



Avaliação da expressão relativa dos genes envolvidos na formação de biofilme por *Acinetobacter baumannii*

Christine Garcia Bierhals¹, Gustavo Pelicori Riboldi², Luisa Abruzzi de Oliveira², Ana Paula Guedes Frazzon¹ e Jeverson Frazzon^{3*}

Recebido: 8 de fevereiro de 2017 Recebido após revisão: 29 de março de 2018 Aceito: 8 de abril de 2018
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3901>

RESUMO: (Avaliação da expressão relativa dos genes envolvidos na formação de biofilme por *Acinetobacter baumannii*). *Acinetobacter baumannii* é um patógeno oportunista, de grande importância no ambiente hospitalar devido à sua capacidade de adquirir mecanismos de resistência, de aderir e formar biofilmes sob diferentes superfícies. Devido a relevância da infecção causadas pelo *A. baumannii* torna-se fundamental o conhecimento dos mecanismos envolvidos na sua patogenicidade. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi realizar a análise transcricional dos genes envolvidos na formação e manutenção do biofilme (*bap*, *abaI*, *ompA*, *bfmRS*, *csuAB*, *pgaA*, *pilZ*, *wspR*, *eal*, *eagg*, *IscRSU* e *csdA*) de duas cepas clínicas de *A. baumannii* obtidas de hospitais de Porto Alegre, Brasil (AbH e AbC) e uma cepa controle ATCC 19606 (AbA) sob diferentes condições de crescimento. As cepas foram avaliadas quanto a sua capacidade de formar biofilme a 25 °C e 37 °C, crescendo em caldo Luria Bertani (LB), LB acrescido de 1% glicose (LB-G), LB acrescido de 10% sangue de carneiro (LB-SC) e urina pura (UP). A análise transcricional foi realizada por PCR quantitativo em tempo real. A cepas AbH, AbC e AbA foram fortes formadoras de biofilme em LB e LB-G a 25 e 37 °C. Em LB-SC, as cepas AbH e AbA foram fortes formadoras e AbC foi classificada fraca formadora de biofilme. Em UP, a cepa AbH foi moderadamente formadora, AbC e AbA foram fracas formadoras de biofilme. Os genes *wspR*, *pgaA*, *ompA*, *bap*, *abaI* de AbA, *csdA* de Ab He 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 *abaI* de AbH não possuíram uma variação significativa na expressão durante a formação do biofilme.

Palavras-chave: Biofilme, expressão diferencial, PCR quantitativo em tempo real.

ABSTRACT: (Evaluation of the relative expression of genes involved in biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*). *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen of high importance in the hospital environment due to its ability to develop resistance mechanisms as well as to adhere and form biofilms on different surface types. Due to the high relevance of infections caused by *A. baumannii*, knowing the mechanisms involved in its pathogenicity is of extreme importance. Thus, we aimed to perform a transcriptional analysis on genes involved in biofilm formation and maintenance (*bap*, *abaI*, *ompA*, *bfmRS*, *csuAB*, *pgaA*, *pilZ*, *wspR*, *eal*, *eagg*, *IscRSU* e *csdA*) of two clinically isolated *A. baumannii* strains obtained from hospitals in Porto Alegre city, Rio Grande do Sul state, southern Brazil (AbH and AbC), and of the reference strain ATCC 19606 (AbA), cultivated under different growth conditions. Biofilm formation ability was evaluated at 25 and 37 °C using LB broth (LB), LB + 1% glucose (LB-G), pure urine (PU), and LB + 10% sheep blood (LB-SB). Gene transcriptional profiling was performed by real time qPCR. Strains AbH, AbC and AbA were strong biofilm producers in LB and LB-G at 25 and 37 °C. In LB-SB, strains AbH and AbA were strong biofilm producers while AbC was a weak biofilm producer. In PU, the strain AbH was a moderate biofilm producer, while strains AbC and AbA were weak biofilm producers. Genes *wspR*, *pgaA*, *ompA*, *bap*, *abaI* of AbA; *csdA* of AbH; and the operon *IscRSU* were all overexpressed in biofilms. On the other hand, genes *eagg* of AbH, *pilZ* and *csuAB* were suppressed, while genes *bfmRS*, *eal* and *eagg* of AbA; *csdA* of AbA; and *abaI* of AbH showed no significant variation in their expression during biofilm formation.

Keywords: Biofilm, relative expression, Real Time qPCR.

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 (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.

1. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmiento Leite 500, sala 216, CEP 90035-190. Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Departamento de Genética, Instituto de Biociências (IB), UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, CEP 91501- 970, Porto Alegre, RS, Brasil.

3. Departamento de Ciência de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), UFRGS. Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43212, CEP 91501- 970, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: jeverson.frazzon@ufrgs.br

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. *Acinetobacter baumannii* possui capacidade de sobreviver na maioria das superfícies ambientais (Jawad *et al.* 1998, Schreckenberger *et al.* 2010, 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, AbaI, Bla_{PERI}, OmpA, Csu-ABCDE, 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. 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, 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 (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 (Py & Barras 2010). A importância desses genes na formação de biofilme já foi verificada em *Escherichia coli* (Wu & Outten 2008).

Devido a relevância da infecção causadas pelo *A. baumannii* torna-se fundamental o conhecimento dos fatores envolvidos com a formação de biofilme. Assim, o objetivo do trabalho foi comparar a expressão diferencial dos genes envolvidos com formação e manutenção de biofilme (*wspR*, *eal*, *eagg*, *pilZ*, *bap*, *abaI*, *ompA*, *csuAB*, *bfmRS*, *pgaABCD*, *iscR*, *iscSe* *iscU*) entre células planctônicas e aderidas ao biofilme de *Acinetobacter* spp. obtidas em hospitais da cidade de Porto Alegre por PCR quantitativo (qPCR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras bacterianas

As cepas de *Acinetobacter* spp., denominadas AbH e AbC, utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas

pelo Hospital de Pronto Socorro (HPS) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), respectivamente. Estas cepas foram isoladas de surtos hospitalares em 2008. Como controle positivo foi utilizada a cepa AbAde *A. baumannii* ATCC19606.

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 *triple sugar and iron* (TSI), teste da catalase e oxidase e coloração de Gram.

Para a caracterização da espécie foi considerado à amplificação do gene *bfmRS* (que possui 100% de homologia somente para a espécie *A. baumannii*) sendo então considerado espécie-específico) por reação em cadeia de polimerase (PCR). A reação foi realizada um volume final de 20 µL, contendo: 0,02 U enzima Platinum® *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,25 µM de oligonucleotídeos iniciadores *bfmRS*_F: TTCATAATGATGGCATGGCT e *bfmRS*_R: ATCATCTAAACGGGCAAAGG, 3 mM de MgCl₂, Tampão *Taq* DNA polimerase 1X, 200 mM de dNTP e 2 µL de DNA total. A reação foi incubada em termociclador *MyCycler*, Bio-Rad sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 55 °C por 10 segundos, 72 °C por 15 segundos, e extensão final 72 °C por 5 minutos.

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado pelo método de disco-difusão em meio Ágar Mueller 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.

Suspensão bacteriana e ensaio de biofilme em microplacas de poliestireno

As cepas de *Acinetobacter* spp. foram inoculadas em meio Luria Bertani (LB) 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 escala Mac Farland (1 x 10⁸ UFC/mL). Para os testes de formação de biofilme *in vitro* foram utilizadas as placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços estéreis (TPP® *Techno Plastic Products AG*). Assim, 20 µL de cada suspensão bacteriana foram transferidos para os poços das microplacas junto com alíquotas de 180 µL de caldo LB; ou LB suplementado com 1% de glicose (LB-G); ou LB suplementado com 10% de sangue de carneiro (LB-SC) ou em urina pura

(UP) estéril filtrada com membrana de 0,22 µm (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 submetidas a duas diferentes temperaturas incubação, a 25 °C (temperatura ambiente) e 37 °C (temperatura corpórea) 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 suspender 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.

Todas as cepas foram separadas em categorias usando a DO dos biofilmes bacterianos, como descrito anteriormente por Christensen *et al.* (1985) 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 ($4 \times DO_{\text{c-}} < DO_{\text{biofilme}}$).

Extração de RNA e síntese de cDNA das células planctônicas e aderidas do biofilme

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 mL de célula bacteriana crescidas de LB-G a 37 °C até uma DO ~0,4 (fase exponencial) e centrifugado por 3 minutos 13000 rpm. O pellet foi suspenso em 1mL 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 aderidas 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-G e incubadas a 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 duas condições foram lavados com 300 µL de TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM – pH 7,8), centrifugados por 3 minutos a 13000 rpm suspensos 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 a 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 a – 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 suspenso em volume apropriado (entre 20 e 50 µL) de água deionizada. A extração de RNA total tanto das células aderidas quanto das células planctônicas foi realizada em triplicata biológica.

Para a síntese do 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 por PCR quantitativo em tempo real. Após o tratamento, o RNA total foi utilizado como molde para a síntese do DNA complementar (cDNA) total, para tanto 10 µM de oligodT (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 oligonucleotídeos iniciadores *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 PCR quantitativo em tempo real.

Análise transcricional dos genes envolvidos na formação de biofilme - PCR quantitativo em tempo real

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

A reação de PCR quantitativo em tempo real foi realizada em microplacas de poliestireno de 96 poços utilizando o termociclador de PCR em Tempo Real (*Applied Biosystems* 7500). Para a reação de PCR quantitativo (qPCR) utilizou-se o seguinte protocolo: 0,1 µM oligonucleotídeos iniciadores *sense* e *anti-sense*; 25 µM dNTPs; 1 x tampão PCR; 3 mM MgCl₂; 1 x SYBR *green*; 0,25 U enzima Platinum *Taq* DNA polimerase e água para um volume final de 20 µL após adição de 10 µL de cDNA

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores testados como normalizadores para a análise transcricional por PCR quantitativo em tempo real com os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação. Abreviatura: T, tamanho da sequência)

Gene	Sequência nucleotídica	T (pb)*
<i>16SrRNA</i>	5' AGAACCTTACCTGGCCTTGA 3' 5' ATCTCACGACACGAGCTGAC 3'	109
<i>gyrB</i>	5' CTGCGGAATATGCTCGTTTA 3' 5' GCGTGAATCTTGCAGAATGT 3'	143
<i>rpoB</i>	5' CGGTGGTTCAACTAAACGTG 3' 5' TCTGCGCTCTTCTTTCAA 3'	150
<i>rpoD</i>	5' TCTCGACTTATGCGACTTGG 3' 5' TGACGCGATACACGGTTAAT 3'	127

* Tamanho do produto, em pares de bases (pb).

das células aderidas ou planctônicas. Foram utilizadas as seguintes condições: passo inicial para ativação da polimerase de 5 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 10 segundos a 60 °C, e 15 segundos a 72 °C, seguida da análise da curva de *melting* e medida da fluorescência de 60 a 95 °C.

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

Para análise de expressão relativa dos genes envolvidos com a formação de biofilme, os resultados gerados, *thresholdcycles* (Cts), pela reação de PCR quantitativo em tempo real foram analisados pelo método comparativos de Cts, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Primeiramente os genes constitutivos *16SrRNA*, *gyrB*, *rpoB* e *rpoD* foram analisados com o programa Norm Finder, 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) $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Análise estatística

A análise estatística relacionada à formação de biofilme nos diferentes meios e temperaturas foi realizada

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise transcricional por PCR quantitativo em tempo real com os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação.

Gene	Sequência nucleotídica	T (pb)*
<i>bfmRS</i>	5' TTCATAATGATGGCATGGCT 3' 5' ATCATCTAAACGGGCAAAGG 3'	104
<i>abaI</i>	5' AATGCCTATTCCTGCTCAC 3' 5' ATTGCTTCTTGCAGAATTGC 3'	132
<i>pgaA</i>	5' AGCAGGAGTCCGTCTTGATT 3' 5' TGCATCAAGGGCTTGTAGAG 3'	103
<i>csu-AB</i>	5' TGTGACTTGTGACGGAACAG 3' 5' AGGTTTGTACGTGCAGCATC 3'	141
<i>Bap</i>	5' GATACCACAGCACCAAATGC 3' 5' CTGTGCCTGCTACCACTGTT 3'	136
<i>ompA</i>	5' AATGGGTGGGTGACAAGATT 3' 5' GGCAACAACCTTCGGTATGTG 3'	104
<i>wspR</i>	5' ATGTCGGAATTGGTTCTTCC 3' 5' TGCCTACCGCACCATAGATA 3'	115
<i>Eagg</i>	5' ATTCGTAACGCGGAAGAGT 3' 5' TCGCCGTTTGTATGTTGAAT 3'	140
<i>Eal</i>	5' CGTTTGGCACTCACTAAACAA 3' 5' GCTGCCGGAATAAACTCTTT 3'	146
<i>pilZ</i>	5' GGATTTACATAAGCAAAGTGG 3' 5' CCGCTCAGCTTCAGCTTTAT 3'	95
<i>iscR</i>	5' CAACCTCATTAGCCGAGACA 3' 5' AAAGAGCTGAATCTGTGCCA 3'	74
<i>iscU</i>	5' CGAAGAAGCACGTTTCAAGA 3' 5' TGATTGCTTGAGCTTCATCC 3'	106
<i>iscS</i>	5' CGGCGCATTATATGTACGTC 3' 5' CGCTAAAGTACCAGAACGCA 3'	97
<i>csdA</i>	5' ACGTCGAATTGTAGCGTCTG 3' 5' GGCACACTGGGTTCACTATG 3'	105

* Tamanho do produto, em pares de bases (pb).

pela Análise de Variância simples (*Oneway ANOVA*). A análise estatística entre os ΔC_{Ts} dos biofilmes e os ΔC_{Ts} das células planctônicas para todos os genes analisados foi realizada pelo programa SAS System utilizando o modelo linear.

RESULTADOS

Caracterização das cepas de *Acinetobacter* spp.

As cepas AbA, AbH e AbC, inoculadas em meio Mac Conkey 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 meio 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 amplificaram o fragmento de DNA de 104 pares de base (pb) esperado para com oligonucleotídeos iniciadores *bfmRS*, sendo dessa forma classificadas como *A. baumannii*.

Perfil de susceptibilidade

A partir do método de disco-difusão, a cepa AbA apresentou fenótipo de resistência aos antibióticos ampicilina, ceftriaxona, cefuroxima/Na, sulfametoxazol/trimetoprima e intermediário à gentamicina, cefotaxima e cefepime. A cepa AbH apresentou fenótipo de resistência a amicacina, ampicilina/sulbactam, ampicilina, ceftriaxona, cefuroxima/Na, ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprima, ticarcilina/clavulanato, cefepime e cefotaxima e intermediário à ceftazidime e Pip/tazobactam. Já a amostra AbC apresentou sensibilidade somente à doxiciclina (Tab. 3), sendo considerada uma cepa multirresistente (Kempf & Rolain 2012).

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-G à 37 °C, todas foram classificadas como fortes formadoras de biofilme. 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-G ($p = 0,354$), sendo todas amostras fortes formadoras de biofilme em ambas as condições. No meio LB-G, 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-SC à 37 °C, as cepas AbA e AbH foram classificadas como fortes formadoras de biofilme, enquanto a cepa AbC como fraca formadora. Na presença da UP 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.

Análise transcricional

As cepas AbA e AbH foram selecionadas para a análise transcricional. A condição de crescimento bacteriano para a avaliação transcricional foi LB-G a 37 °C, pois nesse meio e a essa temperatura o biofilme atingiu maior espessura, biomassa.

A razão das DOs 260/280 de todos os RNAs totais extraídos ficou entre 1,8-2,0, indicando baixo grau de contaminação com proteínas durante o processo. Com o objetivo de verificar a qualidade dos cDNAs produzidos, todos foram submetidos a uma reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 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. 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 de PCR quantitativo em tempo real 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* (Tab. 1). 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 PCR quantitativo em tempo real (Tab. 4).

Foi observada a presença ou não de variação significativa entre os ΔC_t s dos genes testados das condições de vida livre (controle) e de biofilme (teste). Não houve diferença significativa entre os ΔC_t s de biofilme e de vida livre, para os genes *eal* e *bfmRS* de ambas as amostras, *eagg* e *csdA* de AbA e *abaI* de AbH ($p < 0,05$). Quando houve diferença estatística entre os ΔC_t s ($p < 0,05$) o gene foi considerado como sendo mais expresso ($2^{-\Delta \Delta C_t} > 1$) ou menos expresso ($2^{-\Delta \Delta C_t} < 1$) durante a formação de biofilme quando comparado com a vida livre (Figs. 1 e 2). O gene *wspR* teve sua expressão aumentada na condição de biofilme nas duas amostras, sendo $2^{-\Delta \Delta C_t}_{AbH} = 4,50$ e $2^{-\Delta \Delta C_t}_{AbA} = 2,77$. 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 ($2^{-\Delta \Delta C_t}_{AbA} = 0,79$ e $2^{-\Delta \Delta C_t}_{AbH} = 0,91$) e *eagg* de AbA ($2^{-\Delta \Delta C_t}_{AbA} = 0,77$)

Tabela 3. Análise de suscetibilidade aos antimicrobianos analisados de acordo com o CLSI (2012) das amostras de *Acinetobacter baumannii*.

Antibióticos	AbA	AbH	AbC
Amicacina	S	R	R
Ampicilina/Sulbactam	S	R	R
Ampicilina	R	R	R
Ceftazidima	S	I	R
Ceftriaxona	R	R	R
Cefuroxima/Na	R	R	R
Ciprofloxacina	S	R	R
Doxiciclina	S	S	S
Gentamicina	I	R	R
Imipenem	S	S	R
Meropenem	S	S	R
Sulfametoxazol/trimetoprim	R	R	R
Ticarcilina/clavulanato	S	R	R
Pip/tazobactam	S	I	R
Cefepime	I	R	R
Cefotaxime	I	R	R

Abreviaturas: S, sensível; I, intermediário; R, resistente.

Tabela 4. Valores de estabilidade dos genes testados como constitutivos analisado pelo programa NormFinder (Andersen *et al.* 2004).

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

1. Melhor gene constitutivo.

2. Melhor combinação de dois genes.

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 (Figs. 1 e 2). O gene *pilZ* teve sua expressão diminuída em ambas cepas ($2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbA} = 0,19$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}_{AbH} = 0,60$) (Figs. 1 e 2).

Os genes *csuAB* de AbA ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,08$) e AbH ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,0$) tiveram sua expressão diminuída no biofilme. 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 (Figs. 1 e 2).

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 (Figs. 1 e 2). 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.

DISCUSSÃO

Em relação a resistência a antimicrobianos a cepa AbH apresentou resistência a várias classes de antimicrobianos, exceto aos carbapenêmicos e doxiciclina, por sua vez, 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, Furtado *et al.* 2011, 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*), 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 (Martins *et al.* 2009, Martins *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 AbMDR, 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).

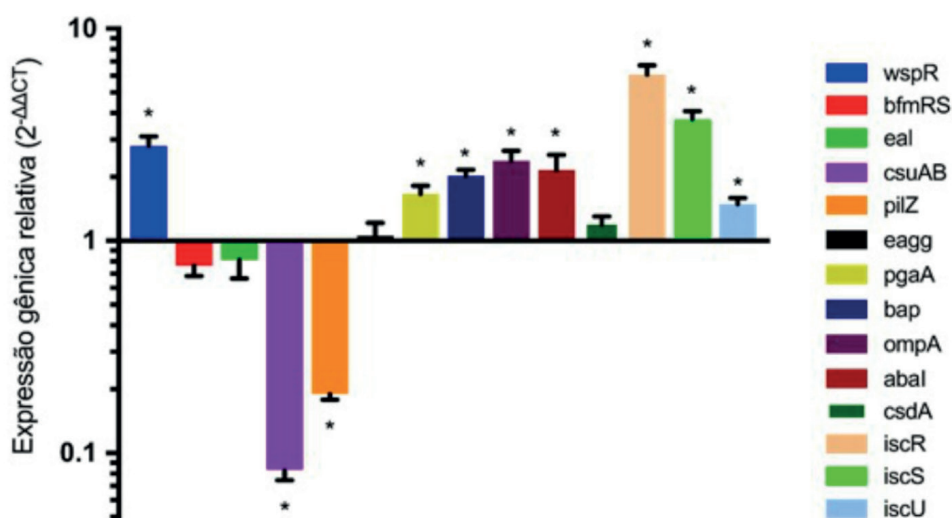


Figura 1. Expressão relativados genes *wspR*, *eal*, *eagg*, *pilZ*, *pgaA*, *ompA*, *bap*, *abaI*, *bfmRS*, *csuAB*, *iscRSU* e *csdA* de AbA durante a formação de biofilme bacteriano. Análise dePCR quantitativo em tempo real de AbA(condição teste) pelo método de expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 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 ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,0$). Foram utilizadas triplicatas biológicas e quadruplicatas experimentais para oPCR quantitativo em tempo real. *Indica diferença estatística em uma análise prévia entre os dados do $\Delta\Delta Ct$ do biofilme, quando comparados com ΔCt das células planctônicas.

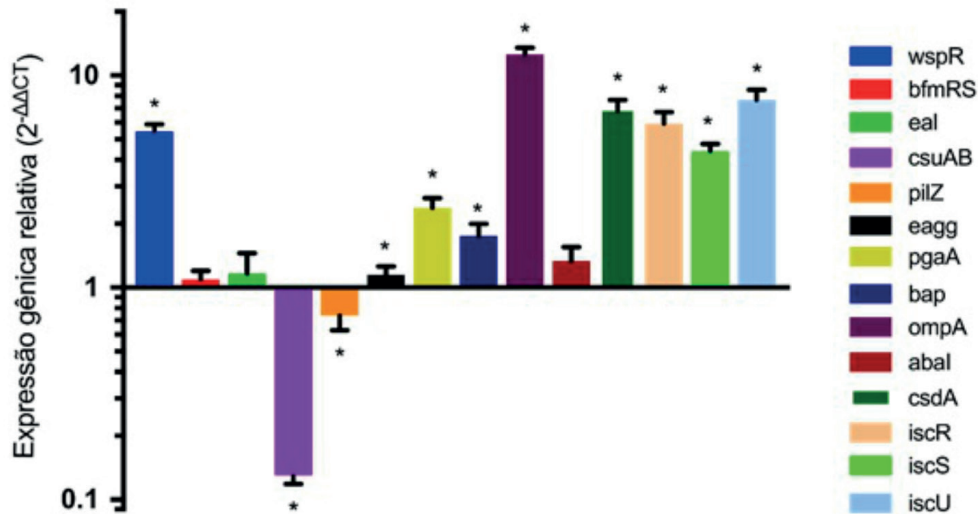


Figura 2. Perfil transcricional dos genes *wspR*, *eal*, *eagg*, *pilZ*, *pgaA*, *ompA*, *bap*, *abaI*, *bfmRS*, *csuAB*, *iscRSU* e *csdA* de AbH durante a formação de biofilme bacteriano. Análise de PCR quantitativo em tempo real de AbH (condição teste) pelo método de expressão relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 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 triplicatas biológicas e quadruplicatas experimentais para o PCR quantitativo em tempo real. *Indica diferença estatística em uma análise prévia entre os dados do $\Delta\Delta C_t$ do biofilme, quando comparados com ΔC_t das células planctônicas.

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 influência 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 (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-G. 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 MüellerHinton, 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-G, as temperaturas de 25 °C e 37 °C não influenciaram a quantidade de biofilme formado.

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-SC, 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 cateteres 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, Marra *et al.* 2011, Djeribi *et al.* 2012).

As três cepas testadas nesse trabalho possuem 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 au-

mento 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 sésil, assim como para *Pseudomonas aeruginosa* (Hengge 2009). O c-di-GMP estimula a biossíntese de adesinas e exopolissacarídeos da matriz em biofilmes (Spiers *et al.* 2003) Bohannon *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).

Os genes *eal* de ambas as cepas hospitalares 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.

O gene *eagg* de AbA não apresentou variação na sua expressão. Por outro lado, o mesmo gene em 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 genes *csuA* e *csuB*, os quais codificam as proteínas *CsuA* e *CsuB*, que são subunidades do pili de *A. baumannii* fazendo parte do operon *csuABCDE* (Tomaras *et al.* 2003). Nesse trabalho, os genes *csuAB* das cepas AbA e AbH tiveram sua expressão diminuída no biofilme de 24 horas, pois a expressão de *csuAB* é 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. Além disso, a produção desse tipo de apêndice não está correlacionada com a quantidade de biofilme formado por diferentes isolados clínicos em superfícies de plástico e vidro (McQueary & Actis 2001).

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.* 2003). 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.

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 (por exemplo, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina e estreptomicina) parecem induzir o biofilme pela 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.* 2012). 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 *abaI*, o qual direciona a produção de sinais de uma acil-homoserinalactona (AHL), que funciona como uma molécula sinalizadora no sistema regulatório *quorum sensing* (Bassler 1999, Gonzalez *et al.* 2009), foi mais expresso em AbA. Contudo, 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 AbaI apresenta papel importante em organizar a expressão de exoproteases, sideróforos, exotoxinas e alguns metabólitos secundários (Bassler 1999, Anbazhagan *et al.* 2012). Talvez existam outras proteínas responsáveis pela produção das moléculas de AHLs, além de AbaI, em AbH, ou que outras moléculas do *quorum sensing* possam também estar envolvidas na sinalização dentro do biofilme.

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).

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. 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 fim AICDFGH, aumentando a

formação de biofilme. Nesse estudo a deleção de IscR aumentou a formação de biofilme, contudo, em nosso trabalho houve uma superexpressão de IscR, assim constatamos que essa proteína mesmo em grande quantidade não influenciou negativamente na formação de biofilme. Talvez em *A. baumannii* não exista a interação de IscR com o operon fim AICDFGH. Portanto, o aumento de expressão das proteínas IscRSU nas amostras testadas, acrescido do aumento da expressão da desulfurase CsdA na cepa AbH, maior produtora de biofilme, sugere que uma maior formação do cofator [Fe-S] está associado a uma maior produção de biofilme.

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.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e CAPES, pelo suporte financeiro e bolsa de mestrado da aluna Christine Garcia, respectivamente. Aos laboratórios de Microbiologia do Hospital de Clínicas e Hospital de Pronto-Socorro de Porto Alegre, por fornecerem as cepas utilizadas no trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, C.L., JENSEN, J.L. & ØRNTOF, T.F. 2004. 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*, 64(15): 5245-5250.
- ANBAZHAGAN, D., MANSOR, M., YAN, G.O., YUSOF, M.Y., HASSAN, H. & SEKARAN, S.D. 2012. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *PLoS One*, 7: 366-396.
- ALSULTAN, A.A., HAMOUDA, A., EVANS, B.A. & AMYES, S.G. 2009. *Acinetobacter baumannii*: emergence of four strains with novel bla(OXA-51-like) genes in patients with diabetes mellitus. *Journal of Chemotherapy*, 21: 290-295.
- BASSLER, B. L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 2(6): 582-587.
- BERGOGNEBEREZIN, E. & TOWNER, K. J. 1996. *Acinetobacter* spp, as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2): 148-157.
- BOEHM A., STEINER, S., ZAEHRINGER, F., CASANOVA A., HAMBURGER, F., RITZ, D., KECK, W., ACKERMANN, M., SCHIRMER T. & JENAL, U. 2009. Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. *Molecular Microbiology*, 72: 1500-1516.

- BRANCHU P., HINDRÉ, T., FANG, X., THOMAS, R., GOMELSKY, M., CLARET, L., HAREL, J., GOBERT, A.P.& MARTIN, C. 2012. 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*, 152(1-2): 132-140.
- BROSSARD, K.A.& CAMPAGNARI, A.A. 2012. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun*, 80: 228-233.
- CERCA N., MAIRA-LITRÁN, T., JEFFERSON, K.K., GROUT, M., GOLDMANN, D.A.& PIER, G.B. 2007. Protection against *Escherichia coli* infection by antibody to the *Staphylococcus aureus* poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(18): 7528-7533.
- CHEN, M. Z., HSUEH, P.R., LEE, L.N., YU, C.J., YANG, P.C.& LUH, K.T. 2001. Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Chest*, 120: 1072-1077.
- CHOI, C.H., HYUN, S.H., LEE, J.Y., LEE, J.S., LEE, Y.S., KIM, S.A., CHAE, J.P., YOO, S.M. & LEE, J.C. 2008. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol*, 10(2): 309-319.
- D'ARGENIO, D. A., CALFEE, M.W., RAINEY, P.B.& PESCI, E.C. 2002. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *Journal of Bacteriology*, 184, (23): 6481-6489.
- DENT, L. L., MARSHALL, D.R., PRATAP, S.& HULETTE, R.B. 2010. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a descriptive study in a city hospital. *BMC Infectious Diseases*, 10: 196-203
- DIJKSHOORN, L., NEMEC, A.& SEIFERT, H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*, 5 (12): 939-951.
- DJERIBI, R., BOUCHLOUKH, W., JOUENNE, T.& MENAA, B. 2012. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *American Journal of Infection Control*, 40: 854-859.
- FALAGAS, M.E., KARVELI, E.A., KELESIDIS, I.& KELESIDIS, T. 2007. Community-acquired *Acinetobacter* infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 26,: 57-68.
- FATTAHIAN, Y., RASOOLI, I., MOUSAVI, GARGARI, S.L., RAHBAR, M.R., DARVISH ALIPOUR, ASTANEH, S.& AMANI, J. 2011. Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). *Microb Pathog*, 51(6): 402-406.
- FERNANDO, D. & KUMAR, A. 2012. Growth phase-dependent expression of RND efflux pump- and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(3): 569-572.
- FURTADO, G.H., CAVALCANTE, A.C., MEDEIROS, E.A., GALES, A.C., OLIVEIRA, V.G.& GIRARDELO, R. 2011. Bloodstream infections with OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in a university-affiliated hospital in Brazil: epidemiology and clinical outcomes. *Am J Infect Control*, 39: 706-708.
- GADDY, J. A. & ACTIS, L. A. 2009. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiology*, 4(3): 273-278.
- GONZALEZ, R. H., DIJKSHOORN, L., VAN DEN BARSELAAR, M.& NUDEL, C. 2009. Quorum sensing signal profile of *Acinetobacter* strains from nosocomial and environmental sources. *Revista Argentina De Microbiologia*, 41(2): 73-78.
- HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. 2009. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4): 263-273.
- HIGGINS, P.G., WISPLINGHOFF, H., STEFANIK, D.& SEIFERT, H. 2004. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4): 821-823.
- HISERT, K.B., MACCOSS, M., SHILOH, M.U., DARWIN, K.H., SINGH, S., JONES, R.A., EHRT, S., ZHANG, Z., GAFFNEY, B.L., GANDOTRA, S., HOLDEN, D.W., MURRAY, D.& NATHAN, C. 2005. 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*, 56: 1234-1245.
- JAWAD, A. SEIFERT, H., SNEELLING, A.M., HERITAGE, J.& HAWKEY, P.M. 1998. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: Comparison of outbreak and sporadic isolates. 1998. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7): 1938-1941.
- JUNG, J. Y., PARK, M.S., KIM, S.E., PARK, B.H., SON, J.Y., KIM, E.Y., LIM, J.E., LEE S.K., LEE, S.H., LEE, K.J., KANG, Y.A., KIM, S.K., CHANG, J.& KIM, Y.S. 2010. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. *BMC Infectious Diseases*, 10.
- KEMPF, M.& ROLAIN, J.M. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*, 39(2): 105-114.
- LATASA, C., SOLANO, C., PENADÉS, J.R.& LASA, I. 2006. Biofilm-associated proteins. *C R Biol*, 329(11): 849-857.
- LEE, N. Y., CHANG, T.C., WU, C.J., CHANG, C.M., LEE, H.C., CHEN, P.L., LEE, C.C., KO, N.Y. & KO, W.C. 2010. Clinical manifestations, antimicrobial therapy, and prognostic factors of monomicrobial *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia. *Journal of Infection*, 61: 219-227.
- LEVIN, A.S., MENDES, C.M., SINTO, S.I., SADER, H.S., SCARPITTA, C.R., RODRIGUES, E., SAUAIA, N.& BOULOS, M. 1996. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 17,(6): 366-368.
- LI, J., NATION, R.L., OWEN, R.J., WONG, S., SPELMAN, D. & FRANKLIN, C. 2007. Antibiograms of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: Promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. *Clinical Infectious Diseases*, 45: 594-598.
- LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4): 402-408.
- LIVERMORE, D. M., HILL, R.L., THOMSON, H., CHARLETT, A., TURTON, J.F., PIKE, R., PATEL, B.C., MANUEL, R., GILLESPIE, S., BALAKRISHNAN, I., BARRETT, S.P., CUMBERLAND, N.& TWAGIRA, M. 2010. Antimicrobial treatment and clinical outcome for infections with carbapenem- and multiply-resistant *Acinetobacter baumannii* around London. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35: 19-24.
- LOEHFELM, T. W., LUKE, N.R.& CAMPAGNARI, A.A. 2008. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Journal of Bacteriology*, 190(3): 1036-1044.
- MARRA, A.R., CAMARGO, L.F., PIGNATARI, A.C., SUKIENNIK, T., BEHAR, P.R., MEDEIROS, E.A., RIBEIRO, J., GIRÃO, E., CORREA, L., GUERRA, C., BRITES, C., PEREIRA, C.A., CARNEIRO, I., REIS, M., DE SOUZA, M.A., TRANCHESE, R., BARATA, C.U.& EDMOND, M.B. 2011. 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*, 49: 1866-1871.
- MARTÍ, S., RODRÍGUEZ-BAÑO, J., CATEL-FERREIRA, M., JOUENNE, T., VILA, J., SEIFERT, H.& DÉE, E. 2011. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Research Notes*, 4: 5.
- MARTINS, A.F., KUCHENBECKER, R., SUKIENNIK, T., BOFF, R., REITER, K.C., LUTZ, L., MACHADO, A.B. & BARTH, A.L. 2009. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection*, 37: 474-476.
- MARTINS, A.F., KUCHENBECKER, R.S., PILGER, K.O., PAGANO, M.& BARTH, A.L. 2012. CMCIES-PMPA/SMS Task Force. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control*, 40: 108-112.
- MCQUEARY, C.N.& ACTIS, L.A. 2001. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *Journal of Microbiology*, 49(2): 243-250.

- MICHALOPOULOS, A., FALAGAS, M.E., KARATZA, D.C., AL-EXANDROPOULOU, P., PAPADAKIS, E., GREGORAKOS, L., CHALEVELAKIS, G. & PAPPAS, G. 2011. Epidemiologic, clinical characteristics, and risk factors for adverse outcome in multidrug-resistant gram-negative primary bacteremia of critically ill patients. *American Journal of Infection Control*, 39: 396-400.
- NIU, C.CLEMMER, K.M., BONOMO, R.A. & RATHER, P.N. 2008. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 190(9): 3386-3392.
- PARK, Y.K., CHOI, J.Y., SHIN, D. & KO, K.S. 2011. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(6): 525-530.
- POUR, N.K., DUSANE, D.H., DHAKEPHALKAR, P.K., ZAMIN, F.R., ZINJARDE, S.S. & CHOPADEV, B.A. 2011. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 62: 328-238.
- PRATA-ROCHA, M.L., GONTIJO-FILHO, P.P. & MELO, G.B. 2012. Factors influencing survival in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Brazilian Journal of Infectious Disease*, 16(3): 237-241.
- PRATES, C.G., MARTINS, A.F., SUPERTI, S.V., LOPES, F.S., RAMOS, F., CANTARELLI, V.V. & ZAVASCKI, A.P. 2011. Risk factors for 30-day mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. *Epidemiology and Infection*, 39: 411-418.
- PRATT, J. T., TAMAYO, R., TISCHLER, A.D. & CAMILLI, A. 2007. PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 12860-12870.
- PY, B. & BARRAS, F. 2010. Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nature Review Microbiology*, 8: 436-446.
- PYLA, R., KIM, T.J., SILVA, J.L. & JUNG, Y.S. 2009. Overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in the *Azotobacter vinelandii* mutant that does not express small RNA *ArrF*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 84(4): 717-724.
- RAJAMOCHAN, G., SRINIVASAN, V.B. & GEBREYES, W.A. 2009. Biocide-tolerant multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains are associated with higher biofilm formation. *Journal of Hospital Infection*, 73: 287-289.
- ROSENTHAL, V. D. *et al.* International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. 2010. *American Journal of Infection Control*, 38: 95-131.
- ROY, A.B., PETROVA, O.E. & SAUER, K. 2012. The phosphodiesterase DipA (PA5017) is essential for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion. *Journal of Bacteriology*, 194(11): 2904-2915.
- SADER, H.S. GALES, A.C., PFALLER, M.A., MENDES, R.E., ZOC-COLI, C., BARTH, A. & JONES, R.N. 2001. 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*, 5: 100-105.
- SCHRECKENBERGER, P.C., DANESHVAR, M.I. & HOLLIS, D.G. 2010. *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: 770-774.
- SLOAN, G.P., LOVE, C.F., SUKUMAR, N., MISHRA, M. & DEORA, R. 2007. The Bordetella Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol*. 189(22): 8270-8276
- SPIERS, A. J., BOHANNON, J., GEHRIG, S.M. & RAINEY P.B. 2003. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology*, 50: 15-27.
- STEPANOVIC, S., CIRKOVIC, I., RANIN, L. & SVABIC-VLAHOVIC M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*, 38(5): 428-432.
- TCHIGVINTSEV, A., XU, X., SINGER, A., CHANG, C., BROWN, G., PROUDFOOT, M., CUI, H., FLICK, R., ANDERSON, W.F., JOACHIMIAK, A., GALPERIN, M.Y., SAVCHENKO, A. & YAKUNIN A.F. 2010. Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *Journal of Molecular Biology*, 402(3): 524-538.
- TOLEDO, P.V., AREND, L.N., PILONETTO, M., COSTA OLIVEIRA, J.C. & LUHM K.R. 2012. 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.*, 80(4): 351-353.
- TOMARAS, A. P., DORSEY, C.W., EDELMANN, R.E. & ACTIS L.A. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology-Sgm*, 149: 3473-3484.
- VALENCIA, R., ARROYO, L.A., CONDE, M., ALDANA, J.M., TORRES, M.J., FERNÁNDEZ-CUENCA, F., GARNACHO-MONTERO, J., CISNEROS, J.M., ORTÍZ, C., PACHÓN, J. & AZNAR, J. 2009. Nosocomial Outbreak of Infection With Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Care University Hospital. 2009. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 30(2): 257-263.
- VIDAL, R., DOMINGUEZ, M., URRUTIA, H., BELLO, H., GONZALEZ, G., GARCIA, A. & ZEMELMAN, R. 1996. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbio*, 86: 49-58.
- VUONG, C., KOCIANOVA, S., VOYICH, J.M., YAO, Y., FISCHER, E.R., DELEO, F.R. & OTTO, M. 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*, 279(52): 54881-54886.
- WU, Y. & OUTTEN F.W. 2008. IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. *Journal of Bacteriology*, 191(4): 1248-1257.