



AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM ISOLADOS SENSÍVEIS E RESISTENTES DE *Pseudomonas aeruginosa* APÓS EXPOSIÇÃO AO MEROPENEM

Yasmin Eiko Narimatsu (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Heitor Felipe de Souza Silva, Regiane Bertim de Lima Scodro, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, Rosilene Fressatti Cardoso (Co-orientador) Vera Lúcia Dias Siqueira (Orientadora) e-mail: vldsiqueira@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá /Centro de Ciências Saúde/Maringá, PR.

Microbiologia - Microbiologia Médica

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, expressão gênica, meropenem

Resumo:

O presente projeto tem como objetivo detectar e quantificar genes diferencialmente expressos em um isolado clínico multirresistente e em uma cepa padrão sensível de *Pseudomonas aeruginosa* decorrentes da exposição a concentrações subinibitórias de meropenem. Foi utilizado um isolado de *P. aeruginosa* resistente ao meropenem, proveniente do setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá. *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle sensível ao antimicrobiano estudado. A expressão gênica diferencial, de ambos os isolados, após exposição à concentração subinibitória de meropenem, foi obtida empregando a técnica *Representational Difference Analysis* (RDA) e a quantificação dos genes diferencialmente expressos foi determinada pela *Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR* (qPCR). Produtos gênicos relacionados com a manutenção da morfologia e parede celulares, além de um gene relacionado ao transportador do sistema glutamato-aspartato foram diferencialmente expressos em ambas as amostras, mas quantitativamente superexpressos no isolado clínico resistente. Genes de resistência associados à produção de β -lactamase também se mostraram superexpressos na 1071-MRPA. Diferença expressiva entre as amostras não foi verificada na quantificação da expressão de bombas de efluxo do tipo MexA. A exposição ao meropenem também ativou mecanismos de resposta SOS bacteriana,





principalmente no isolado clínico multirresistente, devido à superexpressão do gene *lexA*. Embora os resultados deste trabalho necessitem ser corroborados por estudos adicionais, eles sugerem que isolados de *P. aeruginosa* possam ser resistentes ao meropenem por ativarem de forma mais eficiente os genes responsáveis pela manutenção da parede e morfologia celular, resposta SOS bacteriana e resistência antimicrobiana intrínseca.

Introdução

Dos agentes antimicrobianos que podem ser ativos contra *Pseudomonas aeruginosa* destacam-se o meropenem. A resistência ao meropenem em *P. aeruginosa* se deve à presença de diversos mecanismos, que podem atuar ou não em combinação, como alterações na membrana externa, superexpressão de AmpC e bombas de efluxo (MexAB-OprM), além da produção de outras β -lactamases, principalmente do tipo carbapenemase (LISTER et al., 2009)

Entender a resposta bacteriana frente à ação de determinado antimicrobiano pode contribuir para o conhecimento da interação antimicrobiano e alvo bacteriano, e assim otimizar seu controle. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo identificar e quantificar possíveis genes diferencialmente expressos em um isolado clínico resistente e em uma cepa padrão sensível ao meropenem de *P.aeruginosa* após exposição a concentração subinibitória do fármaco.

Materiais e métodos

Foi utilizado um isolado de *P. aeruginosa* resistente ao meropenem (1071-MRPA) proveniente do setor de Bacteriologia Médica/LEPAC/UEM. *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como amostra controle sensível ao antimicrobiano estudado. Ambos isolados bacterianos, expostos (T_R e T_S) e não expostos (D_R e D_S) à concentração subinibitória de meropenem por 1 hora, tiveram seu RNA extraído e a primeira e segunda fita de cDNA sintetizadas como descrito por Siqueira et al., (2014). A segunda fita de cDNA das bactérias ATCC e 1071-MRPA foi utilizada para a avaliação dos genes diferencialmente expressos após exposição ao meropenem empregando a técnica *Representational Difference Analysis* (RDA1 e 2, respectivamente), com posterior clonagem e sequenciamento dos produtos





diferencialmente expressos (Siqueira et al., 2014). qPCR foi realizado para confirmar e quantificar os níveis de transcritos dos genes diferencialmente expressos detectados pela técnica de RDA (com redundância superior a 10), além de genes relacionados à resistência de *P. aeruginosa* ao meropenem (Siqueira et al., 2014).

Resultados e Discussão

Os genes diferencialmente expressos mais redundantes foram glutamato/aspartato pronton simporter seguidos da hidrolase associada à parede celular na RDA1 (Isolado ATCC sensível) e serina acetiltransferase e OprF na RDA2 (1071-MRPA resistente) (Tabela 1).

Tabela 1. ESTs^a da cepa padrão sensível (ATCC 27853) e do isolado clínico multirresistente (1071-MRPA) de *Pseudomonas aeruginosa*, após 1 hora de exposição à concentração subinibitória de meropenem (0,5 x CIM).

Isolado bacteriano	Produto gênico	Função	Redundância
ATCC 27853 (RDA1)	OprF	Proteína externa de membrana (parede celular)	15 clones
	hidrolase	(parede celular)	23 clones
	Glutamato/aspartato:proton symporter	Proteína carreadora do sistema Glu/ Asp Na ⁺ -independente	30 clones
1071-MRPA (RDA2)	OprF	Proteína externa de membrana (parede celular)	22 clones
	Serina acetiltransferase	Biossíntese de L-cisteína	26 clones
	Proteína hipotética (Hyp I)	Proteína não classificada (desconhecida)	18 clones
	Proteína hipotética (Hyp II)	Proteína não classificada (desconhecida)	10 clones
	Proteína hipotética (desconhecida)	(desconhecida)	9 clones
	Proteína hipotética (desconhecida) ERCG_04613	(desconhecida)	6 clones

^a ESTs - Expressed Sequence Tags. ^b Número de acesso no GenBank - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Os genes que codificam a OprF e hidrolase de parede celular, mostraram-se superexpressos em 1071-MRPA. Dos genes de resistência bacteriana, não houve diferença expressiva, entre a cepa padrão e o isolado clínico, para os níveis de *mexA*. Entretanto, observou-se superexpressão





dos transcritos de *ampC* e *oprD* em 1071-MRPA. O mesmo se verificou para o gene *lexA*, repressor da resposta SOS (Figura 1).

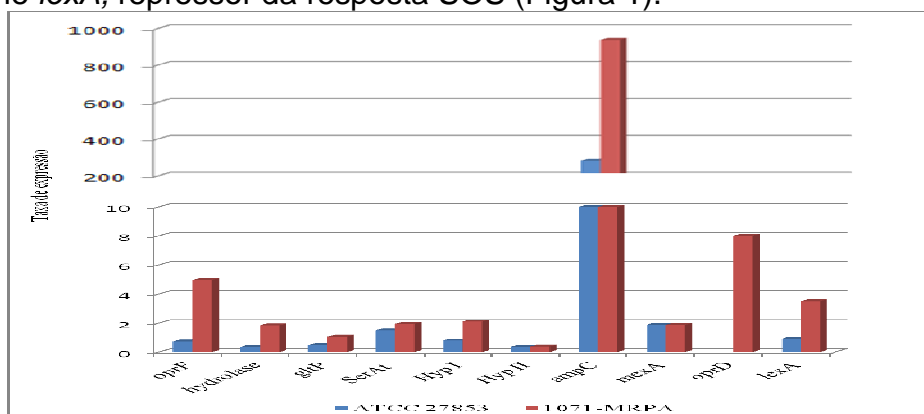


Figura 1 - Níveis dos transcritos gênicos, diferencialmente expressos, da cepa padrão sensível (ATCC 27853) e do isolado clínico multirresistente (1071-MRPA) de *P.aeruginosa*, expostos a 0.5 X CIMs, respectivas, de meropenem e normalizados com os respectivos níveis transcritos de suas culturas não expostas. *gltP* (gene codificador da glutamato/aspartato proton simpoter); *SerAt* (gene serina acetiltransferase); *Hyp I* e *Hyp II* (genes codificadores de proteínas hipotéticas).

Conclusões

Os resultados deste trabalho sugerem que isolados de *P. aeruginosa* podem ser resistentes ao meropenem por ativarem de forma mais eficiente os genes responsáveis pela manutenção da parede e morfologia celular, pela resposta SOS bacteriana e pela resistência antimicrobiana intrínseca.

Agradecimentos

(CNPq)/Fundação Araucária. Setor de Bac Médica/LEPAC/UEM

Referências

LISTER, P. D., et al. Antibacterial-resistente *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clin. Microbiol Rev**, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009.

SIQUEIRA, V.L.D., et al., Structural Changes and Differentially Expressed Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Exposed to Meropenem-Ciprofloxacin Combination. **Antimicrob Agentes Chemother.**, v. 58, n.7, p. 3957-67.

