



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Valdir Cristóvão Barth Junior

Avaliação da formação de células persistentes em *Acinetobacter baumannii*

Porto Alegre

2014

Valdir Cristóvão Barth Junior

Avaliação da formação de células persistentes em *Acinetobacter baumannii*

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

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira

Porto Alegre

2014

VALDIR CRISTÓVÃO BARTH JUNIOR

Avaliação da formação de células persistentes em *Acinetobacter baumannii*

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

Aprovado em _____ de _____
de _____

BANCA EXAMINADORA:

Beatriz Meurer Moreira

Cristiano Valim Bizarro

Rodrigo da Silva Galhardo

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

À minha família e amigos pessoais, em especial Jussara Vieira, Márcia Bittencourt, Tiago Cardoso e Fernanda Luz, pela compreensão, apoio, suporte emocional e conselhos, os quais foram tão importantes quanto a capacidade técnica necessária para a conclusão deste trabalho.

À Profa. Sílvia Dias de Oliveira e ao Prof. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira, pelas orientações, oportunidades e conquistas.

À Samara Paula Mattiello, pelo apoio a qualquer hora.

À Stephanie Wagner Gallo, pela amizade e discussões científicas oportunas.

À Maria Cláudia Rosa Garcia e à Joana Ines Ayres Reis, pelo apoio técnico imensurável e indispensável a todo o laboratório.

Aos colegas Grasiela Bonatto, Belisa Rodrigues, Stephanie Wagner Gallo, Samara e Shaiana Paula Mattiello, Maria Cláudia Rosa Garcia, Joana Ines Ayres Reis, Guilherme Drescher, Aimeé Lersch, Fernanda Macchi, Luciele Gonzaga, Patrícia Vilches, Felipe Morales, Anelise Baptista, Priscila Just, Lucas Hopf e todos que ofereceram ajuda em um dos momentos mais críticos do mestrado.

Aos supracitados acrescidos de Natasha Ruschel Soares, Daniela Behrends, Daniela Figueiró, Bruna Leal, Júlia Puffal, Audrey Proença, César Aguzzoli, Dra. Marjo Cadó Bessa, Dra. Renata Medina da Silva, e outros amigos e colegas do Laboratório de Imunologia e Microbiologia por terem participado diariamente e indiretamente na conquista desse trabalho e por terem compartilhado seus conhecimentos, pensamentos, frustrações, elogios e opiniões, os quais contribuíram grandemente à minha formação profissional e pessoal.

RESUMO

A persistência é um fenótipo de tolerância a fármacos antimicrobianos com bases moleculares pouco entendidas. Tais células tolerantes (chamadas de *persisters*) correspondem a pequenas parcelas da população bacteriana e são capazes de sobreviver a concentrações elevadas do fármaco, mesmo sem possuir mecanismos de resistência específicos. O impacto clínico das células *persisters* se dá pela capacidade destas células de retomar seu crescimento e restabelecer a infecção após os níveis do fármaco diminuírem no sítio da infecção, podendo ser responsáveis pela reincidência e pelo aspecto crônico de certas doenças infecciosas. Este fenótipo de sobrevivência já foi observado em inúmeras espécies, porém relatos envolvendo o *A. baumannii* são escassos. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar o fenótipo de persistência a drogas antimicrobianas em isolados nosocomiais de *A. baumannii*, bem como verificar a possível participação do gene *sodB* envolvido no controle do estresse oxidativo e do gene *pmrC*, determinante de resistência às polimixinas, em células *persisters* formadas a partir da exposição à polimixina B. Para tal, isolados clínicos de *A. baumannii* foram expostos a concentrações elevadas de tobramicina e polimixina B por 6 h e o número de células sobreviventes foi averiguado em intervalos de 1,5 h. Além disso, as expressões gênicas a nível de transcrição de dois isolados foram avaliadas após a exposição à polimixina B por 5 h. Uma grande heterogeneidade na capacidade de formação de células *persisters* foi observada dentre os isolados, não havendo correlação entre a fração de *persisters* após o tratamento com tobramicina e polimixina B. Estes dados podem indicar variações genéticas ou epigenéticas determinantes para o desenvolvimento desta característica, as quais não são relacionadas entre drogas de diferentes classes. Além disso, os resultados preliminares dos ensaios de expressão gênica podem sugerir que o mecanismo de resistência às polimixinas não participa diretamente na persistência à polimixina B, e que não há a participação de *sodB* no desenvolvimento e manutenção deste fenótipo nas condições testadas. O estudo desta característica e de seus determinantes moleculares são de suma importância para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Palavras-chave: tobramicina; tolerância; polimixina B; estresse oxidativo .

ABSTRACT

Persistence is an antimicrobial tolerance phenotype with an unclear molecular background. Such tolerant cells (called *persisters*) correspond to small portions of the bacterial population and are capable of surviving excessive concentrations of the drug, even though they do not possess any specific resistance mechanism. The clinical impact of *persisters* lies on their capacity to resume multiplication and reestablish the infection after the concentration of the drug diminishes in the infection site, possibly being responsible for the re-incidence and for the chronic aspect of certain infectious diseases. This survival phenotype has been observed in several species; however reports involving *A. baumannii* are scarce. Therefore, this work aimed to evaluate the persistence phenotype to antimicrobial drugs in nosocomial isolates of *A. baumannii*, as well as verifying the possible contribution of the *sodB* gene, which is involved in the control of oxidative stress, and the *pmrC* gene, a determinant of polymyxins resistance, in persister cells formed upon polymyxin B exposure. In order to do so, clinical isolates of *A. baumannii* were exposed to high concentration of tobramycin and polymyxin B for 6 h and the number of surviving cells were estimated every 1.5 h. In addition, the gene expressions at transcription level of two isolates were evaluated after the exposure to polymyxin B for 5 h. A high heterogeneity in the ability to form persister cells was observed among the isolates, presenting no correlation between the fractions of persisters after tobramycin and polymyxin B treatments. These data may indicate genetic or epigenetic variations that are determinant to the development of this characteristic, and that are not related among drugs of different classes. Moreover, the preliminary results of the gene expression assays may suggest that the mechanism involved in the polymyxin B resistance phenotype does not directly participate in persistence to polymyxin B, nor indicate the participation of *sodB* in this phenotype. In conclusion, the molecular mechanisms for persistence are still to be determined, and this characterization is highly important to assist in the development of new therapeutic options.

Keywords: tobramycin; tolerance; polymyxin B; oxidative stress.

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADEP4 – Acildepsipeptídeo 4

ATP – Adenosina trifosfato

BF8 – (Z)-4-bromo-5-(bromometileno)-3-metilfuran-2(5H)-ona

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CFU – Colony-forming unit (Unidades formadoras de colônias)

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

LB – Lysogeny Broth

LPS – Lipopolissacarídeo

MDR – Multi-Drug Resistant (resistente a múltiplas drogas)

MIC – Minimal Inhibitory Concentration (Concentração inibitória mínima)

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa)

ROS – Reactive Oxygen Species (espécies reativas de oxigênio)

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

TA – Toxina-antitoxina

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Capítulo 1 | 10 |
| 1.1 Introdução..... | 11 |
| 1.2 Objetivo..... | 16 |
| 1.2.1 Objetivo Geral..... | 16 |
| 1.2.2 Objetivos Específicos..... | 16 |
| Capítulo 2 | 17 |
| Capítulo 3 | 23 |
| Capítulo 4 | 31 |
| 4.1 Considerações finais..... | 32 |
| Referências Bibliográficas..... | 35 |
| Anexo A – Tabela complementar do artigo publicado no periódico científico Plos One intitulado “Heterogeneous persister cells formation in <i>Acinetobacter baumannii</i> “ | 40 |

Capítulo 1

Introdução

Objetivos

1.1 Introdução

O gênero *Acinetobacter* possui 32 espécies descritas, sendo a maioria de origem ambiental (1). Dentre elas, o *Acinetobacter baumannii* se destaca pelos crescentes relatos de associação com infecções nosocomiais, como pneumonia, meningite e sepse, e elevada resistência a drogas antimicrobianas (2,3), tornando de suma importância o entendimento de características que participam no seu sucesso adaptativo ao ambiente hospitalar. Uma grande preocupação relativa a esta espécie é o elevado número de mecanismos de resistência a diferentes classes de drogas antimicrobianas presentes em *A. baumannii*, os quais, associados ao uso indiscriminado de antibióticos, possibilitaram o surgimento das características de multirresistência (MDR) e pan-resistência. Cepas MDR podem representar até 88% dos isolados nosocomiais de *A. baumannii* (4). A preocupação em casos de infecções por cepas MDR e pan-resistentes se baseia na falta de opções de tratamento, sendo necessário o emprego de antimicrobianos alternativos como polimixinas (colistina e polimixina B) e tigeciclina (4–6).

Porém, a causa da falha no tratamento não é limitada apenas ao fenótipo de resistência a antimicrobianos. Outra característica igualmente importante na eficácia do tratamento e, ainda assim menos conhecida, é a persistência. O fenótipo de persistência foi primeiramente observado na década de 40, quando se constatou a impossibilidade da total eliminação das células viáveis de *Staphylococcus aureus* (anteriormente *Staphylococcus pyogenes*), apesar da adição de doses letais de penicilina e da provável ausência de mecanismos de resistência a esta droga (7). Tais células remanescentes (as quais compunham menos de 0,001% da população inicial antes do pré-tratamento) foram chamadas de *persisters*, com intuito de diferenciá-las de células possuidoras de mecanismos de resistência (7). Contudo, diferentemente de isolados resistentes, os quais possuem mecanismos genéticos específicos, como aqueles que conferem alterações na molécula alvo e/ou levam à síntese de enzimas inativadoras da droga que permitem a multiplicação celular mesmo na presença de antimicrobianos, as células *persisters* não apresentam crescimento microbiano significativo enquanto em contato com a droga, acreditando caracterizar-se um

estado de dormência, mantendo a sua viabilidade por tempo indeterminado (8). Devido ao surgimento destas células ser dependente da fase de crescimento em alguns microrganismos, estando mais presentes no final da fase logarítmica e na fase estacionária, alguns estudos indicam a participação de sinalizações *quorum sensing* na formação de *persisters* (9,10). Em *Pseudomonas aeruginosa*, pode-se observar um aumento significativo na quantidade de *persisters* quando um cultivo em fase logarítmica de crescimento entra em contato com moléculas envolvidas na sinalização *quorum sensing*, como a piocianina e acil-homoserina-lactonas (9). Outro sinalizador deste sistema em *Streptococcus mutans*, o peptídeo CSP, também parece ter associação com a manifestação do fenótipo de persistência, uma vez que apresenta expressão elevada neste estado e induz a formação de *persisters* (10). Portanto, tais observações indicam que em fases de cultivo com condições de superpopulação, como a estacionária e em biofilmes, a participação mais significativa do sistema *quorum sensing* pode regular a formação de *persisters*.

O impacto clínico destas células é dado pela sua capacidade de retomar seu crescimento após os níveis da droga diminuírem abaixo da dose terapêutica, diminuindo a pressão seletiva e permitindo o restabelecimento da infecção, a qual pode adquirir um caráter crônico, como nos casos de patógenos associados à fibrose cística, tuberculose e candidose (11). Além disso, apesar de em frequência baixa, uma fração resistente pode surgir a partir de células tolerantes que permanecerem após a terapia antimicrobiana por longo tempo (12). Atualmente, o fenótipo de persistência já foi averiguado em diversos patógenos filogeneticamente distantes, como *Mycobacterium tuberculosis* (13), *P. aeruginosa* (14) e *Escherichia coli* (15), indicando um mecanismo amplamente difundido e evolutivamente vantajoso para o microrganismo. Além disso, pouco se sabe sobre a fisiologia e as vias envolvidas na indução de células *persisters*, embora se acredite que não envolva apenas um único mecanismo gênico (8). Indícios de tal poligenia provêm de estudos utilizando técnicas de mutagênese por transposons que falharam na produção de isolados completamente tolerantes e da observação de heterogeneidade de resposta de um mesmo isolado frente a diferentes classes de antimicrobianos (15,16). Apesar disso, sistemas de toxina-antitoxina (TA) parecem controlar, em parte, o surgimento e a

manutenção do fenótipo tolerante. Estes sistemas são bastante conhecidos pelo seu papel de perpetuação plasmidial na célula bacteriana, e são comumente encontrados na forma organizacional de operons (17). Porém, seus papéis fisiológicos quando associados a cromossomos de procariontes de vida livre não são totalmente conhecidos, embora a resposta ao estresse seja uma possível explicação, uma vez que a expressão de certos sistemas TA é controlada por alarmônios e enzimas envolvidas em respostas SOS de reparo (17,18). Além disso, os níveis de transcritos das toxinas dos sistemas TA HipAB, MazEF, RelEB e TisAB/IstR têm sido encontrados elevados em células *persisters* de *E. coli*, indicando um forte envolvimento no desenvolvimento deste fenótipo. As toxinas RelE e MazF são conhecidas por diminuir os níveis de RNA em *E. coli*, enquanto HipA atua diretamente sobre a tradução, impedindo a ligação do fator de alongamento Tu, ambos os mecanismos que resultam em um metabolismo diminuído e redução da replicação (17). Porém, a deleção destes genes não resultou em uma diminuição da formação de células *persisters*. O sistema TA mais fortemente associado com persistência em *E. coli* é, portanto, o TisAB/IstR, que é regulado diretamente por proteínas do sistema de resposta SOS e diminui os níveis de ATP pelo desbalanço da força próton-motiva na membrana citoplasmática (19). Porém, a maioria destes sistemas TA não apresentam similares evidentes ou íntegros nos genomas de *A. baumannii* disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), dificultando possíveis estudos moleculares desta característica. Recentemente, uma busca por possíveis sistemas TA em genomas de *A. baumannii* identificou 15 possíveis sistemas, dentre eles HipAB e RelB, sendo 5 destes funcionais (incluindo o ortólogo de RelEB) (20). Ainda assim, há poucos relatos demonstrando o fenótipo de persistência em isolados de *A. baumannii*, mesmo este sendo um importante patógeno recorrente em ambientes hospitalares e esta característica garantir um sucesso adaptativo nestes ambientes.

O fenótipo de persistência e tolerância a antimicrobianos também parece estar mais pronunciado quando as células se encontram em forma de biofilme, estrutura organizada e agregada a superfícies que permite sua sobrevivência em condições adversas. Nesta condição, há o aumento de mais de 10^6 vezes na quantidade de células *persisters* quando

comparado a um cultivo em fase logarítmica de *Staphylococcus epidermidis* (21), além de promover maior tolerância a outros fatores externos. Além da proteção física promovida por substâncias poliméricas extracelulares (22), condições de biofilmes ativam um mecanismo de regulação de expressão gênica, chamado *stringent response*, o qual tem efeitos citoprotetores, incluindo ativação de genes anti-oxidantes e inibição de genes pró-oxidantes (23). Esta resposta generalizada de proteção contra danos oxidativos e estresse celular pode estar relacionada com a persistência após a utilização de antimicrobianos. A análise transcriptômica em biofilmes de *Burkholderia* spp. demonstrou uma queda na expressão em genes geradores de espécies reativas de oxigênio, como os participantes do ciclo do ácido tricarboxílico, da cadeia respiratória e da ferredoxina redutase (24). Além disso, a adição de tobramicina resultou em um aumento significativo de espécies reativas de oxigênio nas células sésseis, e a fração de *persisters* sobrevivente foi 100 vezes menor em cultivos com inibidor da enzima superóxido dismutase e 40 vezes menor em um mutante para um gene de catalase (*katB*) (24). Portanto, estes dados indicam um possível envolvimento do controle do estresse oxidativo na tolerância e sobrevivência a antimicrobianos. Em *E. coli*, a exposição prévia ao paraquat (indutor de estresse oxidativo) aumentou a sobrevivência de células à adição de antimicrobianos da classe das quinolonas, indicando que o contato prévio a um agente estressor pode aumentar a expressão de genes reguladores de estresse oxidativo, e, possivelmente, da bomba de efluxo AcrAB-TolC, conferindo maior tolerância a antimicrobianos (25). De acordo com esta observação, a formação de *persisters* induzida por indol foi aumentada com exposição prévia ao peróxido de hidrogênio, e reduzida significativamente em células de *E. coli* mutantes com a deleção do gene *oxyR*, um regulador de resposta ao peróxido de hidrogênio (26).

Sendo assim, mesmo sem mecanismos muito bem elucidados, alternativas têm sido buscadas com intuito de formular uma estratégia terapêutica eficaz que objetive também a erradicação de células *persisters*. Recentemente, o uso da furanona brominada BF8 ((Z)-4-bromo-5-(bromometileno)-3-metilfuran-2(5H)-ona) em doses subinibitórias mostrou ser uma forma de tornar as células *persisters* de biofilmes e planctônicas de *P. aeruginosa* mais suscetíveis a antimicrobianos (27). Apesar deste composto ter sido primeiramente descrito

como um inibidor de sinalização *quorum sensing*, o mecanismo pelo qual este agiu nas células tolerantes parece ser independente deste sistema de comunicação. Estudos posteriores demonstraram que este tratamento também foi efetivo em *E. coli* (28) e que, em concentrações elevadas, este composto tem a capacidade de erradicar células *persisters*, mesmo sem o uso sinérgico com drogas antimicrobianas, e diminuir a formação de biofilme (29). Outro composto com possível aplicabilidade terapêutica contra células *persisters* é o acildepsipeptídeo 4 (ADEP4) (30). Esta molécula é um ativador específico da protease bacteriana dependente de ATP ClpP, que naturalmente tem como alvo inúmeras proteínas intracelulares mal enoveladas. A interação com ADEP4 deixa o sítio catalítico da ClpP constantemente aberto e ativo (31), tornando desnecessário o uso de ATP e permitindo a ação em células com baixos níveis de energia (ex. dormentes) (30). O tratamento com ADEP4 ou com antimicrobianos isoladamente ou combinados não foi capaz de eliminar completamente células *persisters* de *S. aureus in vitro* ou *in vivo* (utilizando o modelo de infecção profunda em músculo de murino neutropênico, emulando uma infecção em pacientes imunocomprometidos). Porém, a administração de ADEP4 associado à rifampicina eliminou as células planctônicas em meio de cultivo e reverteu a infecção no tecido muscular, não deixando níveis de células *persisters* detectáveis (30). Estes estudos demonstram a importância da elucidação das vias moleculares da formação de células *persisters*, visando à criação de possíveis alternativas farmacológicas.

1.2 Objetivo

1.2.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo avaliar o fenótipo de persistência a drogas antimicrobianas em isolados nosocomiais de *A. baumannii*, bem como possíveis bases moleculares participantes no seu desenvolvimento.

1.2.2 Objetivos Específicos

- 1.2.2.1 Verificar a capacidade de formação de células *persisters* nos isolados de *A. baumannii* frente à exposição à polimixina B;
- 1.2.2.2 Verificar a capacidade de formação de células *persisters* nos isolados de *A. baumannii* frente à exposição à tobramicina;
- 1.2.2.3 Comparar os níveis de formação de células *persisters* entre polimixina B e tobramicina;
- 1.2.2.4 Verificar os níveis de expressão dos genes *sodB* e *pmrC* em células *persisters* frente à exposição à polimixina B.

Capítulo 2

Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*

Artigo científico publicado no periódico científico *PlosOne*.

Fator de impacto (JIF - JCR 2012): 3.73

Heterogeneous Persister Cells Formation in *Acinetobacter baumannii*

Valdir Cristóvão Barth Jr.¹, Belisa Ávila Rodrigues¹, Grasiela Daiane Bonatto¹, Stephanie Wagner Gallo¹, Vany Elisa Pagnussatti², Carlos Alexandre Sanchez Ferreira¹, Sílvia Dias de Oliveira^{1*}

1 Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2** Departamento de Microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Abstract

Bacterial persistence is a feature that allows susceptible bacteria to survive extreme concentrations of antibiotics and it has been verified in a number of species, such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *Mycobacterium* spp. However, even though *Acinetobacter baumannii* is an important nosocomial pathogen, data regarding its persistence phenotype are still lacking. Therefore, the aim of this study was to evaluate the persistence phenotype in *A. baumannii* strains, as well as its variation among strains after treatment with polymyxin B and tobramycin. Stationary cultures of 37 polymyxin B-susceptible clinical strains of *A. baumannii* were analyzed for surviving cells after exposure to 15 µg/mL of polymyxin B for 6 h, by serial dilutions and colony counting. Among these, the 30 tobramycin-susceptible isolates also underwent tobramycin treatment at a concentration of 160 µg/mL and persister cells occurrence was evaluated equally. A high heterogeneity of persister cells formation patterns among isolates was observed. Polymyxin B-treated cultures presented persister cells corresponding from 0.0007% to 10.1% of the initial population and two isolates failed to produce detectable persister cells under this condition. A high variability could also be observed when cells were treated with tobramycin: the persister fraction corresponded to 0.0003%–11.84% of the pre-treatment population. Moreover, no correlation was found between persister subpopulations comparing both antibiotics among isolates, indicating that different mechanisms underlie the internal control of this phenotype. This is the first report of persister cells occurrence in *A. baumannii*. Our data suggest that distinct factors regulate the tolerance for unrelated antibiotics in this species, contrasting the multi-drug tolerance observed in other species (eg. dormancy-mediated tolerance). Supporting this observation, polymyxin B – an antibiotic that is believed to act on non-dividing cells as well – failed to eradicate persister cells in the majority of the isolates, possibly reflecting a disconnection between persistence and dormancy.

Citation: Barth VC Jr., Rodrigues BÁ, Bonatto GD, Gallo SW, Pagnussatti VE, et al. (2013) Heterogeneous Persister Cells Formation in *Acinetobacter baumannii*. PLoS ONE 8(12): e84361. doi:10.1371/journal.pone.0084361

Editor: David M. Ojcius, University of California Merced, United States of America

Received: September 2, 2013; **Accepted:** November 22, 2013; **Published:** December 31, 2013

Copyright: © 2013 Barth et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Valdir C. Barth Jr. received a scholarship from CAPES, Brazil. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: silviadias@pucrs.br

Introduction

Acinetobacter baumannii is a nosocomial pathogen responsible for numerous deaths. Although much has been elucidated about its resistance phenotype and mechanisms, very little is known about the persistence phenotype in this species. Persistence is a feature already observed in some important species, such as *Escherichia coli* [1], *Pseudomonas aeruginosa* [2], *Staphylococcus aureus* [3] and *Mycobacterium* spp. [4]. Indeed, these studies show that strains phenotypically susceptible to antibiotics are not effectively eliminated upon exposure to high doses of those drugs. The remaining subpopulations after this treatment are called persister cells [5], in order to differentiate them from resistant cells [3], and are believed to be responsible for the recalcitrant nature and therapy unresponsiveness of several chronic infections [6]. Unlike resistant strains, in such cells there is not a specific genetic resistance mechanism, being initially inferred as a general regulation in bacterial metabolism leading to a dormancy state, which possibly reduces the antibiotic action through the diminished activity or availability of its target [5,7,8]. However, recent studies suggest that the persistence phenotype is not directly linked

to dormancy [9,10]. The molecular determinants for the formation of persister cells are still not clear and seem to involve different mechanisms implicated in stress responses, such as the stringent response to starvation and regulation of oxidative stress [11–13]. Additionally, mathematical models suggest that an interaction of multiple toxin-antitoxin (TA) systems together may regulate the presence and intensity of this tolerance phenotype [14]. Supporting this idea, some TA systems have been found to impact significantly in the composition and quantity of the antibiotic-tolerant subpopulation of a susceptible strain [7,13,15]. Most studies on that matter, however, have been performed using *E. coli* strains and not much is described for other clinically important species. To our knowledge, the ability to form persister cells has not yet been reported in *A. baumannii*, even though it is a major nosocomial pathogen that is often unresponsive to treatment. Therefore, the aim of this study was to verify the persistence phenotype in *A. baumannii* strains, as well as the variation of this phenotype among strains following antimicrobial exposure.

Materials and Methods

Bacterial Strains

Thirty-seven strains of *A. baumannii* were isolated as part of routine diagnostic testing and donated by the Microbiology Department of São Lucas Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil, during January to September 2012. No information was retrieved along with the bacterial strains and the anonymity of the samples was respected throughout the study. The susceptibility to tobramycin and polymyxin B were previously evaluated by disk diffusion method and microdilution, respectively, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute's (CLSI) recommendations [16]. All 37 strains presented susceptibility to polymyxin B, 30 of which were also susceptible to tobramycin. The susceptibility to tobramycin was confirmed by the assessment of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (Table S1). All strains evaluated in the current study presented unique profiles when analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, antimicrobial susceptibility phenotype, persistence formation level, and presence of *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-23} and *int12* (data not shown).

Formation of Persister Cells

Persister cells from susceptible strains were estimated under exposure to polymyxin B ($n = 37$) and tobramycin ($n = 30$). All strains were cultivated for approximately 18 h on LB broth and initial cell concentration was measured by serial decimal dilutions proceeded by plating three 10- μ L drops of each dilution on nutrient agar surface. In order to assess a death curve, polymyxin B or tobramycin was added to the media to a final concentration of 15 μ g/mL (approximately 5 \times the highest MIC found) or 160 μ g/mL (10 \times the MIC for a strain to be considered resistant, according to CLSI [17]). An aliquot was removed every 1.5 h, for 6 h, and washed using sterile 0.85% saline to remove the drug. The number of Colony Forming Units per milliliter (CFU/mL) of the surviving fraction was estimated by decimal serial dilutions and drop plating.

The final fraction of persisters for both unrelated antibiotics was estimated considering the pre-treatment cell counts and the surviving cells after the 6 h incubation. All experiments were performed in triplicate. Persister cells were re-cultivated into a sterile LB with the same concentration of antibiotic in order to discard the possibility of resistant mutant selection.

Statistical Analysis

For frequency distribution charts, the persister producer strains were grouped in 6 classes (number defined by the rounded square root of the sample size).

The association between the persister cell formation upon exposure to both drugs as well as between persister formation and the MIC value for each strain were analyzed using Spearman's rho (r_s) test. All analyses were performed using SPSS[®] Statistics version 22 (IBM), using the significance level of 0.05.

Results and Discussion

All clinical strains tested were susceptible to polymyxin B, presenting MIC values ranging from 0.5 to 2 μ g/mL. Thirty-five (94.6%) of the isolates showed detectable persister cells formation, yet in varying intensities, upon polymyxin B exposure, displaying classic biphasic death curves (data not shown). Such high percentage of persister cells formation positive strains indicates that such phenotype may be widely distributed among *A. baumannii* strains, especially in the hospital settings. Surprisingly, we have found two isolates that failed to produce detectable levels of

persister cells under these experimental conditions. Considering that these samples presented very low MIC values (0.5 μ g/mL), the lack of persister cells could also be due to remaining inhibitory levels of antibiotic within the first dilutions, which prevented regrowth and, consequently, quantification of the few remaining persister cells on the agar plate. However, even after multiple saline washes associated to lower initial levels of polymyxin B (2.5 μ g/mL instead of 15 μ g/mL), they were still not able to produce detectable quantities of persister cells. The absence of persister cells in wild populations appears to be unusual and unreported in the literature so far, since the two studies that also have used a quantitative approach with more than one strain described all isolates as persister producers [1,18]. This finding reveals that such putative persister genotype may be absent or have its expression silenced in some strains, not being crucial for bacterial viability.

Concerning to the magnitude of persister cell formation, it was possible to notice a very heterogeneous pattern among the polymyxin B-tolerant persisters, since the size of these subpopulations fluctuated greatly from 0.0007% to 10.1% of the original pretreated population, which showed to be uncorrelated to the MIC values ($r_s = 0.081$, $p = 0.63$). Indeed, 70.2% presented a persister cells fraction corresponding to up to 1.2% of the initial population (Figure 1a). This diversity in the phenotype intensity may indicate differential expression levels or number of non-redundant genetic determinants or distinct genes with greater potency in stimulating persistence in those isolates that showed higher persister cells formation. Such determinants are still being revealed in other species, such as *E. coli*, which appears to have a combination of TA modules as the strongest candidates to modulate this type of antibiotic tolerance [13,14]. However, the genetic background participating in the development of this feature is yet to be determined in *A. baumannii*. Recently, Jurenaite et al. [19] have demonstrated computationally the presence of several type II TA modules integrated into *A. baumannii* chromosome and plasmids, including the HipAB, the module most associated with persistence in *E. coli*. Nonetheless, the authors have not established its role in persistence nor demonstrated its full functionality.

Although we found a high prevalence of persistence among the isolates, it must be considered that they have a nosocomial origin, therefore from an environment with constant selective pressure imposed by antibiotic therapy. Therefore, it is possible that such feature and its genetic determinants might have been selected by the antimicrobial drug pressure. Such phenotype perpetuation could also arise from selective pressures other than polymyxin B use, via cross effects with other antimicrobials or chemicals, as the presence of a generalized tolerance to multiple antimicrobials in some persistence reports has been demonstrated [7,20]. Thus, we selected the 30 tobramycin susceptible strains among the 37 isolates tested for persister formation with polymyxin B, in order to evaluate such assumption to *A. baumannii* as well. Tobramycin-mediated persistence could be detected in 27 samples, including one that had not formed any detectable persister cells in the polymyxin B assay. Among the three isolates that failed to form persisters upon exposure to tobramycin, one had not shown any persistence level in the polymyxin B assay either. The persister subpopulation to tobramycin varied greatly from 0.0003% to 11.84% of total population, also forming a biphasic death curve (data not shown), and no correlation was found between MIC values and persister cells formation among the isolates for tobramycin either ($r_s = 0.3$, $p = 0.1$). Although persistence could be observed after selection with both antibiotics tested for most isolates, there was no significant correlation ($r_s = -0.182$,

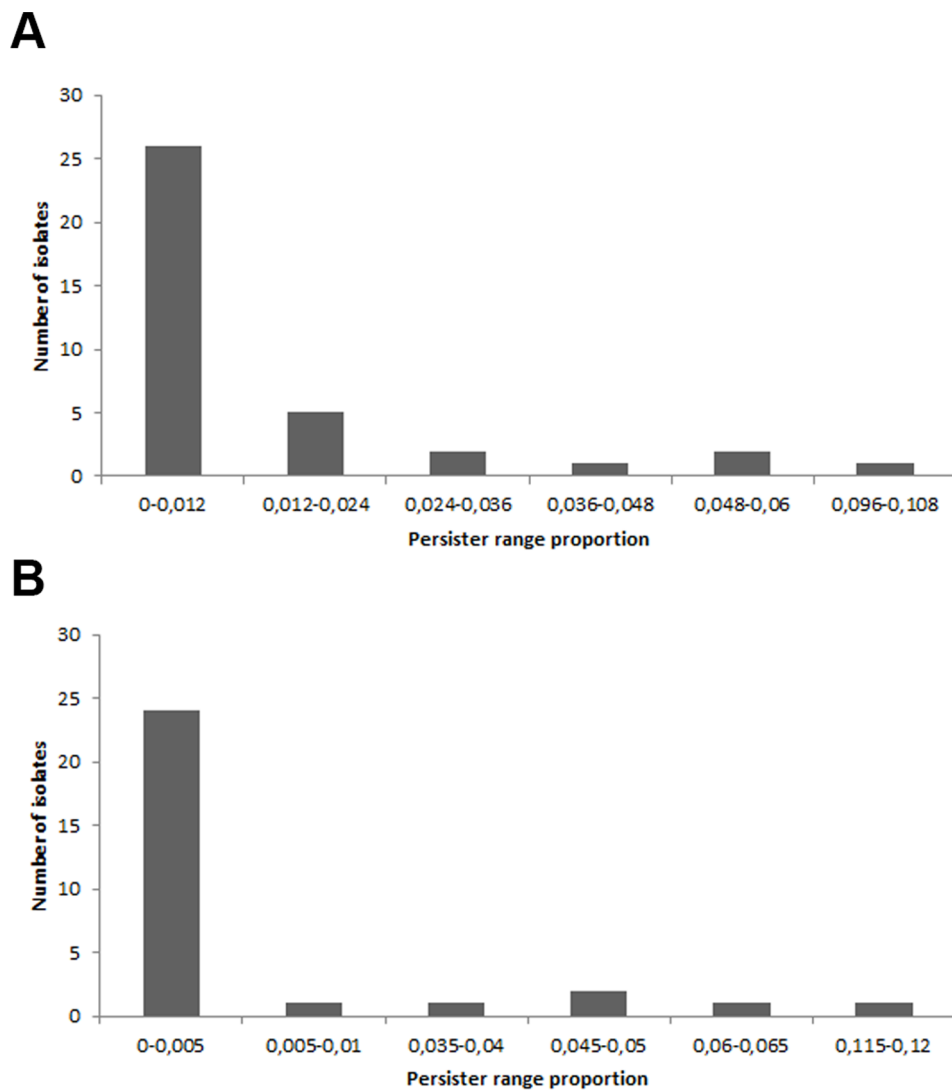


Figure 1. Frequency distribution of the persister fractions. Persister producer strains were grouped in 6 classes (defined by the square root of sample size) according to their persister fraction in the population after polymyxin B (a) or tobramycin (b) exposure. Most isolates presented persister fractions that corresponded to less than 1.2% and 0.5% of the total population for polymyxin B and tobramycin, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0084361.g001

$p=0.336$) between the intensity of persistence formation to polymyxin B and tobramycin (Figure 2). It must also be noted that the proportion of persister cells formation described here for both drugs are similar to those reported under similar exposure time in other species and antibiotics, for example, *E. coli* upon exposure to ampicillin [18] and *Listeria monocytogenes* using norfloxacin [21]. Drug-related variations in the proportion of persister cells formation among strains might also point to the need to clarify whether there is indeed an association of genetic determinants for persistence (eg. specific sets of TA modules) or their expression levels when cells are exposed to different drugs. Still, further analyses are needed to evaluate such assumption. The premise that dormancy justifies the persistence phenotype derives largely from experimentations in which single strains (commonly *E. coli* K-12-derived strains) presented similar persister levels upon exposure to distinct antibiotics [9,13]. However, similar variations to those found in this study were also observed in strains of *E. coli* retrieved from environmental samples, evidencing a possible strain-to-strain discrepancy [18]. Our findings corroborate the

data presented by Hofsteenge et al. [18] that also revealed an unexpected lack of correlation of persister cells formation between antimicrobials, even those with very similar mechanisms of action (ie. ciprofloxacin and nalidixic acid), substantiating the theory that dormancy alone is not sufficient to fully explain a state of multi-drug tolerance. In fact, it has been recently shown that even though most persister cells lie on a non-growing fraction, actively dividing cells are also part of the persister subpopulation and that only a small portion of dormant cells are actual persisters [9].

Furthermore, to our knowledge, this is the first report using polymyxin B to evaluate persister cells. Polymyxins interact initially with lipid components of the cell wall (LPS) and cell membrane, targets that theoretically are exposed and susceptible to the antimicrobial action even in cases of non-growing states, and this interaction constitutes a necessary step for bacterial killing [22]. Therefore, unlike most other antibiotics, polymyxin B should effectively kill cells despite their cell cycle stage (non-dividing or actively growing). The fact that we observed high persistence even after polymyxin B treatment also implies that other determinants

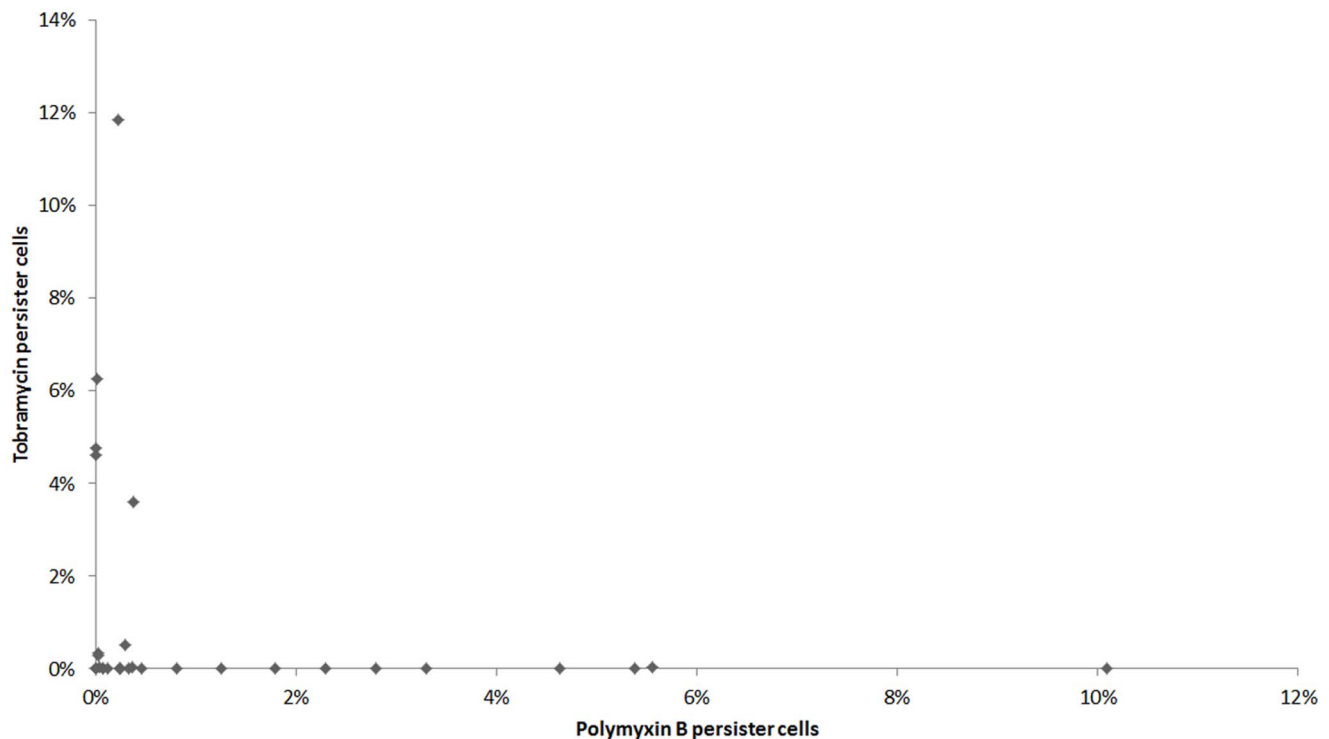


Figure 2. Correlation between polymyxin B and tobramycin persister cells in the sample population.
doi:10.1371/journal.pone.0084361.g002

that are independent of those from tobramycin-selected persisters are involved, perhaps specific for this drug, acting on other steps of polymyxin B killing. Recent reports suggest that polymyxin B (as well as many other bactericidal antimicrobials, including aminoglycosides, eg. tobramycin, which blocks protein synthesis) kill cells through the production of reactive oxygen species by a still unclear manner instead of directly blocking their targets [23,24]. If this is the case, controlling ROS production, and not dormancy itself, might explain at least in part the tolerance to polymyxins. Nonetheless, data from recent analyses show certain controversy and are under debate [25–27], which reinforces the need to clarify the actual implication of these results.

Conclusion

The high prevalence of *A. baumannii* persister cells producers in nosocomial strains following polymyxin B exposure points to a new degree of concern upon infection and reinfection on hospital environments. Also, qualitative and quantitative data regarding the diverseness of this phenotype and correlation between two mechanistically unrelated antimicrobial agents in this species showed here cannot be thoroughly explained by the information

currently available in the scientific literature. The lack of data regarding TA modules in *A. baumannii*, for instance, limits the full understanding of the molecular background possibly related to persistence induction in this species, requiring a further emphasis in this research field. Additionally, the comprehension of the basis of persistence may contribute to the development of alternative strategies aiming the eradication of persister cells in chronic infections.

Supporting Information

Table S1 Minimum Inhibitory Concentration to polymyxin B and tobramycin in the isolates used in this study.
(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VCB SDdO. Performed the experiments: VCB BÄR GDB SWG. Analyzed the data: VCB CASF SDdO. Contributed reagents/materials/analysis tools: VEP CASF SDdO. Wrote the paper: VCB CASF SDdO.

References

- Stewart B, Rozen DE (2012) Genetic variation for antibiotic persistence in *Escherichia coli*. *Evolution* 66: 933–939.
- Möker N, Dean CR, Tao J (2010) *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J Bacteriol* 192: 1946–1955.
- Bigger JW (1944) Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet* 244: 497–500.
- Grant SS, Kaufmann BB, Chand NS, Haseley N, Hung DT (2012) Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 12147–12152.
- Lewis K (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5: 48–56.
- Fauvart M, De Grootte VN, Michiels J (2011) Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol* 60: 699–709.
- Tashiro Y, Kawata K, Taniuchi A, Kakinuma K, May T, et al. (2012) RelE-mediated dormancy is enhanced at high cell density in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 194: 1169–1176.
- Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jørgensen MG, Gerdes K (2011) Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13206–13211.
- Orman M, Brynildsen MP (2013) Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 3230–3239.

10. Wakamoto Y, Dhar N, Chait R, Schneider K, Signorino-Gelo F, et al. (2013) Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science* 339: 91–95.
11. Wu Y, Vulić M, Keren I, Lewis K (2012) Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 4922–4926.
12. Bernier SP, Lebeaux D, DeFrancesco AS, Valomon A, Soubigou G, et al. (2013) Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet* 9: e1003144.
13. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K (2004) Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 8172–8180.
14. Fasani RA, Savageau MA (2013) Molecular mechanisms of multiple toxin-antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E2528–E2537.
15. Correia FF, D'Onofrio A, Rejtar T, Li L, Karger BL, et al. (2006) Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188: 8360–8367.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard - Eleventh Edition. CLSI document M02-A11.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M100-S22 32.
18. Hofsteenge N, Van Nimwegen E, Silander OK (2013) Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. *BMC Microbiol* 13: 25.
19. Jurenaite M, Markuckas A, Suziedeliene E (2013) Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 195: 3165–3172.
20. Dörr T, Vulić M, Lewis K (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 8: e1000317.
21. Knudsen GM, Ng Y, Gram L (2013) Survival of Bactericidal Antibiotic Treatment by a Persister Subpopulation of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 79: 7390–7397.
22. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, et al. (2010) Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4971–4977.
23. Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM, et al. (2012) Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 5642–5649.
24. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130: 797–810.
25. Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K (2013) Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science* 339: 1213–1216.
26. Renggli S, Keck W, Jenal U, Ritz D (2013) The role of auto-fluorescence in flow-cytometric analysis of *Escherichia coli* treated with bactericidal antibiotics. *J Bacteriol* 195: 4067–4073.
27. Liu Y, Imlay JA (2013) Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science* 339: 1210–1213.

Capítulo 3

Análise da expressão de *sodB* e *pmrC* em células *persisters* de *Acinetobacter baumannii* expostas à polimixina B

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

3.1 Resumo

Persistência é um fenótipo no qual uma pequena subpopulação (chamada de *persisters*) permanece viável mesmo na presença de altas concentrações de antibióticos. Este fenótipo deriva de diferenças de expressão gênica, incluindo de vias relacionadas ao estresse oxidativo e a módulos toxina-antitoxina. Portanto, este estudo avaliou a expressão dos genes *sodB* e *pmrC*, responsáveis por controlar os níveis de espécies reativas de oxigênio e por conferir resistência às polimixinas, respectivamente, em células *persisters* expostas à polimixina B. Ambos os genes mantiveram suas expressões estáveis na condição de *persisters*, apontando a participação de outros possíveis mecanismos moleculares envolvidos em *A. baumannii*.

Palavras chave: fosfoetanolamina transferase; tolerância a antimicrobianos; infecções crônicas; superóxido dismutase.

3.2 Introdução

Persistência bacteriana é um fenótipo de tolerância observado em cepas susceptíveis de várias espécies, tais como *E. coli* (25), *Enterococcus faecalis* (32) e *Mycobacterium* spp. (13), quando exposto a doses elevadas de agentes antimicrobianos. Esta característica permite que as células sobreviventes, chamadas *persisters*, permaneçam viáveis por tempo indeterminado, possivelmente restabelecendo a infecção após o tratamento (33). Os mecanismos moleculares que medeiam este fenótipo ainda não estão claros. Embora o estado de dormência provocada pela ativação de sistemas toxina-antitoxina (TA) pareça ser um forte candidato a modular este fenótipo de tolerância antimicrobiana (33–35), outras alternativas têm sido sugeridas. Estudos têm demonstrado que enzimas e genes de vias envolvidas na defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como a superóxido

dismutase (possivelmente *sodB*), podem desempenhar um papel no desenvolvimento deste fenótipo (26,32).

Embora a persistência tenha sido amplamente estudada em algumas espécies, os trabalhos que envolvem esta característica em *A. baumannii*, principalmente em relação aos aspectos genéticos, são escassos. Esta espécie é um importante patógeno nosocomial envolvido em infecções recalcitrantes e difíceis de tratar, frequentemente apresentando resistência a múltiplas drogas, sendo necessário o uso de antimicrobianos de último escolha, como polimixinas (36). Todos os genes necessários para desenvolver a resistência às polimixinas mediada pelo operon *pmrCAB* estão presentes no genoma *A. baumannii* (37), apontando para uma nova possibilidade de mecanismo específico de tolerância a estas drogas. Este operon contém o gene *pmrC*, o qual é responsável por interferir na interação do fármaco com o seu alvo através da adição de fosfoetanolamina à estrutura do LPS (38), levando a uma diminuição da susceptibilidade quando a sua expressão é aumentada.

Portanto, neste trabalho, foram analisadas as possíveis participações dos genes *sodB* e *pmrC* em células *persisters* selecionadas pela exposição à polimixina B .

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Isolados bacterianos

Dois isolados (denominados isolados 1 e 2) previamente caracterizados como produtores de células *persisters* foram utilizados neste estudo (39). Estes isolados foram oriundos da rotina laboratorial do Departamento de Microbiologia do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil, de janeiro a setembro de 2012. Ambos os isolados foram suscetíveis à polimixina B (Concentração Inibitória Mínima – CIM < 4 µg/mL), conforme determinado pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute's (CLSI) (40).

3.3.2 Formação de células *persisters*

Para avaliar a formação de uma fração de células *persisters*, os isolados foram cultivados em *Lysogeny Broth* (LB) por 18 h e a densidade celular inicial foi estimada por diluições seriadas em solução salina estéril e semeadas três gotas de 10 µL de cada diluição na superfície de agar nutriente. As culturas foram expostas a 20 µg/mL (5 vezes o CIM para um isolado ser considerado resistente, conforme CLSI) de polimixina B por 5 h. As células foram lavadas usando solução salina a 0,85% estéril para remover o excesso de antibiótico, e o número de células *persisters* foi quantificado (Unidades Formadoras de Colônia por mililitro - UFC/mL) por diluições seriadas decimais e cultivo em gota. A fração de células *persisters* foi considerada ser a proporção de células sobreviventes após as 5 h de tratamento com antibiótico sem crescimento considerável quando recultivado em um LB estéril com a mesma concentração de antibiótico. O experimento foi realizado em triplicatas independentes.

3.3.3 Extração de RNA

Uma alíquota de 400 µL de cada replicata foi removida, pré e pós tratamento, e lavada com uma solução de NaCl a 1 M para remover o excesso de restos celulares provenientes de células invivializadas. Após, as amostras foram submetidas à extração de RNA utilizando o reagente Trizol-LS (Ambion®), de acordo com as instruções do

fabricante para extração de RNA procariótico, e tratadas com DNase I (Fermentas®). A quantidade e a qualidade do RNA foram avaliadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.3.4 Síntese de cDNA e qPCR

A transcrição reversa foi realizada utilizando a Transcriptase Reversa MMLV (Promega®), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o oligonucleotídeo iniciador reverso específico para os genes 16S rRNA, *sodB* e *pmrC* (Tabela 1). Um microlitro de cDNA de cada amostra foi amplificado, em duplicata, usando o *kit* Fast SYBR Green (Invitrogen®). O nível de transcritos dos genes *sodB* e *pmrC* foi normalizado utilizando o gene 16S rRNA como controle endógeno. Como controle de contaminação de DNA genômico, reações sem o uso da transcriptase reversa foram efetuadas. Os níveis de expressão e a análise estatística foram realizadas pelo programa REST, utilizando o teste de Randomização de Realocação Pareada com um nível de significância de 5% (41).

Tabela 1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para síntese de cDNA e quantificação por PCR em tempo real

| Oligonucleotídeos iniciadores | Sequências (5' → 3') | Fonte |
|-------------------------------|----------------------|-------------|
| <i>sodB</i> -F | AAGCCAAACGGTGGTGGTAA | Este estudo |
| <i>sodB</i> -R | AAGCCCAACCTGAACCGAAT | |
| <i>pmrC</i> -F | TTCATTTGCAGTGGTCGGTG | (38) |
| <i>pmrC</i> -R | TTTGCGGTGAAATCATCCCT | |
| 16S rRNA 1-F | CAGCTCGTGTCGTGAGATGT | (42) |
| 16S rRNA 2-R | CGTAAGGGCCATGATGACTT | |

3.4 Resultados e Discussão

O tratamento com polimixina B foi capaz de inviabilizar a maior parte da população das células dos cultivos dos isolados 1 e 2, deixando apenas 0,29% e 0,86%, respectivamente, da densidade celular inicial viável. Estas células sobreviventes não foram capazes de crescer significativamente em um novo meio com a mesma concentração de antibióticos, indicando a seleção da fração de *persisters*.

A expressão do gene *sodB* não apresentou mudança significativa ($p > 0,05$) em células *persisters* comparada à população inicial do cultivo em fase estacionária (Figura 1), apesar de relatos apontarem para uma participação destas vias para o desenvolvimento de células *persisters* (24–26,32). Estes resultados indicam que a formação de persistência pode diferir de acordo com a espécie ou fatores ambientais. Em *E. faecalis*, os níveis de células *persisters* parecem ser diretamente influenciados pela atividade de sua única superóxido dismutase (*sodA*) quando exposto à vancomicina ou penicilina (32). Por outro lado, *A. baumannii* tem duas superóxido dismutases (uma dependente de ferro e outra de manganês ou cobre) e várias outras enzimas desintoxicantes de H_2O_2 (37). É possível, portanto, que distintas isoenzimas possam contribuir de forma desigual para o fenótipo. De fato, um trabalho já demonstra uma contribuição diferencial de genes catalase (*katA* e *katB*) à presença de células *persisters* em biofilmes de isolados clínicos de *Burkholderia cenocepacia* (24).

Da mesma forma, o gene *pmrC*, responsável pela conferência de resistência às polimixinas, pareceu permanecer com sua transcrição constante nas duas condições ($p > 0,05$). Em *A. baumannii*, até o momento, os únicos mecanismos para desenvolver resistência às polimixinas é através da perda total da membrana externa (43), ou a super-expressão de *pmrC*, o que leva a uma adição de fosfoetanolamina à porção de LPS da membrana externa, interrompendo suas interações com as polimixinas (38). Embora a possibilidade de seleção de subpopulações deficientes de LPS não foi avaliada neste estudo, esse mecanismo demonstrou conferir um fenótipo de resistência total (43), isto é, a cepa apresentaria valores de CIM muito mais elevados. Assim, a possível intersecção entre

resistência e persistência a polimixinas iria provavelmente envolver a expressão diferencial do *pmrC*. No entanto, os resultados indicam que não houve alterações significativas em sua expressão, sugerindo que a persistência é de fato uma resposta fisiológica generalizada ao invés de uma resistência parcial ou heterogênea dada pela participação de vias clássicas de resistência, pelo menos em células de *A. baumannii* expostos à polimixina B.

Visto que muito pouco tem sido investigado sobre persistência nesta espécie, é necessário o desenvolvimento de mais trabalhos nessa área, especialmente investigando e caracterizando outros genes possivelmente cruciais para este fenótipo em *A. baumannii*. Sendo assim, a compreensão dos aspectos moleculares da persistência é de extrema relevância, pois tais conhecimentos podem ajudar no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que visam à erradicação de células de *A. baumannii* em infecções crônicas e recorrentes.

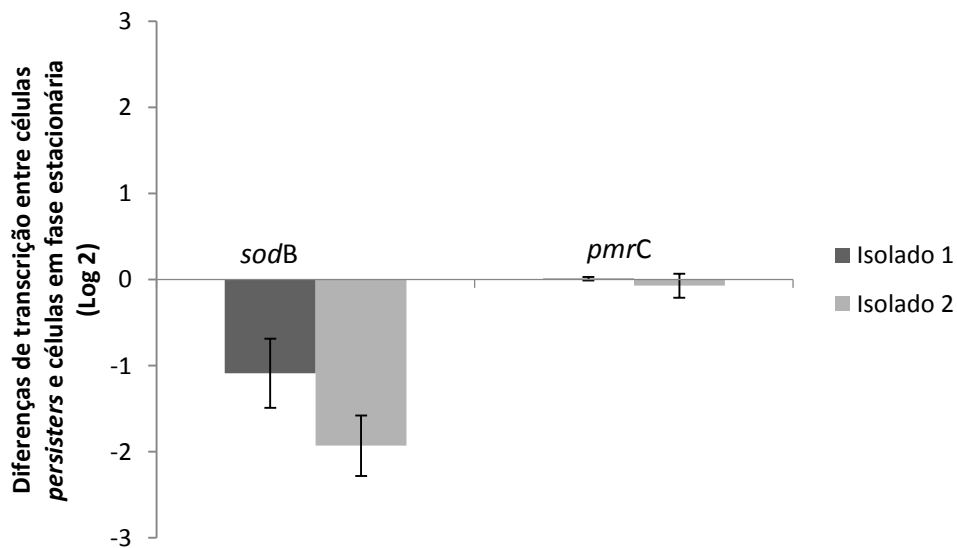


Figura 1 Diferenças transcricionais dos genes *sodB* e *pmrC*, envolvidos no controle do estresse oxidativo e na resistência à polimixina B, respectivamente, em células *persisters* de *A. baumannii* comparadas às células em fase estacionária.

Capítulo 4

Considerações Finais

4.1 Considerações finais

O *A. baumannii* é um importante patógeno continuamente envolvido em surtos hospitalares e infecções recorrentes. Já é amplamente descrita a sua plasticidade gênica e sua conseqüente capacidade de apresentar resistência a múltiplas drogas, o que favorece a sua presença no ambiente extremamente seletivo de hospitais, porém pouco se sabe sobre o quanto a tolerância dada por mecanismos de persistência contribui nesse contexto. Neste trabalho, nós relatamos pela primeira vez a capacidade deste microrganismo de tolerar altas drogas de antimicrobianos de diferentes classes, mesmo apresentando fenotipicamente suscetibilidade a elas. Condizente com relatos prévios em outras espécies (15,44), cepas distintas de *A. baumannii* apresentaram uma heterogeneidade notável frente às mesmas drogas e em condições semelhantes, indicando uma possível variação de base genética ou epigenética, ou ambas, dentre os isolados. A investigação destas bases se torna bastante dificultada, pois mesmo em espécies de amplo estudo na área, como a *E. coli*, ainda há uma dificuldade em estabelecer os principais fatores preponderantes no desenvolvimento das células *persisters*, havendo ainda a possibilidade dos mecanismos moleculares serem amplos e redundantes. Em *A. baumannii*, essa dificuldade é ainda exacerbada pela carência de informação em nível de genômica funcional, o que nos permite investigar com maior facilidade apenas a participação de genes ortólogos já descritos como participantes em outras espécies. A falta de amplas caracterizações genômicas prévias impossibilita, por exemplo, o estudo mais aprofundado da influência de sistemas toxina-antitoxina, os quais têm relatos escassos de ocorrência em *A. baumannii*. Alguns relatos apontam, ainda, para o envolvimento de vias de controle do estresse oxidativo neste tipo de tolerância a antimicrobianos, incluindo enzimas como catalase e superóxido dismutase (13,24,32,45). O modo pelo qual este mecanismo de proteção contra espécies reativas de oxigênio também interfere no mecanismo de ação das drogas é pouco conhecido. Uma possibilidade está ligada a inúmeros relatos de que os antimicrobianos bactericidas podem ter seus mecanismos de ação relacionados fortemente com a formação de radicais livres e danos oxidativos nas células bacterianas (46,47) e, controlando estes danos, as células poderiam permitir a sua sobrevivência na presença destes em dadas ocasiões. Porém, não há um

consenso nesta proposta de envolvimento de danos oxidativos com o mecanismo pelo qual antimicrobianos agem (48,49). Uma nova ligação entre persistência e estresse oxidativo pode se apresentar em regulons, como o *soxRS*, comuns ao estresse oxidativo e mecanismos protetores que conferem resistência em alguns casos (25). Este regulon apresenta um regulador, *soxR*, que consegue detectar a presença de radicais superóxido devido a sua oxidação e mudança em sua estrutura o que ativa a transcrição de *soxS* e permite o controle gênico de outros inúmeros genes, incluindo superóxidos dismutases (*sodA* e *sodB*) e a bomba de efluxo AcrB-TolC e, assim, conferindo maior tolerância a certos antimicrobianos (25,50,51). O regulador *oxyR* também parece estar envolvido na indução de persistência pela influência do indol, que estimula a sua expressão e consequente regulação de resposta ao estresse oxidativo e também resposta de choque a fagos (26). Estes exemplos demonstram que outros reguladores comuns podem ocasionar este fenótipo cruzado, permitindo a sobrevivência de células *persisters*. Porém, neste estudo nós não encontramos evidência em nível de transcrição para transpor estas propostas de participação da superóxido dismutase (*sodB*) para o *A. baumannii* nas condições testadas, ainda que outros genes da via, como *katB* e *oxyR*, possam estar envolvidos e serão testados na continuidade desta investigação. Estes genes podem ter uma participação ainda maior em outras condições, como em fase logarítmica, na qual o estresse oxidativo pode ser elevado em relação à fase estacionária devido à alta taxa metabólica.

Além disso, em uma análise prévia, o gene da fosfoetanolamina transferase (*pmrC*) aparentemente não apresentou modificações em nível de transcrição. Em *A. baumannii*, até agora, os únicos mecanismos descritos para obter a resistência às polimixinas é através da perda total da membrana externa (43), ou superexpressão de *pmrC*, que leva à adição aumentada de fosfoetanolamina à porção lipídica do LPS, interrompendo as interações com as drogas dessa classe (38). Apesar da possibilidade de seleção de subpopulações deficientes em LPS não ter sido abordada neste estudo, este mecanismo se mostrou levar a um fenótipo de resistência total (43), ou seja, a cepa apresenta CIMs muito elevadas que permitem sua replicação na presença de altas concentrações do antibiótico. Portanto, a possibilidade de intersecção entre resistência e persistência à polimixina B estaria

relacionada a uma expressão diferenciada de *pmrC*. Entretanto, como os resultados inicialmente sugerem, a persistência é de fato uma resposta fisiológica generalizada ao invés de um fenótipo parcial de resistência dado pela participação de vias clássicas de resistência à polimixina B em *A. baumannii*.

Portanto, dada a pequena probabilidade de ocorrência de *persisters* na população total, acredita-se que o surgimento destas se trate de um processo pelo menos parcialmente estocástico (8,52,53), envolvendo complexas interações multi-gênicas de baixa frequência que combinadas culminem em um comportamento diferenciado em relação à média populacional. Esta interpretação cria margens para supor que mesmo dentro de uma população de *persisters* possa existir heterogeneidade de expressão gênica, havendo células que expressam genes diferentes, porém que apresentam o mesmo fenótipo, dificultando ainda mais a análise de expressão por métodos convencionais, que verificam a média populacional, e requerendo técnicas avançadas que avaliem células únicas ou subpopulações para a detecção destas pequenas variações.

Sendo assim, os dados deste trabalho contribuem para o início da investigação dos possíveis mecanismos de formação de células *persisters*, os quais aparentam ser variados, e avaliar os padrões de formação em diferentes isolados clínicos, com o intuito de facilitar a escolha da antibioticoterapia e aprimorar a eficácia do tratamento, bem como auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos para a erradicação destas células em infecções crônicas e recorrentes.

Por fim, este trabalho tem como perspectiva analisar a expressão de outros genes da via de proteção ao estresse oxidativo descritos como participantes do desenvolvimento do fenótipo de persistência em outras espécies, como *oxyR* e *katB*, para os quais já foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores com este intuito e testes estão sendo realizados.

Referências Bibliográficas

1. Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;47(2):590–2.
2. Joly-Guillou M-L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(11):868–73.
3. Yang M, Hu Z, Hu F. Nosocomial meningitis caused by *Acinetobacter baumannii*: risk factors and their impact on patient outcomes and treatments. *Future Microbiol*. 2012;7:787–93.
4. Al-Sweih NA, Al-Hubail MA, Rotimi VO. Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. *J Chemother*. 2011;23(1):13–6.
5. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(3):219–26.
6. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40(9):1333–41.
7. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*. 1944;244(6320):497–500.
8. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:357–72.
9. Möker N, Dean CR, Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J Bacteriol*. 2010;192(7):1946–55.
10. Leung V, Lévesque CM. A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *J Bacteriol*. 2012;194(9):2265–74.
11. Fauvart M, De Groote VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 6):699–709.
12. Levin BR, Rozen DE. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(7):556–62.
13. Grant SS, Kaufmann BB, Chand NS, Haseley N, Hung DT. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(30):12147–52.

14. Niepa THR, Gilbert JL, Ren D. Controlling *Pseudomonas aeruginosa* persister cells by weak electrochemical currents and synergistic effects with tobramycin. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2012;33(30):7356–65.
15. Stewart B, Rozen DE. Genetic variation for antibiotic persistence in *Escherichia coli*. *Evolution* (N Y). 2012;66(3):933–9.
16. Hu Y, Coates ARM. Transposon mutagenesis identifies genes which control antimicrobial drug tolerance in stationary-phase *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;243(1):117–24.
17. Gerdes K, Christensen SK, Løbner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(5):371–82.
18. Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol*. 2010;8(2):e1000317.
19. Unoson C, Wagner EGH. A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2008;70(1):258–70.
20. Jurenaite M, Markuckas A, Suziedeliene E. Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*. 2013;195(14):3165–72.
21. Shapiro J a, Nguyen VL, Chamberlain NR. Evidence for persisters in *Staphylococcus epidermidis* RP62a planktonic cultures and biofilms. *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 7):950–60.
22. Ryu J-H, Beuchat LR. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(1):247–54.
23. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*. 2011;334(6058):982–6.
24. Van Acker H, Sass A, Bazzini S, De Roy K, Udine C, Messiaen T, et al. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. *PLoS One*. 2013;8(3):e58943.
25. Wu Y, Vulić M, Keren I, Lewis K. Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4922–6.
26. Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nat Chem Biol*. 2012;8(5):431–3.

27. Pan J, Bahar AA, Syed H, Ren D. Reverting antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 persister cells by (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-methylfuran-2(5H)-one. PLoS One. 2012;7(9):e45778.
28. Pan J, Xie X, Tian W, Bahar AA, Lin N, Song F, et al. (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-methylfuran-2(5H)-one sensitizes *Escherichia coli* persister cells to antibiotics. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(20):9145–54.
29. Pan J, Song F, Ren D. Controlling persister cells of *Pseudomonas aeruginosa* PDO300 by (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-methylfuran-2(5H)-one. Bioorg Med Chem Lett. Elsevier Ltd; 2013;23(16):4648–51.
30. Conlon BP, Nakayasu ES, Fleck LE, LaFleur MD, Isabella VM, Coleman K, et al. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. Nature. 2013;503(7476):365–70.
31. Lee B-G, Park EY, Lee K-E, Jeon H, Sung KH, Paulsen H, et al. Structures of ClpP in complex with acyldepsipeptide antibiotics reveal its activation mechanism. Nat Struct Mol Biol. 2010;17(4):471–8.
32. Bizzini A, Zhao C, Auffray Y, Hartke A. The *Enterococcus faecalis* superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. J Antimicrob Chemother. 2009;64(6):1196–202.
33. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol. 2007;5(1):48–56.
34. Wang X, Wood TK. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. Appl Environ Microbiol. 2011;77(16):5577–83.
35. Slattery A, Victorsen AH, Brown A, Hillman K, Phillips GJ. Isolation of highly persistent mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a new toxin-antitoxin module. J Bacteriol. 2013;195(4):647–57.
36. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J Antimicrob Chemother. 2012;67(7):1607–15.
37. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, et al. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. Genes Dev. 2007;21(5):601–14.
38. Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins J V, Trent MS, Hancock REW. The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(8):3743–51.

39. Barth VC, Rodrigues B^Á, Bonatto GD, Gallo SW, Pagnussatti VE, Ferreira CAS, et al. Heterogeneous Persister Cells Formation in *Acinetobacter baumannii*. PLoS One. 2013;8(12):e84361.
40. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Doc M100-S22. 2012;32(3).
41. Pfaffl MW. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 2002;30(9):36e–36.
42. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(9):3628–34.
43. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(12):4971–7.
44. Hofsteenge N, Van Nimwegen E, Silander OK. Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. BMC Microbiol. 2013;13:25.
45. Kim J-S, Heo P, Yang T-J, Lee K-S, Jin Y-S, Kim S-K, et al. Bacterial persisters tolerate antibiotics by not producing hydroxyl radicals. Biochem Biophys Res Commun. 2011;413(1):105–10.
46. Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM, Weiss DS. Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(11):5642–9.
47. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell. 2007;130(5):797–810.
48. Liu Y, Imlay JA. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. Science (80-). 2013;339(6124):1210–3.
49. Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. Science (80-). 2013;339(6124):1213–6.
50. Blanchard JL, Wholey W-Y, Conlon EM, Pomposiello PJ. Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. PLoS One. 2007;2(11):e1186.

51. Fujikawa M, Kobayashi K, Kozawa T. Direct oxidation of the [2Fe-2S] cluster in SoxR protein by superoxide: distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 2012;287(42):35702–8.
52. Gelens L, Hill L, Vandervelde A, Danckaert J, Loris R. A general model for toxin-antitoxin module dynamics can explain persister cell formation in *E. coli*. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(8):e1003190.
53. Fasani RA, Savageau MA. Molecular mechanisms of multiple toxin-antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;

Anexo A – Tabela complementar do artigo publicado no periódico científico Plos One intitulado “Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*”

Table S1. Minimum Inhibitory Concentration to polymyxin B and tobramycin in the isolates used in this study.

| Isolate | MIC for polymyxin B ($\mu\text{g/mL}$) ^a | MIC for tobramycin ($\mu\text{g/mL}$) ^b |
|---------|--|---|
| 1 | 0.5 | 4 |
| 2 | 0.5 | ND ^c |
| 3 | 0.5 | ND ^c |
| 5 | 0.5 | ND ^c |
| 6 | 0.5 | 2 |
| 7 | 0.5 | 4 |
| 8 | 0.5 | 2 |
| 11 | 2 | 0.5 |
| 14 | 2 | 2 |
| 19 | 0.5 | ND ^c |
| 20 | 0.5 | 4 |
| 25 | 0.5 | 4 |
| 28 | 0.5 | 1 |
| 29 | 2 | ND ^c |
| 31 | 1 | 2 |
| 32 | 2 | 4 |
| 33 | 2 | 0.5 |
| 34 | 1 | 0.5 |
| 35 | 2 | 2 |
| 36 | 0.5 | 2 |
| 37 | 0.5 | 4 |
| 39 | 0.5 | ND ^c |
| 40 | 0.5 | 0.5 |
| 45 | 0.5 | 0.5 |
| 47 | 2 | 1 |
| 48 | 1 | ND ^c |
| 49 | 2 | 0.5 |
| 52 | 2 | 1 |
| 55 | 2 | 0.5 |
| 56 | 2 | 4 |
| 57 | 0.5 | 2 |
| 61 | 0.5 | 2 |

| | | |
|----|-----|---|
| 62 | 0.5 | 2 |
| 65 | 0.5 | 2 |
| 66 | 0.5 | 2 |
| 68 | 0.5 | 1 |
| 75 | 0.5 | 4 |

^a MIC range to be considered susceptible: $\leq 2 \mu\text{g/mL}$

^b MIC range to be considered susceptible: $\leq 4 \mu\text{g/mL}$

^c ND: Not Determined. Strains were previously classified as resistant in the disk diffusion test.