



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V- MINISTRO ALCIDES CARNEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

DAMARA FREITAS RODRIGUES

ANÁLISES *IN SILICO* DAS BETA-LACTAMASES DO TIPO TEM

**JOÃO PESSOA - PB
2019**

DAMARA FREITAS RODRIGUES

ANÁLISES *IN SILICO* DAS BETA-LACTAMASES DO TIPO TEM

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado ao Departamento do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador (a): Profa. Dra. Daniela Santos Pontes.

**JOÃO PESSOA - PB
2019**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

R696 Rodrigues, Damara Freitas.
Análises *in silico* das beta-lactamases do tipo TEM
[manuscrito] / Damara Freitas Rodrigues. - 2019.
37 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Daniela Santos Pontes ,
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."
1. Variantes TEM. 2. Beta-lactamase. 3. Beta-lactâmicos. I.
Título

21. ed. CDD 572.75

DAMARA FREITAS RODRIGUES

ANÁLISES *IN SILICO* DAS BETA-LACTAMASES DO TIPO TEM

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado ao Departamento do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Molecular.

Aprovada em: 17/08/19.

BANCA EXAMINADORA

Daniela Santos Pontes

Profa. Dra. Daniela Santos Pontes (Orientador (a))
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Francisco Jaime

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Brigida Thais Luckwu de Lucena

Profa. Dra. Brigida Thais Luckwu de Lucena
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Á todos que, de alguma forma,
contribuíram para a realização deste
trabalho, DEDICO.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Anel beta-lactâmico, característico do grupo.....	11
Figura 2 – Motivo STFK totalmente conservado.....	16
Figura 3 – Motivo SDN com variação na Ser130.....	16
Figura 4 – Motivo KSG conservado.....	17
Figura 5 – Região conservada 101-112 das beta-lactamases TEM.....	18
Tabela 1 – Posições dos resíduos de aminoácidos das variantes TEM que alteram em mais de cinco variantes.....	20
Figura 6 – Árvore filogenética das variantes TEM que substituem resíduos de aminoácidos comuns.....	24
Figura 7 – Árvore filogenética das beta-lactamases do tipo TEM.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Aminoácido
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLDB	Beta-Lactamase DataBase
CDD	Conserved Domain Database
Cys	Cisteína
ESBL	Extended-Spectrum Beta-Lactamase
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
JTT	Modelo Evolutivo Jones-Taylor-Thornton
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MAFFT	Multiple Alignment Program for Amino Acid or Nucleotide Sequences
MEGA 7	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
Met	Metionina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDARO	National Database of Antibiotic Resistant Organisms
PBP	Penicillin-binding protein
Phe	Fenilalanina
PhyML	Software de filogenia baseado em Máxima Verossimilhança
Pro	Prolina
RMSD	Desvio Médio da Raiz Quadrada
Ser	Serina
TEM	Temoniera (beta-lactamase)

Thr	Treonina
TM-score	Template modeling score
Trp	Triptofano
T-REX	Tree and Reticulogram Reconstruction
Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Antibióticos beta-lactâmicos.....	11
2.1.1	<i>Mecanismos de resistência bacteriana aos beta-lactâmicos.....</i>	12
2.1.2	<i>Enzimas beta-lactamases do tipo TEM.....</i>	13
3	METODOLOGIA	14
3.1	Seleção das sequências de aminoácidos.....	14
3.2	Alinhamento múltiplo de sequências.....	14
3.3	Construção e análise da tabela de mutação.....	14
3.4	Construção e análise de árvores filogenéticas.....	15
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	15
4.1	Seleção das sequências de aminoácidos das beta-lactamases do tipo TEM.....	15
4.2	Alinhamento múltiplo e análise das posições conservadas dos resíduos.....	15
4.3	Análise de resíduos substituídos.....	19
4.4	Análises filogenéticas das enzimas TEM beta-lactamases.....	23
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
	REFERÊNCIAS	29
	APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DAS SEQUÊNCIAS UTILIZADAS NO TRABALHO	35

ANÁLISES *IN SILICO* DAS BETA-LACTAMASES DO TIPO TEM

IN SILICO ANALYSIS OF BETA-LACTAMASES OF TEM TYPE

Damara Freitas Rodrigues*
Daniela Santos Pontes**

RESUMO

As beta-lactamases do tipo TEM são enzimas produzidas por bactérias, sendo comumente encontradas em bactérias gram-negativas. Essas enzimas conferem resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos, pois atuam eficientemente na clivagem do anel beta-lactâmico que os constituem. As enzimas TEM são uma das mais prevalentes em bactérias resistentes e podem apresentar múltiplas alterações em seus resíduos de aminoácidos que podem levar ao aumento do seu espectro de ação. Considerando que os beta-lactâmicos são um dos principais grupos de antibióticos disponíveis para o uso clínico, que a resistência é um atual problema mundial, e que as enzimas TEM apresentam uma alta plasticidade fenotípica, capazes de evoluir para formas que acarretam maior resistência, este estudo teve como objetivo realizar análises *in silico* comparativas entre as variantes das enzimas TEM beta-lactamases. Para isso, foram selecionadas sequências de aminoácidos das beta-lactamases TEM disponíveis no Banco de Dados Nacional de Organismos Resistentes a Antibióticos (NDARO) do NCBI. As sequências foram alinhadas com o auxílio do programa MAFFT para identificação de regiões de similaridade, como também para identificação das posições dos resíduos variáveis dessas enzimas e as suas respectivas substituições de aminoácidos. A partir dessas análises foi feito o levantamento de uma tabela de mutação destacando os principais resíduos dessas enzimas que sofrem substituições de aminoácidos e a substituição observada para cada variante em comparação com a enzima TEM-1, primeira enzima dessa família identificada em bactérias. Pela análise do alinhamento das sequências foi observada a presença dos principais motivos conservados característicos das beta-lactamases da classe, além de serem identificadas quinze posições de resíduos de aminoácidos que são frequentemente substituídos, sendo essas substituições associadas ao funcionamento das enzimas. Foram realizadas análises filogenéticas através do método de agrupamento de vizinhos para comparar as variantes TEM e identificar a similaridade entre elas, através das análises filogenéticas foi observado uma alta similaridade entre as sequências das enzimas TEM. Para avaliação de relações evolutivas entre as sequências, o método filogenético mostrou ser inconclusivo para esse tipo de estudo devido à extrema similaridade entre as sequências. As enzimas TEM são uma das beta-lactamases que evoluem mais rápido e apresentam resíduos e motivos que são cruciais para a sua funcionalidade, analisar a variação presente nesses resíduos e sua importância para variação na atividade da enzima é fundamental para o melhoramento e desenvolvimento de fármacos que sejam capazes de impedir que essas enzimas promovam resistência bacteriana.

Palavras-chave: Variantes TEM. Beta-lactamase. Beta-lactâmicos.

* Graduanda do curso de Ciências Biológicas (damarafreitas19@gmail.com).

** Doutora em genética (danisp_bio@yahoo.com.br).

ABSTRACT

TEM-type beta-lactamases are enzymes produced by bacteria, and are commonly found in gram-negative bacteria. These enzymes confer bacterial resistance to beta-lactam antibiotics, since they act efficiently in the cleavage of the beta-lactam ring that constitute them. TEM enzymes are one of the most prevalent in resistant bacteria and may exhibit multiple changes in their amino acid residues that may lead to an increase in their action spectrum. Considering that beta-lactams are one of the main groups of antibiotics available for clinical use, that resistance is a current worldwide problem, and that TEM enzymes have a high phenotypic plasticity, able to evolve to forms that lead to greater resistance, this The aim of this study was to carry out comparative in silico analyzes between the variants of the TEM beta-lactamases enzymes. For this, amino acid sequences of the TEM beta-lactamases available from NCBI's National Database of Antibiotic Resistant Organisms (NDARO) were selected. The sequences were aligned with the aid of the MAFFT program to identify regions of similarity, as well as to identify the positions of the variable residues of these enzymes and their respective amino acid substitutions. From these analyzes, a mutation table was surveyed highlighting the main residues of these enzymes that undergo amino acid substitutions and the observed substitution for each variant compared to the TEM-1 enzyme, the first enzyme of this family identified in bacteria. Sequence alignment analysis showed the presence of the main preserved motifs characteristic of the beta-lactamases of the class, in addition to identifying fifteen positions of amino acid residues that are frequently substituted, these replacements being associated with the functioning of the enzymes. Phylogenetic analyzes were performed using the neighbors clustering method to compare the TEM variants and to identify the similarity between them. Through the phylogenetic analysis a high similarity was observed between the sequences of the TEM enzymes. For the evaluation of evolutionary relationships between sequences, the phylogenetic method proved to be inconclusive for this type of study due to the extreme similarity between the sequences. TEM enzymes are one of the fastest evolving beta-lactamases and present residues and motifs that are crucial to its functionality, to analyze the variation present in these residues and its importance for variation in enzyme activity is fundamental for the improvement and development of drugs that are able to prevent these enzymes from promoting bacterial resistance.

Keywords: TEM variants. Beta-lactamase. Beta-lactams.

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos beta-lactâmicos foram os primeiros a serem clinicamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas, e ainda são um dos mais prescritos aos humanos e aos animais, devido a sua eficiência e baixa toxicidade. Atuam interrompendo a formação da parede celular bacteriana, ligando-se covalentemente às proteínas essenciais de ligação a penicilina (PBP's) ou transpeptidases, que são responsáveis pela síntese dos peptidoglicanos (BARLOW; HALL, 2002; LACHMAYR et al., 2009; PALZKILL, 2018). Porém o uso intensivo desses e outros antimicrobianos nas mais diversas áreas (agricultura, aquicultura, pecuária, clínica, etc.), com finalidades que vai desde o tratamento terapêutico ao tratamento profilático, promoveram o surgimento e disseminação de genes resistentes entre várias espécies bacterianas presentes nos mais diversos ambientes (AMINOV; MACKIE, 2007).

A produção de enzimas beta-lactamases, codificadas por genes de resistência, consiste no principal mecanismo bacteriano de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Por isso, tem sido de grande preocupação a saúde pública, pois as infecções ainda são uma das maiores causadoras de mortalidade, enquanto que o descobrimento de novos antibióticos tem decaído (BARLOW; HALL, 2002; BAYM; STONE; KISHONY, 2016).

As enzimas beta-lactamases inativam o antibiótico hidrolisando a ligação amida do anel beta-lactâmico, característico desses compostos, impedindo-os de se ligarem as PBP's e realizarem a sua função. As beta-lactamases mais comuns são as do tipo TEM e SHV, as quais também são as principais responsáveis por produzir beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), que são capazes de inativar todos os antibióticos beta-lactâmicos, exceto os carbapenêmicos (MAJIDUDDIN; PALZKILL, 2003; ROBIN et al., 2007b; MOOSAVIAN; DEIHAM, 2012; BAJPAI et al., 2017).

Muitos dos genes que codificam as beta-lactamases são encontrados em elementos genéticos móveis como: plasmídeos, transposons, integrons, sequências de inserção e elementos integrativos sendo potencialmente sujeitos a transferência gênica horizontal (TGH), desta forma a TGH é um importante mecanismo na disseminação da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (DAVIES. J; DAVIES. D, 2010; GAZE et al., 2013; GILLINGS, 2013; AZEVEDO, 2014; PERRY; WESTMAN; WRIGHT, 2014; BAYM; STONE; KISHONY, 2016; BRANDT et al., 2017; COLAVECCHIO et al., 2017).

Os genes *bla*TEM codificam as enzimas TEM beta-lactamases. Atualmente existem 236 variantes de TEM-1, a primeira TEM identificada (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=A#TEM>). As diversas variantes das enzimas TEM beta-lactamases são o resultado de uma evolução natural, frente à pressão seletiva da exposição contínua aos beta-lactâmicos. Sendo assim, as ferramentas de bioinformática vêm sendo importantes para a compreensão e monitoramento dos genótipos de resistência bacteriana, permitindo uma maior compreensão do papel das mutações e dos mecanismos de resistência (ABRIATA; PALZKILL; PERARO, 2015).

Graças ao melhoramento e desenvolvimento de novos *softwares* aliado as técnicas moleculares e bioquímicas tornou-se possível entender a importância de muitos resíduos e motivos conservados de diversas classes de enzimas, como também compreender os efeitos das alterações dos resíduos na atividade funcional proteica. O conhecimento sobre os resíduos mais conservados e variáveis da TEM e

sua relação com a resistência aos beta-lactâmicos é importante para compreensão de mecanismos de inibição dessas enzimas.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi realizar análises *in silico* baseadas no alinhamento das sequências proteicas e na filogenia das enzimas TEM-1 e suas variantes para exploração de aspectos filogenéticos, moleculares, estruturais e funcionais das enzimas TEM beta-lactamases.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

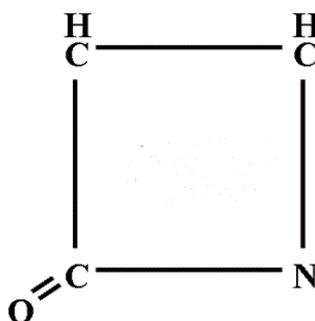
2.1 Antibióticos beta-lactâmicos

O termo “antibiótico” foi proposto pela primeira vez por Selman Abraham Waksman em 1942, definindo-o como uma substância produzida por microorganismos que afetam a sobrevivência ou o crescimento de outros microorganismos, termo utilizado ainda hoje, mas os antibióticos atuais também incluem os semissintéticos e sintéticos (YAZDANKHAH et al., 2013).

O primeiro antibiótico foi identificado no ano de 1928, pelo cientista britânico Alexander Fleming durante seus experimentos, quando uma cultura de *Staphylococcus* foi contaminada por fungos do gênero *Penicillium*, que produziam uma substância denominada penicilina, que era capaz de inibir o crescimento bacteriano. No final de 1930, Howard Florey e colaboradores fizeram experimentos utilizando a penicilina em ratos infectados com *Streptococcus spp.* e obtiveram resultados significativos no tratamento da infecção. A penicilina passou a ser utilizada no tratamento em seres humanos apenas, a partir de 1941, na Inglaterra (YAZDANKHAH et al., 2013).

A penicilina é um antibiótico beta-lactâmico que apresenta em sua estrutura química um anel beta-lactâmico, formado por três átomos de carbono e um de nitrogênio (Figura 1), a cadeia lateral ligada a esse anel determina o espectro de ação do antibiótico e suas propriedades farmacológicas (AZEVEDO, 2014).

Figura 1 – Anel beta-lactâmico, característico do grupo



Fonte: Azevedo (2014).

Nos anos posteriores à aplicação da penicilina, a busca e o descobrimento de novos antibióticos cresceram amplamente. Inclusive novos antibióticos beta-lactâmicos foram produzidos para estenderem o efeito de ação das penicilinas originais, para agirem tanto contra bactérias gram-positivas como para gram-negativas. No início da década de 80, após o descobrimento das cefalosporinas C em 1953 por Guy Nexton e Edward Abraham, foram desenvolvidos beta-lactâmicos de amplo espectro, por exemplo, ceftazidima, cefotaxima e aztreonam, análogos as cefalosporinas C e a ampicilina (LACHMAYR et al., 2009; AZEVEDO, 2014).

Os antibióticos beta-lactâmicos são um dos mais prescritos para o tratamento de infecções bacterianas e representam cerca de 65% do uso mundial de antimicrobianos. Atuam impedindo a formação da parede celular bacteriana (BARLOW; HALL, 2002; LACHMAYR et al., 2009; LUPOLI et al., 2011; SALAHUDDIN; KHAN, 2014; BUTHANI et al., 2015; PALZKILL, 2018).

Outras classes de antibióticos beta-lactâmicos são: as cefalosporinas, os carbapenêmicos e os monobactâmicos. Os inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) também são considerados beta-lactâmicos por possuírem estrutura química básica comum, mas não possuem atividade antimicrobiana; podem ser aplicados em associação com esses antibióticos, pois se ligam de forma irreversível às beta-lactamases e previnem a hidrólise dos beta-lactâmicos (RUDGERS; PALZKILL, 1999; AZEVEDO, 2014).

Porém, a exposição frequente e intensiva das bactérias a esses e outros antimicrobianos promoveu pressão seletiva e fez com que essas desenvolvessem métodos cada vez mais eficientes para poderem inativá-los e sobreviverem.

2.1.1 Mecanismos de resistência bacteriana aos beta-lactâmicos

Os principais mecanismos bacterianos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos são: 1. inativação do antibiótico, por enzimas beta-lactamases; 2. alteração do sítio de ligação do antibiótico, quando ocorre a modificação das proteínas de ligação a penicilinas (PBP's); 3. impermeabilidade da membrana externa ao antibiótico, através da redução de porinas na membrana celular; e 4. superexpressão de bombas de efluxo na membrana, expulsando o antimicrobiano de dentro da célula. Dentre esses mecanismos de resistência o mais comum é a produção bacteriana de enzimas beta-lactamases. Essas enzimas têm atraído muita atenção devido à sua importância clínica e ao seu interesse ecológico e evolutivo. As beta-lactamases são produzidas por uma grande diversidade de bactérias e variam em suas propriedades enzimáticas e moleculares (FUCHS, 1994; AMBLER, 1980).

Acredita-se que as beta-lactamases possam ter evoluído a partir das PBP's (inclusive por semelhanças estruturais observadas entre elas) e que essas, existam antes da "era antibiótica", pois alguns microorganismos, como bactérias e fungos, produzem antibióticos naturalmente como mecanismos de defesa contra outros microorganismos, por exemplo, bactérias do gênero *Streptomyces* (MATAGNE; LAMOTTE-BRASSEUR; FRÈRE, 1998; AZEVEDO, 2014; BEKIESCH; BASITTA; APEL, 2016; HU; GAO; ZHU, 2017).

As enzimas beta-lactamases foram classificadas por Ambler (1980) em quatro classes moleculares (A, B, C e D) baseadas na homologia de suas sequências proteicas e em quatro grupos funcionais (I, II, III e IV) por Bush (1989). As classes A, C e D são as mais parecidas estruturalmente por serem serinas beta-lactamases e apresentarem uma serina em seus sítios ativos para hidrolisarem o anel beta-lactâmico. Por sua vez, a classe B composta por enzimas classificadas como metalo beta-lactamases utilizam íons de zinco para sua atividade catalítica (BUSH; JACOBY, 2010).

No grupo I estão incluídas as enzimas da classe C que hidrolisam cefalosporinas. No grupo II estão incluídas as enzimas da classe A e D, que podem hidrolisar penicilinas e cefalosporinas. O grupo II é subdividido em subgrupos de 2a à 2f, as enzimas da classe D estão presentes apenas no subgrupo 2d, as quais são capazes de hidrolisar penicilinas chamadas oxacilinas e cloxacilinas. As enzimas da

classe A foram as primeiras enzimas descobertas em bactérias resistentes à penicilina, sendo as mais comuns até o momento. No grupo III estão incluídas as enzimas da classe B que hidrolisam carbapenêmicos e no grupo IV enzimas que hidrolisam penicilinas que são resistentes ao ácido clavulânico, mas atualmente esse grupo está removido dessa classificação (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; HALL; BARLOW, 2004; KESHRI et al., 2018; SALAHUDDIN; KHAN, 2014).

2.1.2 Enzimas beta-lactamases do tipo TEM

Os genes *bla*TEM codificam as enzimas TEM beta-lactamases, que pertencem à classe A das beta-lactamases. A TEM-1, primeira enzima do tipo TEM, foi identificada no ano de 1963 a partir de um isolado de *Escherichia coli*, de um paciente chamado Temoniera (por este motivo a denominação do gene TEM). Inicialmente essas enzimas foram nomeadas como TEM beta-lactamase resistente ao inibidor (IRT), mas posteriormente foram renomeadas com designações numéricas de TEM. Esse gene é frequentemente encontrado em elementos genéticos móveis, sendo facilmente disseminado entre diversas espécies bacterianas pelo mecanismo de TGH. Na década de 1970 o gene já havia se espalhado entre as enterobactérias e outros patógenos gram-negativos. A TEM-1 é responsável por 90% da resistência a ampicilina em *E. coli*, e promove uma resistência crescente a ampicilina e penicilina nas espécies *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, onde TEM foi encontrado em transposons localizados em plasmídeos dessas espécies (PETROSINO; CANTU III; PALZKILL, 1998; BRADFORD, 2001; LACHMAYR et al, 2009).

As enzimas TEM são numeradas de TEM-1 a TEM-237 (<http://blddb.eu/BLDB.php?prot=A#TEM>) e possuem 286 resíduos de aminoácidos que formam a sua sequência proteica primária. A numeração TEM-2 a TEM-237 é o resultado de substituições de aminoácidos que ocorrem nesses resíduos em comparação com a enzima TEM-1. A substituição de aminoácido observada nos 286 resíduos de aminoácidos que formam essas enzimas determina qual é a variante de TEM-1. Apesar de existirem muitas variantes de TEM-1, essas enzimas apresentam resíduos e motivos estritamente conservados, característicos da classe A (serinas beta-lactamases), responsáveis por sua estrutura e função, dentre eles, os motivos: SDN (posição 130-132), KS/TG (posição 234-236), STFK (posição 70-73) e os resíduos DLV-YSPVTEK (posição 101-112, exceto 104). Destacam-se os principais resíduos do sítio ativo envolvidos na catálise do anel beta-lactâmico: Ser70, Lys73, Ser130, Glu166 e Lys234 (MATAGNE; LAMOTTE-BRASSEUR; FRÈRE, 1998; FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001; HALL; BARLOW, 2004; SALVERDA; DE VISSER; BARLOW, 2010; GUNTAS; KANWAR; OSTERMEIER, 2012; DHARA; TRIPATHI; PAL, 2013; GRIGORENKO et al., 2018).

As substituições de aminoácidos das TEM beta-lactamases podem ser classificadas em mutações primárias que são aquelas que ocorrem no seu sítio ativo, e em secundárias que estão localizadas em posições mais distantes do seu sítio ativo. Mutações nos resíduos próximos do sítio ativo da enzima podem resultar em alterações estruturais, afetando assim sua atividade catalítica, por isso, são resíduos bem conservados (BRADFORD, 2001; GRIGORENKO et al., 2018; SIDERAKI et al., 2001).

A maioria das TEM beta-lactamases são ESBLs, onde a TEM-3 foi a primeira ESBL reconhecida, capaz de degradar cefalosporinas de terceira geração, mas é

inibida pelo ácido clavulânico. Embora existam TEM beta-lactamases resistentes a inibidores de beta-lactamases, que não são ESBLs, algumas foram identificadas com essa capacidade, principalmente em relação aos inibidores ácido clavulânico e sulbactam. Normalmente a inibição com tazobactam em associação com piperacilina (penicilina de largo espectro) é mais efetiva, porém a resistência a essas drogas também já foi descrita. Um forte inibidor de beta-lactamases é a proteína inibidora de beta-lactamase (BLIP) produzida pela bactéria *Streptomyces clavuligerus*, o qual inibi muitas enzimas da classe A, inclusive TEM-1 (BRADFORD, 2001; LACHMAYR et al, 2009).

A presença dos genes *bla*_{TEM} em plasmídios e transposons, associada à alta pressão seletiva dos beta-lactâmicos, facilitou sua disseminação entre as mais diferentes espécies de bactérias. A variabilidade das beta-lactamase TEM mostra a importância de compreender as enzimas variantes e sua associação com a resistência (SALVERDA, DE VISSER; BARLOW, 2010). Nesse contexto, estudos moleculares e filogenéticos dessa enzima são importantes para o estudo da resistência e o desenvolvimento de novas drogas.

3 METODOLOGIA

3.1 Seleção das sequências de aminoácidos

As sequências de aminoácidos das TEM beta-lactamases foram coletadas do banco de dados *National Database of Antibiotic Resistant Organisms* (NDARO - [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/gene_family:\(blaTEM\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/gene_family:(blaTEM))) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) por ser um banco de dados curado unicamente para genes de resistência aos antibióticos. Todas as sequências TEM disponíveis no banco de dados foram arquivadas no formato FASTA no bloco de notas, no período do mês de março de 2019. Foram escolhidas as sequências de aminoácidos por serem mais adequadas na determinação das regiões da proteína que são mais críticas para sua função. Todas as referências das sequências TEM obtidas para a realização desse trabalho estão compiladas no Apêndice A.

3.2 Alinhamento múltiplo de sequências

O alinhamento das sequências de aminoácidos das enzimas beta-lactamases TEM foi realizado através do programa online *Multiple Alignment Program for Amino Acid or Nucleotide Sequences* (MAFFT), através do site de acesso livre *Tree and Reticulogram Reconstruction* (T-REX - <http://www.trex.uqam.ca/index.php?action=mafft&project=>) (BOC; DIALLO; MAKARENKOV, 2012; KATOH; STANDLEY, 2013). Os alinhamentos foram visualizados e analisados, com o auxílio do programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 7.0).

3.3 Construção e análise da tabela de mutação

Através da análise do alinhamento das sequências TEM gerado nesse trabalho, utilizando o programa MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), foi feita uma tabela de mutação, comparando cada variante TEM com a enzima TEM-1, em cada um dos 286 resíduos de aminoácidos que formam essas enzimas. Na

tabela foram descritas as principais substituições de aminoácidos observadas entre elas. Foi estabelecido como critério, selecionar as substituições de resíduos de aminoácidos que ocorressem em mais de 5 sequências. A tabela de mutação foi feita e salva como uma planilha no Excel.

3.4 Construção e análise de árvores filogenéticas

Duas árvores filogenéticas foram construídas nesse trabalho através do programa MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), utilizando como método de reconstrução de filogenia, o método *Neighbor-Joining* (agrupamento de vizinhos); o modelo de substituição *Jones–Taylor–Thornton* (JTT) que foi gerado pelo *software* ProtTest 3 (ABASCAL; ZARDOYA; POSADA, 2005; DARRIBA et al., 2011); e 100 réplicas de bootstrap, como método de suporte estatístico. A primeira árvore foi feita com uma parte das sequências TEM obtidas no banco de dados. E a outra árvore foi feita com todas as sequências TEM obtidas no banco de dados e outras duas sequências SHV-1 e OXA-1, a primeira pertence à classe A das beta-lactamases e a segunda à classe D e foi utilizada como grupo externo para enraizar a árvore.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Seleção das sequências de aminoácidos das beta-lactamases do tipo TEM

Foram obtidas a partir do banco de dados NDARO ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/gene_family:\(blaTEM\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/gene_family:(blaTEM))) 179 sequências de aminoácidos, que correspondem ao total de sequências proteicas de variantes TEM depositadas. Esse banco de dados é bem curado e exclusivo de genes de resistência a antimicrobianos. O banco fornece as melhores sequências representativas que são utilizadas como referência para as enzimas TEM. Essas sequências foram utilizadas para as análises das TEM variantes devidamente nomeadas por representarem uma coleção de sequências precisas e de anotação específica de genes de resistência TEM isolados de patógenos.

4.2 Alinhamento múltiplo e análise das posições conservadas dos resíduos

Com alinhamento de sequências das 179 variantes da enzima TEM, foi possível analisar as semelhanças e diferenças entre essas sequências de aminoácidos, como também observar a presença de resíduos e motivos conservados que são característicos da classe A das beta-lactamases.

Os resíduos Ser70, Ser130, Asn132, Glu166, Asn170, Lys234, Ser/Thr235, Gly236 e Ala/Ser/Thr237, encontram-se localizados no sítio ativo das serinas beta-lactamases, são bem conservados e são responsáveis por promover a ligação e catálise do substrato. As posições dos resíduos da enzima TEM foram numerados de acordo com o alinhamento de Ambler (1991) (HALL; BARLOW, 2004; BUSH, 2013; PALKILL, 2018).

Dentre os motivos conservados observados, o motivo STFK (Figura 2) apresentou-se totalmente conservado em todas as sequências analisadas. Segundo Matagne e Fréré (1995), a serina (Ser70) presente nesse motivo está fortemente relacionada com a função catalítica da enzima e a lisina (Lys73) está envolvida na rede de ligação de hidrogênio dentro do sítio ativo e tem papel importante na acilação, atuando como base para ativação da serina (Ser70).

Figura 2 – Motivo STFK totalmente conservado

	70	71	72	73								
1. 1.TEM-1	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
2. 131.TEM-171	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
3. 24.TEM-33	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
4. 51.TEM-81	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
5. 158.TEM-210	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
6. 25.TEM-34	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
7. 28.TEM-40	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
8. 165.TEM-217	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
9. 177.TEM-234	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
10. 119.TEM-156	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
11. 174.TEM-231	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
12. 113.TEM-150	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
13. 161.TEM-213	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L

Fonte: Elaborado pelo autor. Representação de parte do alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos de TEM-1 e suas variantes, mostrando o motivo STFK, delineado em preto, totalmente conservado. As letras representam os aminoácidos: S – serina; T – treonina; F – fenilalanina e K – lisina, nas posições 70, 71, 72, e 73, respectivamente.

Segundo Matagne e Freré (1995) o motivo SDN (Ser130, Asp131, Asn132) está envolvido na formação de uma ponte hidrofóbica responsável pela ação catalítica da enzima. Entre as seqüências analisadas o motivo SDN, apresentou os resíduos de aspartato (Asp131) e asparagina (Asn132) totalmente conservados em todas as seqüências analisadas. Já no sítio da serina (Ser130) foi observada a substituição desse resíduo de aminoácido pela glicina (Gly) na variante TEM-76; e pela treonina (Thr) nas variantes TEM-224 e TEM-211 (Figura 3).

Figura 3 – Motivo SDN com variação na Ser130

	130	131	132									
1. 1.TEM-1	S	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
* 2. 46.TEM-76	G	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
* 3. 159.TEM-211	T	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
* 4. 168.TEM-224	T	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
5. 131.TEM-171	S	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
6. 24.TEM-33	S	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
7. 51.TEM-81	S	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
8. 158.TEM-210	S	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
9. 25.TEM-34	S	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
10. 28.TEM-40	S	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
11. 165.TEM-217	S	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
12. 177.TEM-234	S	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T
13. 119.TEM-156	S	D	N	T	A	A	N	L	L	L	T	T

Fonte: Elaborado pelo autor. Representação de parte do alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos de TEM-1 e suas variantes, mostrando o motivo SDN, delineado em preto. As letras representam os aminoácidos: S – serina; D – aspartato; N – asparagina, nas posições 130, 131 e 132 respectivamente, na

enzima TEM-1. As posições 131 e 132 são conservadas em todas as variantes TEM, já a posição 130 (destacada em amarelo) apresenta substituição do resíduo serina para os aminoácidos representados pelas letras: T – treonina (na TEM-76) e G – glicina (na TEM-224 e TEM-211), destacados (*).

Em um estudo de mutagênese dirigida a substituição da serina para asparagina na posição 130 produziu uma enzima quase inativa, enquanto que para alanina e glicina a enzima manteve alguma atividade, porém com estabilidade menor em comparação com a enzima selvagem (JACOB et al., 1990).

Não é incomum que o resíduo aspartato (Asp131) tenha sido observado totalmente conservado, pois a literatura afirma que alterações nesse resíduo, por exemplo, para ácido glutâmico e glicina, afetam a estabilidade da enzima promovendo perturbações na sua estrutura. Já a asparagina (Asn132) apesar de estar envolvida na rede de ligações de hidrogênio no sítio ativo, parece ser, de menor importância estrutural que a serina (Ser130) e apresenta maior atividade enzimática contra cefalosporinas. O resíduo Asn132 foi conservado em todas as variantes; substituições nesse resíduo, por exemplo, para alanina, produzem uma enzima com atividade extremamente diminuída, principalmente contra cefalosporinas (JACOB et al., 1990; MATAGNE; FRERÉ, 1995; MATAGNE; LAMOTTE-BRASSEUR; FRÈRE, 1998).

Outro motivo altamente conservado nas serinas beta-lactamases é o KT/SG (Lys234, Thr/Ser235, Gly236 - Figura 4). Nas sequências analisadas os resíduos da lisina (Lys234) e da glicina (Gly236), se apresentaram totalmente conservados. Sabe-se que qualquer substituição na glicina (Gly236) produz uma enzima com atividade fortemente reduzida, afetando a enzima estruturalmente por fatores estéricos (MATAGNE; FRERÉ, 1995; MATAGNE; LAMOTTE-BRASSEUR; FRÈRE, 1998). Já na posição 235, geralmente pode ser encontrado treonina (Thr) ou serina (Ser), a substituição Ser235Thr foi observada apenas na variante TEM-230.

Figura 4 – Motivo KSG conservado

Posição:	234	235	236									
1. 1.TEM-1	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
* 2. 173.TEM-230	K	T	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
3. 46.TEM-76	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
4. 168.TEM-224	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
5. 131.TEM-171	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
6. 24.TEM-33	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
7. 51.TEM-81	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
8. 158.TEM-210	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
9. 25.TEM-34	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
10. 28.TEM-40	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
11. 165.TEM-217	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
12. 177.TEM-234	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I
13. 119.TEM-156	K	S	G	A	G	E	R	G	S	R	G	I

Fonte: Elaborado pelo autor. Representação de parte do alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de TEM-1 e suas variantes, mostrando o motivo KSG, delineado em preto. As letras representam os aminoácidos: K – lisina; S – serina e G – glicina, nas posições 234, 235 e 236 respectivamente, na enzima TEM-1. As posições 234 e 236 são

conservadas em todas as variantes TEM. Na posição 235 (destacado em amarelo), esse motivo pode apresentar tanto o resíduo de serina quanto o resíduo de treonina, nessa posição apenas a variante TEM-230 apresentou o resíduo treonina, representado pela letra T, em vez de serina, destacado (*).

Os resíduos da posição 101 a 112 são encontrados em uma região de volta-hélice das TEM beta-lactamases e delineiam um dos sítios ativos da enzima. Sendo importantes para manutenção da sua estrutura e função, principalmente os resíduos selvagens das posições 101, 102, 103, 106, 107, 109 e 112 (PETIT et al., 1995).

Essa região encontra-se altamente conservada, exceto o resíduo da posição 104. As posições dos resíduos que variaram nessa região (102, 104, 105 e 106) estão destacadas em amarelo na Figura 5. Nas beta-lactamases de amplo espectro do tipo TEM, o resíduo de glutamato na posição 104 é substituído por uma lisina, essa substituição pode ser observada em muitas variantes de TEM. A substituição E104K é conhecida por promover resistência a cefalosporinas de terceira geração, como a cefotaxima (PETIT et al., 1995; RUDGERS; PALZKILL, 1999).

Figura 5 – Região conservada 101-112 das beta-lactamases TEM

Posição:	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
1. 1.TEM-1	D	L	V	E	Y	S	P	V	T	E	K	H
* 2. 124.TEM-162	D	V	V	E	Y	S	P	V	T	E	K	H
* 3. 156.TEM-208	D	F	V	E	Y	S	P	V	T	E	K	H
* 4. 176.TEM-233	D	L	V	E	S	P	P	V	T	E	K	H
* 5. 161.TEM-213	D	L	V	E	F	S	P	V	T	E	K	H
* 6. 160.TEM-212	D	L	V	E	N	S	P	V	T	E	K	H
7. 168.TEM-224	D	L	V	K	Y	S	P	V	T	E	K	H
8. 159.TEM-211	D	L	V	K	Y	S	P	V	T	E	K	H
9. 103.TEM-139	D	L	V	K	Y	S	P	V	T	E	K	H
10. 11.TEM-15	D	L	V	K	Y	S	P	V	T	E	K	H
11. 150.TEM-197	D	L	V	K	Y	S	P	V	T	E	K	H
12. 170.TEM-226	D	L	V	K	Y	S	P	V	T	E	K	H

Fonte: Elaborado pelo autor. Representação de parte do alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de TEM-1 e suas variantes, mostrando a região conservada, delineada em preto. As letras representam os aminoácidos: D – aspartato; L – leucina; V – valina; E – glutamato; Y – tirosina; S – serina; P – prolina; T – treonina; K – lisina; e H – histidina, nas posições 101; 102; 103 e 108; 104 e 110; 105; 106; 107; 109; 111; 112 respectivamente, na enzima TEM-1. As posições que apresentam variação de aminoácido estão representadas em amarelo, que correspondem às posições 102; 104; 105 e 106, as demais posições possuem resíduos conservados em todas as variantes TEM. A posição 104 não é considerada conservada nessa região, pode apresentar resíduos de glutamato ou lisina. O resíduo leucina na posição 102 alterou nas variantes TEM-162 e TEM-208, para V – valina e F – fenilalanina, respectivamente; o resíduo tirosina na posição 105, alterou em três variantes TEM-233; TEM-213 e TEM-212, para S – serina, F – fenilalanina e N – asparagina, respectivamente; e o resíduo serina na posição 106 alterou apenas na variante TEM-233, para P – prolina, as variantes que apresentaram alteração estão destacadas (*).

Na posição 102 o resíduo leucina foi substituído por fenilalanina e valina nas variantes TEM-208 e TEM-162, respectivamente. Na posição 105 houve substituição da tirosina por fenilalanina, asparagina e serina nas variantes TEM-213, TEM-212 e TEM-233, respectivamente e na posição 106 a serina foi substituída por prolina apenas na variante TEM-233. Os demais resíduos nas posições 101; 103; 107; 108; 109; 110; 111 e 112 foram totalmente conservados.

Outros resíduos conservados na maioria das sequências das beta-lactamases da classe A são os resíduos glutamato (Glu166), asparagina (Asn170) e arginina (Arg220). Esses resíduos também foram observados nas sequências das beta-lactamases do tipo TEM.

No glutamato (Glu166) houve substituição apenas pela glicina (Gly) na sequência TEM-193. A asparagina (Asn170) apresentou apenas uma substituição para treonina (Thr) também na variante TEM-193. Estudos de estruturas cristalográficas e de modelagem molecular indicaram que o glutamato (Glu166) e a asparagina (Asn170) são ligados por ligações de hidrogênio e são encontrados em uma estrutura de alça ômega que forma a base do sítio ativo das beta-lactamases da classe A, onde, ambos estão envolvidos no mecanismo catalítico da enzima (MATAGNE; FRERÉ, 1995; MATAGNE; LAMOTTE-BRASSEUR; FRÈRE, 1998; PALZKILL, 2018).

A arginina (Arg220) se apresentou conservada em todas as sequências. Segundo Matagne e Frère (1995) ela pode estar envolvida no processo de ligação do substrato carboxilato ou participar do posicionamento adequado do antibiótico.

O alinhamento múltiplo mostrou que aproximadamente 64% dos resíduos de aminoácidos da sequência TEM-1 e suas variantes são totalmente conservados. Muitos desses resíduos formam motivos estruturais e funcionais das enzimas TEM e de outras beta-lactamases da classe A, por isso entender as mutações isoladas ou em conjunto dessa enzima é de grande interesse.

4.3 Análise de resíduos substituídos

Através da análise da tabela de mutação elaborada nesse trabalho (dados não mostrados), foram observadas 103 posições de resíduos de aminoácidos das variantes TEM com substituições de aminoácidos em comparação com TEM-1. Contudo, apenas 15 desses resíduos apresentaram substituições de aminoácidos em mais de cinco variantes. Enquanto que os demais resíduos não alteraram em um número maior que três variantes. Esses 15 resíduos estão nas posições 6, 21, 39, 69, 104, 164, 182, 184, 237, 238, 240, 244, 265, 275 e 276, Como nem todos os resíduos com substituições de aminoácidos estão associados diretamente a resistência aos antibióticos, acredita-se que os resíduos mais relevantes para a evolução da enzima sejam aqueles em que uma considerável quantidade de variantes apresente alteração nesse determinado resíduo (SALVERDA; VISSER; BARLOW, 2010; GUTHRIE et al., 2011). Dessa forma, os 15 sítios de substituição de resíduos foram selecionados como sendo sítios com provável importância para adaptação e/ou mudança no espectro de resistência da enzima.

Os 15 resíduos que substituem no maior número de variantes analisadas, foram compilados na Tabela 1, mostrando o número de variantes que alteram na respectiva posição, as substituições de aminoácidos observadas em comparação com a TEM-1 e as consequências para a enzima, que são conhecidas na literatura para essas alterações.

Tabela 1 – Posições dos resíduos de aminoácidos das variantes TEM que alteram em mais de cinco variantes

Posição do resíduo variável	Número de variantes que alteram no resíduo	Aminoácido substituído em comparação a TEM-1	Consequência enzimática
6	8	Q para K	Efluxo eficiente de proteínas pela membrana e pode promover resistência
21	19	L para F e I	Hidrólise de cefalosporinas de terceira geração
39	22	Q para K	Mobilidade conformacional
69	28	M para L, I e V	Resistência a inibidores de beta-lactamases
104	47	E para K	Aumento da hidrólise de cefalosporinas de terceira geração
164	50	R para S, H e C	Diminuição da hidrólise de penicilinas e aumento na hidrólise de cefalosporinas
182	31	M para T e I	Estabilidade estrutural
184	9	A para V	Desestabilidade proteica
237	9	A para T e G	Aumento da hidrólise de cefalosporinas C e diminuição na hidrólise de benzilpenicilina e ampicilina
238	38	G para S, R, N e D	Diminuição da hidrólise de penicilinas e aumento na hidrólise de cefalosporinas
240	28	E para K, R, V e G	Estabilidade estrutural
244	9	R para S, H, L, C e G	Resistência a inibidores de beta-lactamases
265	16	T para M	Estabilidade estrutural
275	11	R para Q, L e A	Estabilidade estrutural
276	11	N para D e S	Estabilidade estrutural

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos 15 resíduos, 5, possuem variantes que alteram apenas de um aminoácido para outro. Nas posições 6 e 39 as variantes alteram de Q para K, na posição 104 alteram de E para K, na 184 de A para V e na 265 de T para M. Os

outros dez sítios apresentam 2 à 5 aminoácidos diferentes para a mesma posição, mostrando-se mais variáveis.

A posição 6, se localiza na região do peptídeo sinal da enzima, observou-se oito variantes TEM substituindo o aminoácido glutamato selvagem pela lisina. A consequência da mutação Q6K ainda é incerta, acredita-se que possa estar relacionada com o efluxo mais eficiente de proteínas (SALVERDA; VISSER; BARLOW, 2010).

A posição 21 também faz parte do peptídeo sinal da enzima e dezenove variantes apresentaram alteração nesta posição. A alteração do aminoácido leucina para isoleucina foi identificado apenas na TEM-67 e para fenilalanina nas demais variantes, sendo esta a substituição mais comum para essa posição. A substituição L21F está presente na TEM-187 uma ESBL, além dessa mutação a TEM-187 possui outras três substituições de aminoácidos: R164H, A184V e T265M. Em um estudo feito sobre a atividade dessa variante, isolada da bactéria *Proteus mirabilis*, foi observado menor atividade contra penicilina que a TEM-1, porém, ainda que em baixo nível, apresentou atividade na hidrólise de cefalosporinas de terceira geração, sendo também susceptível a inibidores de beta-lactamases (CORVEC et al., 2013).

A posição 39, assim como na posição 6, também variou o resíduo glutamato para lisina, porém em vinte e duas variantes. Já se sabe que Q39K foi a primeira mutação naturalmente identificada nas beta-lactamases. Isoladamente, a substituição não altera o efeito catalítico da enzima, porém pode provocar desestabilidade térmica, principalmente se estiver associada às mutações E104K e M69V. Nenhuma das variantes analisadas apresentou combinação dessas três mutações. Quatorze variantes com a mutação Q39K possuíam também a substituição E104K (TEM-3; 8; 16; 21; 22; 24; 60; 113; 121; 130; 134; 139; 177 e 227), e apenas uma variante (TEM-160) continha Q39K e M69V, mas não as três mutações em uma única variante. A substituição Q39K também pode proporcionar uma maior mobilidade conformacional a enzima, por isso pode estar associada substituição M182T descrita como uma mutação estabilizante, esta combinação foi observada nas variantes TEM-72, 113 e 177. A eficiência catalítica da enzima diminui com a combinação Q39K com E104K, mas, não mais que a combinação Q39K com R164S encontrada nas variantes TEM-8; 24; 60; 114; 121; 130; 155 e 177. A substituição R164S também possui um efeito na estabilidade proteica tanto, combinada com Q39K, quanto associada às substituições Q39K e E104K (GRIGORENKO et al., 2018).

Assim como a substituição Q39K, a substituição do resíduo alanina por valina na posição 184 promove desestabilidade proteica, essa substituição foi observada em nove variantes: TEM-102; 116; 157; 162; 181; 187; 197; 205 e 229, a qual, foi primeiramente identificada na variante TEM-116 (CORVEC et al., 2013; DHARA; TRIPATHI; PAL, 2013; GRIGORENKO et al., 2018).

A substituição mais comum no resíduo arginina da posição 164 é pelo resíduo serina, essa substituição foi observada em 28 variantes, mas a arginina também foi alterada para histidina e cisteína em 15 e 7 variantes, respectivamente. Sendo assim o resíduo 164 variou em um maior número de sequências (50). Outro resíduo que, comumente, substitui para serina é o resíduo glicina da posição 238. Essa alteração foi observada em 35 variantes. Apenas três variantes substituíram a glicina para outros três aminoácidos, arginina, aspartato e asparagina, em TEM-178, 111 e 142, respectivamente. As substituições R164S e G238S são conhecidas por diminuir a hidrólise de penicilinas e aumentar significativamente a hidrólise de cefotaxima e ceftazidima em comparação a TEM-1. Por esse motivo essas substituições são

comumente identificadas em enzimas TEM ESBLs, e essas substituições podem também ser observadas em associação com as substituições E104K e E240K. As combinações R164S/E104K e R164S/E240K são encontradas nas variantes TEM-8; 9; 24; 26; 60; 63; 121; 130; 131; 133; 149; 177; 184; 205 e 224 e TEM-10; 24; 85; 86; 114; 121; 136; 155 e 177, respectivamente. As combinações G238S/E104K e G238S/E240K são encontradas nas variantes TEM-3; 4; 8; 15; 21; 22; 88; 92; 93; 94; 107; 113; 123; 134; 138; 139; 167; 197; 211; 225; 226 e 227 e TEM-47; 48; 49; 68; 71; 72; 93; 101 e 188, respectivamente. A redução na eficiência catalítica contra penicilinas por beta-lactamases com essas substituições aumentam a ligação da enzima com seus respectivos substratos (MATAGNE; LAMOTTE-BRASSEUR; FRÈRE, 1998; SIDERAKI et al., 2001; PALZKILL, 2018).

A substituição E240K foi observada em vinte e cinco variantes. Além da substituição do ácido glutâmico para lisina na posição 240, esse resíduo também pode ser substituído por arginina, valina e glicina em três variantes, TEM-137; 149 e 207, respectivamente. A substituição E240K favorece a estabilidade estrutural da enzima, assim como substituições nas posições 182 e 265.

O resíduo metionina da posição 182 altera em trinta variantes para treonina e em apenas uma variante (TEM-231) para isoleucina. A variante TEM-135 com a substituição M182T é considerada uma das variantes TEM mais estáveis. O resíduo treonina da posição 265 alterou apenas para metionina, e essa substituição T265M foi observada em 16 variantes (SIDERAKI et al., 2001; ABRIATA; SALVERDA; TOMATIS, 2012; GRIGORENKO et al., 2018; PALKILL, 2018).

Palzkill (2018) mostrou que as substituições R275Q, R275L e N276D também promovem o aumento da estabilidade enzimática, além disso, as substituições R275Q e N276D são observadas em variantes resistentes a inibidores de beta-lactamases. Na posição 275 a substituição de arginina por glutamina foi observada em cinco variantes, mas também foi substituída por leucina e por alanina nas variantes TEM-68; 182; 211 e TEM-123; 124; 233, respectivamente. Já o resíduo asparagina na posição 276 alterou em dez variantes para o aspartato e em apenas uma variante (TEM-108) para serina.

Substituições na posição 244 também promovem resistência a inibidores de beta-lactamases, o resíduo arginina selvagem dessa posição foi substituído por cinco aminoácidos diferentes: serina, histidina, leucina, cisteína e glicina no total de nove variantes. Porém, a principal posição responsável por resistência a inibidores é M69V/L, a posição do resíduo 69 apresentou alteração em vinte e oito variantes TEM, substituindo a metionina por leucina, isoleucina e valina, em 16, 4 e 8 variantes, respectivamente. Apesar desse resíduo, estar localizado anteriormente ao resíduo Ser70 do sítio ativo, foi relatado que a alteração M69L não afetou significativamente a estrutura da enzima, e indicou ser uma substituição estável (SIDERAKI et al., 2001; DHARA; TRIPATHI; PAL, 2013; GRIGORENKO et al., 2018).

Depois da posição 164 a mais variável é a 104, onde o resíduo glutamato é substituído por lisina em quarenta e sete variantes. Como já havia sido discutido anteriormente, o resíduo 104 é importante para a ligação de substrato das TEM beta-lactamases e está presente entre resíduos bem conservados (Figura 4), a substituição E104K é bem descrita na bibliografia e está relacionada com o aumento da hidrólise de cefotaxima e ceftazidima (cefalosporinas de terceira geração) (PALZKILL, 2018).

Substituições no resíduo alanina da posição 237 também são responsáveis por promover a hidrólise de cefalosporinas. Na enzima, o resíduo 237 está

localizado após o motivo conservado KT/SG, e está envolvido em uma rede de ligação de hidrogênio no sítio ativo que estabiliza a ligação ao substrato. Nesse resíduo nove variantes substituíram a alanina por treonina e glicina, em 8 e 1 variantes, respectivamente. A substituição A237T é mais frequentemente observada e pode causar aumento na hidrólise de cefalosporinas C e reduzir a hidrólise de benzilpenicilina e ampicilina; essa substituição foi observada em combinação com R164S em todas as 8 variantes com essa substituição, entre elas: TEM-24; 86; 114; 121; 130; 131; 136 e 177 (MATAGNE; LAMOTTE-BRASSEUR; FRÈRE, 1998; PALZKILL, 2018; GRIGORENKO et al., 2018).

Grigorenko et al., (2018) considerou que as mutações mais comuns nas enzimas TEM ocorrem em 11 dessas posições entre elas a posição 21, 39, 69, 104, 164, 182, 238, 240, 244, 265, e 275. Substituições de aminoácidos nessas posições, como já foi discutido anteriormente, são importantes para entender a funcionalidade da enzima, pois estão relacionados com diversos aspectos como o aumento na especificidade de substrato, resistência a inibidores de beta-lactamases, estabilidade da enzima, mobilidade conformacional e aumento na hidrólise de cefalosporinas de terceira geração.

As substituições de aminoácidos entre as diferentes posições, quando são combinadas em variantes, podem promover efeitos epistáticos; por exemplo, alterações de aminoácidos nos resíduos 104, 164, 238 e 237 são conhecidas por promover a hidrólise de cefalosporinas e os resíduos 69, 244, 275 e 276 conferir resistência á inibidores de beta-lactamases, porém quando combinadas com outras substituições podem apresentar novas propriedades catalíticas, estabilizadoras, desestabilizadoras, entre outras (MATAGNE; LAMOTTE-BRASSEUR; FRÈRE, 1998; GRIGORENKO et al., 2018). Por isso a análise desses resíduos quanto as substituições de aminoácidos que apresentam e suas combinações é um passo fundamental, para avançar nos estudos estruturais dessas enzimas.

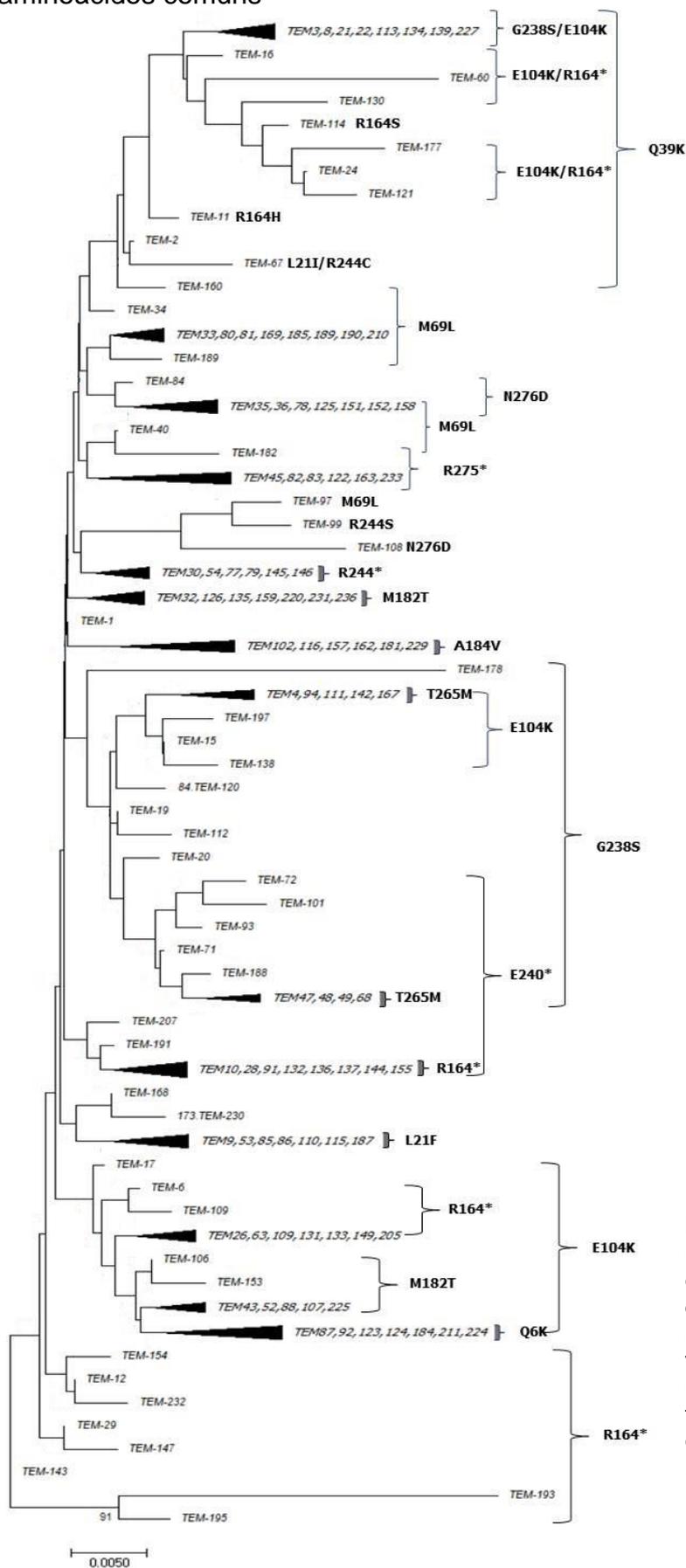
4.4 Análises filogenéticas das enzimas TEM beta-lactamases

Uma mesma variante pode apresentar substituições de aminoácidos em um ou mais de um desses 15 resíduos analisados (Tabela 1), por isso foi feito um alinhamento com as variantes TEM que alteram nesses 15 resíduos, totalizando 139 sequências e através desse alinhamento foi elaborada uma árvore filogenética.

A árvore filogenética (Figura 6) foi gerada pelo programa MEGA 7.0, utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*), o qual se baseia em uma matriz de distância, comparando os pares de sequências e agrupando as mais relacionadas. Esse método é interessante para sequências com baixa divergência entre elas, como as variantes TEM.

Foi possível observar grupos de variantes TEM na árvore que compartilham as mesmas substituições de aminoácidos para os mesmos resíduos. Muitas vezes essas variantes compartilham duas ou mais substituições. A maioria das variantes TEM compartilharam substituições duplas ou triplas nesses resíduos. As variantes TEM-3; 8; 21; 22; 113; 134; 139 e 227 compartilharam as substituições G238S, E104K e Q39K. A TEM-3 é uma beta-lactamase de espectro estendido e difere da TEM-139 por uma substituição a menos na posição 49, onde a TEM-139 altera a leucina por metionina nessa posição. Em um estudo anterior observou-se que essas variantes promoveram o mesmo fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos, sendo assim a substituição L49M apresentou um caráter conservador (SCHNEIDER et al., 2007).

Figura 6 – Árvore filogenética das variantes TEM que substituem resíduos de aminoácidos comuns



Fonte: Elaborado pelo autor.

Inferência filogenética baseada no método *Neighbor-joining*. O modelo evolutivo utilizado foi o JTT com distribuição gama e taxa de sítios invariáveis. Os ramos com as variantes TEM que apresentavam uma mesma substituição de resíduo foram condensados. As posições com (*) podem apresentar mais de um tipo de aminoácido e os números após o nome TEM representam as variantes.

A TEM-21 também é uma beta-lactamase de espectro estendido e difere de TEM-3 por uma substituição na posição 153, onde altera a histidina pela arginina nessa posição. Em outro estudo observou-se que essa variante promoveu taxas de hidrólise para cefotaxima e ceftriaxona (cefalosporinas de terceira geração) similares a de TEM-3. Já a TEM-22 difere de TEM-3 por uma substituição de alanina por glicina na posição 237, a qual promove um nível de resistência mais elevado ao aztreonam (monobactâmico) do que a ceftazidima e cefotaxima (cefalosporinas de terceira geração) (ARLET et al., 1999).

As variantes TEM-10; 28; 91; 132; 136; 137; 144 e 155 compartilham as substituições R164* e E240* (* mais de um tipo de aminoácido). TEM-28 é similar ao TEM-10 a única diferença entre essas sequências é que em TEM-10 substitui R164 por serina enquanto que TEM-28 substitui R164 por histidina. Em um estudo, TEM-28 e TEM-10 apresentaram afinidade similar a cefaloridina (cefalosporina de primeira geração), benzilpenicilina, ceftazidima, cefotaxima e aztreonam, mas o TEM-28 foi mais susceptível a inibição por sulbactam (inibidor de beta-lactamase) do que TEM-10 (BRADFORD et al., 1996).

As variantes TEM-6; 109; 26; 63; 131; 133; 149 e 205 compartilham as substituições R164* e E104K. A variante TEM-6 também substitui R164 por histidina e assim como a TEM-28 descrita anteriormente é mais susceptível que a TEM-10 a inibição por sulbactam (BRADFORD et al., 1996).

As variantes TEM-16; 60; 130; 177; 24 e 121 compartilham as substituições E104K, R164* e Q39K. A TEM-60 também substitui R164 por serina, essa variante apresenta alta atividade hidrolítica contra a ceftazidima, cefotaxima e aztreonam (FRANCESCHINI et al., 1998). A TEM-121 difere da TEM-24 apenas por uma substituição adicional (R244S), em um estudo observou-se que essas variantes apresentaram eficiências catalíticas similares à benzilpenicilina, ticarcilina (penicilinas), cefpiroma, cefepima, ceftazidima (cefalosporinas de quarta geração) e ceftazidima, enquanto que para outros antibióticos como amoxicilina, aztreonam, cefotaxima, entre outros foram hidrolisados em níveis mais baixos com TEM-121 do que com TEM-24 (POIREL; MAMMERI; NORDMANN, 2004).

As variantes TEM-106; 153; 43; 52; 88; 107 e 225 compartilham as substituições M182T e E104K. Acredita-se que a substituição M182T sozinha não estende o perfil de substrato, entretanto em combinação com E104K pode conferir resistência ao moxalactam (cefalosporina de terceira geração) como é observado na TEM-52 (ARLET et al., 1999).

As variantes TEM-35; 36; 78; 125; 151; 152 e 158 compartilham as substituições N276D e M69L. A TEM-125 é uma ESBL resistente a inibidores de beta-lactamases, em um estudo esta foi identificada em uma cepa de *Escherichia coli* com altos níveis de resistência a combinação de ceftazidima e penicilina com o ácido clavulânico. Já se foi analisado bioquimicamente que as variantes TEM-151 e TEM-152 hidrolisam penicilinas em níveis mais baixos que a TEM-1, mas hidrolisam em níveis maiores oximino-beta-lactâmicos (cefalosporinas de terceira e quarta geração e o aztreonam), sendo que a eficiência catalítica a esses antibióticos foi maior em TEM-152 do que em TEM-151 (ROBIN et al., 2006b, 2007a).

As variantes TEM-4; 94; 111; 142 e 167 compartilham as substituições T265M, E104K e G238S. Acredita-se que o TEM-94 evoluiu a partir do TEM-4, pois a única diferença entre essas sequências é uma substituição adicional (M182T) no TEM-94. Assim como que o TEM-4 difere do TEM-25 apenas pela substituição no E104K, por isso o TEM-25 pode ter sido o precursor do TEM-4, como também das

variantes TEM-47; 48; 49 e 68 que compartilham as substituições T265M, E240K e G238S em comum (BARANIAK et al., 2005).

As variantes TEM-87; 92; 123; 124; 184; 211 e 224 compartilham as substituições Q6K e E104K. Em um estudo TEM-87 foi isolado da espécie bacteriana *Proteus mirabilis* e a análise cinética dessa enzima mostrou atividade de espectro estendido principalmente para ceftazidima e para aztreonam (PERILLI et al., 2002a). Outro estudo mostrou que TEM-92 foi capaz de hidrolisar com eficiência diferentes beta-lactâmicos, por exemplo, penicilina G, cefotaxima, cefepima entre outros, enquanto que a ceftazidima foi hidrolisada em taxas mais baixas e nenhuma hidrólise foi detectada para moxalactam, cefoxitina e aztreonam (PERILLI et al., 2002b).

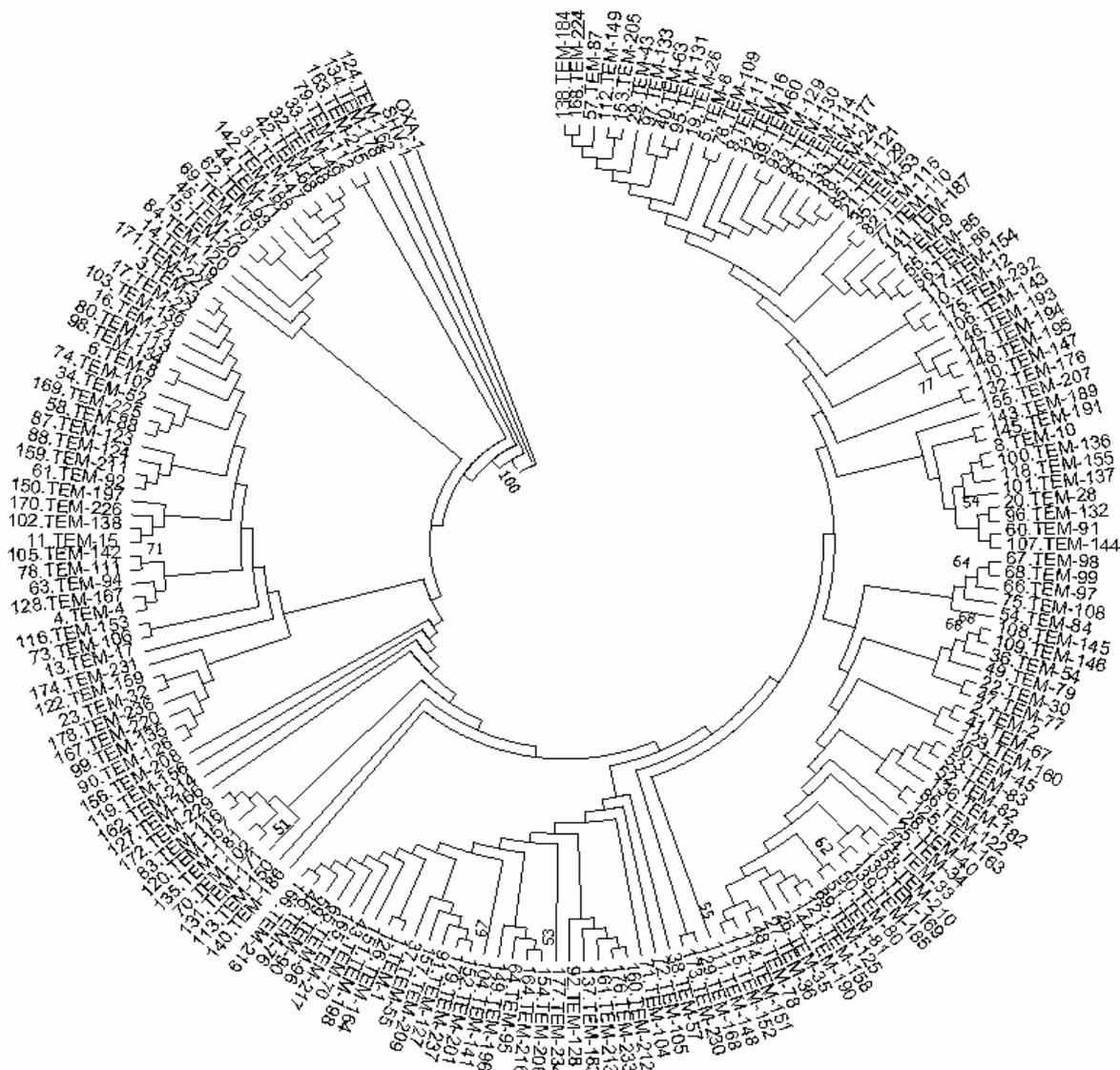
As variantes TEM podem se apresentar mais próximas umas das outras na árvore filogenética por possuírem substituições de aminoácidos comuns.

Outra árvore filogenética foi gerada a partir do alinhamento das 179 sequências de aminoácidos das TEM beta-lactamases e duas sequências de outros dois genes, uma sequência da enzima OXA-1 pertencente à classe D das beta-lactamases e uma sequência de SHV-1 da classe A das beta-lactamases, sendo o grupo mais próximo de TEM. A OXA-1 foi utilizada como *outgroup* para enraizar a árvore (Figura 7). Essas sequências foram escolhidas uma vez que estudos filogenéticos anteriores indicaram que a classe C se divergiu antes das classes A e D, e essas duas classes formam táxons irmãos (HALL; BARLOW, 2003, 2004).

A maioria dos nós observados na árvore filogenética apresentaram baixos valores de bootstrap e muitos apresentaram valor igual a zero, isso reflete a alta similaridade entre as sequências das TEM beta-lactamases e esses baixos valores de bootstrap evidenciam a falta de robustez dos ramos formados na árvore gerada. A árvore possui um único ramo de bootstrap 100, que agrupa todas as sequências analisadas. A árvore filogenética gerada neste estudo não permitiu a separação das variantes TEM em subgrupos, praticamente todos os ramos formados convergiram para um único nó com bootstrap com valor relevante de 100. Como esperado a sequência SHV-1 se apresentou mais próxima as enzimas TEM por serem da mesma classe e a sequência OXA-1 agrupou todas as variantes TEM em um ramo com bootstrap 100.

Os resultados reafirmam a alta similaridade entre as variantes do tipo TEM, que foram observadas pelas análises do alinhamento de resíduos, mostrando que TEM-1 e suas variantes apresentam muito poucas diferenças entre si. Consequentemente, as variantes do tipo TEM podem apresentar múltiplos caminhos evolutivos, igualmente prováveis, que dificultam a construção da filogenia e a obtenção de informações mais precisas da história evolutiva dessa família de enzimas (ZEIL et al., 2016).

Figura 7 – Árvore filogenética das beta-lactamases do tipo TEM



Fonte: Elaborado pelo autor. Inferência filogenética baseada no método *Neighbor-joining*. O modelo evolutivo utilizado foi o JTT com distribuição gama e taxa de sítios invariáveis. Foi utilizada a sequência da enzima OXA-1 como outgroup para enraizar a árvore. As enzimas TEM foram agrupadas em um único bootstrap de 100.

Bradford (2001) fez uma filogenia das beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) utilizando o método *Neighbor-Joining* e observou que as enzimas da classe A são mais intimamente relacionadas entre si, do que com qualquer enzima da classe D, e que as enzimas TEM e SHV se agrupam fortemente e estão mais próximas, uma da outra, do que com as demais ESBLs.

As enzimas TEM e SHV são as enzimas mais comuns da classe A das beta-lactamases, Hall and Barlow (2002) remontaram uma árvore filogenética pelo método bayesiano dessas duas enzimas, porém os ramos internos da árvore para a enzima TEM, também não apresentaram valores maiores que 75% de bootstrap.

Segundo Zeil et al. (2016) a representação por árvore filogenética é falha quando todos os membros possuem distâncias semelhantes entre si, como acontece com as enzimas TEM, e propõem que o método mais adequado para interpretar as

relações entre essas enzimas seja por meio de análise de rede proteica. Eles observaram por meio da análise de redes que as enzimas TEM formaram *sub-clusters* principalmente com variantes do mesmo fenótipo; e podem formar múltiplos quartetos conectados, onde esses grupos de sequências interligadas podem tolerar mutações duplas em uma única variante. A previsão desses quartetos é importante para prever variantes que podem apresentar combinações de mutações viáveis que ainda não foram descobertas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As enzimas TEM beta-lactamases apresentam resíduos e motivos estritamente conservados dentro dessa classe de enzimas, sendo importantes para a sua atividade catalítica, bem como para a sua estabilidade estrutural. Muitos desses resíduos estão localizados em pontos cruciais do sítio ativo e as substituições nessas posições, podem ocasionar desestabilidade proteica. Por isso, geralmente estão relacionados com substituições em outros resíduos que favoreçam a sua estabilidade, o que torna essas enzimas funcionalmente ativas e podem permitir aquisição de um novo espectro de ação. A análise desses resíduos conservados e não conservados das enzimas TEM é importante para compreender o surgimento de novas variantes e para buscar novos mecanismos de inibição dessas enzimas por novos fármacos.

As enzimas TEM apresentam um alto grau de similaridade e o estudo através de árvores filogenéticas torna-se inapropriado para estudos evolutivos. Por isso novos métodos precisam ser melhorados e desenvolvidos para a inferência mais precisa da evolução de enzimas semelhantes. As relações entre essas enzimas podem ser avaliadas pelos métodos de redes proteicas, que são importantes para entender como as substituições de aminoácidos, em resíduos cruciais para a função da enzima, são compartilhados entre as variantes, e assim, também inferir novas variantes com combinações de aminoácidos diferenciadas, que possam surgir e promover uma maior resistência as espécies bacterianas.

REFERÊNCIAS

- ABASCAL, Federico; ZARDOYA, Rafael; POSADA, David. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 2104-2105, 2005.
- ABRIATA, Luciano A.; PALZKILL, Timothy; DAL PERARO, Matteo. How structural and physicochemical determinants shape sequence constraints in a functional enzyme. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0118684, 2015.
- ABRIATA, Luciano A.; SALVERDA, Merijn LM; TOMATIS, Pablo E. Sequence–function–stability relationships in proteins from datasets of functionally annotated variants: The case of TEM β -lactamases. **FEBS letters**, v. 586, n. 19, p. 3330-3335, 2012.
- AMBLER, R. P. et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, v. 276, n. Pt 1, p. 269, 1991.
- AMBLER, Richard P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- AMINOV, Rustam I.; MACKIE, Roderick I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. **FEMS microbiology letters**, v. 271, n. 2, p. 147-161, 2007.
- ARLET, Guillaume et al. Sequences of the genes for the TEM-20, TEM-21, TEM-22, and TEM-29 extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 969-971, 1999.
- AZEVEDO, Sílvia Marisa Moreira. **Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- BAJPAI, Trupti et al. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. **Avicenna journal of medicine**, v. 7, n. 1, p. 12, 2017.
- BARANIAK, Anna et al. Evolution of TEM-type extended-spectrum β -lactamases in clinical *Enterobacteriaceae* strains in Poland. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1872-1880, 2005.
- BARLOW, Miriam; HALL, Barry G. Predicting evolutionary potential: in vitro evolution accurately reproduces natural evolution of the TEM β -lactamase. **Genetics**, v. 160, n. 3, p. 823-832, 2002.
- BAYM, Michael; STONE, Laura K.; KISHONY, Roy. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, n. 6268, p. aad3292, 2016.
- BEKIESCH, Paulina; BASITTA, Patrick; APEL, Alexander K. Challenges in the heterologous production of antibiotics in *Streptomyces*. **Archiv der Pharmazie**, v. 349, n. 8, p. 594-601, 2016.

- BHUTANI, Natasha et al. Occurrence of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase-producing bacteria on iceberg lettuce retailed for human consumption. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.
- BOC, Alix; DIALLO, Alpha Boubacar; MAKARENKOV, Vladimir. T-REX: a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks. **Nucleic acids research**, v. 40, n. W1, p. W573-W579, 2012.
- BRADFORD, Patricia A. et al. TEM-28 from an Escherichia coli clinical isolate is a member of the His-164 family of TEM-1 extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 260-262, 1996.
- BRANDT, Christian et al. In silico serine β -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species. **Scientific reports**, v. 7, p. 43232, 2017.
- BUSH, Karen. Characterization of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 33, n. 3, p. 259, 1989.
- BUSH, Karen; JACOBY, George A.; MEDEIROS, Antone A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.
- BUSH, Karen; JACOBY, George A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.
- BUSH, Karen. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 549-559, 2013.
- COLAVECCHIO, Anna et al. Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the Enterobacteriaceae family—a review. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1108, 2017.
- CORVEC, Stéphane et al. TEM-187, a new extended-spectrum β -lactamase with weak activity in a Proteus mirabilis clinical strain. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2410-2412, 2013.
- DARRIBA, Diego et al. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, v. 27, n. 8, p. 1164-1165, 2011.
- DAVIES, Julian; DAVIES, Dorothy. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.
- DHARA, Lena; TRIPATHI, Anusri; PAL, Arijit. Molecular characterization and in silico analysis of naturally occurring TEM beta-lactamase variants among pathogenic Enterobacteriaceae infecting Indian patients. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

FLUIT, Ad C.; VISSER, Maarten R.; SCHMITZ, Franz-Josef. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FRANCESCHINI, Nicola et al. Ceftazidime and Aztreonam Resistance in *Providencia stuartii*: Characterization of a Natural TEM-Derived Extended Spectrum β -Lactamase, TEM-60. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1459-1462, 1998.

FUCHS, Lidia Yolanda et al. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. **Salud Pública de México**, v. 36, n. 4, p. 428-438, 1994.

GAZE, William H. et al. Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 7, 2013.

GILLINGS, Michael R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 4, 2013.

GRIGORENKO, V. G. et al. Bacterial TEM-Type Serine Beta-Lactamases: Structure and Analysis of Mutations. **Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 87-95, 2018.

GRIGORENKO, Vitaly et al. Mutual influence of secondary and key drug-resistance mutations on catalytic properties and thermal stability of TEM-type β -lactamases. **FEBS open bio**, v. 8, n. 1, p. 117-129, 2018.

GUNTAS, Gurkan; KANWAR, Manu; OSTERMEIER, Marc. Circular permutation in the Ω -loop of TEM-1 β -lactamase results in improved activity and altered substrate specificity. **Plos one**, v. 7, n. 4, p. e35998, 2012.

GUTHRIE, Violeta Beleva et al. Network models of TEM β -lactamase mutations coevolving under antibiotic selection show modular structure and anticipate evolutionary trajectories. **PLoS computational biology**, v. 7, n. 9, p. e1002184, 2011.

HALL, Barry G.; BARLOW, Miriam. Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 2, p. 111-123, 2004.

HALL, Barry G.; BARLOW, Miriam. Structure-based phylogenies of the serine β -lactamases. **Journal of molecular evolution**, v. 57, n. 3, p. 255-260, 2003.

HOLDER, Mark; LEWIS, Paul O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. **Nature reviews genetics**, v. 4, n. 4, p. 275, 2003.

HU, Yongfei; GAO, George F.; ZHU, Baoli. The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. **Frontiers of medicine**, v. 11, n. 2, p. 161-168, 2017.

JACOB, Françoise et al. Role of the conserved amino acids of the 'SDN' loop (Ser130, Asp131 and Asn132) in a class A β -lactamase studied by site-directed mutagenesis. **Biochemical Journal**, v. 271, n. 2, p. 399-406, 1990.

JOHNSON, Mark et al. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_2, p. W5-W9, 2008.

KATOH, Kazutaka; STANDLEY, Daron M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KESHRI, Vivek et al. Phylogenomic analysis of β -lactamase in archaea and bacteria enables the identification of putative new members. **Genome biology and evolution**, v. 10, n. 4, p. 1106-1114, 2018.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LACHMAYR, Karen L. et al. Quantifying nonspecific TEM β -lactamase (blaTEM) genes in a wastewater stream. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 1, p. 203-211, 2009.

LUPOLI, Tania J. et al. Transpeptidase-mediated incorporation of D-amino acids into bacterial peptidoglycan. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 28, p. 10748-10751, 2011.

MAJIDUDDIN, Fahd K.; PALZKILL, Timothy. An analysis of why highly similar enzymes evolve differently. **Genetics**, v. 163, n. 2, p. 457-466, 2003.

MOOSAVIAN, Mojtaba; DEIHAM, Behnaz. Distribution of TEM, SHV and CTX-M Genes among ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates in Iran. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 26, p. 5433-5439, 2012.

MARCHLER-BAUER, Aron et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic acids research**, v. 43, n. D1, p. D222-D226, 2014.

MATAGNE, André; FRÈRE, Jean-Marie. Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: the case of class A β -lactamases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1246, n. 2, p. 109-127, 1995.

MATAGNE, André; LAMOTTE-BRASSEUR, Josette; FRÈRE, Jean-Marie. Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. **Biochemical Journal**, v. 330, n. 2, p. 581-598, 1998.

PALZKILL, Timothy. Structural and mechanistic basis for extended-spectrum drug-resistance mutations in altering the specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 5, p. 16, 2018.

PERILLI, Mariagrazia et al. Biochemical characterization of TEM-92 extended-spectrum β -lactamase, a protein differing from TEM-52 in the signal

peptide. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3981-3983, 2002b.

PERILLI, Mariagrazia et al. Characterization of a new extended-spectrum β -lactamase (TEM-87) isolated in *Proteus mirabilis* during an Italian survey. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 925-928, 2002a.

PERILLI, Mariagrazia et al. Kinetic Study of the Effect of Histidines 240 and 164 on TEM-149 Enzyme Probed by β -Lactam Inhibitors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6294-6296, 2014.

PERRY, Julie Ann; WESTMAN, Erin Louise; WRIGHT, Gerard D. The antibiotic resistome: what's new?. **Current opinion in microbiology**, v. 21, p. 45-50, 2014.

PETIT, A. et al. Multiple substitutions at position 104 of β -lactamase TEM-1: assessing the role of this residue in substrate specificity. **Biochemical Journal**, v. 305, n. 1, p. 33-40, 1995.

PETROSINO, Joseph; CANTU III, Carlos; PALZKILL, Timothy. β -Lactamases: protein evolution in real time. **Trends in microbiology**, v. 6, n. 8, p. 323-327, 1998.

POIREL, Laurent; MAMMERI, Hedi; NORDMANN, Patrice. TEM-121, a novel complex mutant of TEM-type β -lactamase from *Enterobacter aerogenes*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4528-4531, 2004.

ROBIN, Frédéric et al. CMT-type β -lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum β -lactamase detection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2403-2408, 2006.

ROBIN, Frédéric et al. Evolution of TEM-type enzymes: biochemical and genetic characterization of two new complex mutant TEM enzymes, TEM-151 and TEM-152, from a single patient. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1304-1309, 2007a.

ROBIN, Frédéric et al. TEM-158 (CMT-9), a new member of the CMT-type extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 4181-4183, 2007b.

SALAHUDDIN, Parveen; KHAN, Asad U. Studies on structure-based sequence alignment and phylogenies of beta-lactamases. **Bioinformatics**, v. 10, n. 5, p. 308, 2014.

SALVERDA, Merijn LM; DE VISSER, J. Arjan GM; BARLOW, Miriam. Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 6, p. 1015-1036, 2010.

SCHNEIDER, Ines et al. Dissemination and persistence of a plasmid-mediated TEM-3-like β -lactamase, TEM-139, among Enterobacteriaceae in Bulgaria. **International journal of antimicrobial agents**, v. 29, n. 6, p. 710-714, 2007.

SIDERAKI, Vera et al. A secondary drug resistance mutation of TEM-1 β -lactamase that suppresses misfolding and aggregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 1, p. 283-288, 2001.

YAZDANKHAH, Siamak; LASSEN, Jørgen; MIDTVEDT, Tore. **Historien om antibiotika**, 2502–7, 2013.

ZEIL, Catharina et al. Network analysis of sequence-function relationships and exploration of sequence space of TEM β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2709-2717, 2016.

ZHANG, Yang; SKOLNICK, Jeffrey. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 7, p. 2302-2309, 2005.

APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DAS SEQUÊNCIAS UTILIZADAS NO TRABALHO

Referências das variantes TEM obtidas no NCBI				
>AAR25033.1	>AAM28884.1	>CBX53726.1	>AAW47922.1	>CAA65888.1
>CAA45828.1	>AAL68923.1	>CAA64682.1	>AAX56615.1	>ADP20705.1
>CAA41038.1	>AAS89982.1	>CAA71323.1	>AAY85632.1	>CCA61905.1
>APG33178.1	>AAS89984.1	>CAA73933.1	>AAZ14083.2	>AET99222.1
>AAW66604.1	>AAB39956.1	>AAD22539.1	>ABB84515.1	>AEL17198.1
>CAO98721.1	>AAQ01671.1	>ACJ43254.1	>ABC96711.1	>AEL88240.1
>CAA74912.2	>AAQ93490.1	>AAK17194.1	>ABI74448.1	>AFC75523.1
>ACB22021.1	>AAT46414.1	>CAB92324.1	>AGA83484.1	>AFC75525.1
>CAA76795.1	>AAR89358.1	>AAL03985.1	>ABG77582.1	>AEK48085.1
>KLG19745.1	>CAG34105.1	>AAF05613.1	>ABI81768.1	>AFS44742.1
>ABB76656.1	>AAR10958.1	>AAF05612.1	>ABM54869.1	>AGK82336.1
>CTD69961.1	>AAS19171.1	>AAM15527.1	>CDN33426.1	>AGL39384.1
>AGE11905.1	>CAG25427.1	>AAL29434.1	>AIW68620.1	>AJO16045.1
>APT65830.1	>CAL08007.1	>AAL29436.1	>APT67991.1	>ABM54870.1
>AAC32889.2	>AAZ23494.1	>CAC43230.1	>AQX83499.1	>ACF32746.1
>CAA71322.1	>ABD60314.1	>AAK14792.1	>AUT06962.1	>ACI25375.1
>CAA71324.1	>CAJ17558.1	>BAB16308.1	>AVP73880.1	>ACR22829.1
>AAD22538.1	>AAZ14084.2	>CAC85660.1	>AWI33307.1	>ADA79630.1
>ABB97007.1	>CAJ32372.1	>CAC67290.1	>AVX49110.1	>CBJ06718.1
>AAC05975.1	>CAJ66089.1	>AAK85244.1	>AIS39742.1	>CAN86931.1
>AAD33116.2	>ABI74447.1	>AAK85243.1	>AMD11804.1	>ADR71220.1
>AAF01046.1	>ACO07310.1	>AAK82652.1	>AQT03459.1	>AEG64812.1
>AAF19151.1	>CAQ00120.1	>AAM61953.1	>AUS83547.1	>ADM61585.1
>AAF05614.1	>ABQ00181.1	>AAM52215.1	>AUT06963.1	>AEL79515.1
>AAF05611.1	>CAA38429.1	>AAT46413.1	>AWH90786.1	>APY23677.1
>AAL29433.1	>CDR98216.1	>AAL77062.1	>AXL10707.1	>AFC75524.1
>AAL29435.1	>CAA46344.1	>AAS89983.1	>AIF78090.1	>AFE48832.1
>CAC43229.1	>AAC72362.1	>AAN04881.1	>AHA49909.1	>BAL68178.1
>AAG44570.1	>AAA25053.1	>AAO85882.1	>AJO16044.1	>AGZ20205.1
>AAK30619.1	>CAA46346.1	>AAQ98890.1	>AHJ78622.1	>AGK40892.1
>AAF66653.1	>AFN21551.1	>AAQ93491.1	>AHA80960.1	>AGW25367.1
>CAC85661.1	>AAN61404.1	>AAT45742.1	>OCN67279.1	-
>AAM22276.1	>CAA46345.1	>AAR89359.1	>ABO64442.1	-
>AAK85245.1	>AAC32891.1	>CAI29263.1	>ABX71157.1	-
>AAM18924.1	>CAD24670.1	>AAR84298.1	>ACJ04051.1	-
>AAM61952.1	>ADL13944.1	>AAS79107.1	>AJC64564.1	-
>AAM52207.1	>AKA60778.1	>AAV83795.1	>ADB90239.1	-

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me ajudado a passar pelos momentos mais difíceis e por ter me dado força e coragem para que eu conseguisse chegar até o fim do curso.

Aos meus pais, Josete e Wilson, por todo cuidado, amor e incentivo para que eu alcançasse os meus objetivos.

Ao meu amado esposo, Willian Romário, por todo amor, todo apoio, paciência e compreensão nos momentos em que não pude lhe dar atenção.

As minhas irmãs, Deyse e Daniele, por todo carinho, incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial.

A minha sogra, Valdiléia, por seu cuidado e carinho e por sempre estar torcendo pelas minhas conquistas.

A minha orientadora Prof^a Dr^a. Daniela Santos Pontes, por ser além de uma orientadora, uma amiga, por toda atenção e paciência, para ensinar e tirar dúvidas quando necessário, por sua ajuda e dedicação na construção desse trabalho.

Aos meus amigos de curso e de laboratório, em especial, Valeska, Dauline, Jesarela, Juliana, Rogério, Amanda, Kamila, Mikaelle, Hianka e Misael. Pelos momentos de descontração e pelas risadas que tornaram os dias de graduação suportáveis, por me incentivarem a não desistir e por me intitularem a dedicada da turma.

A Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) pela oportunidade de realizar o curso, e de ser bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC), do qual esse trabalho é fruto. Aos professores, por contribuírem para minha formação profissional.