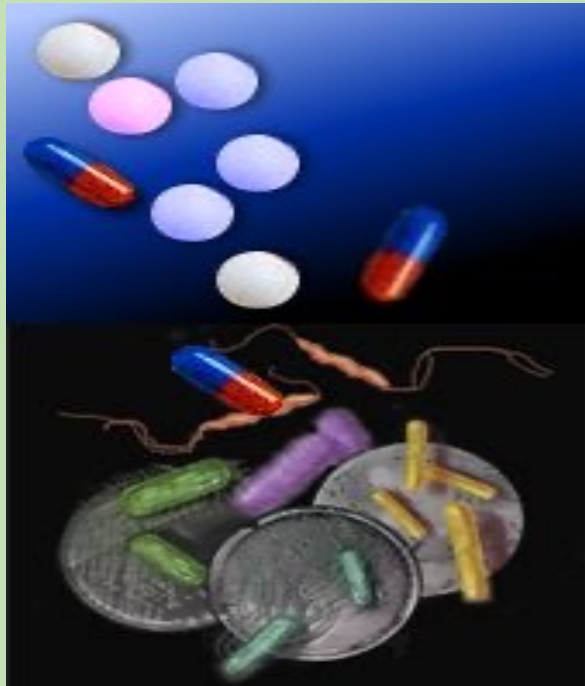


PARTE 2

Mecanismos de resistência



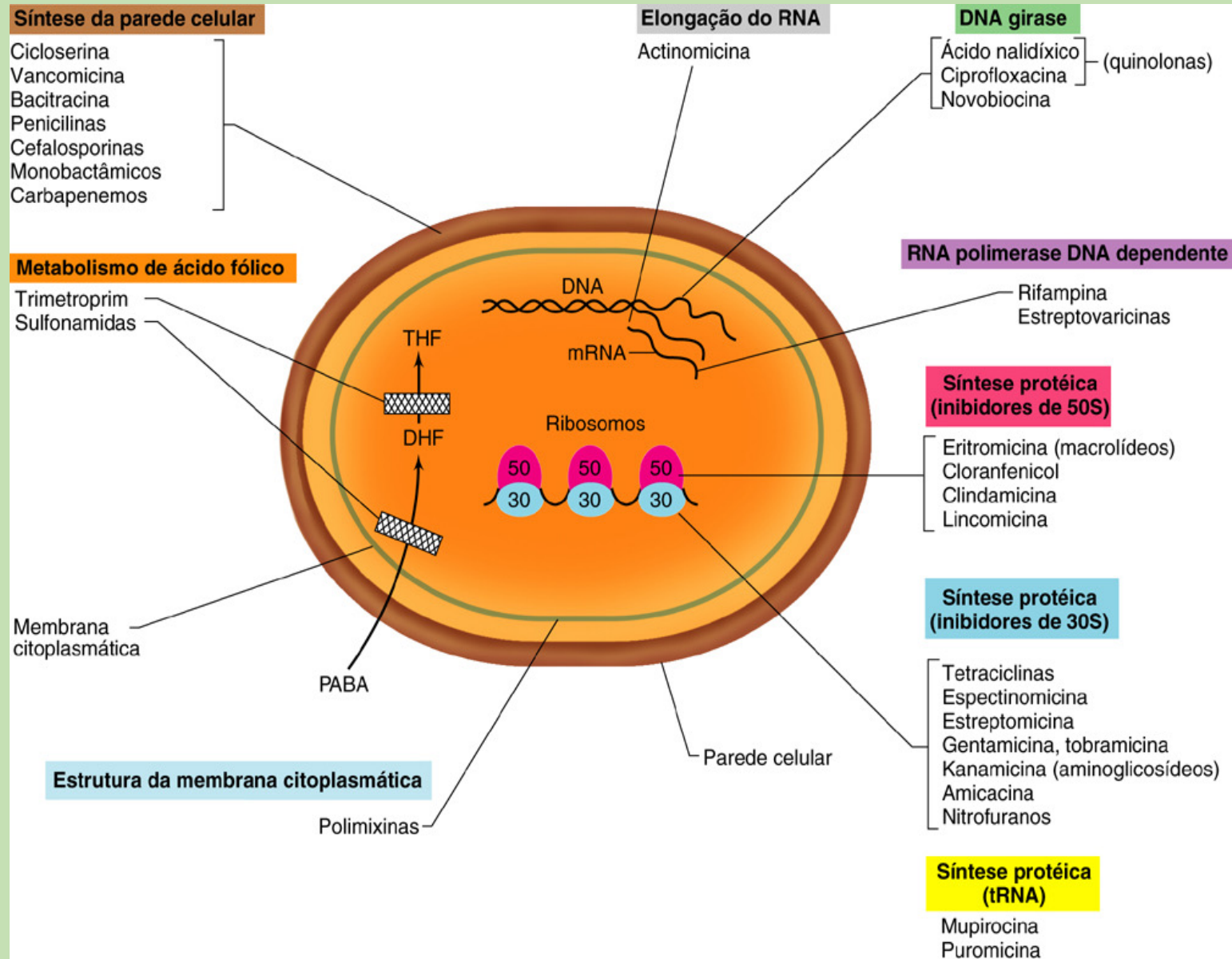
X



\$\$\$\$\$\$\$\$

\$

Classes de Antibióticos



Mecanismos de resistência aos antibióticos

- 1 . Alteração do alvo ✓
- 2 . Enzimas inativadoras ou modificadoras
- 3 . Efluxo da droga
- 4 . Impermeabilidade do envoltório celular

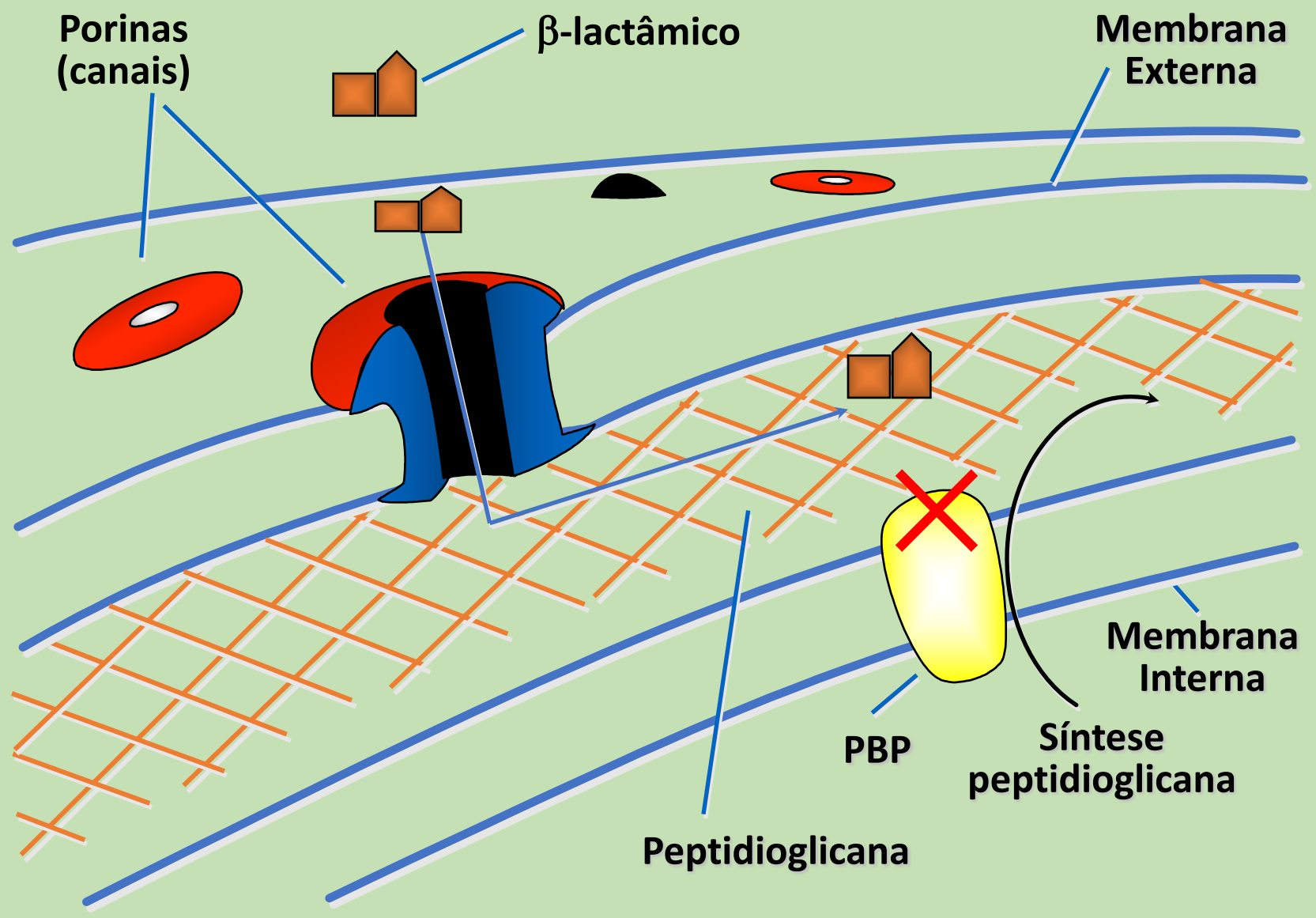
Uso de via alternativa à via afetada pelo antimicrobiano.

1 . Alteração de alvos



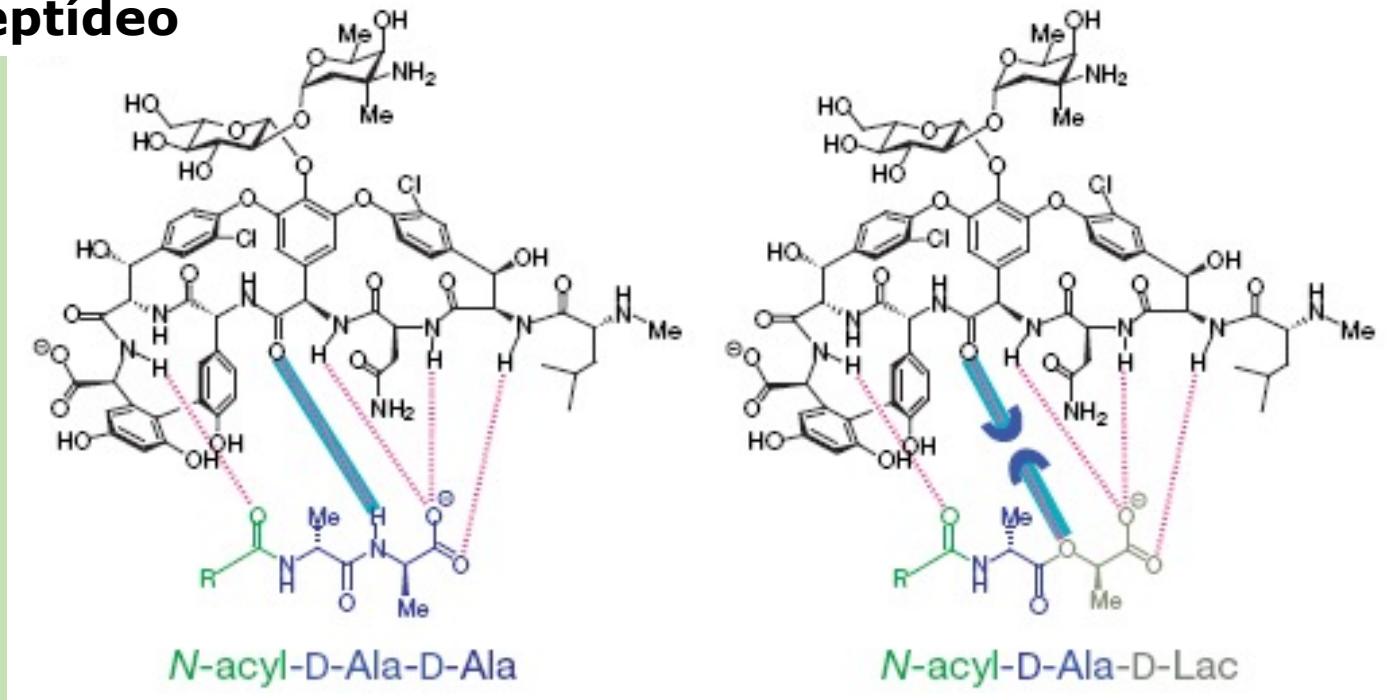
- ◆ **β -lactâmicos**
- ◆ **Glicopeptídeos**
- ◆ **Sulfonamidas**
- ◆ **Rifampicina**
- ◆ **Quinolonas**
- ◆ **Aminoglicosídeos**

Resistência mediada por alteração de alvo



Resistência mediada por alteração de alvo

Glicopeptídeo

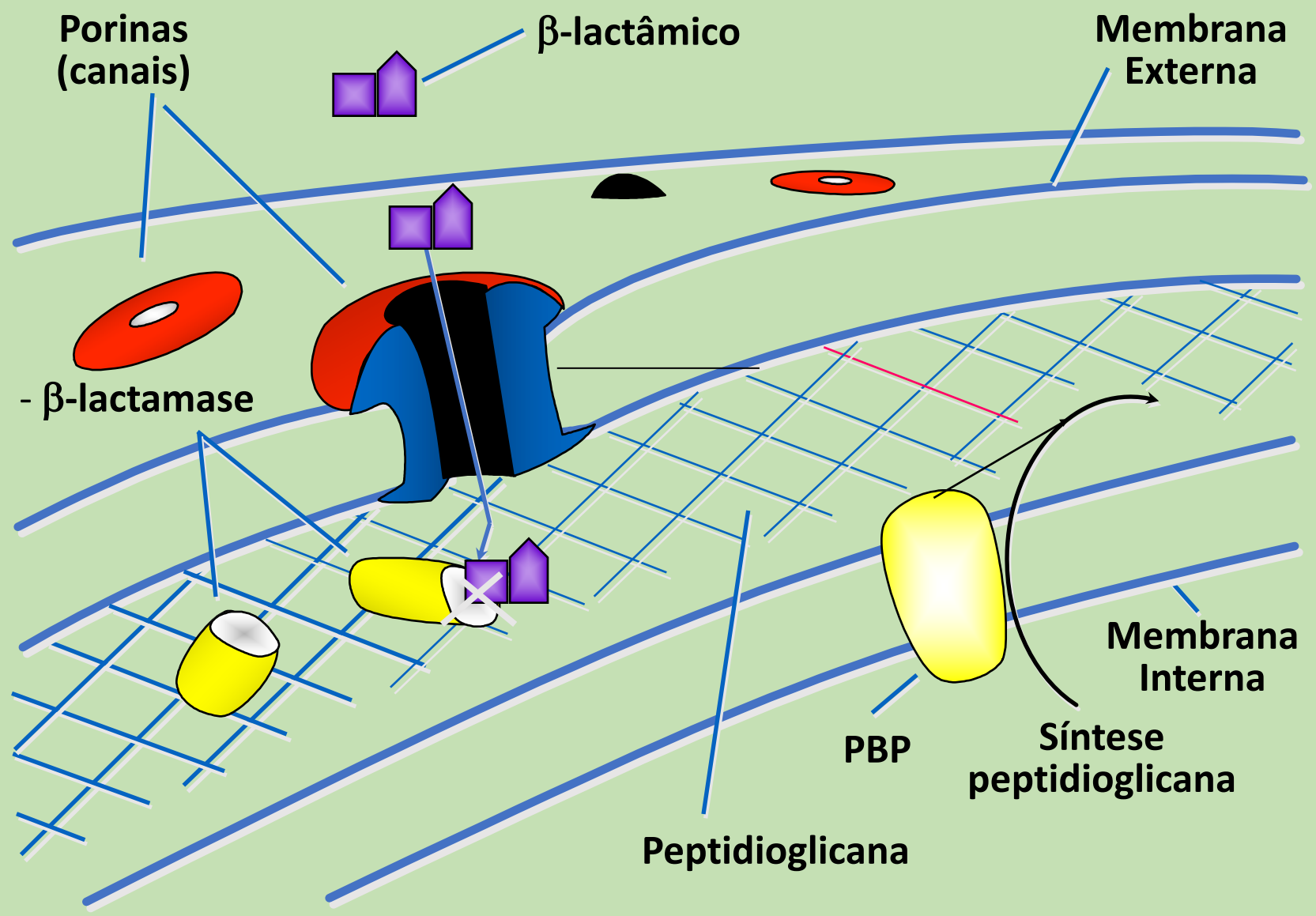


2 . Enzimas inativadoras



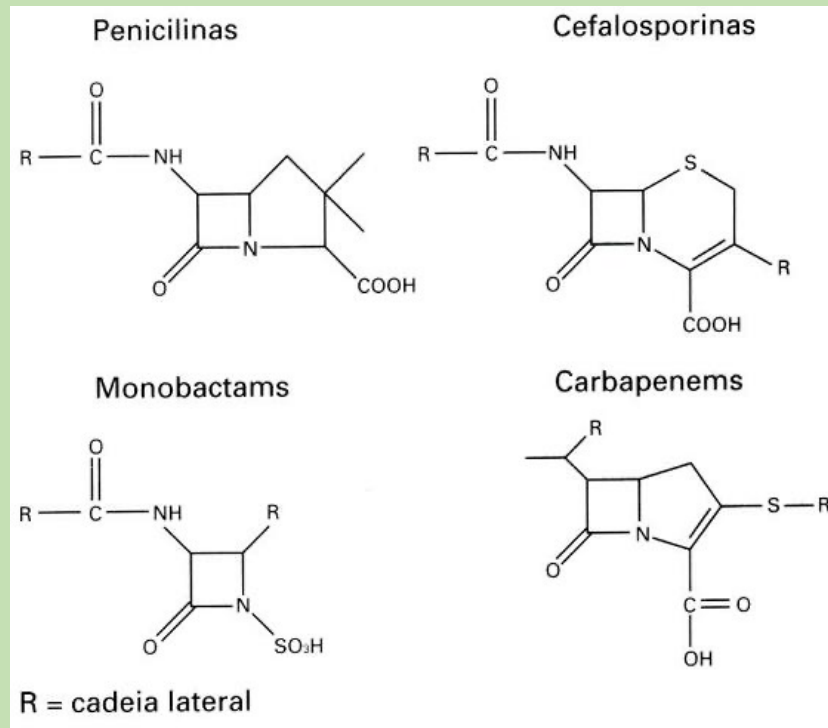
- ◆ **β -lactâmicos**
- ◆ **Aminoglicosídeos**
- ◆ **Clorafenicol**

Resistência mediada por β -lactamases



Resistência mediada por enzimas inativadoras

β -lactâmicos



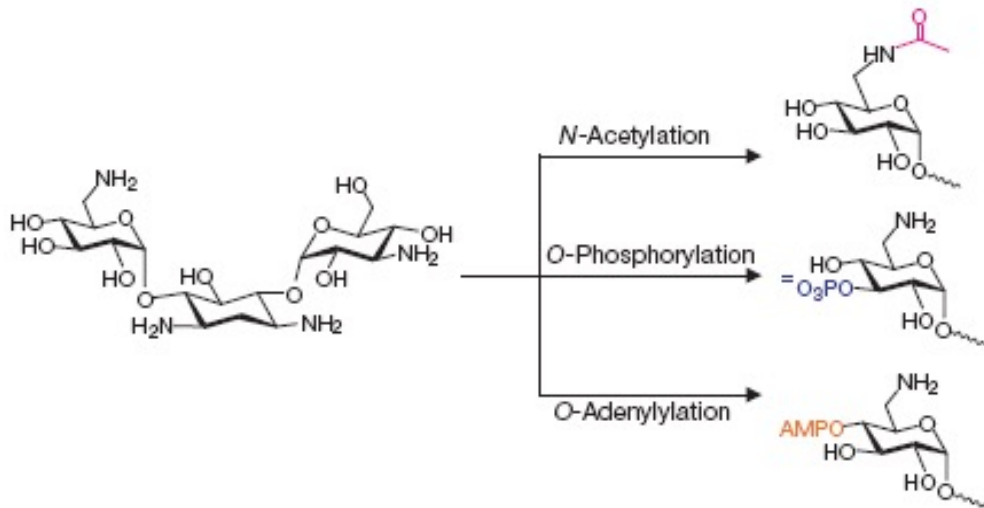
β -lactamases

- Classe A ou grupo II: hidrolisam penicilinas e cefalosporinas
- Classe B ou grupo III: hidrolisam carbapenêmicos
- Classe C ou grupo I: hidrolisam cefalosporinas
- Classe D: hidrolisam penicilinas e cloxacilina
- Grupo IV: hidrolisam penicilina

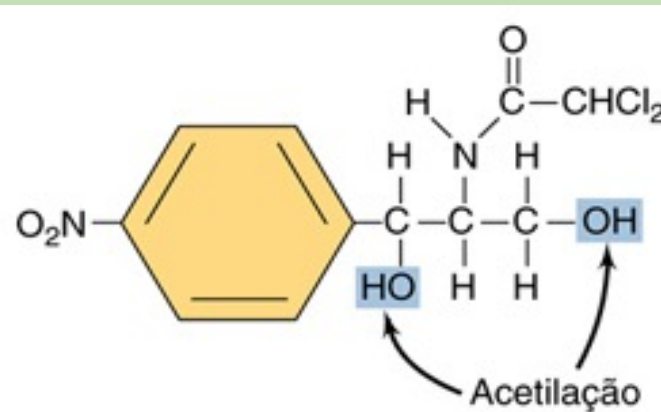
IMPORTANTE: β -lactamases de amplo espectro ou espectro estendido (ESBL – Extended Spectrum β -lactamases)

Resistência mediada por enzimas inativadoras

Aminoglicosídeos



Clorafenicol



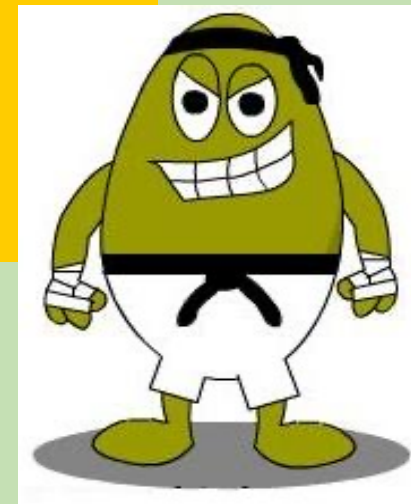
3 . Alteração na permeabilidade de membrana



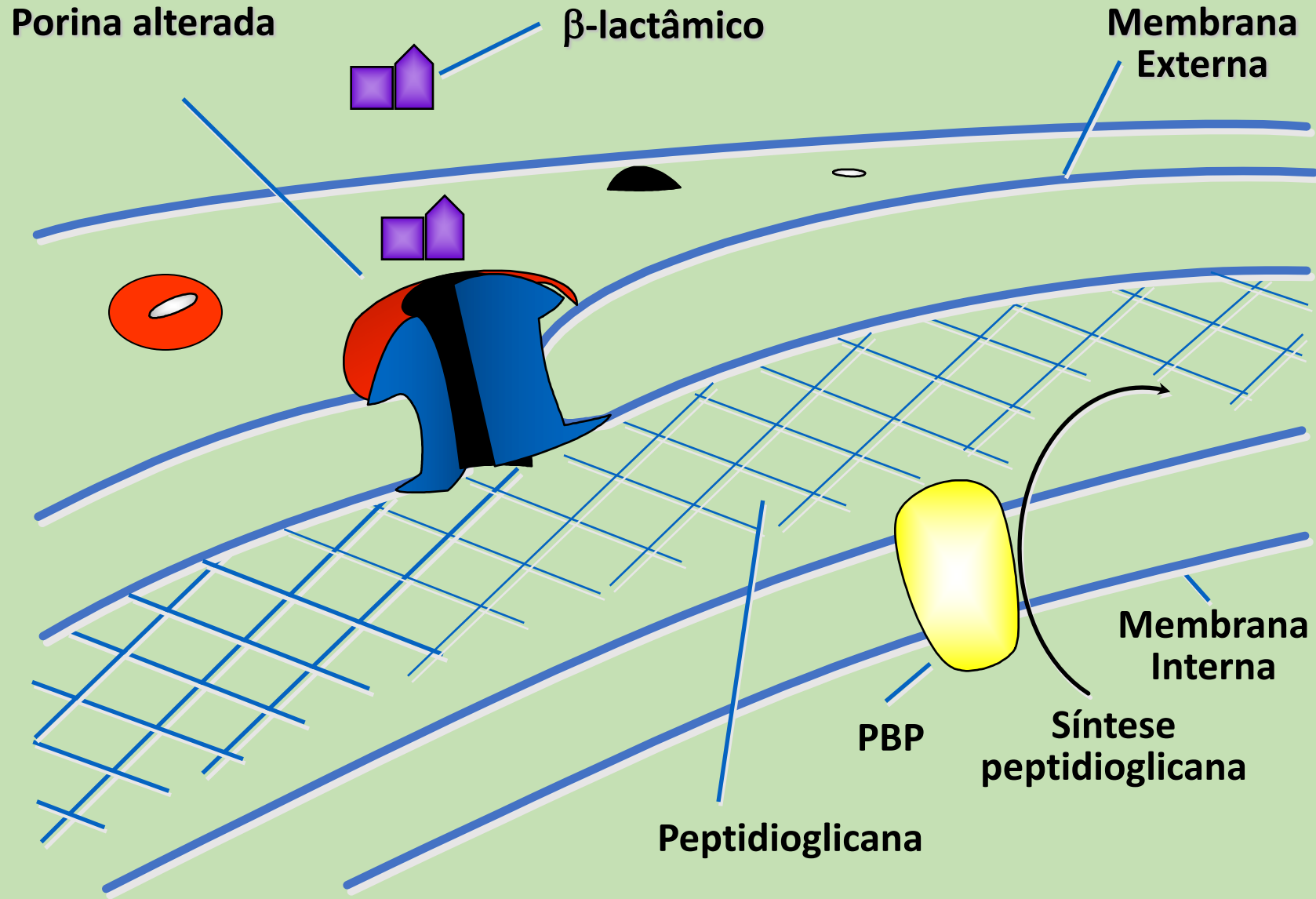
β -lactâmicos

Aminoglicosídeos

Quinolonas

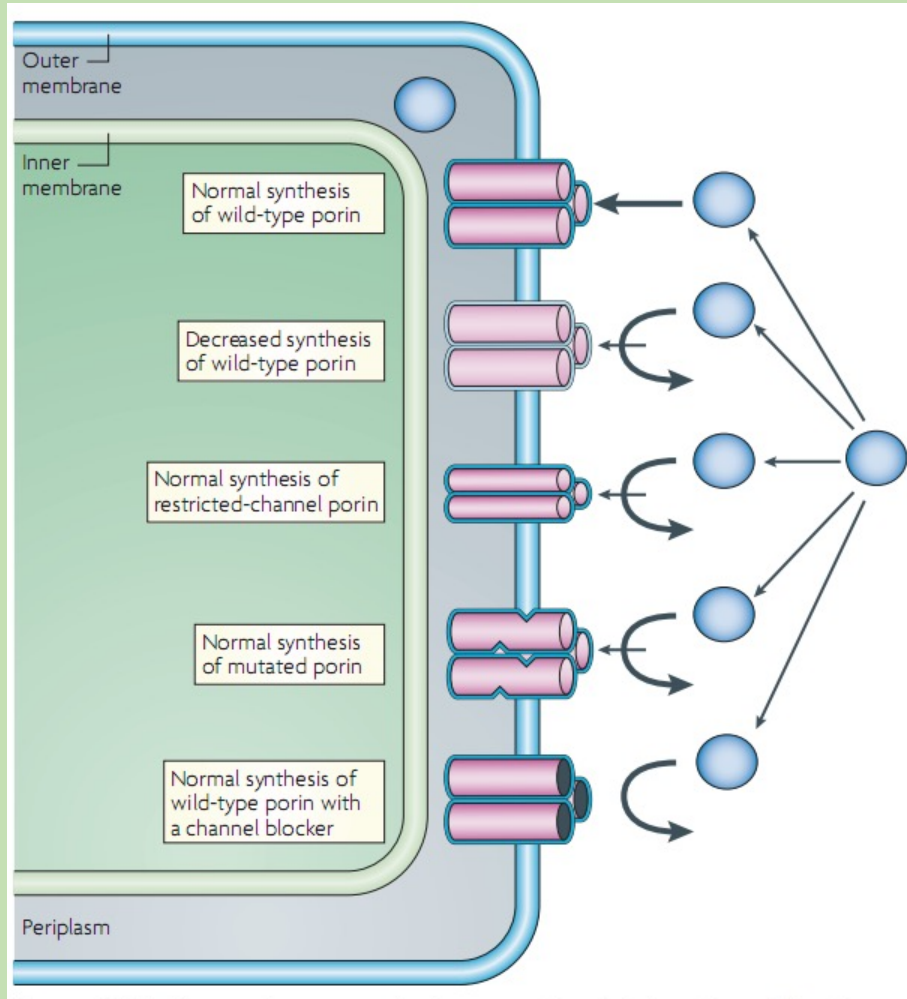


Resistência mediada por alteração de permeabilidade



➤ Tetraciclinas

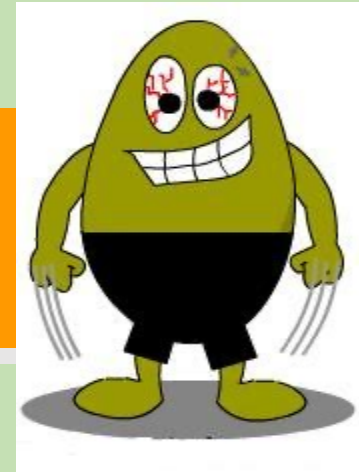
Resistência mediada por alteração de permeabilidade



Diminuição da expressão de OmpF leva a resistência a:

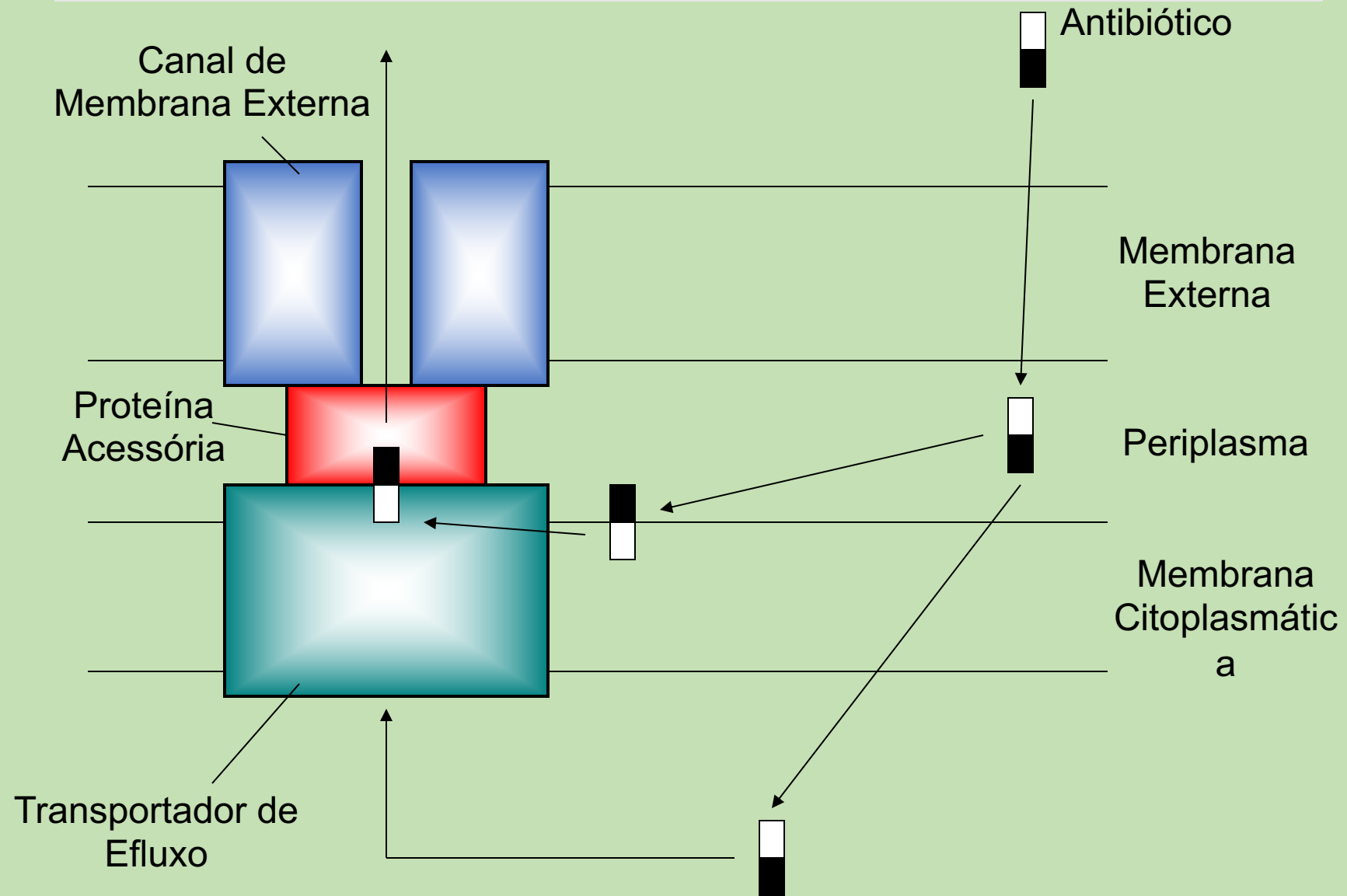
quinolonas
tetraciclinas
clorafenicol
 β -lactâmicos

4 . Efluxo



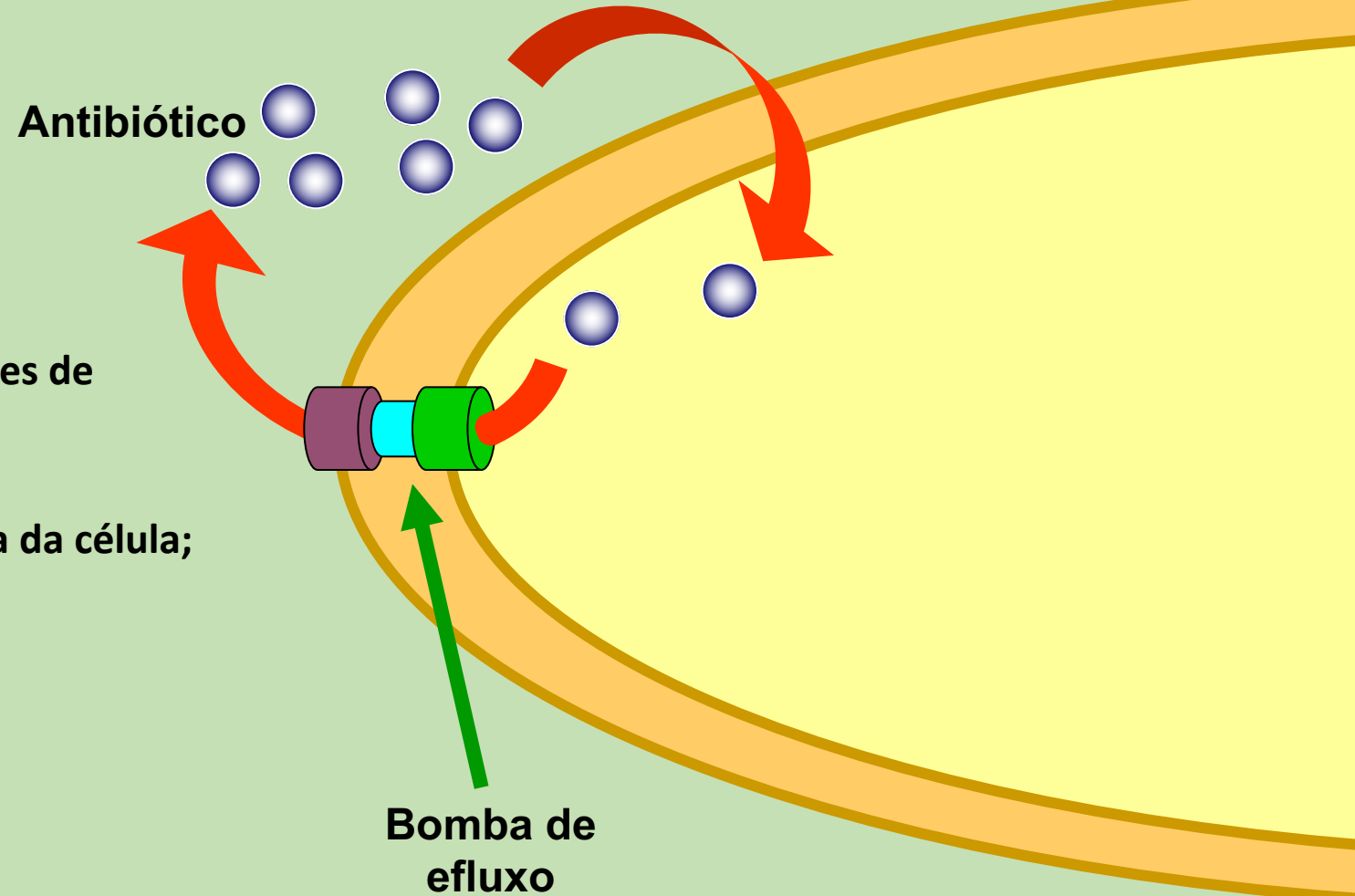
- ◆ Tetraciclina
- ◆ β -lactâmicos
- ◆ Cloranfenicol
- ◆ Quinolonas

Mecanismo de Resistência Baseado no Efluxo



Mecanismo de resistência por sistema de efluxo

- Sistemas de múltiplos componentes de membrana;
- Transporte de substratos para fora da célula;
- Transporte ativo;
- Ex: Transportadores do tipo ABC.



Origem da Resistência a Antibióticos

Aspectos relacionados à resistência aos antibióticos em bactérias

★ Origem da Resistência

- ◆ resistência cromossomal
- ◆ resistência extracromossomal

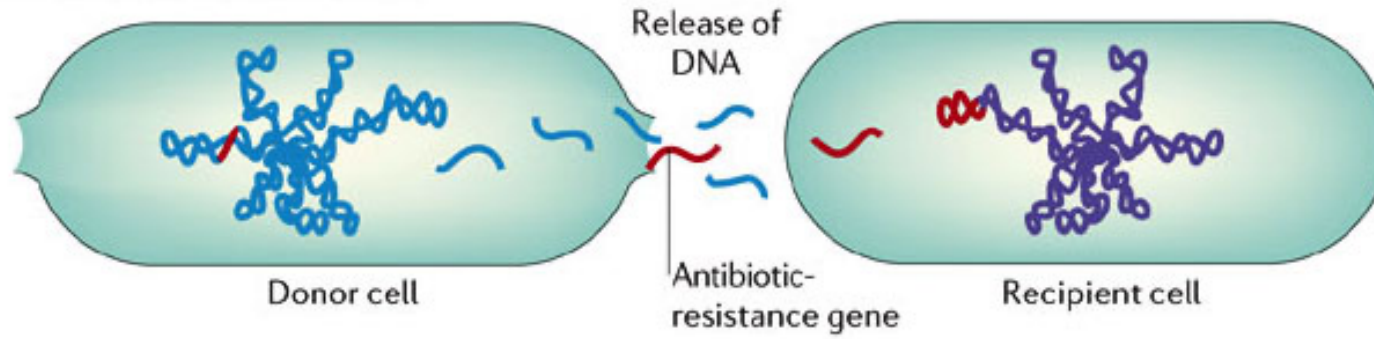
★ Mecanismos de transmissão

- ◆ transmissão vertical
- ◆ transmissão horizontal

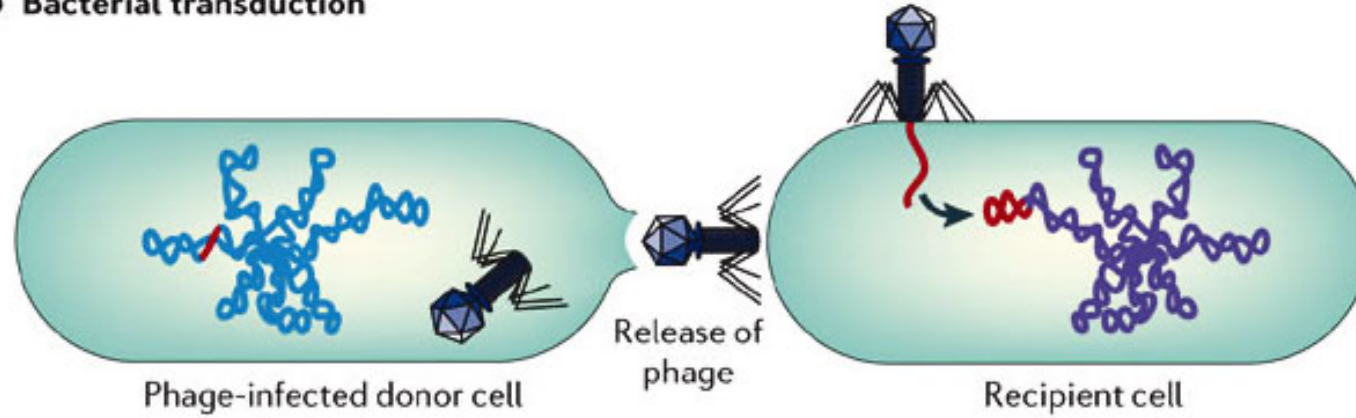
➤ Resistência Intrínseca e Extrínseca

Transmissão Horizontal

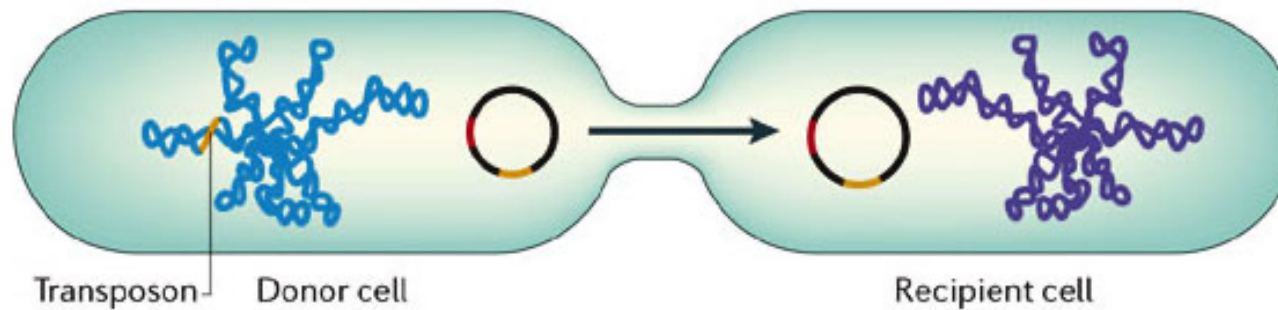
a Bacterial transformation



b Bacterial transduction

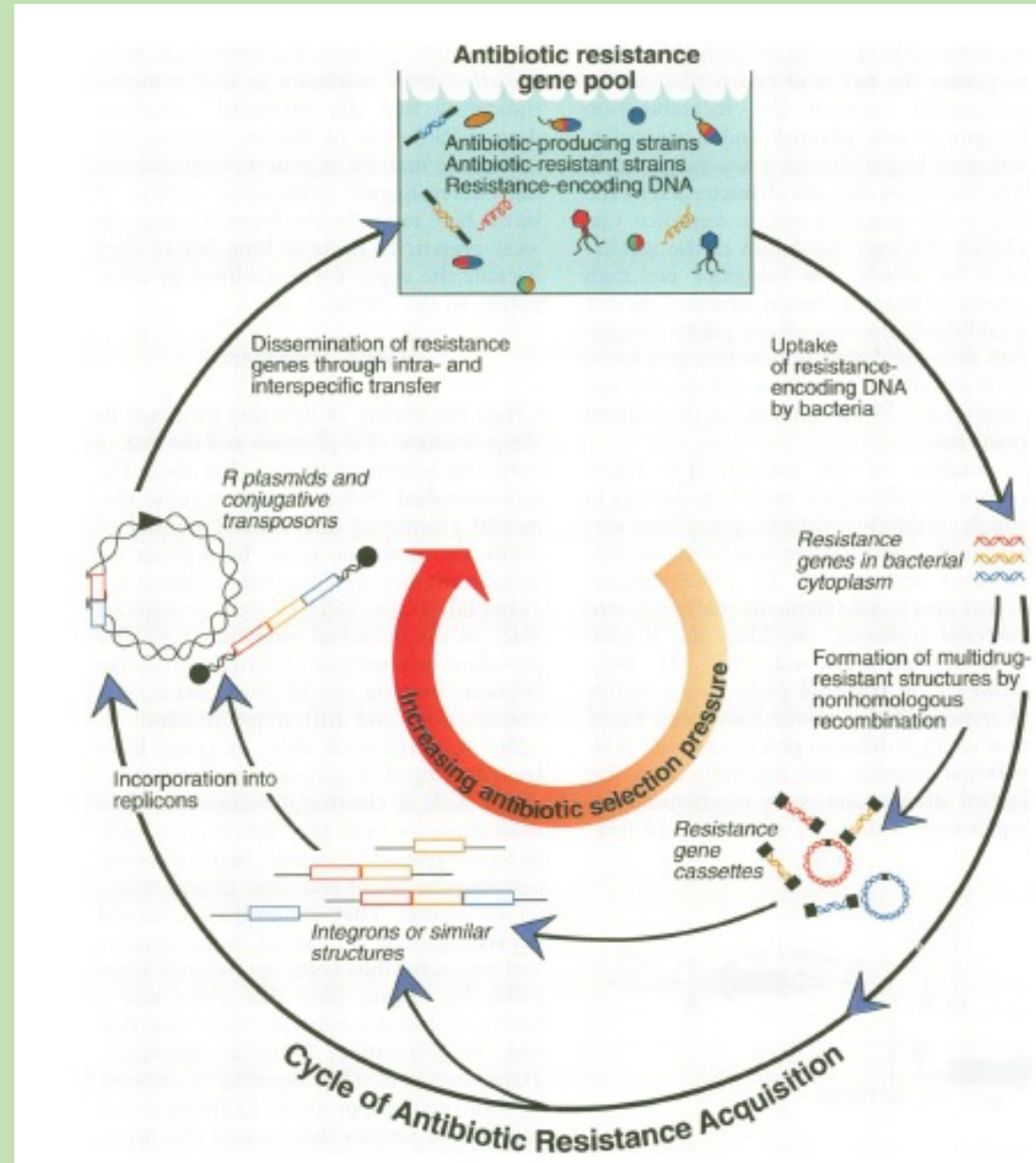


c Bacterial conjugation

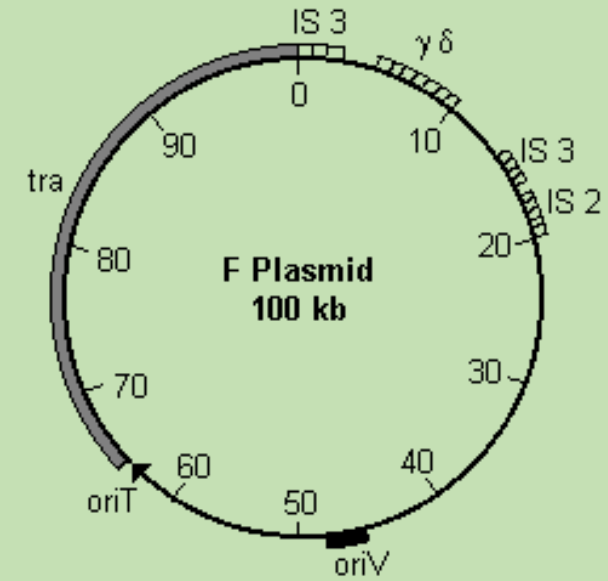
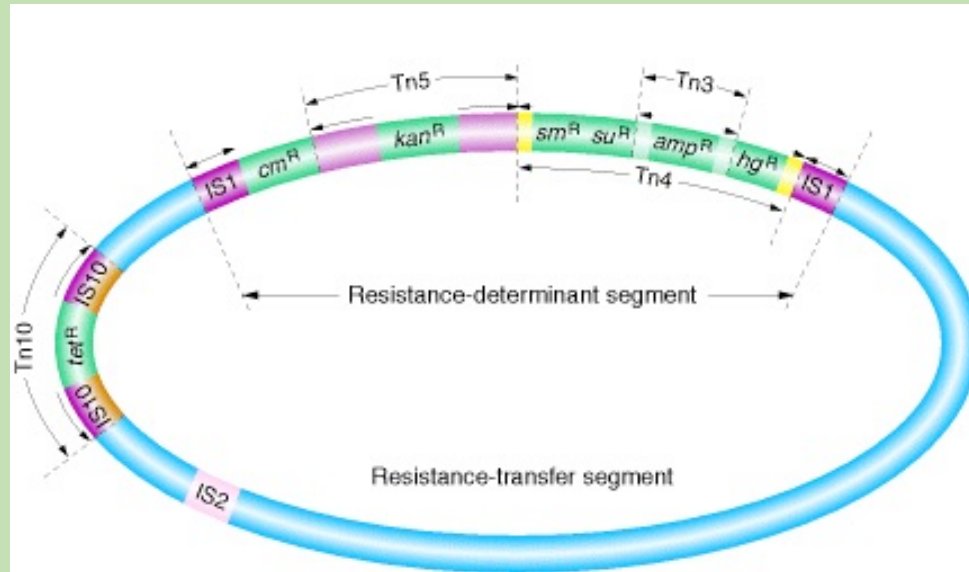


Plasmídeos de Resistência

- Carregam genes de resistência e/ou transposons
- Podem ser transferidos (geralmente através de conjugação), mas também por transformação ou transdução



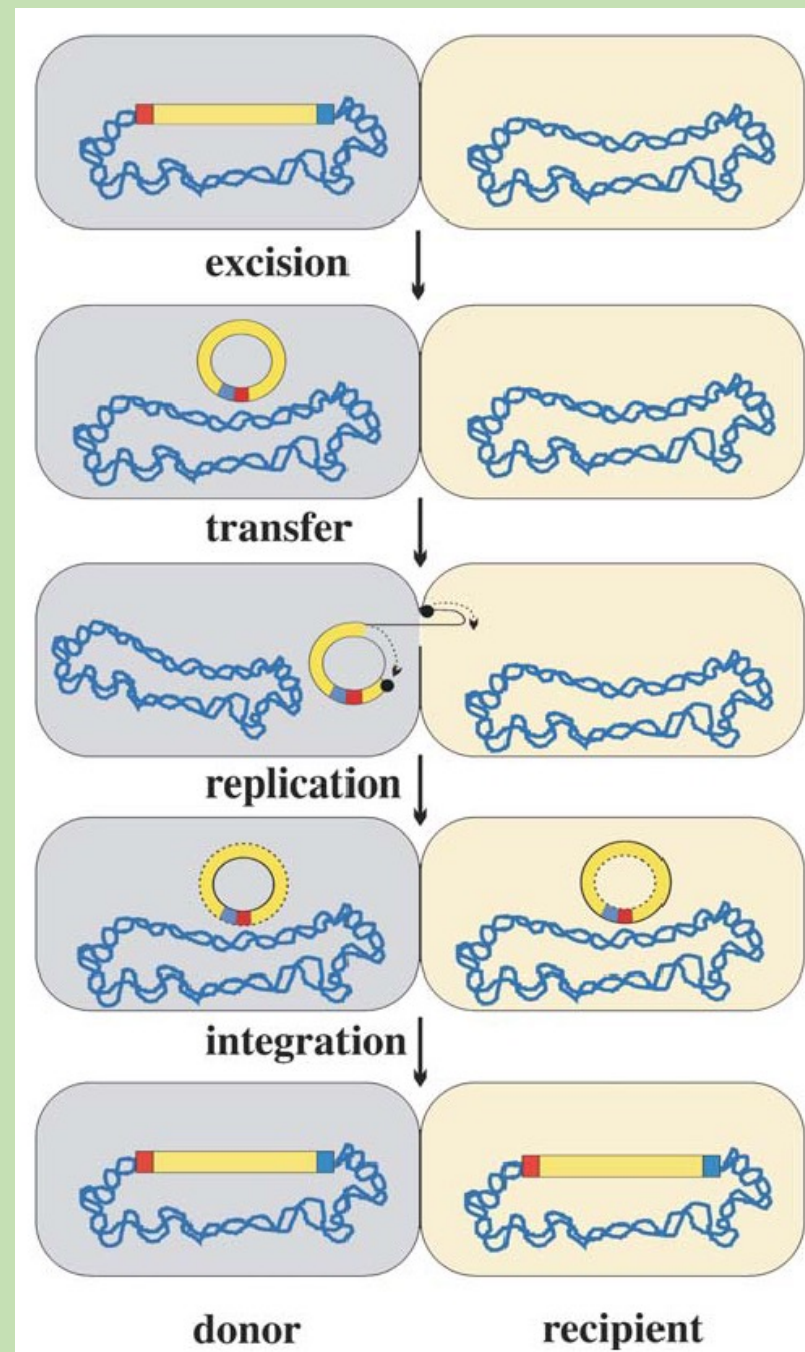
Plasmídeos de Resistência



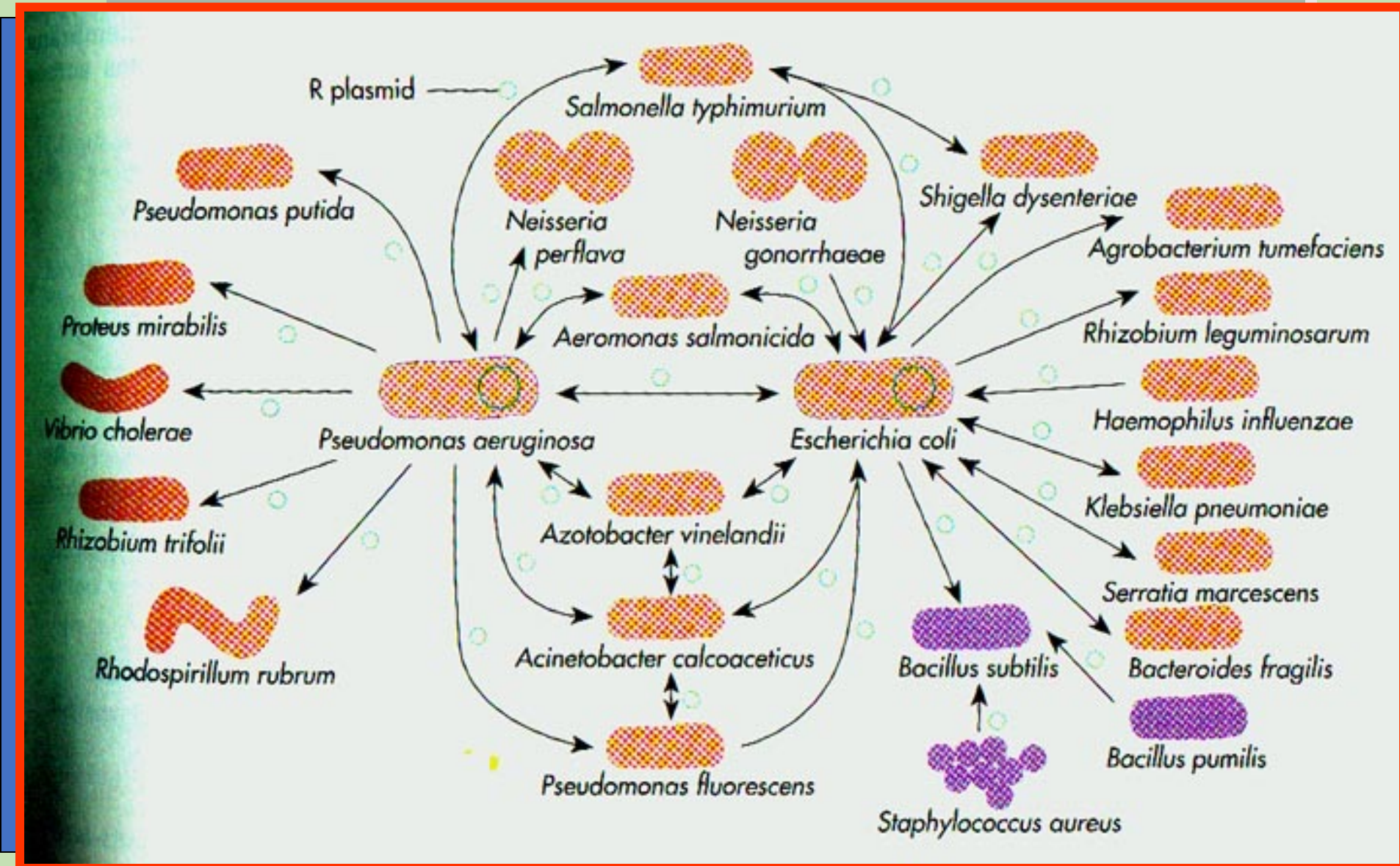
Transposons Conjugativos

Mecanismo de transferência

**Quais elementos genéticos
permitem a transferência por
conjugação?**



Transmissão horizontal da resistência bacteriana



Problemática da Resistência Bacteriana a Antibióticos

Alerta!!!

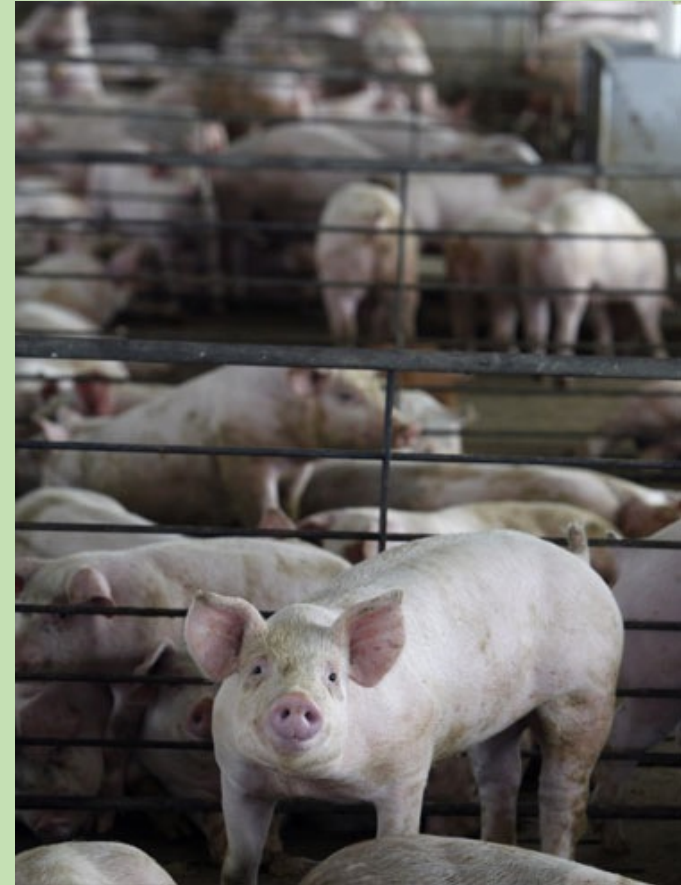
- O uso abusivo dos antibióticos é uma das principais causas do **aumento da resistência bacteriana**, um dos maiores problemas de saúde pública.
- A OMS - advertência clara para punir a utilização da forma incorreta no uso de antibiótico.

Problemas Graves

Uso exagerado de antibióticos em animais:

“Estudos apontam relação entre uso de antibióticos em animais e resistência a medicamentos em seres humanos”

Exemplo: Resistência a vancomicina por *Enterococcus* vem de animais resistentes ao glicopeptídeo avoparcina.



Problema da Resistência a Antibióticos

Até o presente, a maioria das infecções seguem respondendo aos tratamentos padrão com antibióticos.

Entretanto,

Aumento crescente no número de cepas resistentes



Uso de antibióticos mais caros e mais tóxicos



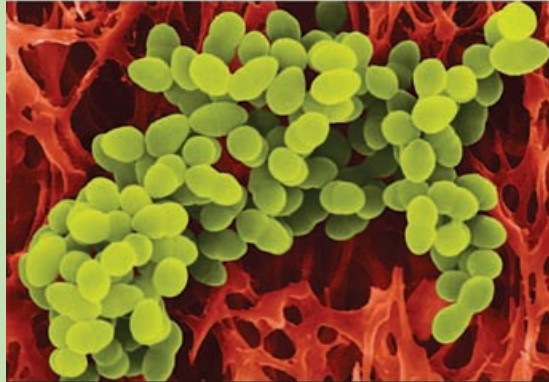
Aumento do tempo de infecção



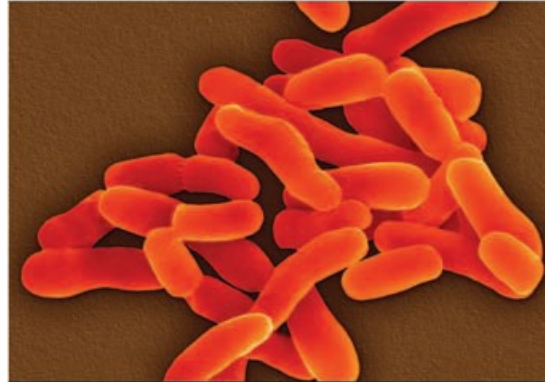
Aumento no custo do tratamento

Problemas Graves

Em infecções nosocomiais:



Staphylococcus aureus



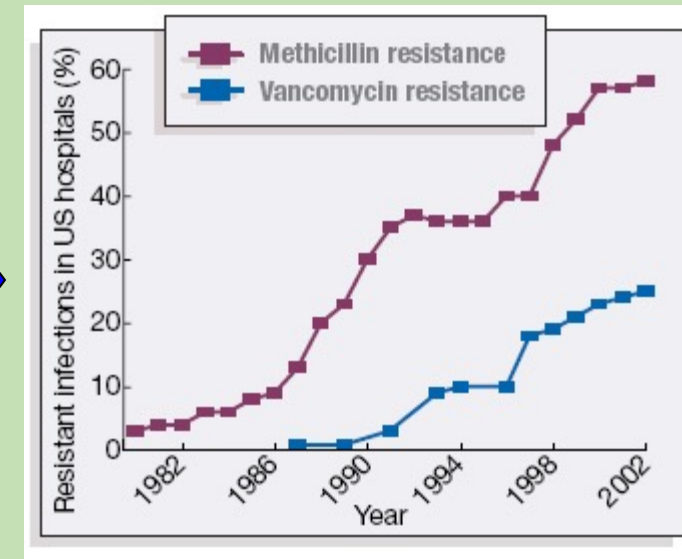
Mycobacterium tuberculosis



Acinetobacter baumannii

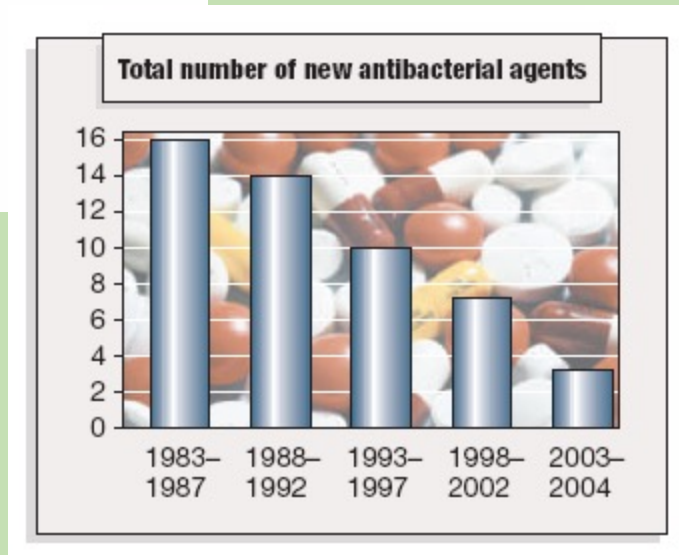
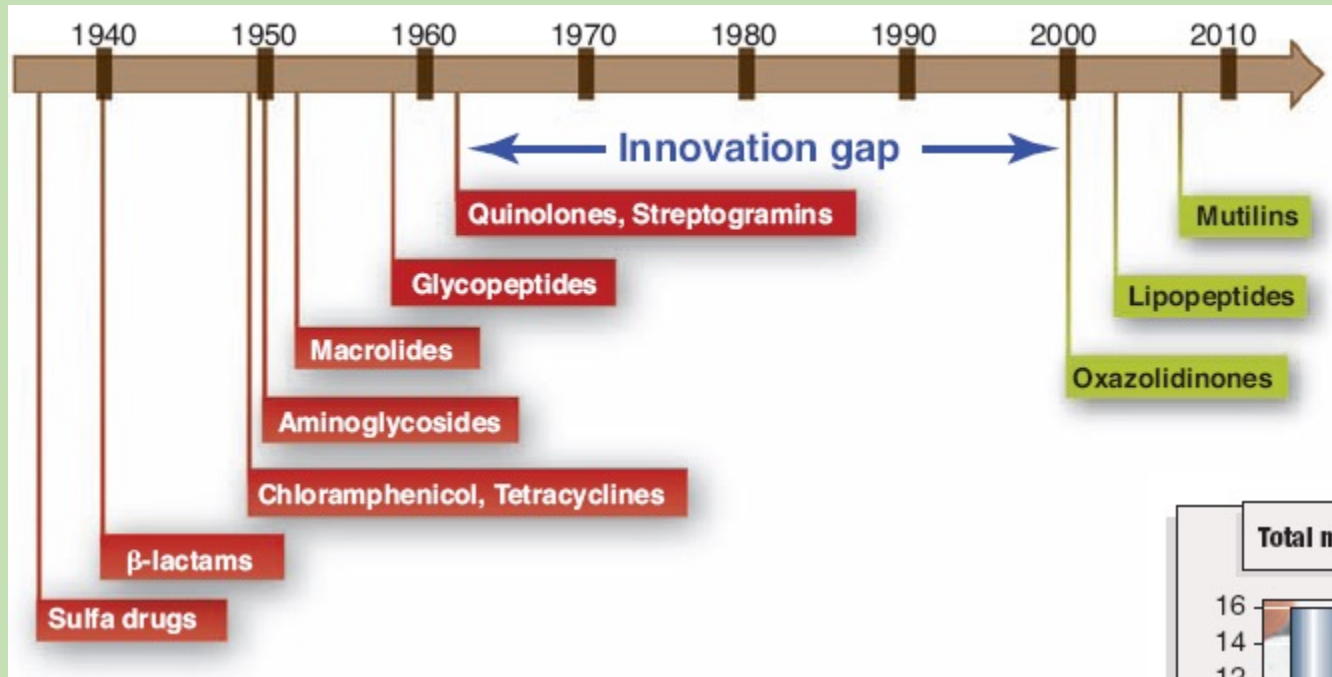


Pseudomonas aeruginosa



Problemas Graves

Desenvolvimento de novas drogas:

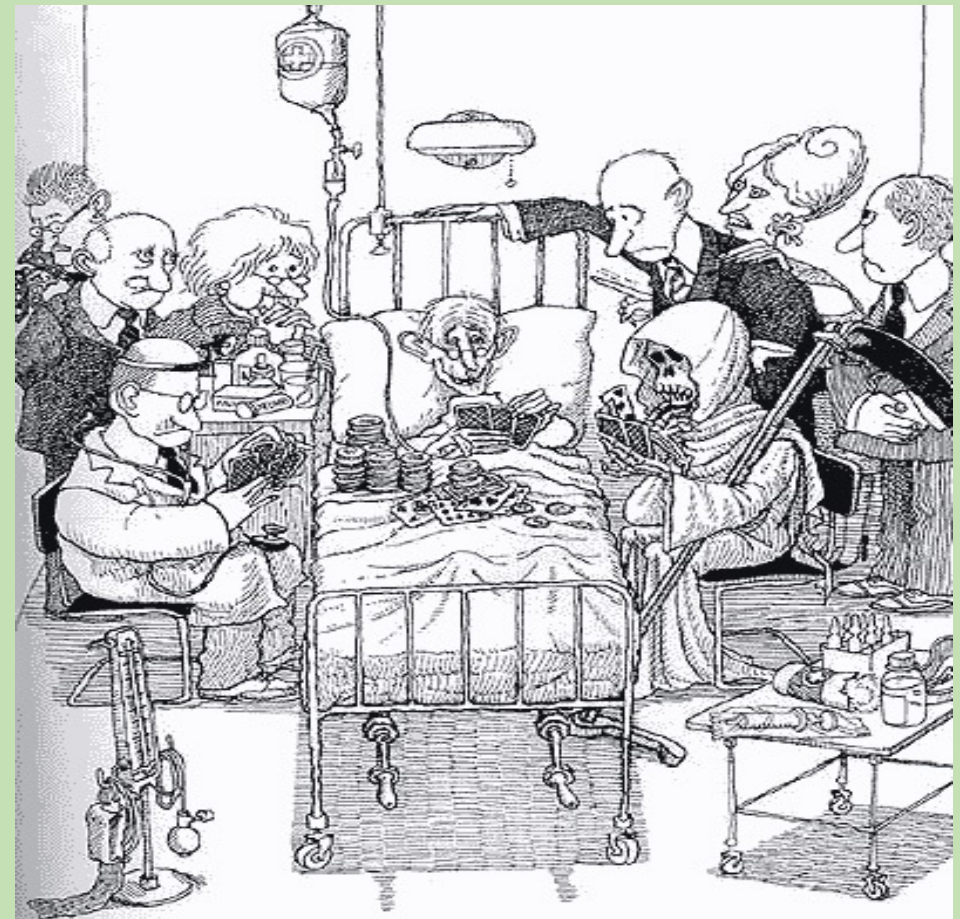


Recomendação para os hospitais

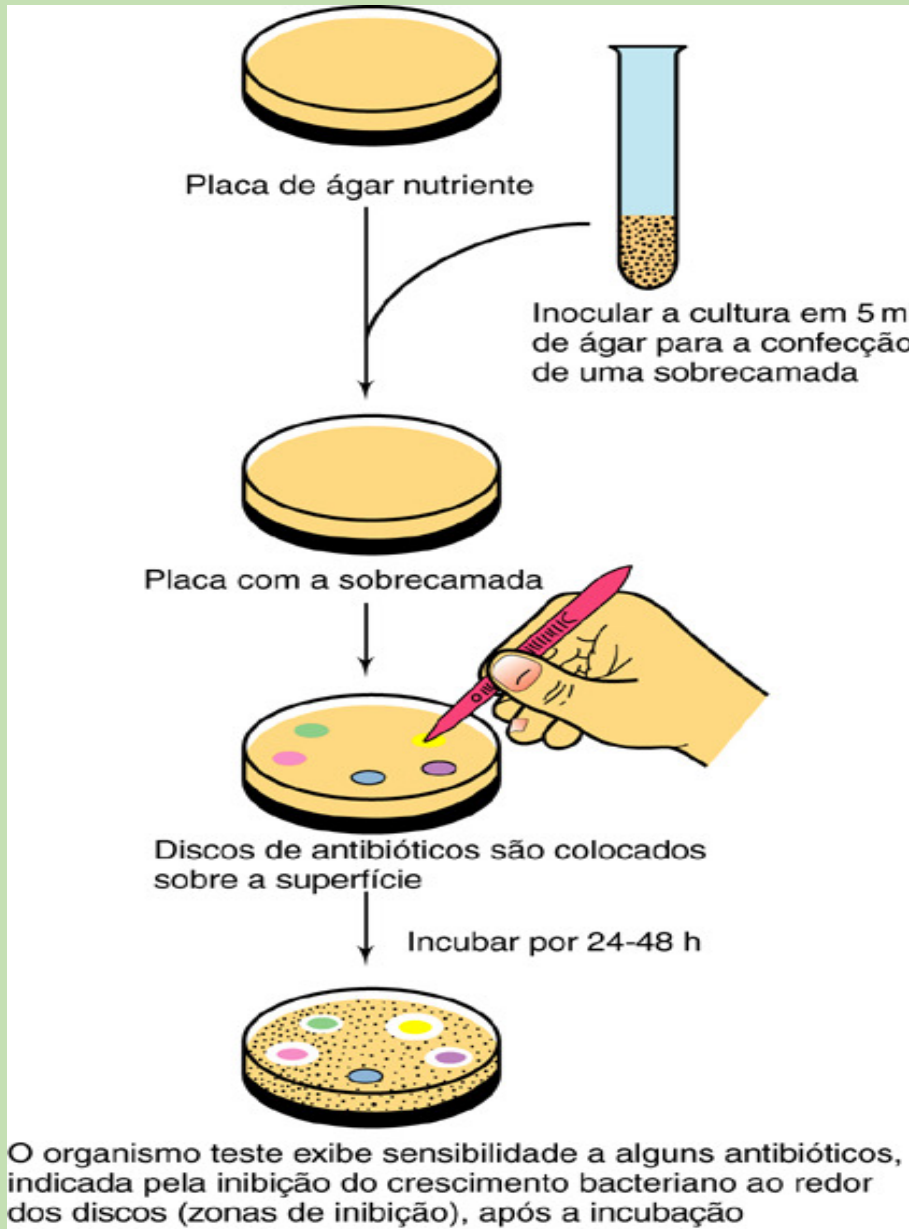
Controlar o índice da Infecção

Identificar com rapidez o paciente c/
resistência bacteriana

Esterilização



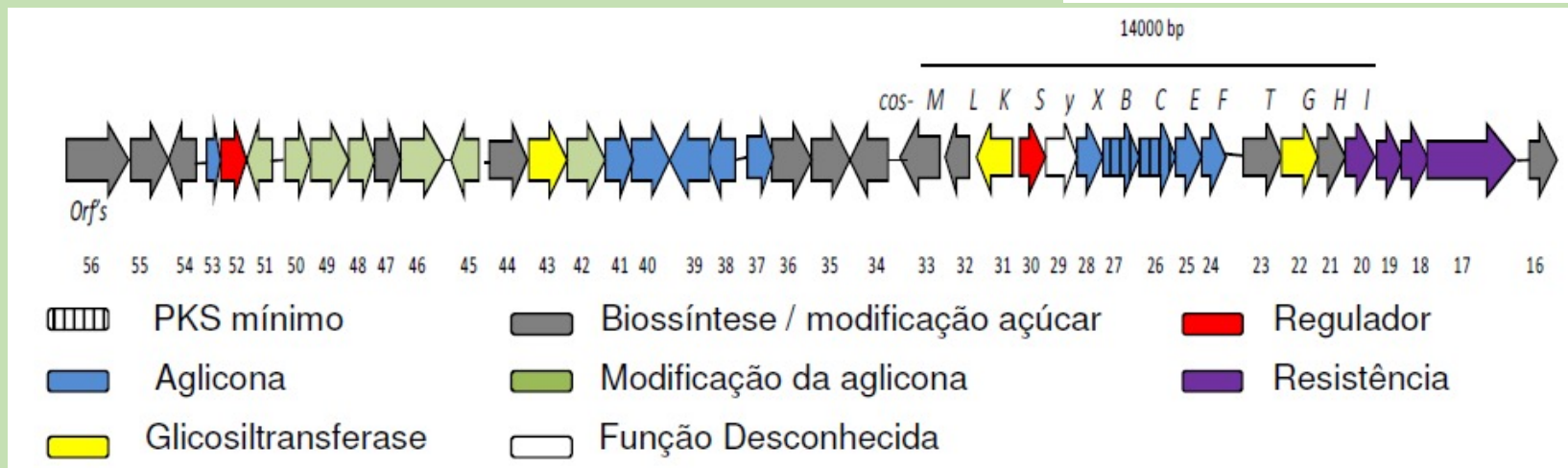
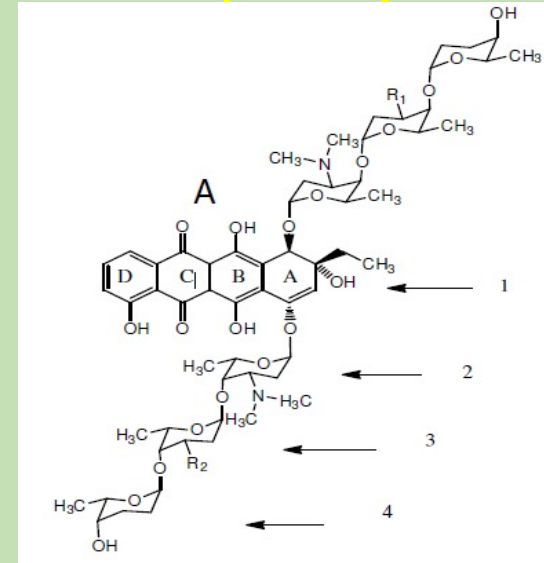
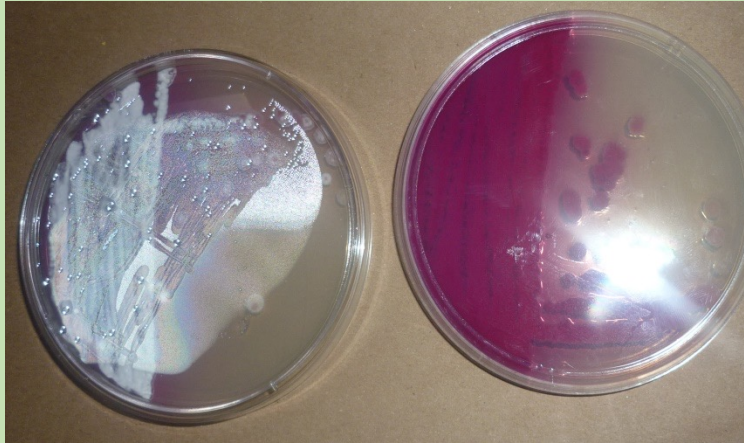
Aula Prática



- **Amostras:**
S. aureus e *E. coli*

- **Antibióticos:**
Rifampicina
Amoxicilina
Eritromicina
Sulfonamida

Caraterísticas *Streptomyces olindensis*



Caraterísticas do genoma

Bacteria	Genome (Mb)	GC (%)	Genes	Plasmids
<i>S. olindensis</i>	9	71	7794	1
<i>S. avermitilis</i>	9,2	70,7	7765	1
<i>S. coelicolor</i>	9,05	72	8300	2
<i>S. lividans</i>	8,19	72,2	7614	-
<i>S. clavuligerus</i>	9,14	72,4	7680	4
<i>S. scabies</i>	10,15	71,5	8901	-

Rojas, J. D. , Vasconcelos, F. N. C., Garrido, L.M., Padilla, G. (2012)

Genome	Streptomyces olindensis (Taxonomy ID: 358823)
Domain	Bacteria
Taxonomy	Bacteria; Streptomyces olindensis
Neighbors	View closest neighbors
Size	9,128,253 bp
Number of Contigs (with PEGs)	146
Number of Subsystems	429
Number of Coding Sequences	8287
Number of RNAs	83

Potencial Biotecnológico de *S. olindensis*

Clusters críticos ??

anti
SMASH antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell

Select Gene Cluster:
Overview 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

The following clusters are from record contig00002:

Cluster 2	Nrps	78108	131160
Cluster 3	T1pks	112322	160619
Cluster 4	T1pks	142855	190312
Cluster 5	Bacteriocin	319673	329888
Cluster 6	T1pks	411271	455404

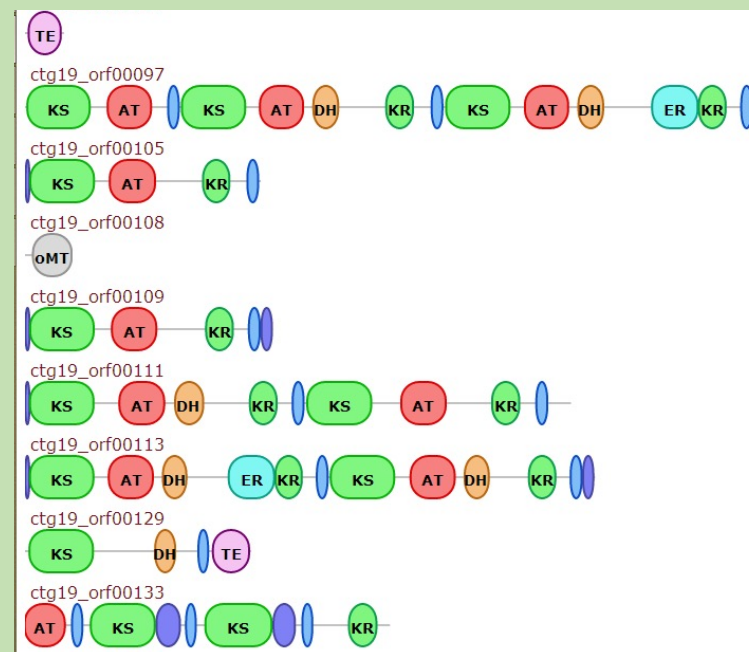
→ The following clusters are from record contig00005:

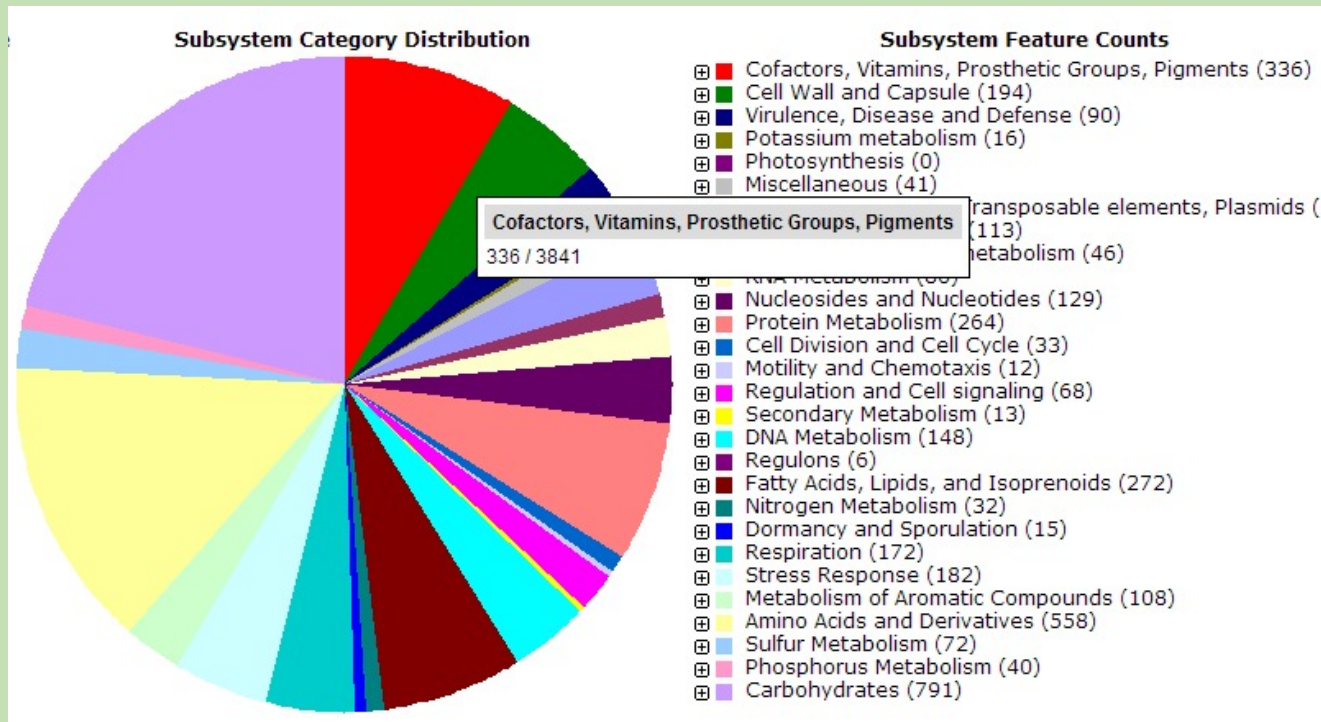
Cluster 11	Oligosaccharide-t2pks	16092	70209
Cluster 12	Amglyccycl	164661	185896

Select Gene Cluster:

Overview 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

The following clusters are from record contig00018:		
Cluster 24	Nrps-t1pks	92386 143178
The following clusters are from record contig00019:		
Cluster 25	T1pks-transatpks	55733 156520
The following clusters are from record contig00022:		
Cluster 26	Terpene	7384 34023
The following clusters are from record contig00024:		
Cluster 27	T1pks-nrps	1 50896
The following clusters are from record contig00029:		
Cluster 28	Siderophore	72913 84685
The following clusters are from record contig00031:		
Cluster 29	Melanin-nucleoside	34684 67334
The following clusters are from record contig00035:		
Cluster 30	Nrps-t1pks	1 49412
The following clusters are from record contig00036:		
Cluster 31	Nrps	1 49008
The following clusters are from record contig00037:		
Cluster 32	Terpene	19592 40677
The following clusters are from record contig00042:		
Cluster 33	T2pks	31455 73691
The following clusters are from record contig00055:		
Cluster 34	Butyrolactone	29278 42838
The following clusters are from record contig00102:		
Cluster 35	Terpene	1 822





Genome ID ▲▼	Score ▲▼	Genome Name ▲▼
100226.1	516	Streptomyces coelicolor A3(2)
100226.15	508	Streptomyces coelicolor A3(2)
591159.3	454	Streptomyces viridochromogenes DSM 40736
566461.4	428	Streptomyces ghanaensis ATCC 14672
457428.4	418	Streptomyces lividans TK24
227882.1	405	Streptomyces avermitilis MA-4680
227882.9	403	Streptomyces avermitilis MA-4680
1079986.3	376	Streptomyces chartreusis NRRL 12338
467200.3	330	Streptomyces griseoflavus Tu4000
680198.5	305	Streptomyces scabiei 87.22
455632.3	300	Streptomyces griseus subsp. griseus NBRC 13350
443255.8	299	Streptomyces clavuligerus ATCC 27064
443255.19	291	Streptomyces clavuligerus ATCC 27064
455632.4	290	Streptomyces griseus subsp. griseus NBRC 13350



RAST Rapid Annotation using
Subsystem Technology version 4.0

The NMPDR, SEED-based, prokaryotic genome annotation service.
For more information about The SEED please visit theSEED.org.

Comparação de genes envolvidos em produção de PKS

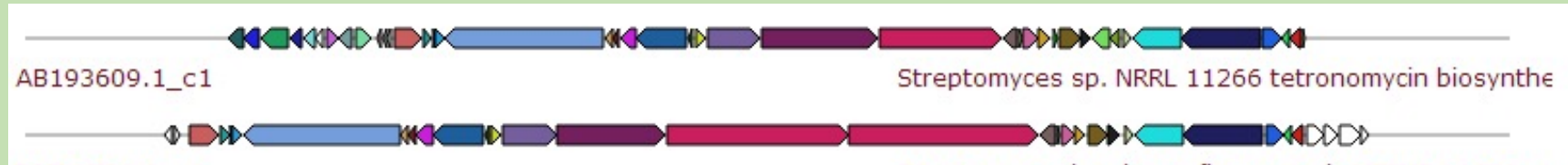
- Biossíntese de estruturas PKS

KEGG map	Distinct ECs	<i>Streptomyces olindensis</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350
Biosynthesis of type II polyketide backbone	3	<u>2</u> (66.7 %)	<u>2</u> (66.7 %)	<u>2</u> (66.7 %)	<u>2</u> (66.7 %)
Biosynthesis of type II polyketide products	2	<u>1</u> (50.0 %)	<u>1</u> (50.0 %)	<u>1</u> (50.0 %)	<u>1</u> (50.0 %)
Butanoate metabolism	52	<u>24</u> (46.2 %)	<u>23</u> (44.2 %)	<u>21</u> (40.4 %)	<u>23</u> (44.2 %)
Pyruvate metabolism	64	<u>27</u> (42.2 %)	<u>28</u> (43.8 %)	<u>25</u> (39.1 %)	<u>26</u> (40.6 %)
Tetracycline biosynthesis	3	<u>1</u> (33.3 %)	<u>1</u> (33.3 %)	<u>1</u> (33.3 %)	<u>1</u> (33.3 %)
Valine, leucine and isoleucine degradation	34	<u>25</u> (73.5 %)	<u>18</u> (52.9 %)	<u>19</u> (55.9 %)	<u>22</u> (64.7 %)

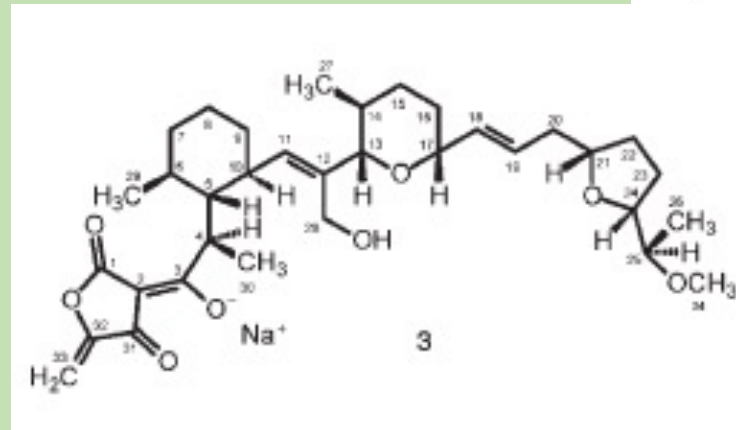
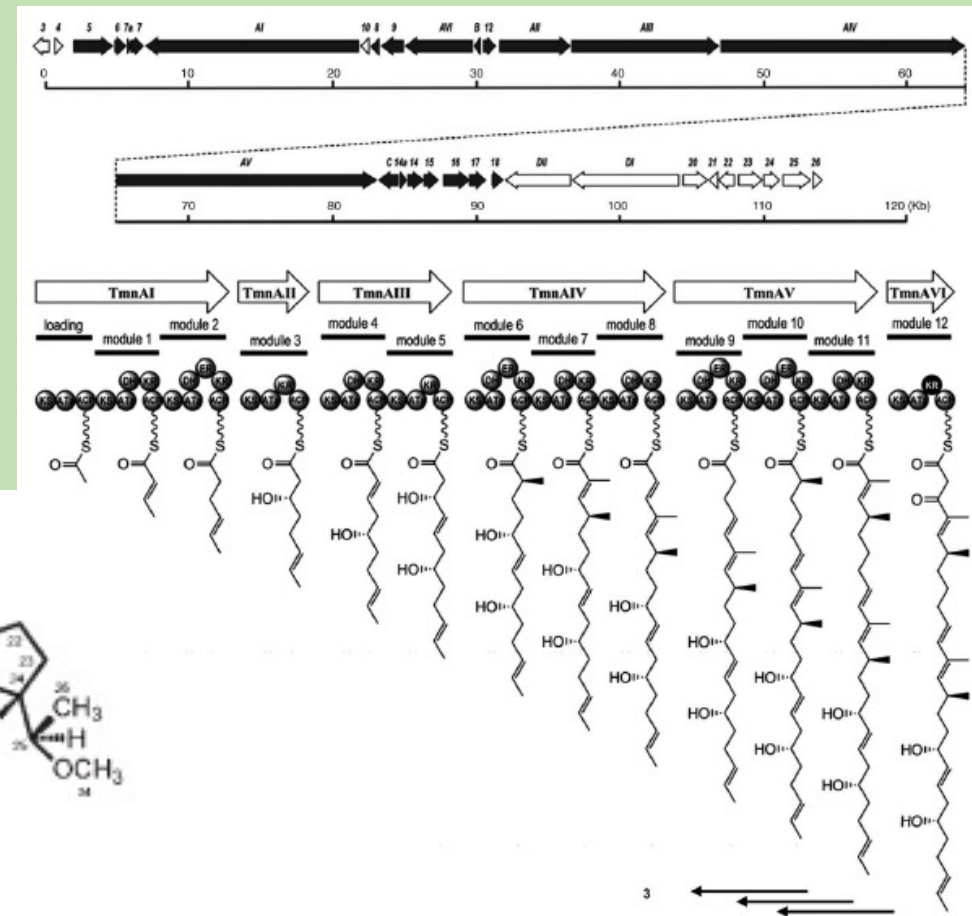
- Biossíntese de unidades de açúcar para PKS

KEGG map	Distinct ECs	<i>Streptomyces olindensis</i>	<i>Streptomyces olindensis</i>	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	94	<u>37</u> (39.4 %)	<u>37</u> (39.4 %)	<u>35</u> (37.2 %)	<u>37</u> (39.4 %)	<u>35</u> (37.2 %)
Biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides	3	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>1</u> (33.3 %)
Novobiocin biosynthesis	6	<u>4</u> (66.7 %)	<u>4</u> (66.7 %)	<u>4</u> (66.7 %)	<u>4</u> (66.7 %)	<u>3</u> (50.0 %)
Polyketide sugar unit biosynthesis	8	<u>5</u> (62.5 %)	<u>5</u> (62.5 %)	<u>4</u> (50.0 %)	<u>3</u> (37.5 %)	<u>5</u> (62.5 %)

Polieter – Cluster-like Tetronomycin



Tentativa de produção



Polieter

Cluster 25 - T1pks-transatpks

Gene cluster description

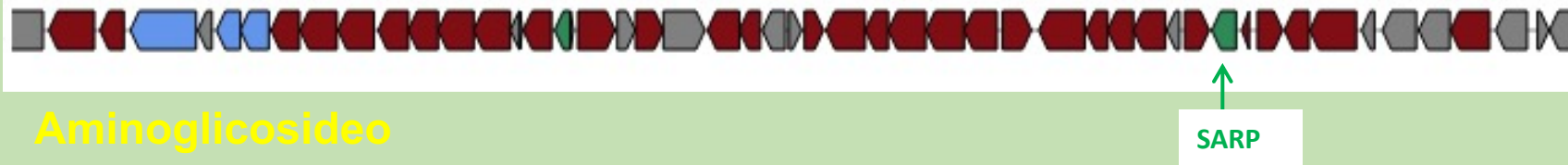
Gene Cluster 25. Type = t1pks-transatpks. Location: 55733 - 156520 nt. Click on genes for more information.
Show pHMM detection rules used



Cosmomicina D

Gene cluster description

Gene Cluster 11. Type = oligosaccharide-t2pks. Location: 16092 - 70209 nt. Click on genes for more information.
Show pHMM detection rules used

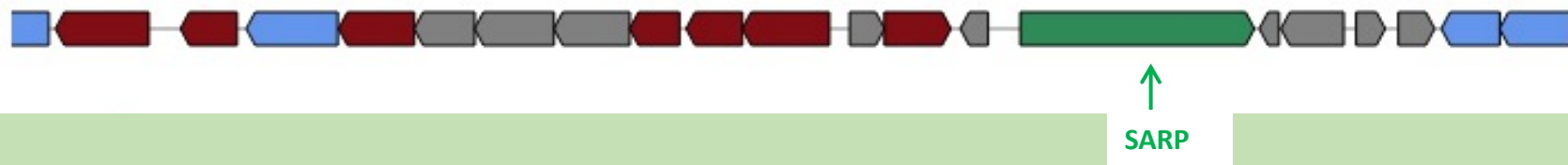


Aminoglicosideo

Cluster 12 - Anglyccycl

Gene cluster description

Gene Cluster 12. Type = amglyccycl. Location: 164661 - 185896 nt. Click on genes for more information.
Show pHMM detection rules used

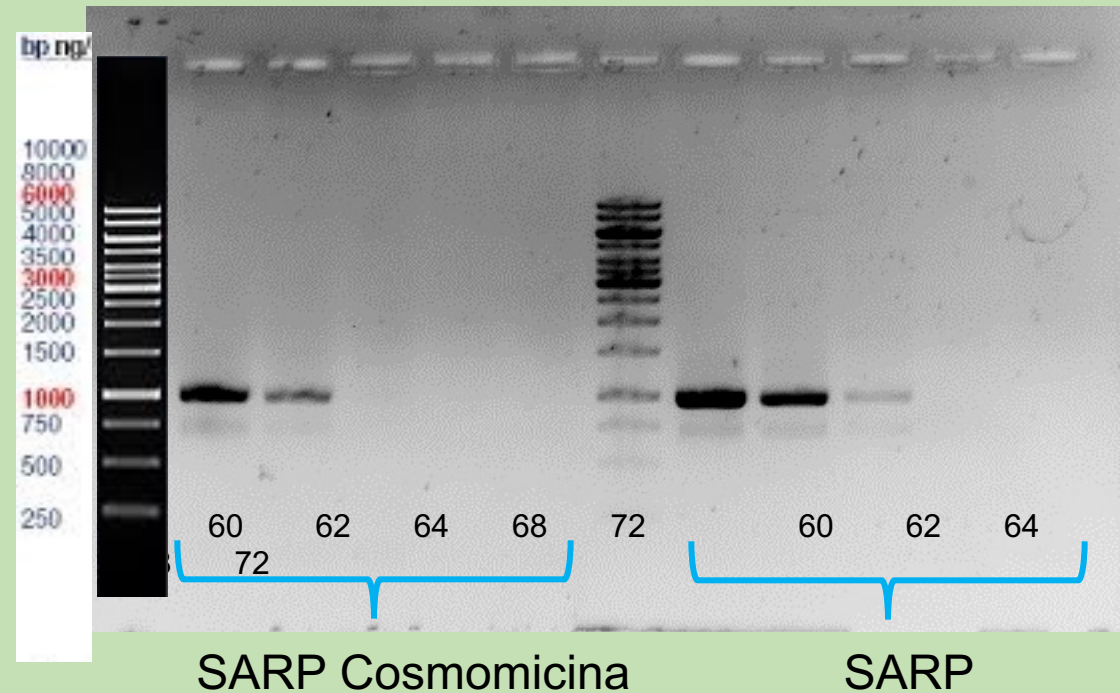


SARPs

Primer N°	Composição	Sequencia 5' - 3'	Tm ° C
1	SARP Primer Left Polieter + Xbal	AGACA <u>TCTAGA</u> GGAAAGTACAGAAACGGAAGCA	71.9
2	SARP Primer Right Polieter + EcoRI	AAATA <u>GAATTC</u> GGAGCTGACGCACCGTCT	72.4
3	SARP Primer Left Aminoglicosido + Xbal	AAAAA <u>TCTAGAA</u> GGAACACGACCGAGACAAC	70.2
4	SARP Primer Right Aminoglicosido + EcoRI	ATTTA <u>GAATTC</u> AGGAAGCAGGGCTGACCAC	71.7
5	SARP Primer Right Cosmomicina + Xbal	AATAA <u>TCTAGA</u> CCTTCATCTGCCACACC	69.0
6	SARP Primer Left Cosmomicina + EcoRI	AATAA <u>GAATTC</u> CACTTTCAGTGCAGGTCGAA	69.9

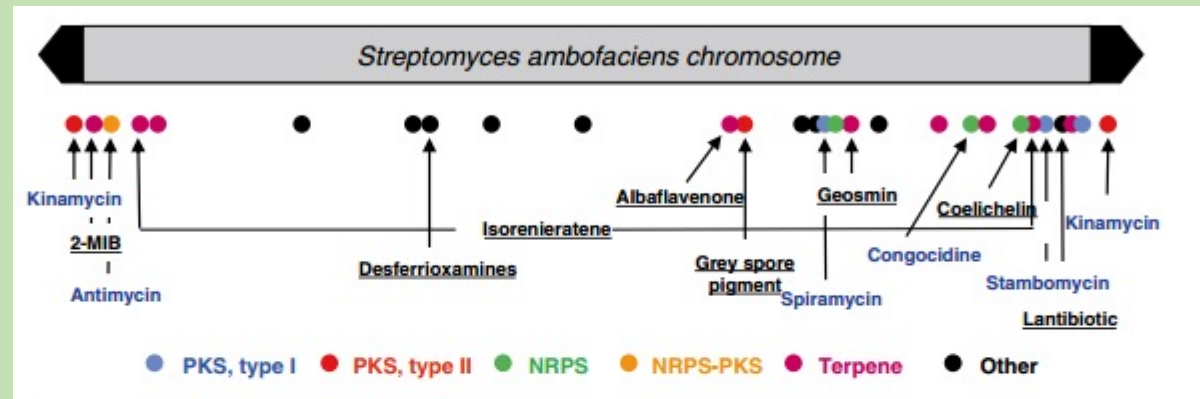
SARP Cos 729 pb

SARP Pol 997 pb



Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*

Bertrand Aigle · Sylvie Lautru · Dieter Spiteller ·
Jeroen S. Dickschat · Gregory L. Challis ·
Pierre Leblond · Jean-Luc Pernodet



Descrição dos clusters

- Estruturas químicas
- Vias metabólicas
- Genes envolvidos (resistência, regulação, biossíntese)
- Possível ação biológica

Ferramentas a utilizar...

- ✓ Nocaute gênico
- ✓ Sobre-expressão de genes (SARPs reguladores)
- ✓ Expressão heteróloga - Clonagem de *clusters* biossintéticos
- ✓ Biossíntese combinatória: Modificações (Padrões de glicosilação)

