1995). Eles se desenvolvem preferencialmente em superfícies inertes, ou em tecidos mortos (Costerton *et al.*, 1978), mas estes também podem se formar em tecidos vivos.

O desenvolvimento do biofilme pode ser dividido em pelo menos quatro estágios: i) ligação reversível; ii) ligação irreversível; iii) maturação e iv) desprendimento (Figura 1). As células que se desligam do biofilme retornam ao modo planctônico de crescimento, fechando o ciclo de desenvolvimento do biofilme. Bactérias em cada estágio do biofilme são fisiologicamente distintas das células em outros estágios. Esses processos não são necessariamente sincronizados em todo biofilme, mas são geralmente localizados de modo que a qualquer momento uma pequena área na superfície possa conter biofilme em cada estágio de desenvolvimento (Stoodley *et al.*, 2002).

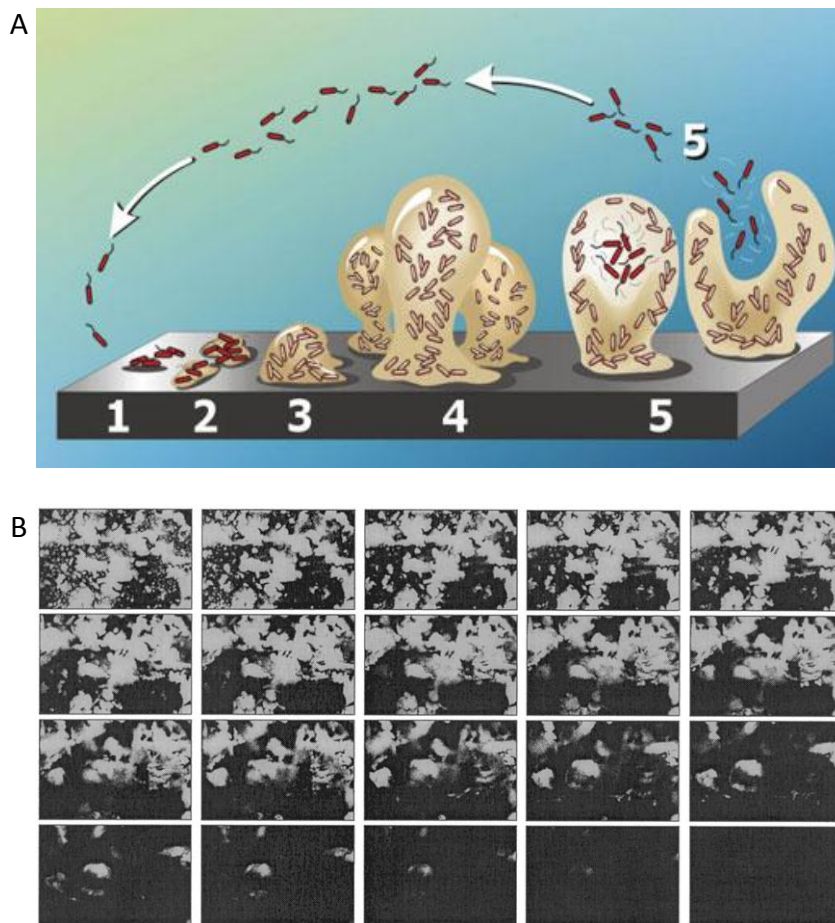


Figura 1: (A) Estágios da formação do biofilme bacteriano: 1) ligação reversível inicial; 2) ligação irreversível; 3 e 4) maturação e 5) dispersão (Adaptada de [MBW:Role of Biofilm Matrix in Structural Development](#)). (B) Série de imagens cofocais de um biofilme tiradas de diferentes profundidades da base do biofilme canto superior esquerdo, até o top, canto direito inferior (Adaptada de Lewandowski, 2000).

Condições externas desencadeiam alterações na expressão de um subconjunto de genes requeridos para a formação do biofilme. Quando inseridas no biofilme, as células bacterianas expressam genes em um padrão que difere profundamente daquele verificado na vida planctônica (Sauer *et al.*, 2002). Dentre eles, verificam-se fatores envolvidos em processos de metabolismo celular, tradução gênica, transporte de membrana e/ou regulação gênica (Whiteley *et al.*, 2001; Stoodley *et al.*, 2002). Mesmo em biofilmes que

apresentem uma única espécie bacteriana, suas células são heterogêneas com respeito à expressão gênica devido a limitações de difusão dentro do biofilme, resultando em variação local do pH, disponibilidade e concentração de nutrientes e oxigênio que modificam a superfície do substrato (Jefferson, 2004).

Os biofilmes contêm substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que circundam as bactérias residentes. Essa característica o diferencia das bactérias que simplesmente se ligam a substratos. O EPS microbiano pode ser altamente diverso na composição química e pode incluir proteínas substituíveis ou insubstituíveis, polissacarídeos, ácidos nucleicos e fosfolipídeos (Stoodley *et al.*, 2002). Ele confere às bactérias resistência a forças de cisalhamento e fagocitose por células inflamatórias e aos antibióticos (Jefferson, 2004).

Após a adesão irreversível, com consequente produção de EPS, ocorre à maturação do biofilme resultando na geração de uma arquitetura complexa com canais, poros, e redistribuição de bactérias longe do substrato (Davies *et al.*, 1998). As bactérias formam estruturas tipo pilares, com canais por onde a água pode transportar os nutrientes para seu interior, o que mantém as células individuais em condições ótimas em muitos locais no biofilme, e também por onde os resíduos saem, como um sistema circulatório primitivo, que demonstram um grande nível de diferenciação. Um biofilme geralmente é composto por uma camada de superfície de cerca de 10 µm de espessura, com pilares que se estendem em até 200 µm acima. A principal consequência dessa arquitetura é que os nutrientes são entregues profundamente na comunidade complexa (Stoodley *et al.*, 2002). Outra característica das

bactérias em um biofilme é a comunicação célula-a-célula, ou do inglês *quorum sensing* (QS), o qual permite as bactérias coordenarem suas atividades e agruparem-se nessas comunidades que as beneficiam (Stickler & Morris, 1998; Kjelleberg & Molin, 2002).

Portanto, sua estrutura permite que os organismos consigam sobreviver em ambientes até então hostis às células bacterianas. Dessa forma, conseguem suportar privação de nutrientes, mudanças de pH, radicais de oxigênio, desinfetantes e antibióticos melhor que as células planctônicas (Stoodley *et al.*, 2002). Como consequência as células bacterianas se perpetuam nos ambientes onde estão fixados por um longo período, se a limpeza não for devidamente realizada.

Além disso, a natureza crônica de certas infecções pode ser consequência do desenvolvimento de um biofilme (Costerton *et al.*, 1999; Jefferson, 2004). Os especialistas do centro de controle e prevenção de doenças, do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos EUA estimam que 65% das infecções bacterianas envolvam biofilme (Lewis, 2007). No Brasil, a ANVISA ciente da relevância da formação de biofilme como fonte de infecções hospitalares, lançou um Informe Técnico nº 01/09 com Princípios Básicos para Limpeza de Instrumentos Cirúrgicos em Serviços de Saúde. Estudos demonstraram que em hospitais brasileiros a ventilação mecânica também é um importante fator de risco possivelmente pelo biofilme aderido, além dos biofilmes formados em cateter venoso central (Camargo, *et al.*, 2005; Storti *et al.*, 2007; Antunes *et al.*, 2010).

As células bacterianas sésseis liberam antígenos e estimulam a produção de anticorpo, mas os anticorpos não são eficientes em matar as bactérias no biofilme (Cochrane *et al.*, 1988). Dessa forma, infecções por biofilme são raramente resolvidas pelas defesas do hospedeiro, mesmo em indivíduos imunocompetentes. Assim, a terapia antimicrobiana reverte os sintomas causados pelas células planctônicas liberadas do biofilme, mas falha em erradicar o biofilme. Por essa razão infecções causadas por biofilme geralmente mostram sintomas recorrentes, após ciclos de terapia com antimicrobiano, até que a população séssil seja cirurgicamente removida do corpo (Costerton *et al.*, 1999).

2.4 – Formação de biofilme por *Acinetobacter baumannii*

A capacidade de formar biofilme pode explicar a proeminente resistência a antibióticos e propriedades de sobrevivência ambiental de *A. baumannii*. Algumas publicações mostraram que isolados clínicos dessa bactéria são capazes de se aderir e formar estruturas de biofilme em superfícies abióticas como vidro (Vidal *et al.*, 1996) e plástico (Tomaras *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007), havendo uma ligação entre a formação de biofilme e a capacidade de se aderir a células epiteliais humanas (Lee *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Gaddy *et al.*, 2009). Um acréscimo na produção de biofilme é observado quando as células se encontram em meio mínimo com quelante de ferro, assim como aglomerados mais densos foram observados na superfície líquido-ar (Tomaras *et al.*, 2003; Martí *et al.*, 2011).

A formação de biofilme em instrumentos médicos fornece um nicho para a bactéria, a partir dos quais elas podem colonizar pacientes e dar origem a

bacteremias ou infecções do trato respiratório (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Isolados clínicos de *A. baumannii* demonstraram sua habilidade de sobreviver em condições de dessecação em superfícies abióticas (Gaddy & Actis, 2009), e resistir à desinfecção (Rajamohan *et al.*, 2009). King *et al.* (2009) encontraram uma associação entre a produção de biofilme e resistência sérica. Parece haver alguma interação entre esses fatores, que pode ser o fato da resistência sérica ajudar a bactéria a formar quantidade de biofilme abundante, uma vez que sobrevive na presença da resposta imune do hospedeiro; ou as substâncias secretadas para formar biofilme, como o EPS, podem contribuir para resistência.

Dentre os mecanismos de resistência aos antimicrobianos do biofilme bacteriano, podemos citar: 1) a possibilidade do EPS do biofilme agir como um adsorvente, reduzindo a quantidade de antibiótico dentro do biofilme; 2) a estrutura do biofilme age como uma barreira de penetração; 3) o biofilme bacteriano aumenta a expressão dos genes que codificam as bombas de efluxo na parede celular e 4) à presença de uma subpopulação bacteriana dormente e agrupada a qual é protegida da morte induzida por antibióticos (Gaddy & Actis, 2009).

A relação entre a capacidade de formação de biofilme e as cepas AbMDR é controversa. Alguns estudos demonstraram que isolados clínicos de AbMDR apresentavam uma elevada capacidade para formar biofilme, havendo uma associação significativa entre multirresistência e o biofilme (Shin *et al.*, 2008; Rao *et al.* 2008), fato que dificultaria muito o tratamento dos pacientes e a desinfecção ambiental para coibir os surtos por AbMDR. Por outro lado,

outros estudos constataram que amostras sensíveis a antibióticos foram maiores produtores de biofilme, do que as linhagens resistentes a drogas, sendo ainda observado um significativo decréscimo na formação de biofilme em linhagens resistentes a certos tipos de antimicrobianos, como a colistina. Além disso, não foi verificada correlação entre a produção de biofilme e a gravidade da doença, somente observou-se um aumento na produção de biofilme com o tempo de infecção no paciente (Wroblewska *et al.*, 2008; King *et al.*, 2009).

2.5 – Regulação da formação de biofilme em *Acinetobacter baumannii*

Até o momento, pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos na regulação da produção do biofilme em *A. baumannii*. Dentre as proteínas relacionadas à formação de biofilme em microrganismos, destacam-se as seguintes: *Biofilm-associated protein* (Bap), *Autoinducer synthase* (Abal), *Bla_{-PER1}*, *Outer membrane protein A* (OmpA), *Chaperone-usher pli assembly system* (CsuABCDE), *Poly- β -1,6-N-acetylglucosamine producer* (PgaABCD) e Proteína Diguanilato Ciclase (Gaddy e Actis, 2009) .

Estudos relataram uma série de proteínas que apresentam um aumento na expressão durante a formação de biofilme. Dentre as proteínas mais expressas em células do biofilme estão: a NAD- malatodesidrogenase (MDH), TonB-dependente, enzima tipo I aminoglicosídeo acetiltransferase (responsáveis pela resistência a antibióticos) e exonuclease III. As proteínas relacionadas à sinalização celulares mais expressas foram: Aldo/ceto redutase e uma histidina quinase sensora que é parte de um sistema de transdução de sinal com dois componentes (TCSTS). Dentre as proteínas expressas somente

nas células do biofilme destacaram-se: UDP-galactose 4-epimerase (GalE), N-acetilmuramoil-L-alanina amidase, e a proteína diguanilato ciclase contendo também um domínio EAL (associado com atividade fosfodiesterase), uma diguanilato ciclase somente com o domínio GGDEF, e um domínio PAS que age como sensor de luz, oxigênio, redox. (Galperin, 2004; Shin *et al.*, 2009).

2.5.1 – Proteína Bap

Membros da família das proteínas associadas com a formação de biofilme (Bap) são definidos como proteínas de alto peso molecular que estão presentes na superfície da bactéria e conferem a ela a capacidade de formar biofilme. As Bap foram primeiramente descritos em *Staphylococcus aureus* e depois foram detectados em outros estafilococos coagulase negativos como *S. epidermidis* (Lasa & Penadés, 2006).

Assim como em estafilococos, a Bap de *A. baumannii* é uma proteína de superfície de 8621 aminoácidos, 854 KDa e homóloga à proteína Bap primeiramente descrita em *S. aureus*. Segundo estudo realizado por Loehfelm *et al* (2008) ela possui uma estrutura similar às adesinas bacterianas, estando envolvida na ligação às células de epitélio bronquial humano normal e células natural *killer* humanas normais *in vitro*, porém não está envolvida na internalização ou invasão às células. Nesse estudo, os autores também observaram que Bap pode funcionar como uma adesina intercelular sendo possível se ligar a outras proteínas Bap ou realizar ligações com carboidratos, de maneira a suportar a integridade da estrutura madura do biofilme de *A. baumannii* em poliestireno. Desse modo possui importância no

desenvolvimento e maturação do biofilme, porém não tem função nas fases iniciais de aderência às superfícies abióticas (Loehfelm *et al.*, 2008).

2.5.2 – Proteína Abal

As bactérias estão frequentemente envolvidas em atividades coordenadas dentro do biofilme. Bactérias Gram-negativas produzem N-acil homoserinas lactonas (AHSL) como moléculas sinalizadoras do sistema regulatório *quorum sensing* – mecanismo regulatório que permite a bactéria fazer decisões coletivas com respeito à expressão de genes específicos, podendo ser genes envolvidos na formação de biofilme e virulência (Bassler, 1999; Gonzalez *et al.*, 2009; Anbazhagan *et al.*, 2012). O AHSL pode ainda controlar genes essenciais para colonização de eucariotos em várias espécies bacterianas (Consterton *et al.*, 1999).

O gene de uma sintase autoindutora de uma linhagem de *A. baumannii*, designado *abal*, direciona a produção de sinais de uma AHL (Niu *et al.*, 2008). A mutação de *abal* levou a formação de biofilme com estrutura anormal e até a inibição da formação do biofilme, demonstrando que a produção de AHL direcionada por Abal é requerida para uma formação de biofilme eficiente (Niu *et al.*, 2008; Anbazhagan *et al.*, 2012)

2.5.3 – Proteína OmpA

A proteína da membrana externa A (OmpA) é uma proteína estrutural transmembrana e a mais abundante da membrana externa de *A. baumannii*, sendo também um potencial fator de virulência. OmpA de *A. baumannii* (AbOmpA) confere integridade celular e, por ser uma porina, aumenta a permeabilidade a pequenos solutos. A AbOmpA é uma porina

relativamente impermeável e contribui para sua resistência antimicrobiana intrínseca, pois é parte da família de proteínas que serve de canal para os β -lactâmicos (Choi *et al.*, 2005, Choi *et al.*, 2008).

A proteína AbOmpA também induz a morte de células dendríticas, responsável pela iniciação e está envolvida na regulação da resposta imune adaptativa, prejudicando a ação das células T e assim inibindo a lise bacteriana pelo complemento (Lee *et al.*, 2007). Isso ocorre via alvo mitocondrial, induzindo ROS o qual, induzido por estímulos externos, contribui para morte celular apoptótica e necrótica (Lee *et al.*, 2010). Sendo o alvo predominante da imunidade humoral, OmpA recombinante seria constituinte efetivo para uma vacina imunogênica, protegendo contra infecções letais, induzindo anticorpos quando administrado como imunização passiva (Luo *et al.*, 2012).

Estudos tem demonstrado a grande influencia de AbOmpA nas vesículas da membrana externa (OMV). As vesículas são secretadas naturalmente por bactérias Gram-negativas durante o crescimento e são compostas por lipopolissacarídeos (LPS), proteínas e fosfolipídios originários do espaço periplasmático e da membrana externa. São observadas em uma variedade de ambientes, inclusive tecidos infectados onde tem um papel na entrega de toxinas e fatores de virulência as células hospedeiras e a indução da resposta imune. Foi demonstrado que AbOmpA empacotada na OMV é responsável pela morte celular do hospedeiro. O domínio periplasmático C-terminal de AbOmpA interage com o peptidoglicano sugerindo que ela pode modular a biogênese de OMVs, pois a ligação entre as proteínas da membrana externa e o peptidoglicano são diretamente responsáveis pela produção de

OMV (Moon *et al.*, 2012). A deficiência de OmpA aumenta a produção de OMV e aumenta sua concentração de LPS. Assim pode-se deduzir que *A. baumannii* secreta OmpA via OMV já que essa é proteína mais abundante associada com OMV (Kwon *et al.*, 2009).

O trabalho de Gaddy *et al* (2009) demonstra que AbOmpA tem um papel parcial na formação de biofilme em plástico e que é absolutamente requerida para a ligação a células epiteliais, processos que são independentes da produção do pili mediado pelas proteínas CsuABCDE. A proteína OmpA provou ser essencial para a habilidade do *A. baumannii* se ligar a superfícies bióticas assim como aquelas representadas em células epiteliais alveolares humanas. Essa proteína tem também um papel na produção de compostos citotóxicos desconhecidos que demonstraram ser sensíveis ao calor e a protease (Gaddy *et al.*, 2009).

2.5.4 – Proteínas CsuABCDE e BfmRS

Estudos demonstraram que *A. baumannii* possui o operon *csuABCDE*, que codifica proteínas com funções requeridas para a montagem do filme e formação de biofilme. Os produtos previstos para os genes *csuC* e *csuD* estão relacionados a proteínas chaperonas necessárias a secreção de proteínas ancoradas pela membrana externa e envolvidos na montagem do pili em outras bactérias, respectivamente. Esse tipo de sistema de secreção de proteínas está envolvido na montagem de uma variedade de estruturas de superfície que tem um papel na interação entre células bacterianas e superfícies abióticas e bióticas (Dorsey *et al.*, 2002).

Tomaras *et al* (2003) confirmaram a presença da estrutura pili-*like* na superfície do *A. baumannii* e as caracterizaram como essenciais para as primeiras etapas do processo que gera a formação de estruturas de biofilme em superfícies plásticas. Ainda, constataram que *csuC* e *csuE* pertencem a um grupamento de genes relacionados com o *locus* bacteriano que codifica a produção de pili e que *csuA* e *csuB* parecem codificar a maioria das subunidades do pili produzido. Entretanto, a produção desse tipo de apêndice não está correlacionado com a quantidade e tipo de biofilme formado por diferentes isolados clínicos em superfícies de plástico e vidro (McQueary & Actis, 2011).

Histidina quinase sensora é parte de um sistema de transdução de sinal com dois componentes (TCSTS) sendo uma interface de comunicação onipresente distribuído em bactérias. A TSCSTS permite respostas adaptativas a uma ampla variedade de estímulos ambientais (Shin *et al.*, 2009). Tomaras *et al.* (2008) caracterizaram um TCSTS de *A. baumannii* ATCC19606, a qual foi nomeado operon *bfmRS*, no qual *bfmS* codifica uma quinase sensora e *bfmR* codifica um regulador de resposta responsável por continuar a tradução de sinais quando é fosforilado por *bfmS* o que permite que *bfmS* se ligue a elementos promotores de genes alvos. Esse estudo constatou que essas proteínas controlam a expressão do operon *csu* e a montagem do pili, controlando dessa forma a formação de biofilme e a morfologia celular. A proteína BfmRS regula a transição da iniciação da formação de biofilme para a maturação do biofilme em *P. aeruginosa*, sendo fosforilada após 24-72h, a ausência dessa proteína leva a uma redução da biomassa e espessura do

biofilme, possuindo importância em manter a estrutura do biofilme (Figura 2) (Petrova e Sauer, 2009).

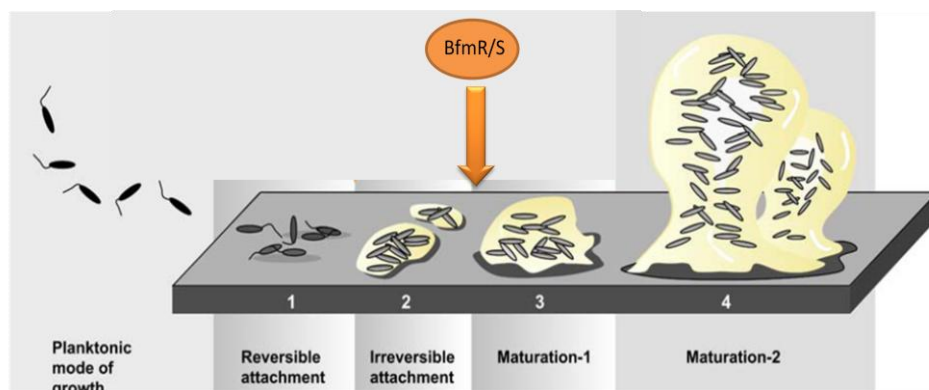


Figura 2: BfmR/S regula o início da maturação do biofilme (Fonte: adaptado de Petrova & Sauer, 2009)

2.5.5 – Proteínas PgaABCD

O Poly- β -1,6-N-acetilglicosamina (PNAG) é um homopolímero, originalmente descrito em *Staphylococcus epidermides* (Mack *et al.*, 1996), sendo após identificado em *Escherichia coli* (Cerca *et al.*, 2007; Sloan *et al.*, 2007; Vuong *et al.*, 2004). O PNAG é um dos polissacarídeos mais importantes que compõe a matriz polimérica externa do biofilme, visto que a integridade da estrutura do biofilme geralmente depende desse polissacarídeo (Itoh *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009).

A expressão do PNAG é controlada pelo operon *pgaABCD*. Esse operon está presente em uma variedade de bactérias e parece ser parte de um locus obtido através de mecanismos genéticos de transferência horizontal (Wang *et al.*, 2004). As proteínas PgaC e PgaD são elementos necessários para a biossíntese de PNAG, enquanto PgaB é uma N-desacetilase cuja

atividade catalítica, junto com PgaA, é necessária para exportar PNAG do periplasma, em *E. coli* (Itoh *et al.*, 2008; Boehm *et al.*, 2009).

2.5.6 – Proteínas ferro-enxofre (IscR, IscS, IscU)

Analisando o genoma de *A. baumannii* verifica-se a presença de proteínas relacionadas à montagem dos cofatores [Fe-S]: o operon *isc* (*iscRSU*). O IscR é o regulador da via Isc de formação e associação do cofator [Fe-S] em bactérias. Esta proteína possui três resíduos de cisteínas essenciais e, algumas bactérias também possuem um resíduo de glutamina na porção N-terminal, necessária para a ligação do cofator, sendo este resíduo o quarto ligante. Quando IscR está preenchida com o cofator [2Fe-2S] (holo-IscR) ela inibe a expressão dos genes *iscSU*, se ligando aos sítios I no promotor *isc*. Quando há pouco cofator associado a proteína IscR(apo-IscR) (IscR não ligado) este não se liga ao sítio I do promotor *isc* permitindo a expressão de *iscSU* e conseqüentemente um aumento na demanda do cofator (Crack *et al.*, 2012; Ayala-Castro *et al.*, 2008; Py & Barras, 2010).

É proposto que em baixas concentrações de Fe e/ou estresse, a expressão de *iscR* é ativada, resultando em um aumento significativo de holo-IscR acarretando na ativação do operon *suf* - um diferente sistema de síntese de cofator [Fe-S] presente em *E. coli* - pela regulação de seu promotor (Figura 3). Entretanto, em *A. baumannii* o sistema *suf* não foi observado, ficando o sistema *isc* responsável, aparentemente, pela maioria da formação dos cofatores [Fe-S] na célula (Ayala-Castro *et al.*, 2008).

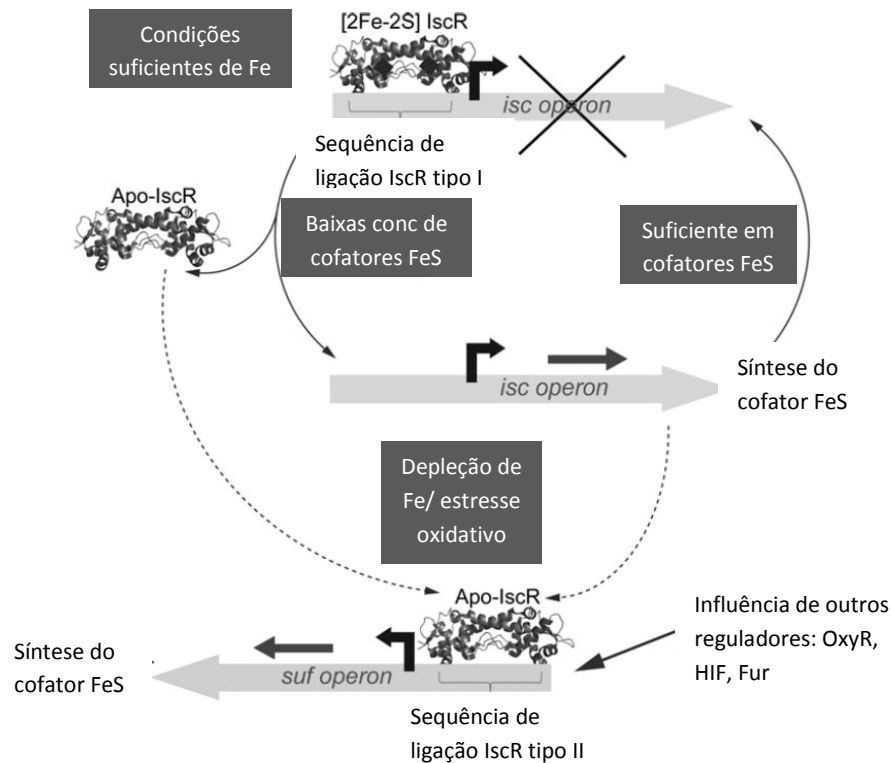


Figura 3: Sistema regulador do IscR (Adaptado de: Crack *et al.*,2012).

A proteína IscS é uma cisteína desulfurase dependente de piridoxal fosfato (PLP) que fornece o enxofre ao cofator [Fe-S]. IscS utiliza L-cisteína como substrato para formar L-alanina e enxofre que é liberado na forma de persulfato, impedindo que o enxofre seja liberado na forma solúvel. *Acinetobacter*, além de IscS, também possuem outra cisteína desulfurase: CsdA, que pode ajudar na formação do cofator [Fe-S] quando uma alta demanda é requerida, mas também pode participar na via da transferência de enxofre para outras moléculas dependentes, como a formação de tiamina. As sequências de proteínas de IscS e csdA diferem principalmente em duas sequências consenso, em torno do sítio ativo com resíduos de cisteína no

domínio C-terminal. A forma que o ferro é entregue ao complexo ainda não está clara (Ayala-Castro *et al.*, 2008; Py & Barras, 2010).

A proteína IscU possui três cisteínas e uma histidina que funcionam como arcabouço para a formação e associação do cofator [Fe-S], e ainda a presença do ácido aspártico próximo a Cys1 que funciona como um ligante transitente necessário para deixar acessível o cofator [Fe-S] ligado à proteína alvo. IscU interage com a cisteína desulfurase e a fonte de Fe, provendo um ambiente químico e estrutural que facilita a formação do cofator [Fe-S] e o transfere aos alvos apropriados. Primeiro, um [2Fe-2S] se formam por homodímero de IscU, o qual pode ser transferido para [2Fe-2S] apoenzimas. Depois de alguns ciclos de adição de ferro e enxofre, a forma [2Fe-2S] pode ser modificada para conter dois [2Fe-2S] por dímero e os dois [2Fe-2S] podem se unir para formar a forma [4Fe-4S] que é capaz de ser transferido para apoenzimas [4Fe-4S] (Figura 4). Embora essa reação não seja reversível a presença de oxigênio converte a forma [4Fe-4S] de volta a forma [2Fe-2S], indicando que a forma [4Fe-4S] seja improvável de ser mantida sob condições de estresse oxidativo (Ayala-Castro *et al.*, 2008; Py & Barras, 2010).

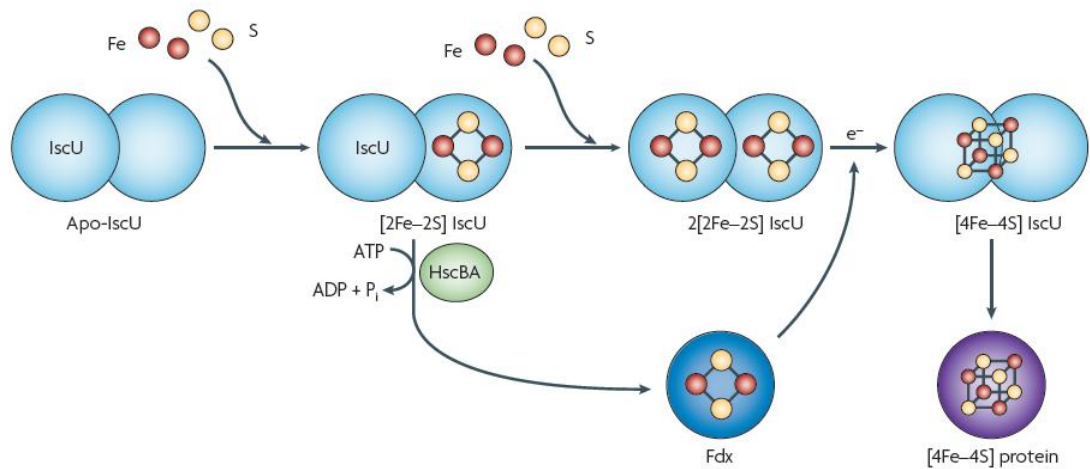


Figura 4: Modelo de associação do grupamento Fe-S na proteína IscU e transferência do cofator para apoproteínas (Fonte: Py e Barras, 2010).

Cofatores [Fe-S] estão entre os mais ancestrais cofatores presentes em proteínas. Presentes em todos os organismos vivos, os cofatores [Fe-S] tem função proeminente em múltiplos processos celulares, como a respiração, metabolismo central, regulação gênica, modificações no RNA e reparo e replicação do DNA (Crack *et al.*, 2012).

A sensibilidade desses cofatores a espécies reativas de oxigênio, íons superóxidos, peróxido de hidrogênio e espécies reativas de nitrogênio permitem que ele funcione como sensor em situações de estresse oxidativo. Sua importância parte do princípio de sua versatilidade estrutural e reatividade química, flexibilidade nos papéis que tem de transferência e armazenamento de elétrons na catálise química redox e não redox. Atingem vários estados oxirredução, podendo atingir potenciais redox muito baixo e então reduzir substratos redox-resistentes (catálise redox); permite que pequenos compostos se liguem a sítios férricos acessíveis com extensíveis propriedades de ácido de Lewis (catálises não redox) (Py & Barras, 2010).

Podem estar ancorados nas diferentes proteínas principalmente nas formas rômica [2Fe-2S] ou cúbica [4Fe-4S], onde o ferro elemento pode mudar o estado de oxidação de Fe⁺² para Fe⁺³, enquanto o enxofre se apresenta sempre no seu estado de oxidação S²⁻. Organismos desenvolveram sistemas multicomponentes que promovem a síntese de proteínas Fe-S, enquanto protegem o entorno celular dos efeitos potencialmente deletérios dos íons Fe⁺², Fe⁺³ e S²⁻ livres (Crack *et al.*, 2012; Py & Barras, 2010).

2.5.7 – Proteínas responsáveis pelo metabolismo de guanosina monofosfato dimérica cíclica (c-di-GMP)

As proteínas diguanilato ciclases (DGC) produzem a molécula de diguanilato cíclico (c-di-GMP) a partir de dois GTPs e fosfodiesterases específicas (PDEs) que quebram essa molécula em 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG), a qual é posteriormente separado em duas moléculas de GMP (Figura 5) (Hengge, 2009). A atividade DGC está associada ao domínio GGDEF e a atividade PDE específica para c-di-GMP aos domínios EAL ou HD-GYP. Estudos demonstraram que *P. aeruginosa* possui um sistema de transdução de sinal envolvendo proteínas de superfície de membrana (WspS), as quais ativam por fosforilação a proteína regulatória (WspR) que apresenta o domínio GGDEF, ocorrendo assim a produção de c-di-GMP (Goymer *et al.*, 2006; Guvener & Harwood, 2007; Wang *et al.*, 2009).

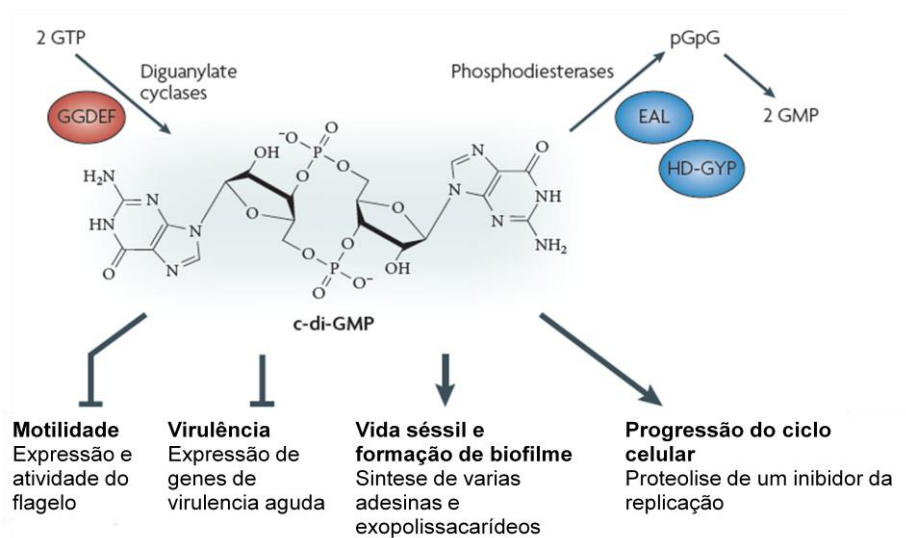


Figura 5: Estrutura e funções fisiológicas de c-di-GMP (Fonte: Hengge, 2009).

O c-di-GMP é uma molécula solúvel que funciona como um mensageiro secundário em bactérias. Em geral, c-di-GMP estimula a biossíntese de adesinas e exopolissacarídeos da matriz em biofilmes (Spiers *et al.*, 2003), interfere nas funções de virulência aguda e inibe várias formas de motilidade, estando universalmente envolvido no controle da troca entre o estilo de vida planctônico móvel e o biofilme sésil da bactéria (D'Argenio *et al.*, 2002).

A notável multiplicidade de DGCs, PDEs c-di-GMP e componentes associados à ligação do c-di-GMP em uma única espécie, especialmente em *Proteobacteria*, permite a integração de uma gama de sinais, e que muitos processos alvos sejam regulados (Povolotsky & Hengge, 2012).

Quatro tipos de proteínas efetoras c-di-GMP são conhecidas, dentre as quais a família de proteínas PilZ representa a classe melhor estudada até o momento (Hengge, 2009; Düvel *et al.*, 2012). Amikam *et al.* (2006) identificaram o domínio PilZ indicando que esse domínio é parte das proteínas

ligadoras de c-di-GMP. As proteínas tipo-PilZ identificadas parecem ser ativas pelo c-di-GMP e funcionam por interações proteína-proteína, sendo que suas funções podem ser negativa ou positivamente controladas pelo efetor. A interação proteína-proteína afeta a motilidade em enterobactéria, através regulação da atividade flagelar de *E. coli* e *Salmonella* spp., da motilidade por contração de *P. aeruginosa* (Ryjenkov *et al.*, 2006), regula a produção da fimbria tipo 3 através da proteína MrkA (pilina principal) em *Klebsiella pneumoniae* sendo sua extensão muito importante para conferir a espessura da cápsula (Wilksch *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2011), da produção de exopolissacarídeo alginato em *Pseudomonas* sp. (Merighi *et al.*, 2007), da expressão de genes de virulência em *Vibrio cholerae* (Pratt *et al.*, 2007) e da síntese de celulose de várias bactérias Gram-negativas (Hengge, 2009).

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Amostras bacterianas

As cepas de *Acinetobacter* sp. utilizadas neste trabalho e testadas para a formação de biofilme, identificação e caracterização do gene *wspR*, foram gentilmente cedidas pelo Hospital de Pronto Socorro (HPS) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) que passaram a ser tratadas como AbH e AbC, respectivamente. Estas cepas foram isoladas de surtos hospitalares em 2008. Como controle positivo de formação de biofilme foi utilizada a cepa de *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, que passou ser tratada como AbA.

Para análise da morfologia colonial, as bactérias foram crescidas em meio Agar Sangue e meio MacConkey por 24 horas a 37°C. Para a confirmação do gênero dos isolados foram realizados testes bioquímicos com meio TSI, teste da catalase, da oxidase e coloração de Gram. A pureza das cepas foi confirmada pela característica morfológica no meio sólido e pela coloração de Gram. Para a caracterização da espécie foi considerado a amplificação por PCR do gene *bfmRS*, cujo o *primer* (*bfmRS_F*: 5' TTCATAATGATGGCATGGCT 3' e *bfmRS_R*: 5' ATCATCTAAACGGGCAAAGG 3') possui 100% de homologia somente para a espécie *A. baumannii* - sendo então considerado específico para esta espécie. Para a mistura da reação foi adicionado: 0,2 U de enzima Platinum® *TaqDNA* polimerase (Invitrogen),

0,25 μM de *primer sense* e de *primer antisense*, 3 mM de MgCl_2 , Tampão de reação 1X, 50 μM de dNTP e 2 μL de DNA total, para um volume final de 20 μL . As condições da reação utilizadas foram: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos para a desnaturação inicial, 40 ciclos a 94°C por 15 segundos, 55°C por 10 segundos para o anelamento, 72°C por 15 segundos para extensão e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos para extensão final, com o auxílio de um termociclador (BioRad).

3.2 – Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado pela equipe Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para as três amostras, pelo método de disco-difusão em meio Ágar Müeller Hinton e a suscetibilidade foi analisada de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), para os seguintes antimicrobianos testados: amicacina, ampicilina/sulbactam, ampicilina, ceftazidime, ceftriaxone, cefuroxime/Na, ciprofloxacina, doxiciclina, gentamicina, imipenem, meropenem, sulfametoxazol/trimetoprima, ticarcilina/clavulanato, Pip/tazobactam, cefepime, cefotaxima.

3.3 – Ensaio de biofilme em microplacas de poliestireno

3.3.1 – Suspensão bacteriana

As cepas de *Acinetobacter* spp. foram inoculadas em meio LB sólido e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período foi realizada a padronização dos inóculos de acordo com o protocolo de detecção de biofilme em microplaca pelo método de cristal violeta (Stepanovic *et al.*, 2004). As colônias crescidas nas placas de LB foram transferidas para uma solução

salina até turvação de 0.5, de acordo com a escala Mac Farland (1×10^8 UFC/mL). Dessa maneira foi determinada a suspensão bacteriana inicial para cada cepa teste.

3.3.2 – Ensaio de biofilme

O protocolo utilizado para os testes de formação de biofilme *in vitro* foi o descrito por Stepanovic *et al* (2004), com adaptações. Para este teste foram utilizadas as placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços (8x12) estéreis (TPP® Techno Plastic Products AG) permitindo oito repetições para cada condição testada.

Então, vinte microlitros de cada suspensão foram transferidos para os poços das microplacas junto com alíquotas de 180 μ L de caldo LB ou LB suplementado com 1% de glicose ou com 10% de sangue de carneiro ou em urina pura filtrada com membrana de 0,22 μ m (pH 6,5). Cada meio foi testado em oito repetições para cada amostra. Utilizou-se como controle negativo o mesmo volume dos meios de cultura, porém ausente de inóculo microbiano. As microplacas foram incubadas a 25°C e 37°C por 24 horas. Após este período, foram descartados os conteúdos dos poços com as células planctônicas e lavadas as placas três vezes com salina estéril. Adicionou-se metanol, para a fixação do biofilme e as microplacas foram secas por 16 horas a temperatura ambiente. A seguir, corou-se os poços com solução de cristal violeta 0,5% à temperatura ambiente, os quais foram posteriormente lavados com água e levemente secos à temperatura ambiente com papel absorvente, para a adição de etanol 95% para ressuspender o pellet. A densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos aderidos foi determinada com o auxílio de um leitor

automatizado de *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em comprimento de onda de 450nm (Stepanovic *et al*, 2004).

Todas as cepas foram separadas em categorias usando a DO dos biofilmes bacterianos, como descrito anteriormente por Christensen *et al.* (1985) e adaptado por Marinho (2009) com 99% de significância. As amostras foram classificadas como: não formador de biofilme ($DO_{\text{biofilme}} < DO_{\text{C-}}$), fraco formador de biofilme ($DO_{\text{C-}} < DO_{\text{biofilme}} \leq 2 \times DO_{\text{C-}}$), moderado formador de biofilme ($2 \times DO_{\text{C-}} < DO_{\text{biofilme}} \leq 4 \times DO_{\text{C-}}$) e forte formador de biofilme ($4 \times DO_{\text{C-}} < DO_{\text{biofilme}}$).

3.4 – Análise transcricional dos genes envolvidos na formação de biofilme

Para verificar diferenças na expressão dos genes envolvidos com a formação de biofilme foram utilizadas as cepas AbA (controle formação de biofilme) e AbH crescidas na forma planctônica e sésseis.

3.4.1 – Extração RNA total

A extração de RNA total foi realizada pelo método brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) modificado para células bacterianas (Salter & Conlon, 2007). Para as células planctônicas foi coletado 3,0 mL de célula bacteriana crescidas a 37°C até uma DO ~0,4 (fase exponencial) e centrifugado por 3 minutos 13000 rpm. O pellet foi ressuspendido em 1,0 mL de RNAProtect (Quiagen), incubado a temperatura ambiente por 10 min, e após centrifugado por 10 minutos a 8000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. Para as células do biofilme a extração foi realizada de acordo com Smith *et al* (2010) com modificações, 20 µL uma cultura bacteriana de DO ~0,1 foi adicionada à

uma garrafa de cultura de célula de 25 mm³ a qual continha 5 mL de LB suplementado com 1% de glicose, incubadas á 37°C por 24 horas. Após, as células planctônicas foram retiradas com o meio de cultura e o biofilme formado ao fundo foi lavado 3 vezes com 2 mL de salina estéril. Foi adicionado 1 mL de RNAProtect incubados por 10 minutos, e então as células do biofilme foram coletadas com raspador de células (TPP® Techno Plastic Products AG) e colocadas em um microtubo, centrifugadas por 10 minutos a 8000 rpm e o sobrenadante foi descartado.

Depois de estabilizado com o RNAProtect, os *pellets* obtidos nas as duas condições foram lavados com 300 µL de TE 1X (Tris 10mM, EDTA 1mM – pH7,8), centrifugados por 3 minutos a 13000 rpm e ressuspensos em 100 µL de TE. A estes *pellets* foi adicionado 3 µL de lisozima (10 mg/mL) seguidos de incubação por 10 minutos à 37°C, após as amostras foram centrifugadas novamente (3 minutos – 13000 rpm). Em seguida, foi adicionado 300 µL de EB-CTAB e as amostras incubadas á 60°C por 20 minutos. Em cada amostra foi acrescentado 400 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitando em *vortex* e centrifugando-se por 12000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi removida (~300 µL) e transferida para um novo microtubo e 300 µL de isopropanol foi acrescentado, e o microtubo incubado á – 20°C por pelo menos 30 min. Centrifugou-se a 12000 rpm por 15 minutos (4°C) e o sobrenadante foi descartado por inversão. O RNA foi ressuspensado em volume apropriado (entre 20 e 50 µL) de água deionizada. A extração de RNA tanto das células do biofilme e das células planctônicas foi realizada em triplicata biológica.

3.4.2 – Síntese de cDNA

O RNA total extraído de ambas as condições foi padronizado de modo que em 10 µL continha em torno de 1 µg de RNA total, o qual foi primeiramente tratado com DNase (Fermentas) para eliminar a presença de moléculas de DNA total que tenham sido extraídas juntamente com o RNA total, para não interferir na amplificação pelo RT-qPCR. Após o tratamento, o RNA total foi utilizado como molde para a síntese do DNA complementar (cDNA) total, para tanto 10 µM de oligo dT(20) (Invitrogen) e 200 U da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega), foram adicionadas a 1 µg de RNA, seguindo as instruções do fabricante. Para avaliar a eficiência do cDNA, uma alíquota de cDNA foi empregado na reação de PCR com o *primer 16SrRNA*. Uma curva de diluição dos cDNAs (1:25, 1:50, 1:100) foi realizada para verificar qual a concentração apresentava melhor eficiência na reação de RT-qPCR.

3.4.3 – PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A verificação da expressão gênica relativa foi realizada através de experimentos de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), no Laboratório de cocos Gram-positivos e microbiologia molecular, UFCSPA, Brasil. Os genes *csuAB*, *bfmRS*, *pgaA*, *bap*, *abal*, *ompA*, *wspR*, *eal*, *eagg*, *pilZ*, *iscR*, *iscS*, *iscU*, *csdA* envolvidos com a formação de biofilme foram analisados (Tabela 1). Os genes *16SrRNA*, *rpoB*, *rpoD* e *gyrB* foram testados como constitutivos (Tabela 2) para posterior normalização dos dados, por já serem descritos na literatura para algumas bactérias (Higgins, *et al.*, 2004; Pyla *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011; Fernando & Kumar, 2012).

TABELA 1: Sequência dos *primers* utilizados na análise transcricional por RT-qPCR com os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação.

Gene	Sequência nucleotídica	Tamanho do produto (pb)
<i>bfmRS</i>	5' TTCATAATGATGGCATGGCT 3'	104
	5' ATCATCTAAACGGGCAAAGG 3'	
<i>abal</i>	5' AATGCCTATTCCCTGCTCAC 3'	132
	5' ATTGCTTCTTGCAGAATTGC 3'	
<i>pgaA</i>	5' AGCAGGAGTCCGTCTTGATT 3'	103
	5' TGCATCAAGGGCTTGAGAG 3'	
<i>csuAB</i>	5' TGTGACTTGTGACGGAACAG 3'	141
	5' AGGTTTGTACGTGCAGCATC 3'	
<i>Bap</i>	5' GATACCACAGCACCAAATGC 3'	136
	5' CTGTGCCTGCTACCACTGTT 3'	
<i>ompA</i>	5' AATGGGTGGGTGACAAGATT 3'	104
	5' GGCAACAACCTCGGTATGTG 3'	
<i>wspR</i>	5' ATGTCGGAATTGGTTCTTCC 3'	115
	5' TGCCTACCGCACCATAGATA 3'	
<i>Eagg</i>	5' ATTCGTAAACGCGGAAGAGT 3'	140
	5' TCGCCGTTTGTATGTTGAAT 3'	
<i>Eal</i>	5' CGTTTGGCACTCACTAAACAA 3'	146
	5' GCTGCCGGAATAAACTCTTT 3'	
<i>pilZ</i>	5' GGATTTACATAAGCAAAGTGG 3'	95
	5' CCGCTCAGCTTCAGCTTTAT 3'	
<i>iscR</i>	5' CAACCTCATTAGCCGAGACA 3'	74
	5' AAAGAGCTGAATCTGTGCCA 3'	
<i>iscU</i>	5' CGAAGAAGCACGTTTCAAGA 3'	106
	5' TGATTGCTTGAGCTTCATCC 3'	
<i>iscS</i>	5' CGGCGCATTATATGTACGTC 3'	97
	5' CGCTAAAGTACCAGAACGCA 3'	
<i>csdA</i>	5' ACGTCGAATTGTAGCGTCTG 3'	105
	5' GGCACACTGGGTTCACTATG 3'	

TABELA 2: Sequência dos *primers* testados como normalizadores para a análise transcricional por RT-qPCR com os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação.

Gene	Sequência nucleotídica	Tamanho do produto (pb)
16SrRNA	5' AGAACCTTACCTGGCCTTGA 3' 5' ATCTCACGACACGAGCTGAC 3'	109
gyrB	5' CTGCGGAATATGCTCGTTTA 3' 5' GCGTGAATCTTGCAGAATGT 3'	143
rpoB	5' CGGTGGTTCAACTAAACGTG 3' 5' TCTGCGCTCTTCTTTTCAA 3'	150
rpoD	5' TCTCGACTTATGCGACTTGG 3' 5' TGACGCGATACACGGTTAAT 3'	127

A reação de RT-qPCR foi realizada em microplacas de poliestireno de 96 poços utilizando o termociclador de PCR em Tempo Real (“Applied Biosystems 7500). Para a reação de RT-qPCR utilizou-se o seguinte protocolo: 10 µL de cDNA, 200 nM de cada *primer* sense e anti-sense; 25 µM dNTPs; 1 x tampão PCR; 3 mM MgCl₂; 0,1 x SYBR *Green* I (Invitrogen); 0,25 U enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água para um volume final de 20µL. Foram utilizadas as seguintes condições: passo inicial, para ativação da polimerase e desnaturação, de 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C para desnaturação, 10 segundos a 60°C para anelamento, e 15 segundos a 72°C para alongação. Após, foi realizada a análise da curva de dissociação para verificar a especificidade da amplificação.

Os ensaios foram realizados em replicatas (triplicatas biológicas e quatro replicatas experimentais) na mesma placa e a reação feita para o mesmo gene

e para os cDNA de biofilme e cDNAs células planctônicas. Assim, o *threshold* foi determinado ao mesmo tempo para as duas condições a fim de analisar os Cts para cada *primer* apresentando a mesma eficiência de reação.

3.4.4 – Análise das expressões relativas

Para análise de expressão relativa dos genes envolvidos com a formação de biofilme, os resultados gerados, *threshold cycles* (Cts), pela reação de RT-qPCR foram analisados pelo método comparativos de Cts, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Primeiramente os genes constitutivos *16SrRNA*, *gyrB*, *rpoB* e *rpoD* foram analisados com o programa NormFinder, que é um algoritmo utilizado para identificação do melhor gene normalizador entre um conjunto de candidatos classificando os candidatos de acordo com sua estabilidade de expressão (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>; Andersen *et al.*, 2004).

Então, foi feita uma média dos Cts das replicatas de cada gene para cada condição testada (biofilme e planctônica), das triplicatas biológicas e quadruplicatas experimentais, e foi calculado o respectivo desvio padrão. Após identificar o melhor gene constitutivo foi feita análise das expressões gênicas dos genes testados seguindo os seguintes cálculos:

- 1) $\Delta C_T = C_{T \text{ gene testado}} - C_{T \text{ gene constitutivo}}$, sendo o desvio padrão calculado pela fórmula $s = (s_1^2 + s_2^2)^{1/2}$.
- 2) $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ biofilme}} - \Delta C_{T \text{ planctônica}}$, sendo o desvio padrão o mesmo gerado para o ΔC_T na condição de biofilme.
- 3) $2^{-\Delta\Delta C_t}$

3.5– Análise estatística

A análise estatística relacionada à formação de biofilme nos diferentes meios e temperaturas foi realizada pela Análise de Variância simples (*One way ANOVA*). A análise estatística entre os ΔC_{Ts} dos biofilme e os ΔC_{Ts} das células planctônicas para todos os genes analisados foi realizada pelo programa SAS System utilizando o modelo linear.

3.6 – Extração de DNA total

A extração do DNA seguiu o protocolo descrito por Fredricks & Relman (1998), modificado. Uma alíquota de 5 ml de cultura crescida a 37°C por 18 horas em caldo BHI foi centrifugada por 5 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 3 vezes com 1ml de tampão TE-1X, e ressuspendido em 200 μ l do mesmo tampão. Foi adicionado 200 μ l de TE⁵N (TE-5X + NaCl), 10% do volume de SDS (40 μ l) e 5 μ l de Proteinase K [20mg/ml]. Incubou-se, em banho, por 1 hora a 37°C. Adicionou-se 30 μ l de NaCl 5M, 400 μ l de fenol-clorofórmio (1:1), centrifugou-se 15 minutos a 14000 rpm e a fase aquosa foi coletada e colocada em um outro microtubo. Então, 400 μ l de fenol-clorofórmio (1:1) foi adicionado, centrifugou-se por 15 minutos a 14000 rpm e coletou-se a fase aquosa, a qual foi transferida para um outro microtubo. Posteriormente, adicionou-se 400 μ l de clorofórmio-álcool isoamílico (9:1), centrifugou-se 15 minutos a 14000 rpm sendo a fase aquosa coletada e transferida para um outro microtubo, ao qual foi adicionado 1 ml de etanol absoluto. A amostra foi incubada por 1 hora à -20°C; Centrifugou-se por 15 minutos a 13000 rpm e desprezou-se o sobrenadante. O pellet foi

ressuspendido em 100 µl de TE-1X e 5 µl de RNase. Incubou-se, em banho, por 30 minutos a 37°C.

3.7 – Amplificação e clonagem do gene *wspR*

Os *primers* empregado na amplificação da região codificante do gene *wspR*, correspondente a um fragmento de DNA de 1230 pb, foram desenhados utilizando a sequencia referência *wspR - putative two-component response regulator* de *A. baumannii* ATCC 17978 disponível no GenBank pelo número GeneID:4919481. Na extremidade 5' do *primer* sense foi adicionado um sítio de restrição para a endonuclease de restrição *NdeI*, e na extremidade 5' do *primer antisense* um sítio de restrição para a endonuclease de restrição *BamHI* (Tabela 3). Estes sítios de restrição foram incluídos para que o fragmento de DNA do gene *wspR* fosse clonado primeiramente no vetor de clonagem pCR-Blunt, e posteriormente sequenciamento.

A amplificação do fragmento de DNA foi realizada pela técnica de PCR, utilizando: 1 U enzima *Taq* DNA polimerase, e 0,5 µM de *primer sense* e de *primer antisense* para o gene *wspR*, 0,25 mM de MgCl₂, Tampão 1X, 500 µM de dNTP e 2 µL de DNA total a cepa AbH, para um volume final de 20 µL, com o auxílio de um termociclador (BioRad). Após esta etapa, 10 µl da reação foram aplicados em gel de agarose 1% para confirmação da presença do fragmento de 1230 pb.

TABELA 3: Sequencia dos primers *sense* e *antisense* utilizados para amplificar o gene *wspR* de *Acinetobacter*.

Orientação	Sequência dos primers
Sense	5' (<i>NdeI</i>) <u>CCACA TATG</u> ATG AAG TTG CAA GGT TCC AAT 3'
Antisense	5' (<i>BamHI</i>) <u>CCAG GATCC</u> TTA AGT TAG ATC TAC AAT TTG 3'

Para a clonagem, o fragmento obtido pela reação de PCR com o primer *wspR* (Tabela 3) foi ligado ao vetor pCR-Blunt (Figura 6) utilizando 4U da enzima T4 DNA ligase (Promega), 90 ng do amplicon do gene *wspR*, 1 x tampão de ligação e 25 ng do vetor pCR-Blunt em volume final de 20 µL. A reação foi incubada por 18 horas à 4°C.

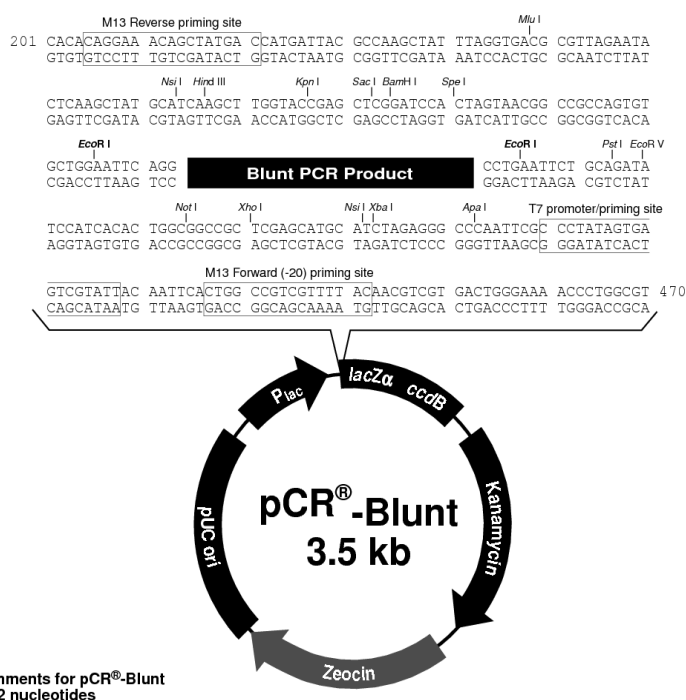


Figura 6: Mapa do plasmídeo pCR-Blunt (Invitrogen).

Para realizar a transformação por choque térmico, 10 µL da ligação foram adicionados à 150 µL da cepa de *E. coli* Top10 competente e conservada em ultrafreezer. Para a transformação por choque térmico, seguiu-se então o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). A mistura foi incubada no gelo por 20 minutos, depois o microtubo foi submetido ao choque térmico em banho maria a 42°C por 2 minutos, seguido de gelo por 10 minutos. Então, adicionou-se 1mL de caldo LB ao microtubo que foi incubado em agitador orbital a 37°C por 1 hora. Após, 50 µL da transformação foram semeados em meio seletivo sólido LB com kanamicina (50 µg/ml), por 16 horas à 37°C.

A única colônia crescida foi inoculada em 5 mL de caldo LB por 16 horas a 37°C e então realizou-se uma extração de DNA plasmidial (miniprep) por lise alcalina e purificação em coluna (Plasmid Miniprep - Invitrogen). O plasmídeo contendo o gene *wspR* foi clivado com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, para liberar o fragmento de 1230 pb que foi purificado do gel de agarose com o *PureLink® Quick Gel Extraction kit* (Invitrogen).

3.8 – Sequenciamento

O gene *wspR* da cepa AbH clonado no plasmídeo pCR-Blunt foi sequenciado pela empresa Lwdwigbiotec utilizando o sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystem) e a sequência do DNA obtida foi comparada com o gene de referência *wspR - putative two-component response regulator* (GeneID - Genbank:4919481) de *A. baumannii* ATCC 17978.

4. RESULTADOS

4.1 – Caracterização das cepas de *Acinetobacter*

As cepas AbA (ATCC 19606), AbH (HPS) e AbC (HCPA), inoculadas em meio MacConkey apresentaram morfologias colônias compatíveis com *Acinetobacter* spp. como superfície lisas, consistência mucóides, transparência opacas, pigmento levemente rosadas e forma arredondadas; e em meio Ágar Sangue suas colônias apresentaram coloração acinzentada. Pelos resultados dos testes bioquímicos as bactérias não fermentaram o meio Triple Sugar Agar (TSI), foram catalase positivas, oxidase negativas e se coraram como cocobacilos Gram negativas, a partir desses resultados as três amostras foram consideradas compatíveis com o gênero *Acinetobacter* spp.

Todas as cepas apresentaram o fragmento ~104 pb esperado após a amplificação com *primer bfmRS*, sendo dessa forma classificadas como *Acinetobacter baumannii*.

4.2 – Perfil de susceptibilidade

A partir do método de disco-difusão, a cepa AbA apresentou fenótipo de resistência a ampicilina, ceftriaxona, cefuroxima/Na, sulfametoxazol/trimetroprima e intermediário à gentamicina, cefotaxima e cefepime. A cepa AbH apresentou fenótipo intermediário à ceftazidime e Pip/tazobactam e resistência a amicacina, ampicilina/sulbactam, ampicilina, ceftriaxona, cefuroxima/Na, ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol/trimetroprima, ticarcilina/clavulanato, cefepime e cefotaxima. Já amostra AbC apresentou sensibilidade somente à doxiciclina (Tabela 4), sendo considerada uma cepa multirresistente (Kempf & Rolain, 2012).

TABELA 4: Análise de suscetibilidade aos antimicrobianos analisados de acordo com o CLSI (2012) das amostras de *A. baumannii*.

Antibióticos	AbA	AbH	AbC	Antibióticos	AbA	AbH	AbC
Amicacina	S	R	R	Gentamicina	I	R	R
Ampicilina/Sulbactam	S	R	R	Imipenem	S	S	R
Ampicilina	R	R	R	Meropenem	S	S	R
Ceftazidima	S	I	R	sulfametoxazol/trimetroprim	R	R	R
Ceftriaxona	R	R	R	ticarcilina/clavulanato	S	R	R
cefuroxima/Na	R	R	R	Pip/tazobactam	S	I	R
Ciprofloxacina	S	R	R	Cefepime	I	R	R
Doxiciclina	S	S	S	Cefotaxime	I	R	R

S = sensível, I = intermediário e R = resistente.

4.3 – Formação de biofilme

Ambas as cepas foram capazes de formar biofilme em microplacas de poliestireno em todos os meios testados. Quando crescidas em LB e LB suplementado com 1% de glicose à 37°C, todas foram classificadas como fortes formadoras de biofilme (DO > 4x controle negativo). Foi observado que a

presença da glicose influenciou a densidade do biofilme formado, considerando que as amostras obtiveram valores de DOs maiores no meio suplementado com 1% de glicose ($p= 0,033$) sob essa temperatura. Já, sob a temperatura de 25°C, não houve diferença entre as DOs das cepas crescendo nos meios LB e LB suplementado com glicose ($p= 0,354$), sendo todas amostras fortes formadoras de biofilme em ambas as condições. No meio LB suplementado com glicose, não houve diferença significativa entre as DOs dos biofilmes nas temperaturas de 37 e 25°C ($p= 0,738$). Por outro lado no meio LB, houve diferença significativa entre as DOs sob as temperaturas de 37 e 25°C, sendo que as DOs observadas pelas cepas crescendo nesse meio foram maiores à 25°C do que à 37°C ($p= 0,025$). Logo, a glicose influenciou no aumento da espessura do biofilme a 37°C, mas não teve efeito a 25°C, e a temperatura de 25°C induziu um aumento de espessura no meio sem adição de glicose.

No meio LB suplementado com 10% de sangue de carneiro à 37°C, as cepas AbAe AbH foram classificadas como fortes formadoras de biofilme, enquanto a cepa AbC como fraca formadora. Na presença da urina a 37°C, as cepas AbA e AbC foram fracas formadoras e AbH moderada formadora de biofilme. Visto que a cepa AbH apresentou maior capacidade de formação de biofilme, sempre obtendo as maiores DOs em todos os meios e temperaturas testadas, essa amostra foi utilizada para realizar a análise transcricional.

4.4 – Análise transcricional

As cepas AbA (controle ATCC 19606) e AbH, foram selecionadas para a análise transcricional. A condição de crescimento bacteriano para a

avaliação transcricional foi LB suplementado com 1% de glicose a 37°C, pois nesse meio e a essa temperatura o biofilme atingiu maior espessura, biomassa.

A razão das DOs 260/280 de todos RNAs totais extraídos ficou entre 1,8-2,0, indicando baixo grau de contaminação com proteínas durante o processo. Estes RNAs foram tratados com DNase e 1µg de RNA foi empregado para sintetizar o DNA complementar (cDNA). Com o objetivo de verificar a qualidade do cDNAs produzidos, todos foram submetido a uma reação de PCR utilizando os *primer* que amplificam a região conservada do gene *16SrRNA* e onde todos os cDNAs amplificaram um fragmento de DNA de 109 pb. como controle negativo foi testado somente o RNA tratado com DNase, o qual não apresentou amplificação de DNA (Figura7).

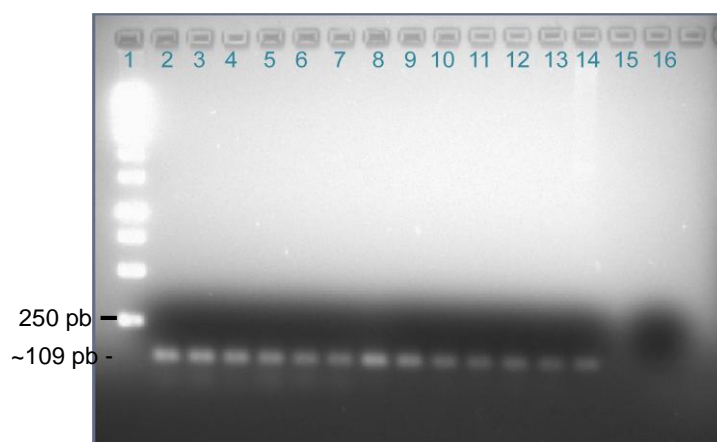


FIGURA 7: Produto da amplificação por PCR dos cDNAs produzidos utilizando os *primer* do gene *16SrRNA* em gel agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV. Marcador de peso molecular 1Kb Fermentas (1), cDNAs (2-13), e controle negativo RNA total tratado com DNase (15) e controle negativo reação de PCR (16).

Esses cDNAs foram diluídos 1:25, 1:50, 1:75 e 1:100 e verificou-se que a diluição 1:100 apresentou a melhor eficiência, sendo essa diluição usada para todas as amostras nas reações RT-qPCR e determinação do *threshold*, com genes a serem testados.

Dentre os possíveis genes constitutivos analisados (*16SrRNA*, *gyrB*, *rpoB* e *rpoD*), o que apresentou a menor variação na expressão gênica entre as duas condições testadas, obtendo assim a melhor estabilidade, de acordo com a análise no programa NormFinder, foi o gene *gyrB* (Tabela 5). A partir dessa análise, o gene *gyrB* foi considerado o melhor gene constitutivo e utilizado para normalizar todos os Cts gerados dos genes e amostras testados por RT-qPCR.

TABELA 5: Valores de estabilidade dos genes testados como constitutivos analisado pelo programa NormFinder (Andersen *et al*, 2004).

Genes	Valores de estabilidade
<i>16SrRNA</i>	0,018
<i>gyrB</i> ^{1,2}	0,007
<i>rpoB</i>	0,011
<i>rpoD</i> ²	0,007

¹Melhor gene constitutivo.²Melhor combinação de dois genes.

Foi observada a presença ou não de variação significativa entre os Δ Cts dos genes testados das condições de vida livre, controle, e de biofilme, teste (Anexo 1). Não houve diferença significativa entre os Δ Cts de biofilme e de vida livre, para os genes *eal* e *bfmRS* de ambas amostras, *eagg* e *csdA* de AbA e *abal* de AbH ($p > 0,05$). Quando houve diferença estatística entre os Δ Cts ($p < 0,05$) o gene foi considerado como sendo mais expresso ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) ou menos expresso ($2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$) durante a formação de biofilme quando comparado com a vida livre.

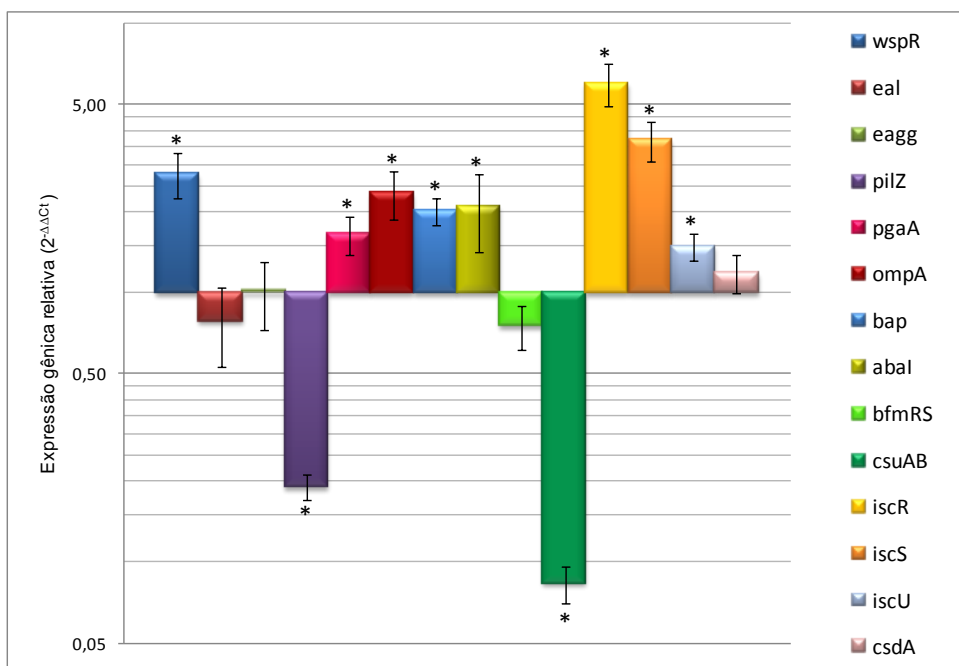
O gene *wspR* teve sua expressão aumentada na condição de biofilme nas duas amostras, sendo $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 4,50$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 2,77$. Além disso, esse aumento na expressão foi maior na amostra AbH, a qual é resistente à uma gama de antibióticos, quando comparada com a amostra AbA ($p = 0,0115$). Os genes *eal* de ambas as cepas ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 0,79$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 0,91$) e *eagg* de AbA ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 0,77$) não tiveram variação significativa na expressão gênica ($p > 0,05$) entre a condição planctônica e a condição de biofilme. Já o gene *eagg* de AbH ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,95$) foi menos expresso no biofilme (Figura 8). O gene *pilZ* teve sua expressão diminuída em ambas as cepas ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 0,19$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 0,60$) (Figura 8).

Os genes *csuAB* de AbA ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,08$) e AbH ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,09$) tiveram sua expressão diminuída no biofilme (Figura 8). Contudo o gene que codifica o sensor de dois componentes, *bfmRS*, não apresentou variação significativa na expressão entre as duas condições ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 0,75$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 0,90$), indicando que ele é sempre expresso da mesma forma ($p > 0,05$), independente da condição de crescimento.

Os genes *pgaA* ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 1,65$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 1,95$), *bap* ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 2,02$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 1,43$) e *ompA* ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 2,35$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 10,39$) tiveram um aumento na expressão gênica na condição de biofilme. Ainda, o gene *opmA* teve expressão mais acentuada na amostra hospitalar AbH, durante o biofilme quando comparado com o aumento da expressão na amostra ATCC, AbA. Já o gene *abaI* foi mais expresso em AbA ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 2,09$) enquanto que na cepa clínica AbH ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,08$) não variou sua expressão durante as duas condições (Figura 8).

O operon *iscR* ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 6,01$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 4,84$), *iscS* ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 3,69$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 3,63$), *iscU* ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 1,48$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 6,29$) e o gene *csdA* de AbH ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 5,56$) tiveram sua expressão aumentada durante a formação do biofilme (Figura 8). Já o gene *csdA* de AbA não variou a expressão entre a vida planctônica e o biofilme. Além disso, *iscU* foi mais expresso na amostra AbH.

AbA



AbH

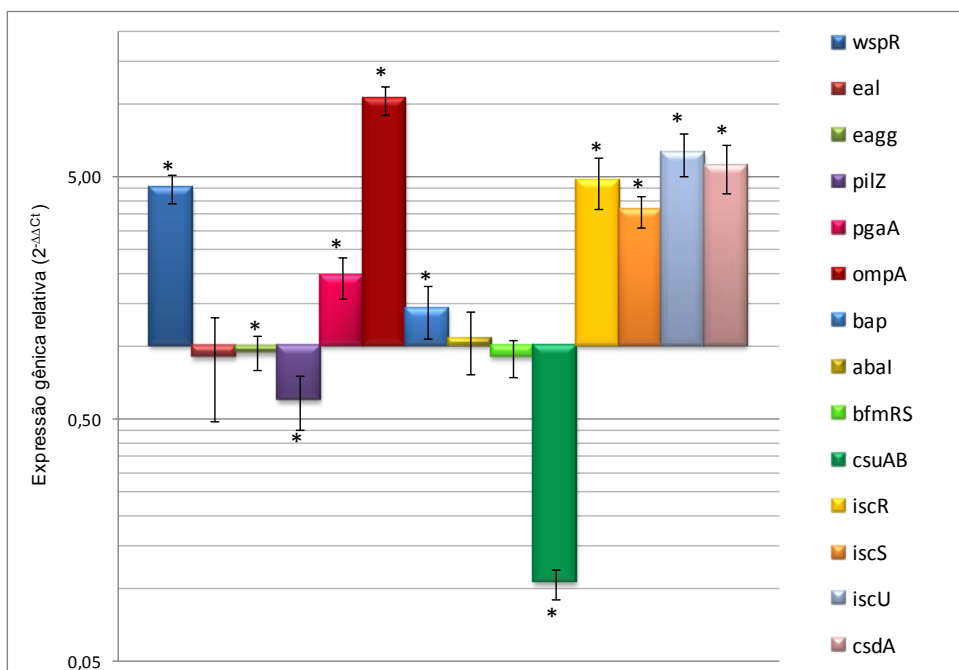


Figura 8: Perfil transcricional dos genes *wspR*, *eal*, *eagg*, *pilZ*, *pgaA*, *ompA*, *bap*, *abal*, *bfmRS*, *csuAB*, *iscRSU* e *csdA* durante a formação de biofilme bacteriano. Análise quantitativa por RT-qPCR de AbA e AbH. Expressão relativa dos genes possivelmente envolvidos na formação de biofilme analisados a partir do RNA total (condição teste) pelo método de expressão relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde o RNA total das células planctônicas foi utilizado como condição controle. Os valores foram normalizados com o gene constitutivo *gyrB*. Os dados estão apresentados de acordo com o nível de aumento ou diminuição na expressão relativa, em comparação com o gene constitutivo não mostrando variação ($2^{-\Delta\Delta C_t}=1,0$). Foram utilizadas triplicata biológica e quatro replicatas experimentais para a RT-qPCR. *Indica diferença estatística em uma análise prévia entre o dados do ΔC_t do biofilme, quando comparados com ΔC_t das células planctônicas.

4.5 – Análise genotípica do gene *wspR*

Pela análise da reação de PCR com os *primers* projetados foi identificado a presença do gene *wspR* nas 3 cepas de *A. baumannii* testadas (Figura 9), indicando que esse gene é provavelmente bem conservado entre as linhagens patogênicas de *A. baumannii*. Podemos deduzir que, assim como para *P. aeruginosa*, é um gene amplamente distribuído nesse gênero também.

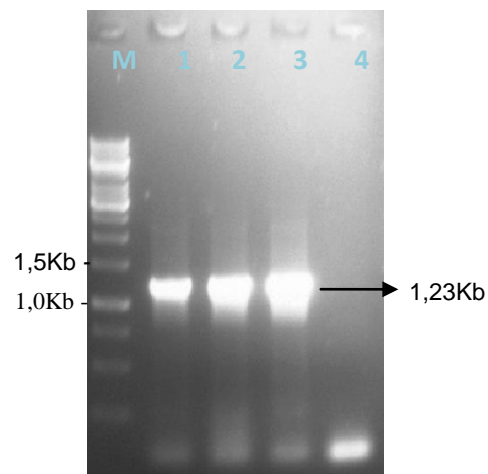


FIGURA 9: Produto da amplificação do gene *wspR* (1,23 Kb) de *Acinteoacter baunami* em gel agarose 1% corado com brometo de etídio. (M): Marcador de peso molecular (1Kb invitrogen); (1) amostra AbC (2) amostra AbA (3) amostra AbH e (4) controle negativo.

Após a transformação por choque térmico somente um clone apresentava o vetor recombinante pCR-Blunt::*wspR* contendo o gene de interesse confirmado pela clivagem com as endonuclease de restrição *NdeI* e *BamHI* (Figura 10).

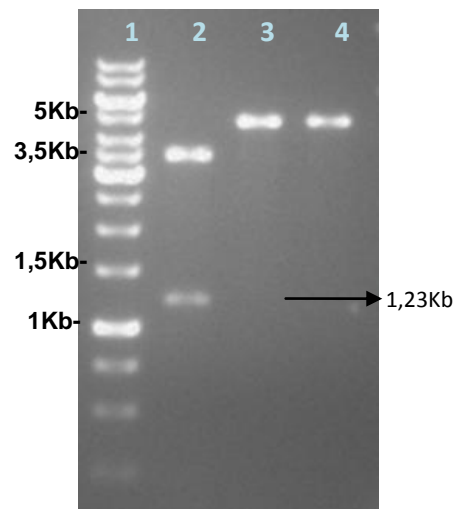


FIGURA 10: Clivagem do recombinante pCRBlunt::*wspR* clivado com as endonuclease de restrição *NdeI* e *BamHI* em gel agarose 1% corado com brometo de etídio. (1) Marcador de peso molecular (1Kb invitrogen), (2) pCRBlunt::*wspR* clivado com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*; (3) pCRBlunt::*wspR* clivado com a endonuclease de restrição *NdeI* e (4) pCRBlunt::*wspR* clivado com a endonuclease de restrição *BamHI*.

A sequência de DNA ligada ao plasmídeo recombinante pCRBlunt::*wspR* foi sequenciada para verificação do grau de homologia do gene clonado com a sequência de referência *wspR* - putative two-component response regulator (GeneID:4919481) de *A. baumannii* ATCC 17978. O inserto apresentou 98% de homologia entre a sequência de nucleotídeos e 99% de homologia entre a sequência de aminoácidos (Figura 11) com o gene de referência analisando os resultados gerados pelo programa *EBI-clustal W*. Pela análise podemos afirmar que o gene clonado é o *wspR* de *Acinetobacter spp.* Pelas análises primárias no programa ExPaSy, essa possível WspR de *Acinetobacter baumannii* possui 46,5 kD e ponto isoelétrico de 6,10. (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?D0C7F2@noft@>) e verificando os domínios conservados pelo NCBI verifica-se a presença do

domínio proteico GGDEF, responsável pela atividade diguanilato ciclase(Figura12).

```

ATCC      MKLQGSNILGQEQIDLLTTRGLNFVWFPKQLETIYRFQYQNGAAYEFRYRAPIILILYLF 60
seq       -----LGQEQIDLLTTRGLNFVWFPKQLETIYRFQYQNGAAYEFRYRAPIILILYLF 52
          *****

ATCC      LSFGIYQVLPTEQVLSWLSYYSWVGIIVLIAWILSFIKKNQWFDYYVIGISSAAVAITF 120
seq       LSFGIYQVLPTEQVLSWLSYYSWVGIIVLIAWILSFIKKNQWFDYYVIGISSAAVAITF 112
          *****

ATCC      ILINVLENGQDNVLFHAAMMYAIVIIYGAVGMRFYTAIAGWVGGILIGILVSTYLNQDID 180
seq       ILINVLENGQDNVLFHAAMMYAIVIIYGAVGMRFYTAIAGWVGGILIGILVSTYLNQDID 172
          *****

ATCC      WFLNRTYTFSSFLGMTLAYATDRQHRENYLQNCMIELNRIELMQQAQQLSLLSQDALT 240
seq       WFLNRTYTFSSFLGMTLAYATDRQHRENYLQNCMIELNRIELMQQAQQLSLLSQDALT 232
          *****

ATCC      GLANRRYLDETLDNWRRALRHETPLTMMVDIDFFKPYNDSLGHKGDQCLKDIATAIS 300
seq       GLANRRYLDETLDNWRRALRHETPLTMMVDIDFFKPYNDSLGHKGDQCLKDIATAIS 292
          *****

ATCC      SIAARSGDLVARYGGEEFLLLPMTNAQQAKIQAERLMNAIKKIAIVHPCSSVSPYVTIS 360
seq       SIAARSGDLVARYGGEEFLLLPMTNAQQAKIQAERLMNAIKKIAIVHPCSSVSPYVTIS 352
          *****

ATCC      VGVATTIPRLNDSISAFVSRADHALYQAKTNGRNQYQIALNEEQIVDLT 409
seq       VGVATTIPRLNDSISAFVSRADHALYQAKTNGRNQYQNALNEE----- 395
          *****
  
```

Figura 11: Alinhamento do fragmento sequenciado e traduzido com a sequência de aminoácidos do gene *wspR* de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 pelo programa *EBI ClustalW*.

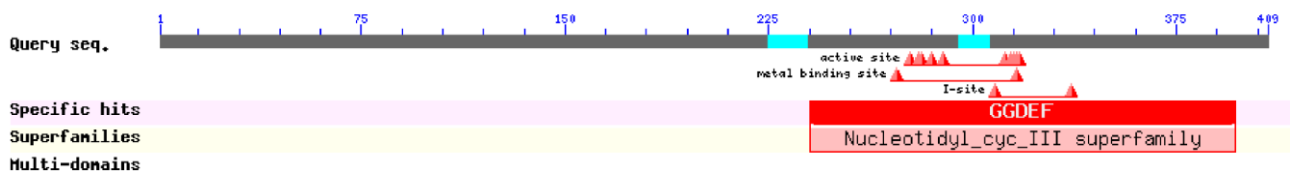


Figura 12: Domínio conservado da proteína WspR- putative two-component response regulator, uma diguanilato ciclase de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978.

5. DISCUSSÃO

5.1 – Amostras

Após a identificação bioquímica as cepas HCPA (AbC) e HPS (AbH) utilizadas no presente estudo, obtidas de dois hospitais de Porto Alegre, foram classificadas como pertencentes a espécie *A. baumannii*. Quanto ao perfil de susceptibilidade das amostras foi observado que a cepa ATCC 19606 (AbA) apresentou sensibilidade a muitos antimicrobianos; a cepa AbH apresentou resistência a várias classes de antimicrobianos, exceto aos carbapenêmicos e doxiciclina; e a cepa AbC apresentou resistência a quase todos antimicrobianos, inclusive carbapenêmicos, exceto resistência a doxiciclina, sendo considerada uma cepa MDR (Kempf & Rolain, 2012).

Como em outros países, no Brasil já foram descritas infecções hospitalares causados por AbMDR em vários estados do país (Levin *et al.*, 1996; Sader *et al.*, 2001; Sader *et al.*, 2005; Furtado *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012; Toledo *et al.*, 2012). Um estudo que avaliou a epidemiologia e microbiologia de bacteremias hospitalares no Brasil utilizando os dados do SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance) Brasileiro, que incluiu 16 hospitais brasileiros e 2.563 pacientes, entre 2007 e 2010, constataram que 11,4% foram causadas com *Acinetobacter* spp. (Marra *et al.*, 2011). Na cidade de Porto Alegre, entre os anos

de 2004 e 2008 mais de 500 casos foram detectados envolvendo surtos em 16 hospitais (Breier & Martins, 2008; Martins *et al* 2009; Martins *et al.*, 2012).

Esse patógeno possui capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos usados na prática clínica, e sua resistência vem aumentando com o passar dos anos (Kempf, *et al.* 2012). Cepas MDR representam um grande problema, visto que o tratamento das infecções se torna extremamente difícil e infecções causadas por esse patógeno, quando ocasionada por cepas AbMDR, apresentam elevadas taxas de morbidade e mortalidade (Falagas *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012). Um estudo realizado por Prates *et al.* 2011 com 66 pacientes internados na UTI de um hospital de Porto Alegre infectados ou colonizados por *A. baumannii* MDR, entre os anos de 2006 e 2008, observou que a taxa de mortalidade em 30 dias foi de 47%, tendo como fator de risco associado a mortalidade o choque séptico e escore de gravidade APACHE II (Prates *et al.*, 2011).

Para o tratamento de infecções causadas por cepas MDR, como observado na cepa AbC, as escolhas terapêuticas possíveis são os antimicrobianos tetracíclico tigeciclina, além da colistina e polimixina B (Mezzatesta *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2003), sendo a doxiciclina (uma tetraciclina) também eficiente contra cepas MDR (Bantar *et al.*, 2008). Estudos tem observado que o uso de sulbactam (inibidor de β -lactamases) associado à ampicilina também é uma alternativa eficiente para o tratamento de algumas infecções por *A. baumannii* MDR (Kempf, *et al.*, 2012; Higgins, *et al.*, 2004; Woods, 2002), entretanto as cepas AbH e AbC mostraram-se resistente à esta combinação.

5.2 – Biofilme

Acinetobacter baumannii possui capacidade de provocar surtos de infecções hospitalares recorrentes. Uma das prováveis explicações para a persistência no ambiente hospitalar é a sua conhecida capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas (Vidal *et al.*, 1996; Rodríguez-Baño *et al.*, 2008; Gaddy & actis, 2009). No presente estudo foi observado que as três cepas testadas apresentaram capacidade de formação de biofilme. No crescimento a 37°C em meio LB, todas as amostras foram classificadas fortes formadoras de biofilme, e a presença da glicose aumentou significativamente a quantidade de biofilme formado. A influencia da glicose na formação de biofilme é relevante e poderia explicar o fato de que pacientes diabéticos são 10 vezes mais propensos a desenvolver infecções por *A. baumannii*, do que indivíduos não-diabéticos (Alsultan *et al.*, 2009). A diabetes é considerada uma comorbidade que influencia na colonização e infecção por esse patógeno, além de contribuir para o mau prognóstico do paciente, levando a um maior índice de mortalidade (Koprnová *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Falagas *et al.*, 2007; Michalopoulos *et al.*, 2011; Prata-Rocha *et al.*, 2012).

Quando submetidas ao crescimento à 25°C, as cepas apresentaram um fenótipo de fortes formadoras de biofilme em LB e em LB suplementado com glicose. Ao mesmo tempo, as cepas quando crescidas em meio LB apresentaram biofilmes mais espessos a 25°C quando comparados com as cepas que cresceram a 37°C. Apesar do número limitado de amostras desse estudo e algumas diferenças metodológicas, os resultados condizem com os achados por Martí *et al.* (2011), que analisaram a capacidade de formação de

biofilme de 64 cepas *A. baumannii*, crescendo em caldo Müller Hinton, por 72 horas, e observaram que a formação de biofilme foi maior à 25°C do que à 37°C (Martí *et al.*, 2011). Portanto, a persistência de *A. baumannii* no ambiente hospitalar pode ser explicada por sua capacidade de formação de biofilme nas superfícies abióticas, como plástico e vidro, à temperatura ambiente, provavelmente resistindo à desinfecção (Rajamohan *et al.*, 2009).

Entretanto, quando crescidos em LB com suplemento de glicose, as temperaturas de 25°C e 37°C não influenciaram a quantidade de biofilme formado. Resultados semelhantes foram demonstrados por Breij *et al.* (2010), que utilizaram o mesmo tempo de crescimento, porém empregaram um meio mínimo M63, temperaturas de 28 e 37°C, e 45 cepas *A. baumannii*. Assim, podemos observar que o meio de crescimento e a temperatura são variáveis importantes que irão determinar a quantidade de biofilme formada por esse patógeno.

Na presença da urina, as cepas AbA e AbC foram classificadas como fracas formadoras e a cepa AbH como moderada formadora de biofilme. Já no meio LB suplementado com sangue, AbA e AbH apresentaram fenótipo de fortes formadoras, e AbC foi moderada formadora de biofilme. A capacidade de formar biofilme nesses meios é um fato extremamente relevante e sua importância deve ser levado em consideração na clínica, visto que *A. baumannii* causa infecções no trato urinário e bacteremia em pacientes imunodeprimidos ou com doenças de base, e tem como um dos fatores predisponentes de infecções o uso de cateter urinário e cateter venoso central. Assim, as bacteremias associadas ao uso de cateter venoso central

possuem uma alta taxa de mortalidade e as infecções urinárias resultantes do uso de cateter tem caráter recorrente (Jung *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Pour *et al.*, 2011; Apisarnthanarak *et al.*, 2011; Marra *et al.*, 2011 Djeribi *et al.*, 2012).

Sabe-se que a maioria das infecções hospitalares está provavelmente relacionada a biofilmes em cateteres. De fato, os biofilmes se formam em quase todos os dispositivos médicos de uso interno. Tecidos obtidos de infecções crônicas não relacionadas a aparelhos médicos, também mostraram a presença de biofilme bacteriano cercado por uma matriz de exopolissacarideo. Por essa razão, infecções causadas por biofilme geralmente mostram sintomas recorrentes, após ciclos de terapia com antibiótico, até que a população séssil seja cirurgicamente removida do corpo. (Costerton *et al.*, 1999; Hanna *et al.*, 2004).

A cepa AbC multirresistente formou menos biofilme quando comparado com as cepas mais sensíveis aos antimicrobianos. Esse resultado difere de alguns estudos que demonstraram que isolados clínicos de AbMDR apresentam uma elevada capacidade para formar biofilme, havendo uma associação significativa entre multiresistência e o biofilme (Shin *et al.*, 2008; Rao *et al.* 2008). Entretanto, nosso resultado é condizente com outros estudos, os quais constataram que amostras mais sensíveis a antibióticos foram maiores produtores de biofilme (Wroblewska *et al.*, 2008; King *et al.*, 2009). Uma possível explicação para este fato é que isolados formadores de biofilme não são tão dependentes de genes e mecanismos de resistência a antibióticos, visto que o próprio biofilme possui capacidade de proteger as células da ação antimicrobiana, dessa forma contribuindo para sua sobrevivência no ambiente

hospitalar (Rodriguez-Bano *et al.*, 2008; Wroblewska *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007).

Portanto, é notório que a capacidade desse patógeno de formar biofilme é multifatorial e diversa, assim como adaptável à natureza da superfície nas quais as células estão interagindo. A elucidação dessas interações complexas é importante, não apenas para entender melhor a patobiologia do *A. baumannii*, mas também para identificação de novos alvos para futuras estratégias antimicrobianas (Gaddy *et al.*, 2009).

5.3 – Análise transcricional de genes envolvidos na formação e manutenção do biofilme de *A. baumannii*

5.3.1 – Proteínas responsáveis pelo metabolismo de guanosina monofosfato dimérica cíclica (c-di-GMP)

As três amostras possuíam o gene *wspR*, cuja proteína codificada apresenta o domínio GGDEF, responsável pela atividade diguanilato ciclase. Além disso, o gene *wspR* teve sua expressão aumentada na condição de biofilme de AbA e AbH. Ainda, esse aumento na expressão foi maior na amostra AbH, podendo ser um indício que essa proteína seja bem conservada entre as amostras de *A. baumannii*, sendo o produto gerado pela enzima, a molécula de c-di-GMP, um importante regulador na mudança entre a fase planctônica e a fase séssil, assim como para *P. aeruginosa* (Henнге, 2009). Porém, devem ser realizados mais estudos para verificar a atividade dessa proteína.

O c-di-GMP estimula a biossíntese de adesinas e exopolissacarídeos da matriz em biofilmes (Spiers *et al.*, 2003), interfere nas

funções de virulência aguda e inibe várias formas de motilidade, estando universalmente envolvido no controle da troca entre o estilo de vida planctônico móvel e o biofilme sésil da bactéria (D'Argenio *et al.*, 2002). Sendo assim, as enzimas envolvidas no metabolismo do c-di-GMP podem ser alvos promissores para drogas anti-biofilme (Povolotsky e Hengge, 2012). Além disso, foi descrito que a adição de c-di-GMP exógeno é capaz de inibir a formação do biofilme por várias bactérias patogênicas e seu potencial como adjuvante em vacinas tem sido demonstrado em experimentos de imunização com ratos (Karaolis *et al.*, 2005, Ishihara *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011;). Ainda, a diguanilato ciclase é essencial para a indução de biofilme mediada por aminoglicosídeos e está envolvida com a resposta a cloranfenicol e tetraciclina. Em *E. coli*, a alta concentração de c-di-GMP super-regula a produção de PNAG, aumentando a transcrição de seu *operon*, sendo uma pré-condição para a produção de biofilme induzido por antibiótico (Boehm *et al.*, 2009; Perez-Mendoza *et al.*, 2011).

Os genes *eal* de ambas as amostras não apresentaram variação significativa na expressão gênica entre a condição planctônica e a condição de biofilme. Esse gene codifica proteínas com o domínio EAL, que provavelmente tem função de fosfodiesterase, a qual cliva a molécula de c-di-GMP (Tchigvintsev *et al.*, 2010). A proteína fosfodiesterase DipA de *P. aeruginosa* aumenta sua atividade em resposta a mudanças repentinas nas concentrações de nutrientes, reduzindo os níveis de c-di-GMP quando comparados com o biofilme e células planctônicas (Roy *et al.*, 2012). Igualmente, o gene *eal* de *A. baumannii* pode variar sua expressão somente durante variações bruscas no

meio em que se encontra, sendo uma possível explicação para *eal* não ter apresentado uma variação em sua expressão nas condições testadas.

As proteínas com domínio EAL reduzem os níveis intracelulares de c-di-GMP, estando associadas com aumento da motilidade e redução da formação de biofilme. Proteínas com função fosfodiesterase também aumentam a virulência em infecções agudas. Em *E. coli*, a proteína que possui domínio EAL designada VmpA somente está presente na *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) sorotipo O157:H7, estando ausente em *E. coli* não patogênica (Branchu *et al.*, 2012). Na *Salmonella enterica* Var. Typhimurium, a proteína CdgR, que possui domínio EAL, controla diversas funções relevantes na interação microrganismo-hospedeiro como a resistência ao peróxido de hidrogênio e resistência à morte pelos macrófagos (Hisert *et al.*, 2005). Dessa forma o estudo de proteínas que possuem domínio EAL e função de fosfodiesterase em *A. baumannii* é de grande importância, pois podem elucidar possíveis mecanismos de patogenicidade.

O gene *eagg* de AbA não apresentou variação na sua expressão. Por outro lado, o gene *eagg* de AbH foi menos expresso no biofilme. Esse gene codifica proteínas com o domínio EAL e domínio GGDEF. Visto que tal proteína possui os dois domínios tanto para formar, como para quebrar a molécula de c-di-GMP, é plausível que sua expressão não varie entre a condição de biofilme e de vida livre. Além disso, *A. baumannii* possui outras proteínas que podem estar desenvolvendo sua atividade em AbA e AbH, durante a formação do biofilme.

O gene *pilZ* teve sua expressão diminuída em AbA e AbH. O domínio pilZ faz parte de proteínas efetoras ligantes de c-di-GMP. Existe a possibilidade de haver outras proteínas com domínio PilZ em *A. baumannii* desempenhando tal função. Além disso, como a atividade da proteína é aumentada pela ligação de c-di-GMP, essa deve ser a forma de regulação intracelular, não havendo uma regulação significativa a nível transcricional. Ao se ligar com outras proteínas, PilZ afeta a motilidade e expressão de exopolissacarídeos, possuindo importante função na formação de biofilme mediada por c-di-GMP, além de influenciar na virulência (Hengge, 2009; Pratt *et al.*, 2007).

Os dados obtidos até o momento a respeito dos genes responsáveis pelo metabolismo de c-di-GMP em *Acinetobacter* são de análises proteômica (Shin *et al.*, 2009) e de dados depositados em bancos de dados de genes e proteínas como o GenBank. Esse é o primeiro estudo a analisar os genes responsáveis pelo metabolismo de c-di-GMP em *A. baumannii* e sua expressão durante a formação do biofilme. Visto sua importância na regulação celular, mais estudos devem elucidar as proteínas envolvidas nesse processo em *A. baumannii*.

5.3.2 – Proteínas responsáveis pelo pili CsuAB e sistema de transdução de sinal com dois componentes BfmRS.

Segundo Tomaras *et al* (2003), os genes *csuA* e *csuB*, os quais codificam as proteínas CsuA e CsuB, que são subunidades do pili de *A. baumannii*, e fazem parte do operon *csuABCDE*. Nesse trabalho os genes *csuAB* das cepas AbA e AbH tiveram sua expressão diminuída no biofilme de

24 horas. O resultado poderia ser explicado, pois a expressão de *csuAB* pode ser requerida somente no início da formação do biofilme sendo sua expressão inibida nos passos seguintes, visto que tais genes são importantes nas primeiras etapas da formação de biofilme em superfícies plásticas (Tomaras *et al.*, 2003). Além disso, a produção desse tipo de apêndice não está correlacionado com a quantidade de biofilme formado por diferentes isolados clínicos em superfícies de plástico e vidro (McQueary & Actis, 2011).

Este resultado poderia ainda indicar que a expressão desses genes pode não ser necessária para a formação do biofilme nesses isolados, assim como constatado no trabalho de Breji e colaboradores (2009) no qual o operon *csuABCDE* não foi necessário para aderência a células bióticas. *A. baumannii* pode se aderir às superfícies bióticas por meio de pili curtos, produzidos independentemente desse operon, sendo vistos principalmente do lado que a bactéria se adere à superfície de célula do hospedeiro (Breji *et al.*, 2009). Também tem sido reportado que nem todas as cepas de *A. baumannii* produzem a proteína CsuA/B sugerindo que diferentes isolados clínicos podem produzir pili com diferentes propriedades físico-químicas e funcionais (McQueary & Actis, 2011).

O gene que codifica o sensor de dois componentes, *bfmRS*, apresentou o mesmo padrão de expressão, independente da condição de crescimento. O *bfmS*, uma quinase sensora, recebe os sinais extracelulares e quando necessário fosforila *bfmR*, um regulador de resposta, o qual continua a tradução de sinais nas células (Tomaras *et al.* 2008). Assim, o operon *bfmRS* regula a transição da iniciação da formação de biofilme para a maturação deste

(Petrova & Sauer 2009). Portanto, a expressão constitutiva de *bfmRS* ressalta a sua importância em perceber as condições do meio e assim fazer a sinalização intracelular sempre que necessário.

5.3.3 – Proteínas PgaA, Bap e Abal

O gene *pgaA* apresentou-se superexpresso no biofilme. A proteína PgaA é importante para a produção do PNAG, um polissacarídeo importante para formar a camada que protege o biofilme, o EPS. Visto que a integridade da estrutura do biofilme geralmente depende desses polissacarídeos, o aumento da expressão desse gene apoia os dados da literatura. Interessantemente, o tratamento com antibióticos que tenham como alvo o ribossomo (eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina) parecem induzir o biofilme através da super-regulação de PNAG em *E. coli* (Boehm *et al.*, 2009). Esse polissacarídeo também apresenta efeitos na interação bactéria-hospedeiro afetando a colonização, virulência e evasão do sistema imune em infecções causadas por espécies Gram-positivas e Gram-negativas, e também na interação com superfícies abióticas (Cerca *et al.*, 2007; Sloan *et al.*, 2007; Vuong *et al.*, 2004). Dessa forma, pode ser considerado um importante fator de patogenicidade de *A. baumannii*.

A importância do gene *bap* também já foi descrita para a formação de biofilme em *A. baumannii*. De fato, houve um aumento significativo da expressão de *bap* no biofilme. Bap apresenta uma estrutura similar às adesinas bacterianas, e pode funcionar como uma adesina intercelular de maneira a suportar a estrutura madura do biofilme (Loehfelm *et al.*, 2008). As Bap estão envolvidas na ligação primária à superfície e também, junto com poli- β -N-

acetilglucosamina (PNAG), estão envolvidas na agregação célula-à-célula, influenciando assim na maturação do biofilme (Latasa *et al.*, 2006). Além disso, as proteínas Bap podem ser um importante fator de aderência a células eucarióticas por sua propensão a aumentar a hidrofobicidade superficial da bactéria, considerado um importante passo na colonização e infecção do hospedeiro (Brossard *et al.*, 2011). Ainda, essa proteína é altamente imunogênica, originando um aumento do nível de anticorpos quando administradas em camundongos (Fattahian *et al.*, 2011), podendo ser um importante alvo terapêutico.

O aumento da expressão desses genes corrobora os dados já descritos na literatura, indicando que para as condições testadas eles também são importantes na formação e na manutenção do biofilme bacteriano de *A. baumannii*.

Por outro lado, o gene *abal*, o qual direciona a produção de sinais de uma acil-homoserina lactona (AHL), que funciona como uma molécula sinalizadora no sistema regulatório *quorum sensing* (Bassler, 1999; Gonzalez *et al.*, 2009), foi mais expresso em AbA. Porém, a amostra clínica AbH não variou sua expressão durante as duas condições (biofilme e vida planctônica), apesar de estudos demonstrarem sua necessidade para a formação de biofilme em *A. baumannii* (Niu *et al.*, 2008). A proteína Abal apresenta papel importante em organizar a expressão de exoproteases, sideróforos, exotoxinas e alguns metabólitos secundários (Bassler, 1999; Gonzalez *et al.*, 2009; Anbazhagan *et al.*, 2012). Talvez existam outras proteínas responsáveis pela produção das moléculas de AHLs, além de Abal, em AbH, ou que outras moléculas do

quorum sensing possam também estar envolvidas na sinalização dentro do biofilme.

5.3.4 – Fator de virulência OmpA

A proteína transmembrana OmpA funciona como porina, influenciando na adesão a superfícies e na absorção de antimicrobianos. De fato, *ompA* foi superexpresso durante a formação de biofilme pelas amostras testadas. Ainda, a expressão foi mais elevada na cepa hospitalar AbH, que quando comparado com a cepa AbA (ATCC19606), indicando que poderia haver uma relação entre a resistência aos antimicrobianos e a expressão de *ompA*.

Estudos demonstraram que a OmpA age como fator de virulência sendo responsável pela morte celular, resistência sérica, adesão e invasão à célula hospedeira. A proteína OmpA de *A. baumannii* (AbOmpA) se liga diretamente às células eucarióticas e é direcionada até o núcleo através de sua região denominada NLS - uma sequência peptídica rica em lisina, a qual gera um sinal de localização nuclear. Essa proteína também foi encontrada em mitocôndrias da célula hospedeira. O direcionamento subcelular de AbOmpA até a mitocôndria induz a apoptose celular pela ativação da cascata de caspases e tradução de fatores que induzem a apoptose no núcleo (Choi *et al.*, 2008). Portanto, quando presente no núcleo induz diretamente a citotoxicidade e morte celular (Choi, 2008; Gaddy, 2009). *Acinetobacter baumannii* secreta *ompA* via OMV, vesículas, que quando presentes em tecidos infectados possuem um papel importante na entrega de toxinas e fatores de virulência as células hospedeiras e na indução da resposta imune (Moon *et al.*, 2012; Kwon

et al., 2009). É sabido que AbompA é essencial para *A. baumannii* se ligar a superfície biótica, mas possuindo apenas um papel parcial na formação de biofilme em plásticos (Gaddy *et al.*, 2009). Pela expressão muito acentuada do gene *opmA* na amostra clínica AbH, a qual foi forte produtora de biofilme nos diversos meios testados, além do aumento da expressão em AbA, podemos deduzir que essa proteína possui uma importante função no biofilme quando as células estão aderidas a superfícies plásticas.

5.3.5 – Proteínas ferro-enxofre (IscR, IscS, IscU)

O operon *iscRSU* de ambas amostras e o gene *csdA* de AbH tiveram sua expressão aumentada durante a formação do biofilme. Além disso, *iscU* foi mais expressos na amostra hospitalar AbH. Tais genes estão envolvidos na formação do cofator [Fe-S], de extrema importância em diferenciados processos celulares metabólicos e regulatórios. É proposto que em baixas concentrações de Fe e/ou estresse oxidativo, a expressão de *iscR* é ativada, resultando em um aumento significativo de apo-IscR acarretando na ativação do operon *suf* - um sistema alternativo de síntese do cofator [Fe-S] presente em *E. coli* - pela regulação de seu promotor, e não reprimindo o operon *iscRSU*. Entretanto, em *A. baumannii* o sistema *suf* não foi observado, ficando o sistema *isc* responsável, aparentemente, pela maioria da formação dos cofatores [Fe-S] na célula. Assim, a produção das proteínas IscRSU e CsdA provavelmente possuem grande importância para o biofilme, visto que as células estão em condições de estresse dentro dele (Crack *et al.*, 2012).

Além disso, a presença do cofator [Fe-S] tem sido relacionada com a virulência de algumas bactérias, como por exemplo, *P. aeruginosa*, onde a

ruptura da regulação do suprimento de cofator [Fe-S] atenuou drasticamente a virulência do patógeno. A proteína IscR controla a formação de biofilme em *E. coli*, através da regulação da expressão da fimbria tipo I. O estudo realizado por Wu e Outten (2008) mostrou que IscR tem uma importante função na regulação da formação de biofilme em *E. coli*, indicando que a deleção de *iscR* leva a uma regulação aumentada do operon *fimAICDFGH*, aumentando a formação de biofilme. Além disso, no estudo de Wu e Outten (2008) a deleção de IscR aumentou a formação de biofilme, contudo, em nosso estudo houve uma superexpressão de IscR, assim poderíamos constatar que essa proteína mesmo em grande quantidade não influenciaria negativamente na formação de biofilme em *A. baumannii*.

Talvez em *A. baumannii* não exista a interação de IscR com o operon *fimAICDFGH*. Também, esse fato poderia ser explicado pela possível escassez de nutrientes e ferro no biofilme que impossibilitaria a formação do cofator na concentração necessária para as células e assim, sem grande concentração de [Fe-S], IscR estaria na forma apo-IscR permitindo a expressão de *iscS* e *iscU* importantes para a formação do biofilme como observado por Wu e Outten, (2009) em *E. coli*, pelo qual a deleção desses genes inibiu a formação de biofilme. Além disso, *A. baumannii* não possui o operon *suf* como a *E. coli* o qual é regulado por apo-IscR, não havendo a formação de cofator de outro modo a não ser pelo operon *isc*, assim os níveis do cofator não subiriam tão rápido resultando na conformação apo-IscR por mais tempo, permitindo a expressão de IscSU, necessário para formação de biofilme. Portanto, o resultado é condizente com o aumento de expressão dessas proteínas nas

amostras testadas, que além do aumento de IscS e IscU houve também um aumento da desulfurase CsdA para amostra maior produtora de biofilme, AbH. Além disso, AbH apresentou uma maior expressão de *iscU*, assim, poderia haver uma maior necessidade de formação do cofator que influenciaria em uma maior produção de biofilme.

6. CONCLUSÕES

As duas amostras clínicas analisadas de pacientes hospitalizados na cidade de Porto Alegre mostraram-se eficazes formadoras de biofilme em poliestireno. Da mesma forma, podemos observar que o meio de crescimento e a temperatura são variáveis importantes que irão determinar a espessura do biofilme formado por *A. baumannii*. Além disso, as amostras formaram biofilme em meio suplementado com sangue e em urina. Deste modo, a formação de biofilme pode estar relacionada com a patogenicidade de *A. baumannii*, principalmente na contaminação do ambiente hospitalar e de dispositivos médicos, sendo um risco para pacientes utilizando cateteres e ventilação mecânica e para pacientes diabéticos.

A superexpressão dos genes *wspR*, *csdA* e do operon *iscRSU* poderia indicar a sua importância na formação de biofilme por *A. baumannii*, como já foi observado para outras bactérias. O aumento de transcrição dos genes *pgaA*, *ompA*, *bap*, *abaI* de AbA, apoiam sua importância na formação de biofilme por *A. baumannii*, como outros grupos já haviam verificado. A inibição dos genes *eagg* de AbA, *pilZ* e *csuAB* poderia indicar que não são necessários no biofilme de 24h. A falta de variação na transcrição dos genes *eal*, *eagg* de AbH e *abaI* poderia indicar que são sempre necessários na mesma proporção não importando a condição de crescimento, planctônica ou biofilme. Portanto, a

regulação positiva dos genes *wspR*, *pgaA*, *ompA*, *bap*, *csdA* e do operon *iscRSU* é um indício de sua importância na formação e manutenção do biofilme por esse patógeno, podendo ser alvos de futuras terapias antimicrobianas.

7. PERSPECTIVAS

Verificar a atividade da proteína WspR em *A. baumannii* e analisar a sua importância para a produção de biofilme através de silenciamento gênico e posterior análise fenotípica.

Assim como, pesquisar sobre as demais proteínas estudadas principalmente a importância do operon IscRSU para a formação de biofilme por esse patógeno, pois não há dados na literatura demonstrando essa relação.

Realizar análise transcricional dos genes testados em outras condições de crescimento, como diferentes meios e temperaturas de formação de biofilme, para verificar se o perfil transcricional se mantém.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTIS, L. A., TOLMASKY ME, CROSA LM, CROSA JH. Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of *Acinetobacter-baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 10, p. 2812-2815, 1993.

ANDERSEN CL, JENSEN JL, ØRNTOFT TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Reserch**, v.64, n.15, p.5245-50, 2004.

AMIKAM, D.; GALPERIN, M. Y. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. **Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 3-6, 2006.

ANBAZHAGAN D, MANSOR M, YAN GO, MD YUSOF MY, HASSAN H, SEKARAN SD. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. **PLoS One**, v.7, n.7, p.e36696, 2012.

ANTUNES AL, TRENTIN DS, BONFANTI JW, PINTO CC, PEREZ LR, MACEDO AJ, BARTH AL. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. **APMIS**. v.118, n.11, p.873-7, 2010.

ALSULTAN AA, HAMOUDA A, EVANS BA, AMYES SG. *Acinetobacter baumannii*: emergence of four strains with novel bla(OXA-51-like) genes in patients with diabetes mellitus. **Journal of Chemotherapy**, v.21, n.3, p.290-5, 2009.

AYALA-CASTRO C, SAINI A, OUTTEN FW. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Ver*, v.72, n.1, p.110-25, 2008.

BANTAR C, SCHELL C, POSSE G, LIMANSKY A, BALLERINI V, MOBILIA L. Comparative time-kill study of doxycycline, tigecycline, sulbactam, and imipenem against several clones of *Acinetobacter baumannii*. **Diagnostic Microbioly and Infectious Disease**. v.61, n.3, p. 309-14, 2008.

BARCHITTA, M., CIPRESSO R, GIAQUINTA L, ROMEO MA, DENARO C, PENNISI C, AGODI A. Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 212, n. 3, p. 330-337, 2009.

BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 582-587, 1999.

BERGOGNEBEREZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp, as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 148-+, 1996.

BOEHM A, STEINER S, ZAEHRINGER F, CASANOVA A, HAMBURGER F, RITZ D, KECK W, ACKERMANN M, SCHIRMER T, JENAL U. Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. **Molecular Microbiology**, v.72, n.6, p.1500-16, 2009.

BRANCHU, P., *et al.* The c-di-GMP phosphodiesterase VmpA absent in *Escherichia coli* K12 strains affects motility and biofilm formation in the enterohemorrhagic O157:H7 serotype. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2012.

BREIER A, MARTINS AF: Surto de Multirresistência em Porto Alegre – Vigilância Epidemiológica de Casos. In: XVIII IEA World Congress of Epidemiology, Porto Alegre, Brazil, September 2008.

BROSSARD KA, CAMPAGNARI AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. **Infect Immun**. v.80, n.1, p.228-33, 2012.

CAMARGO GM, PIZZOLITTO AC, PIZZOLITTO EL. Biofilm formation on catheters used after cesarean section as observed by scanning electron microscopy. **Int J Gynaecol Obstet**. v.90, n.2, p.148-9, 2005.

CARNEIRO, M., BARBOSA PI, VESPERO EC, TANITA MT, CARRILHO CM, PERUGINI M, SARIDAKIS HO, POSSUELO LG, RENNER JD, VALIM AR, TOGNIN MC, MARTINS AF, BARTH AL. Carbapenem-resistant OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates causing ventilator-associated pneumonia. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 8, p. 667-669, 2010.

CERCA N, MAIRA-LITRÁN T, JEFFERSON KK, GROUT M, GOLDMANN DA, PIER GB. Protection against *Escherichia coli* infection by antibody to the *Staphylococcus aureus* poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1;104(18):7528-33.

CHEN, M. Z., HSUEH PR, LEE LN, YU CJ, YANG PC, LUH KT. Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. **Chest**, v. 120, n. 4, p. 1072-1077, 2001.

CHOI, A. H. SLAMTI L, AVCI FY, PIER GB, MAIRA-LITRÁN T. The pgaABCD Locus of *Acinetobacter baumannii* Encodes the Production of Poly-beta-1-6-N-Acetylglucosamine, Which Is Critical for Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 19, p. 5953-5963, 2009.

CHOI CH, HYUN SH, LEE JY, LEE JS, LEE YS, KIM SA, CHAE JP, YOO SM, LEE JC. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol*. 2008 Feb;10(2):309-19.

CISNEROS, J. M., REYES MJ, PACHÓN J, BECERRIL B, CABALLERO FJ, GARCÍA-GARMENDÍA JL, ORTIZ C, COBACHO AR. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* epidemiology, clinical findings, and prognostic features. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 1026-1032, 1996.

CISNEROS, J. M.; RODRIGUEZ-BANO, J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 11, p. 687-693, 2002.

COCHRANE, D. M. BROWN MR, ANWAR H, WELLER PH, LAM K, COSTERTON JW. Antibody-response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 255-261, 1988.

COSTERTON, J. W., GEESEY GG, CHENG KJ. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86-&, 1978.

COSTERTON JW, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPIN-SCOTT HM. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CRACK JC, GREEN J, THOMSON AJ, LE BRUN NE. Iron-sulfur cluster sensor-regulators. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.16, n.1-2, p.35-44, 2012.

D'AREZZO, S. CAPONE A, PETROSILLO N, VISCA P; GRAB, BALLARDINI M, BARTOLINI S, BORDI E, DI STEFANO A, GALIÈ M, MINNITI R, MELEDANDRI M, PACCIANI L, PARISI G, PRIGNANO G, SANTINI C, VALMARIN M, VENDITTI M, ZIANTONI S.. Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 4, p. 347-357, 2009.

D'ARGENIO, D. A. CALFEE MW, RAINEY PB, PESCI EC. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6481-6489, 2002.

D'Argenio DA, Miller SI. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. **Microbiology**, v.150, n.8, p.2497-502, 2004.

DAVIES, D. G. PARSEK MR, PEARSON JP, IGLEWSKI BH, COSTERTON JW, GREENBERG EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 295-298, 1998.

DENT, L. L., MARSHALL DR, PRATAP S, HULETTE RB. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a descriptive study in a city hospital. **Bmc Infectious Diseases**, v. 10, 2010.

DIJKSHOORN, L., NEMEC A, SEIFERT H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 939-951, 2007.

DIJKSHOORN L, VAN DALEN R, VAN OUYEN A, BIJL D, TJERNBERG I, MICHEL MF, HORREVORTS AM. Endemic *Acinetobacter* in intensive-care units - epidemiology and clinical impact. **Journal of Clinical Pathology**, v. 46, n. 6, p. 533-536, 1993.

DJERIBI R, BOUCHLOUKH W, JOUENNE T, MENAA B. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. **American Journal of Infection Control**, v.40, n.9, p.854-9, 2012.

DORSEY, C. W., TOMARAS, A.P., ACTIS, L.A. Genetic and phenotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* insertion derivatives generated with a transposome system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6353-6360, 2002.

DÜVEL J, BERTINETTI D, MÖLLER S, SCHWEDE F, MORR M, WISSING J, RADAMM L, ZIMMERMANN B, GENIESER HG, JÄNSCH L, HERBERG FW, HÄUSSLER S. A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Microbiol Methods*. v.88, n.2, p.229-36, 2012.

ECHENIQUE, J. R. ARIENTI H, TOLMASKY ME, READ RR, STANELONI RJ, CROSA JH, ACTIS LA. characterization of a high-affinity iron transport-system in *acinetobacter-baumannii*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 23, p. 7670-7679, 1992.

FALAGAS, M. E.; KARVELI, E. A. The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 2, p. 117-119, 2007.

FALAGAS ME, KARVELI EA, KELESIDIS I, KELESIDIS T. Community-acquired *Acinetobacter* infections. *European Journal of Clinical Microbiol and Infectious Disease*, v.26, n.12, p.57-68, 2007.

FATTAHIAN Y, RASOOLI I, MOUSAVI GARGARI SL, RAHBAR MR, DARVISH ALIPOUR ASTANEH S, AMANI J. Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). **Microb Pathog**, v.51, n.6, p.402-6, 2011.

FERNANDO D, KUMAR A. Growth phase-dependent expression of RND efflux pump- and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, n.3, p.569-72, 2012.

FURTADO GH, CAVALCANTE AC, MEDEIROS EA, GALES AC, OLIVEIRA VG, GIRARDELO R. Bloodstream infections with OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in a university-affiliated hospital in Brazil: epidemiology and clinical outcomes. **Am J Infect Control**, v.39, n.8, p.706-8, 2011.

GADDY, J. A.; ACTIS, L. A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 273-278, 2009.

GADDY, J. A. TOMARAS AP, ACTIS LA. The Acinetobacter baumannii 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3150-3160, 2009.

GONZALEZ, R. H., DIJKSHOORN L, VAN DEN BARSELAAR M, NUDEL C. Quorum sensing signal profile of Acinetobacter strains from nosocomial and environmental sources. **Revista Argentina De Microbiologia**, v. 41, n. 2, p. 73-78, 2009.

GOYMER, P. KAHN SG, MALONE JG, GEHRIG SM, SPIERS AJ, RAINEY PB. Adaptive divergence in experimental populations of Pseudomonas fluorescens. II. Role of the GGDEF regulator WspR in evolution and development of the wrinkly spreader phenotype. **Genetics**, v. 173, n. 2, p. 515-526, 2006.

GRIFFITH, M. E. CEREMUGA JM, ELLIS MW, GUYMON CH, HOSPENTHAL DR, MURRAY CK. Acinetobacter skin colonization of US army soldiers. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 27, n. 7, p. 659-661, 2006.

GUVENER, Z. T.; HARWOOD, C. S. Subcellular location characteristics of the Pseudomonas aeruginosa GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 1459-1473, 2007.

HANNA H, AFIF C, ALAKECH B, BOKTOUR M, TARRAND J, HACHEM R, RAAD I. Central venous catheter-related bacteremia due to gram-negative bacilli: significance of catheter removal in preventing relapse. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v.25, n.8, p.646-9, 2004.

HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 263-273, 2009.

HIGGINS PG, WISPLINGHOFF H, STEFANIK D, SEIFERT H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of Acinetobacter baumannii. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.54, n.4, p.821-3, 2004.

HISERT KB, MACCOSS M, SHILOH MU, DARWIN KH, SINGH S, JONES RA, EHRT S, ZHANG Z, GAFFNEY BL, GANDOTRA S, HOLDEN DW, MURRAY D, NATHAN C. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial

survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. **Molecular Microbiology**. v. 56, n. 5, p. 1234-45, 2005.

HO, P. L.; HO AY, CHOW KH, LAI EL, CHING P, SETO WH. Epidemiology and clonality of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from a healthcare region in Hong Kong. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, n. 4, p. 358-364, 2010.

HOFFMAN, L. R.; D'ARGENIO DA, MACCOSS MJ, ZHANG Z, JONES RA, MILLER SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1171-1175, 2005.

HOWARD A, O'DONOGHUE M, FEENEY A, SLEATOR RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v.3, n.3, p.243-50, 2012.

ISHIHARA Y, HYODO M, HAYAKAWA Y, KAMEGAYA T, YAMADA K, OKAMOTO A, HASEGAWA T, OHTA M. Effect of cyclic bis(3'-5')diguanylic acid and its analogs on bacterial biofilm formation. **FEMS Microbiol Lett**. v.301, n.2, p.193-200, 2009.

ITOH Y, RICE JD, GOLLER C, PANNURI A, TAYLOR J, MEISNER J, BEVERIDGE TJ, PRESTON JF 3RD, ROMEO T. Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.10, p.3670-80, 2008.

JAWAD, A. SEIFERT H, SNELLING AM, HERITAGE J, HAWKEY PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: Comparison of outbreak and sporadic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1938-1941, 1998.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **Fems Microbiology Letters** , v. 236, n. 2, p. 163-173, 2004.

JIN JS, KWON SO, MOON DC, GURUNG M, LEE JH, KIM SI, LEE JC. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. **PLoS One**, v.28, n.2, p.e17027, 2011.

JOHNSON JG, MURPHY CN, SIPPY J, JOHNSON TJ, CLEGG S. Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v.193, n.14, p.3453-60, 2011.

JOSEPH NM, SISTLA S, DUTTA TK, BADHE AS, RASITHA D, PARIJA SC. Role of intensive care unit environment and health-care workers in transmission of ventilator-associated pneumonia. **J Infect Dev Ctries.** Jun 3;4(5):282-91. 2010.

JUNG, J. Y.; PARK MS, KIM SE, PARK BH, SON JY, KIM EY, LIM JE, LEE SK, LEE SH, LEE KJ, KANG YA, KIM SK, CHANG J, KIM YS. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. **Bmc Infectious Diseases**, v. 10, 2010.

KARAOLIS DK, RASHID MH, CHYTHANYA R, LUO W, HYODO M, HAYAKAWA Y. c-di-GMP(3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. **Antimicrob Agents Chemother.**v.49, n.3, p.1029-38, 2005.

KEMPF M, ROLAIN JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. **Int J Antimicrob Agents**, v.39, n.2, p.105-14, 2012.

KING, L. B.; SWIATLO E, SWIATLO A, MCDANIEL LS. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 414-421, 2009.

KJELLEBERG S, MOLIN S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? **Curr Opin Microbiol.** v.5, n.3, p.254-8, 2002.

KWON SO, GHO YS, LEE JC, KIM SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. **FEMS Microbiol Lett**, v.297, n.2, p.150-6, 2009.

KOHLBERG, A.; BRÜMMER S, HIGGINS PG, SOHR D, PIENING BC, DE GRAHL C, HALLE E, RÜDEN H, SEIFERT H. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1499-1507, 2009.

KOPRNOVÁ J, SVETLANSKÝ I, BABEL'A R, BILÍKOVÁ E, HANZEN J, ZUSČÁKOVÁ IJ, MÍLOVSKÝ V, MASÁR O, KOVACICOVÁ G, GOGOVIČ M, KOREN P, RUSNÁK M, LISKOVÁ A, ZÁK V, KARVAJ M, KANIK K, STREHÁR A, LESAY M, SZÖVENIOVÁ Z, TRUPL J, PURGELOVÁ A, KRÁLINSKÝ K, ROIDOVÁ A, LAMOSOVÁ J, HUTTOVÁ M, KRČMÉRY V. Prospective study of antibacterial susceptibility, risk factors and outcome

of 157 episodes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia in 1999 in Slovakia. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.33, n.12, p.891-5, 2001.

KULAH, C.; MOOIJ MJ, COMERT F, AKTAS E, CELEBI G, OZLU N, RIJNSBURGER MC, SAVELKOUL PH. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 2, p. 114-118, 2010.

LANDMAN D, BABU E, SHAH N, KELLY P, OLAWOLE O, BÄCKER M, BRATU S, QUALE J. Transmission of carbapenem-resistant pathogens in New York City hospitals: progress and frustration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 67, n.6, p.1427-31, 2012.

LATASA C, SOLANO C, PENADÉS JR, LASA I. Biofilm-associated proteins. **C R Biol**. v.329, n.11, p.849-57, 2006.

LASA I, PENADÉS JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v.157, n.2, p.99-107, 2006.

LEE, H. W.; KOH YM, KIM J, LEE JC, LEE YC, SEOL SY, CHO DT, KIM J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 49-54, 2008.

LEE, J. C.; KOERTEN H, VAN DEN BROEK P, BEEKHUIZEN H, WOLTERBEEK R, VAN DEN BARSELAAR M, VAN DER REIJDEN T, VAN DER MEER J, VAN DE GEVEL J, DIJKSHOORN L. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 4, p. 360-366, 2006.

LEE, N. Y.; CHANG TC, WU CJ, CHANG CM, LEE HC, CHEN PL, LEE CC, KO NY, KO WC. Clinical manifestations, antimicrobial therapy, and prognostic factors of monomicrobial *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia. **Journal of Infection**, v. 61, n. 3, p. 219-227, 2010.

LEE YT, KUO SC, YANG SP, LIN YT, TSENG FC, CHEN TL, FUNG CP. Impact of appropriate antimicrobial therapy on mortality associated with *Acinetobacter baumannii* bacteremia: relation to severity of infection. *Clin Infect Dis*. v. 55, n.2, p.209-15, 2012.

LEONE, S.; STURIALE L, PESSIONE E, MAZZOLI R, GIUNTA C, LANZETTA R, GAROZZO D, MOLINARO A, PARRILLI M. Detailed characterization of the lipid A fraction from the nonpathogen *Acinetobacter radioresistens* strain S13. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 5, p. 1045-1051, 2007.

LEWANDOWSKI Z. Notes on biofilm porosity. **Wat. Res.** Vol. 34, No. 9, p. 2620±2624, 2000.

LEWIS K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.1, p.48-56, 2007.

LEVIN AS, MENDES CM, SINTO SI, SADER HS, SCARPITTA CR, RODRIGUES E, SAUAIA N, BOULOS M. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.17, n.6, p.366-8, 1996.

LI, J.; NATION RL, OWEN RJ, WONG S, SPELMAN D, FRANKLIN C. Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: Promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 594-598, 2007.

LITZOW, J. M.; GILL CJ, MANTARING JB, FOX MP, MACLEOD WB, MENDOZA M, MENDOZA S, SCOBIE R, HUSKINS CW, GOLDMAN DA, HAMER DH. High Frequency of Multidrug-Resistant Gram-Negative Rods in 2 Neonatal Intensive Care Units in the Philippines. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 6, p. 543-549, 2009.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. v.25, n.4, p.402-8, 2001.

IVERMORE, D. M.; HILL RL, THOMSON H, CHARLETT A, TURTON JF, PIKE R, PATEL BC, MANUEL R, GILLESPIE S, BALAKRISHNAN I, BARRETT SP, CUMBERLAND N, TWAGIRA M; C-MRAB STUDY GROUP. Antimicrobial treatment and clinical outcome for infections with carbapenem-and multiply-resistant *Acinetobacter baumannii* around London. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 1, p. 19-24, 2010.

LOEHFELM, T. W.; LUKE NR, CAMPAGNARI AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1036-1044, 2008.

LUO G, LIN L, IBRAHIM AS, BAQUIR B, PANTAPALANGKOOR P, BONOMO RA, DOI Y, ADAMS MD, RUSSO TA, SPELLBERG B. Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-*Acinetobacter baumannii* infection. **PLoS One**.v.7, n.1, p.e29446, 2012.

MACK D, FISCHER W, KROKOTSCH A, LEOPOLD K, HARTMANN R, EGGE H, LAUFS R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **Journal of Bacteriology**. v.178, n.1, p.175-83, 1996.

MARKOGIANNAKIS, A. *et al.* Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 5, p. 410-417, 2008.

MARRA AR, CAMARGO LF, PIGNATARI AC, SUKIENNIK T, BEHAR PR, MEDEIROS EA, RIBEIRO J, GIRÃO E, CORREA L, GUERRA C, BRITES C, PEREIRA CA, CARNEIRO I, REIS M, DE SOUZA MA, TRANCHESI R, BARATA CU, Edmond MB; Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.5, p.1866-71, 2011.

MARTÍ S, RODRÍGUEZ-BAÑO J, CATEL-FERREIRA M, JOUENNE T, VILA J, SEIFERT H, DÉ E. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. **BMC Research Notes**, v. 4, p.5, 2011.

MARTINS AF, KUCHENBECKER R, SUKIENNIK T, BOFF R, REITER KC, LUTZ L, MACHADO AB, BARTH AL. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. **Infection**, v.37, n.5, p.474-6, 2009.

MARTINS AF, KUCHENBECKER RS, PILGER KO, PAGANO M, BARTH AL; CMCIES-PMPA/SMS Task Force. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. **Am J Infect Control**, v.40, n.2, p.108-12, 2012.

MATASEJE LF, BRYCE E, ROSCOE D, BOYD DA, EMBREE J, GRAVEL D, KATZ K, KIBSEY P, KUHN M, MOUNCHILI A, SIMOR A, TAYLOR G, THOMAS E, TURGEON N, MULVEY MR; Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, n.6, p.1359-67, 2012.

MARAIS E, DE JONG G, FERRAZ V, MALOBA B, DUSÉ AG. Interhospital transfer of pan-resistant Acinetobacter strains in Johannesburg, South Africa. **American Journal of Infection Control**, v.32, n.5, p.278-81, 2004.

MCQUEARY CN, ACTIS LA. Acinetobacter baumannii biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. **Journal of Microbiology**, v.49, n.2, p.243-50, 2011.

MERIGHI, M. LEE VT, HYODO M, HAYAKAWA Y, LORY S. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 876-895, 2007.

MEZZATESTA ML, TROVATO G, GONA F, NICOLOSI VM, NICOLOSI D, CARATTOLI A, FADDA G, NICOLETTI G, STEFANI S. In vitro activity of tigecycline and comparators against carbapenem-susceptible and resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates in Italy. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.7, p.4, 2008.

MICHALOPOULOS A, FALAGAS ME, KARATZA DC, ALEXANDROPOULOU P, PAPADAKIS E, GREGORAKOS L, CHALEVELAKIS G, PAPPAS G. Epidemiologic, clinical characteristics, and risk factors for adverse outcome in multiresistant gram-negative primary bacteremia of critically ill patients. **American Journal of Infection Control**. v.39, n.5, p.396-400,2011.

MOON DC, CHOI CH, LEE JH, CHOI CW, KIM HY, PARK JS, KIM SI, LEE JC. Acinetobacter baumannii outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. **Journal of Microbiology**. v.50, n.1, p.155-60, 2012.

NIU, C. CLEMMER KM, BONOMO RA, RATHER PN. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 9, p. 3386-3392, 2008.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295-304, 1998.

PARK, Y. K. *et al.* A Single Clone of *Acinetobacter baumannii*, ST22, Is Responsible for High Antimicrobial Resistance Rates of *Acinetobacter* Spp. Isolates That Cause Bacteremia and Urinary Tract Infections in Korea. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 2, p. 143-149, 2010.

PARK YK, CHOI JY, SHIN D, KO KS. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. **International journal of Antimicrobial Agents**. v.37, n.6, p.525-30, 2011.

PEREZ F, HUJER AM, HUJER KM, DECKER BK, RATHER PN, BONOMO RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 3471-3484, 2007.

PETROVA OE, SAUER K. A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS Pathogens*, v.5, n.11, p.e1000668,2009.

POVOLOTSKY TL, HENGGE R. 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP. **Journal of Biotechnology**. v.160, n.1-2, p.10-6, 2012.

POUR NK, DUSANE DH, DHAKEPHALKAR PK, ZAMIN FR, ZINJARDE SS, CHOPADE BA. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. v.62, n.3, p.328-38, 2011.

PRATA-ROCHA, ML. GONTIJO-FILHO PP, MELO GB. Factors influencing survival in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. **Brazilian Journal of Infectious Disease**. v. 16, n.3, p.237-241, 2012.

PRATES CG, MARTINS AF, SUPERTI SV, LOPES FS, RAMOS F, CANTARELLI VV, ZAVASCKI AP. Risk factors for 30-day mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. **Epidemiology and Infection**, v. 39, n.3, p.411-8, 2011.

PÉREZ-MENDOZA D, COULTHURST SJ, SANJUÁN J, SALMOND GP. N-Acetylglucosamine-dependent biofilm formation in *Pectobacterium atrosepticum* is cryptic and activated by elevated c-di-GMP levels. **Microbiology**. v.157, n.12, p.3340-8, 2011.

PRATT, J. T. TAMAYO R, TISCHLER AD, CAMILLI A. PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 17, p. 12860-12870, 2007.

PY B, BARRAS F. Building Fe-S proteins: bacterial strategies. **Nature Review Microbiology**. v.8, n.6, p.436-46, 2010.

PYLA R, KIM TJ, SILVA JL, JUNG YS. Overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in the *Azotobacter vinelandii* mutant that does not express small RNA ArrF. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.84, n.4, p.717-24, 2009.

RAJAMOHAN, G. SRINIVASAN VB, GEBREYES WA. Biocide-tolerant multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains are associated with higher biofilm formation. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 3, p. 287-289, 2009.

RAO, R.S. KARTHIKA RU, SINGH SP, SHASHIKALA P, KANUNGO R, JAYACHANDRAN S, PRASHANTH K. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 333-337, 2008.

RESSNER, R. A.; MURRAY CK, GRIFFITH ME, RASNAKE MS, HOSPENTHAL DR, WOLF SE. Outcomes of bacteremia in burn patients involved in combat operations overseas. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 206, n. 3, p. 439-444, 2008.

ROBERTS, S. A. FINDLAY R, LANG SD. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 48, n. 3, p. 228-232, 2001.

RODRIGUEZ-BANO, J.; MARTÍ S, SOTO S, FERNÁNDEZ-CUENCA F, CISNEROS JM, PACHÓN J, PASCUAL A, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, MCQUEARY C, ACTIS LA, VILA J. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 3, p. 276-278, 2008.

ROMANELLI RM, JESUS LA, CLEMENTE WT, LIMA SS, REZENDE EM, COUTINHO RL, MOREIRA RL, NEVES FA, BRÁS NDE J. Outbreak of resistant *Acinetobacter baumannii*- measures and proposal for prevention and control. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.13, n.5, p.341-7, 2009.

ROSENTHAL, V. D. *et al.* International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 2, p. 95-U31, 2010.

ROY AB, PETROVA OE, SAUER K. The phosphodiesterase DipA (PA5017) is essential for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion. **Journal of Bacteriology**, v.194, n.11, p.2904-15, 2012.

RYJENKOV, D. A. SIMM R, RÖMLING U, GOMELSKY M. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP - The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30310-30314, 2006.

SADER H.S. GALES AC, PFALLER MA, MENDES RE, ZOCCOLI C, BARTH A, JONES RN. Pathogen frequency and resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, n.4, 2001.

SALTER MG, CONLON HE. Extraction of plant RNA. *Methods Mol Biol*, v. 362, p.309-14, 2007.

SAUER, K. CAMPER AK, EHRLICH GD, COSTERTON JW, DAVIES DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1140-1154, 2002.

SCHRECKENBERGER, P.C.; DANESHVAR, M.I.; HOLLIS, D.G. *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M.L.; PFALLER M.A. (Ed). **Manual of Clinical Microbiology**. 9 Ed. Vol. 2. Washington, D.C.: ASM Press, 2007. P.770-774.

SHIN, J. H. LEE HW, KIM SM, KIM J. Proteomic Analysis of *Acinetobacter baumannii* in Biofilm and Planktonic Growth Mode. **Journal of Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 728-735, 2009.

SLOAN GP, LOVE CF, SUKUMAR N, MISHRA M, DEORA R. The *Bordetella Bps* polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. **J Bacteriol.** 2007 Nov;189(22):8270-6

SMITH, A. W. FREEMAN S, MINETT WG, LAMBERT PA. Characterization of a siderophore from *Acinetobacter-calcoaceticus*. **Fems Microbiology Letters**, v. 70, n. 1, p. 29-32, 1990.

SMITH, M. G. GIANOULIS TA, PUKATZKI S, MEKALANOS JJ, ORNSTON LN, GERSTEIN M, SNYDER M. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. **Genes & Development**, v. 21, p. 601-614, 2007.

SOMERVIL.DA; NOBLE, W. C. A note on gram negative bacilli of human skin. **European Journal of Clinical and Biological Research**, v. 15, n. 6, p. 669-&, 1970.

SPIERS, A. J. BOHANNON J, GEHRIG SM, RAINEY PB. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 15-27, 2003.

STEPANOVIC S, CIRKOVIC I, RANIN L, SVABIC-VLAHOVIC M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Lett Appl Microbiol**, v. 38, n. 5, p. 428–432, 2004

STICKLER DJ, MORRIS NS, MCLEAN RJ, FUQUA C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Appl Environ Microbiol*, v.64, n.9, p.3486-90, 1998.

STOODLEY, P. SAUER K, DAVIES DG, COSTERTON JW. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

Storti A, Pizzolitto AC, Stein RA, Pizzolitto EL. Biofilme detectado em ponta de cateter venoso central por cultura usando método quantitativo. **RBAC**, v.39, n.3, p.183-187, 2007

TCHIGVINTSEV A, XU X, SINGER A, CHANG C, BROWN G, PROUDFOOT M, CUI H, FLICK R, ANDERSON WF, JOACHIMIAK A, GALPERIN MY, SAVCHENKO A, YAKUNIN AF. Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, n.3, p.524-38, 2010.

TJERNBERG, I.; URSING, J. Clinical studies of Acinetobacter classified by DNA-DNA hybridization. **Apmis** , v. 115, n. 5, p. 646-656, 2007.

TOLEDO PV, AREND LN, PILONETTO M, COSTA OLIVEIRA JC, LUHM KR; Working Group in Healthcare Associated Infections (WGHA). Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. **J Hosp Infect.** v.80, n.4, p.351-3, 2012.

TOMARAS, A. P. DORSEY CW, EDELMANN RE, ACTIS LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology-Sgm**, v. 149, p. 3473-3484, 2003.

TOMARAS AP, FLAGLER MJ, DORSEY CW, GADDY JA, ACTIS LA. Characterization of a two-component regulatory system from Acinetobacter baumannii that controls biofilm formation and cellular morphology. **Microbiology-Sgm**, v. 154, p. 3398-3409, 2008.

VALENCIA, R. ARROYO LA, CONDE M, ALDANA JM, TORRES MJ, FERNÁNDEZ-CUENCA F, GARNACHO-MONTERO J, CISNEROS JM, ORTÍZ C, PACHÓN J, AZNAR J. Nosocomial Outbreak of Infection With Pan-Drug-Resistant Acinetobacter baumannii in a Tertiary Care University Hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 3, p. 257-263, 2009.

VAN DEN BROEK, P. J. ARENDS J, BERNARDS AT, DE BRAUWER E, MASCINI EM, VAN DER REIJDEN TJ, SPANJAARD L, THEWESSEN EA, VAN DER ZEE A,

VAN ZEIJL JH, DIJKSHOORN L. Epidemiology of multiple Acinetobacter outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 837-843, 2006.

VAN DEN BROEK PJ, VAN DER REIJDEN TJ, VAN STRIJEN E, HELMIG-SCHURTER AV, BERNARDS AT, DIJKSHOORN L. Endemic and Epidemic

Acinetobacter Species in a University Hospital: an 8-Year Survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3593-3599, 2009.

VIDAL R, DOMINGUEZ M, URRUTIA H, BELLO H, GONZALEZ G, GARCIA A, ZEMELMAN R. Biofilm formation by Acinetobacter baumannii. **Microbio**,v. 86, n.346, p.49-58, 1996.

VUONG C, KOCIANOVA S, VOYICH JM, YAO Y, FISCHER ER, DELEO FR, OTTO M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **J Biol Chem**, v.279, n.52, p.54881-6, 2004.

WADL, M. HECKENBACH K, NOLL I, ZIESING S, PFISTER W, BEER J, SCHUBERT S, ECKMANNNS T. Increasing Occurrence of Multidrug-Resistance in Acinetobacter baumannii Isolates From Four German University Hospitals, 2002-2006. **Infection**, v. 38, n. 1, p. 47-51, 2010.

WHITELEY, M. BANGERA MG, BUMGARNER RE, PARSEK MR, TEITZEL GM, LORY S, GREENBERG EP. Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 860-864, 2001.

WILKSCH JJ, YANG J, CLEMENTS A, GABBE JL, SHORT KR, CAO H, CAVALIERE R, JAMES CE, WHITCHURCH CB, SCHEMBRI MA, CHUAH ML, LIANG ZX, WIJBURG OL, JENNEY AW, LITHGOW T, STRUGNELL RA. MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls Klebsiella pneumoniae biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. **PLoS Pathogens**, v.7, n.8, p.e1002204,2011.

WISPLINGHOFF, H. HIPPLER C, BARTUAL SG, HAEFS C, STEFANIK D, HIGGINS PG, SEIFERT H. Molecular epidemiology of clinical Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 7, p. 708-715, 2008.

WOOD GC, HANES SD, CROCE MA, FABIAN TC, BOUCHER BA Comparison of ampicillin-sulbactam and imipenem-cilastatin for the treatment of Acinetobacter ventilator-associated pneumonia. **Clinical Infectious Disease**, v. 34, n.11, p.1425-30, 2002.

WOOD GC, HANES SD, BOUCHER BA, CROCE MA, FABIAN TC. Tetracyclines for treating multidrug-resistant Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia.**Intensive Care Medicine**, v. 29, n.11,p. 2072-6, 2003.

WROBLEWSKA, M. M. SAWICKA-GRZELAK A, MARCHEL H, LUCZAK M, SIVAN A. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 140-144, 2008.

WU Y, OUTTEN FW. IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. **Journal of Bacteriology**. V.191, n.4, p.1248-57, 2009.

YAN W, QU T, ZHAO H, SU L, YU Q, GAO J, WU B. The effect of c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) on the biofilm formation and adherence of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Res**, v.165, n.2, p.87-96, 2010.

ZHAO L, KUOLEE R, HARRIS G, TRAM K, YAN H, CHEN W. c-di-GMP protects against intranasal *Acinetobacter baumannii* infection in mice by chemokine induction and enhanced neutrophil recruitment. **Int Immunopharmacol**, v.11, n.9, p.1378-83, 2011.

9. ANEXO

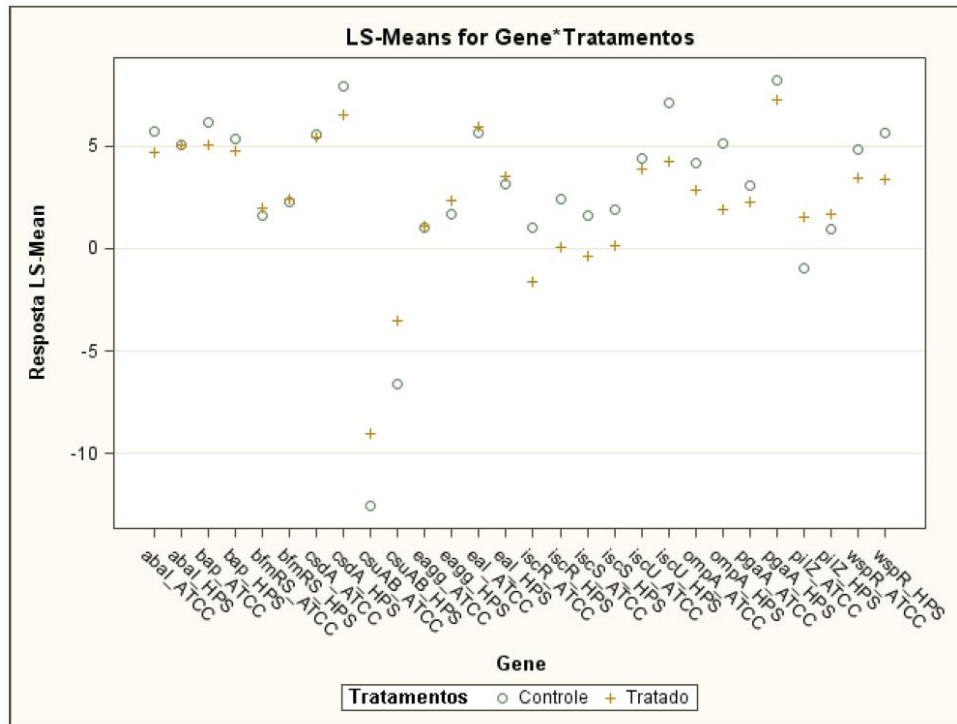


GRÁFICO 1: Comparação entre os Δ Cts de todos genes testados em cepas de *Acinetobacter baumannii* (AbA e AbH) sob a forma de vida livre (controle) e em biofilme (tratado).

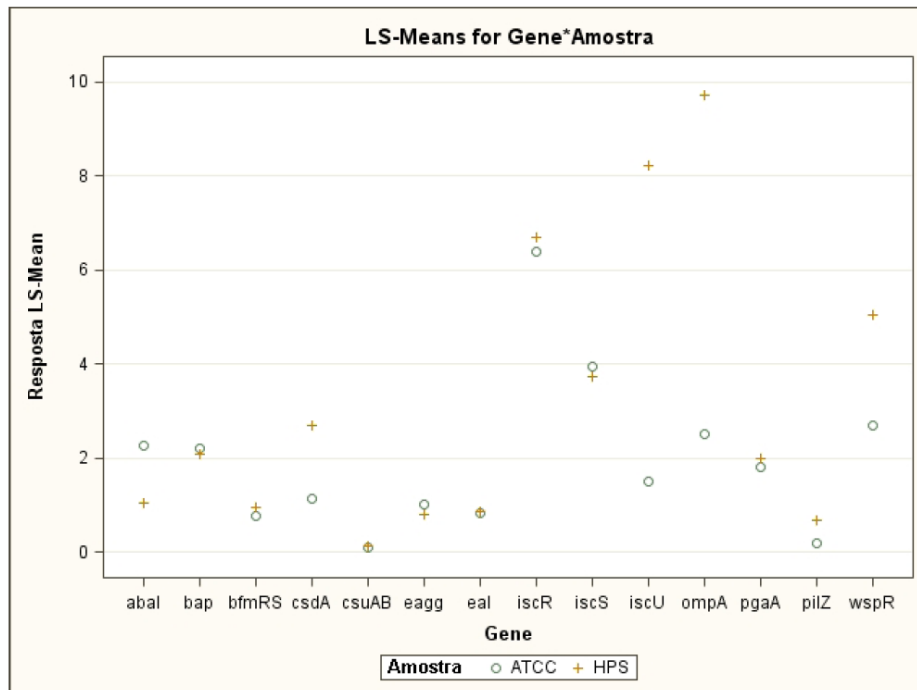


GRÁFICO 2: Diferença na expressão dos genes testado entre as duas amostras AbA (ATCC) e AbH (HPS), obtido na análise estatística. Indicando que os genes *wspR*, *ompA*, *abal*, *csdA* e *iscU* possuem diferença significativa de expressão entre as duas amostras.