



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V – MINISTRO ALCIDES CARNEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELIZABETH DA ROCHA VIEIRA

ESTUDOS EVOLUTIVOS DE GENES DE RESISTÊNCIA CODIFICADORES DE β -
LACTAMASES DO GRUPO DAS OXACILINASES

JOÃO PESSOA - PB

2017

ELIZABETH DA ROCHA VIEIRA

ESTUDOS EVOLUTIVOS DE GENES DE RESISTÊNCIA CODIFICADORES DE β -
LACTAMASES DO GRUPO DAS OXACILINASES

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba – UEPB, como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Área de concentração: Biologia molecular

Orientador (a): Professora Dr. Daniela Santos Pontes

Co-Orientador: Professor Dr. Sávio Torre de Farias

JOÃO PESSOA - PB

2017

É expressamente proibida 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 da dissertação.

V657e Vieira, Elizabeth da Rocha
Estudos evolutivos de genes de resistência codificadores de β -lactamases do grupo das Oxacilinases [manuscrito] / Elizabeth da Rocha Vieira. - 2017.
61 p. : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2017.
"Orientação: Profa. Dra. Daniela Santos Pontes, Departamento de Ciências Biológicas".
"Co-Orientação: Prof. Dr. Sávio Torre de Farias, Departamento de".
1. Evolução. 2. Genes de resistência a antibióticos.
3. β -lactamases I. Título.

21. ed. CDD 576.8

ELIZABETH DA ROCHA VIEIRA

ESTUDOS EVOLUTIVOS DE GENES DE RESISTÊNCIA CODIFICADORES DE β -
LACTAMASES DO GRUPO DAS OXACILINASES

Aprovada em: 10/03/2017

BANCA EXAMINADORA

Daniela Santos Pontes

Professora Doutora Daniela Santos Pontes (Orientador(a))

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Brigida Thais Luckwu Lucena

Professora Doutora Brigida Thais Luckwu Lucena

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Simone Silva dos Santos Lopes

Professora Doutora Simone Silva dos Santos Lopes

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Kátia e ao meu pai Lauro, por todo o amor, cuidado e dedicação, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, por acreditarem em mim, vocês não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos meus irmãos, Heloísa, Samuel e Lauro Filho, pela compreensão durante os anos de graduação em que não pude dar muita atenção, mas que espero ter compensado pelas brincadeiras nos momentos de diversão.

A Universidade Estadual da Paraíba, pela oportunidade de fazer o curso. A todos os professores do curso de Ciências Biológicas, que me acompanharam durante a graduação, vocês me ensinaram a questionar e a duvidar.

A minha orientadora Prof^{ta} Dr^a Daniela Pontes, por ter me aceitado como aluna, pela paciência, seu incentivo e confiança tornaram possível a conclusão desta monografia. Ao meu coorientador Prof. Dr. Sávio Farias, pelo conhecimento e auxílio no esclarecimento de dúvidas.

Aos meus amigos de sala, principalmente, Ana, Bruna, Edlla, Gaby, Jan, João, e Saara pelas alegrias e tristezas, pelas conversas e pelas brigas, aos que me ajudaram a estudar e aos que sempre me atrapalharam com suas conversas e piadas. Sem eles, os anos de Universidade não fariam sentido.

“Conhece teu inimigo e conhece-te a ti mesmo; se tiveres cem combates a travar, cem vezes serás vitorioso.

Se ignoras teu inimigo e conheces a ti mesmo, tuas chances de perder e ganhar serão idênticas.

Se ignoras ao mesmo tempo teu inimigo e a ti mesmo, só contarás teus combates por tuas derrotas.”

Sun Tzu

RESUMO

As β -lactamases são enzimas que degradam β -lactâmicos catalisando a quebra do anel β -lactâmico. Uma das primeiras enzimas identificadas conferia resistência à oxacilina, sendo classificada como oxacilinase (OXA). A resistência antimicrobiana causada pela ação das OXA β -lactamases é um problema para saúde humana e animal, e ao ambiente, sendo assim, este estudo buscou analisar a história evolutiva das OXAs e a influência dos eventos de transferência gênica horizontal (TGH) na disseminação da resistência decorrente da ação destas enzimas. Para as análises moleculares e evolutivas, foram selecionadas sequências de aminoácidos de β -lactamases dos tipos TEM, VIM, AmpC e OXA do banco de dados *GenBank*. Foi construído um banco de sequências dos genes 16S ribossomais (16S rDNA) referentes às espécies bacterianas nas quais o gene codificador da oxacilinase foi detectado. As sequências de aminoácidos das β -lactamases e as sequências nucleotídicas dos genes 16S ribossomais foram alinhadas pelo programa MAFFT, os modelos evolutivos foram determinados através do programa ProtTest, e as árvores filogenéticas foram construídas pelo método da máxima verossimilhança utilizando o programa PhyML. As sequências proteicas ancestrais foram reconstruídas utilizando o programa MEGA 6. Foram gerados modelos proteicos tridimensionais a partir das sequências ancestrais das β -lactamases no programa I-Tasser, então foi calculado o desvio da raiz quadrada média (RMSD) entre os carbonos alfa das estruturas em estudo e construída uma matriz de distância e um dendograma para visualizar a similaridade entre as enzimas. A análise filogenética referente as β -lactamases do tipo OXA mostraram que elas possuem grande diversidade, estão presentes principalmente em bactérias do gênero *Acinetobacter*, e parecem ser fortemente influenciadas pela TGH, apresentando várias incongruências nos agrupamentos formados quando comparada com a filogenia do gene 16S rDNA. A árvore filogenética das β -lactamases do tipo OXA apresentou coerência com a divisão dos grupos das OXA β -lactamases conhecidas. As quatro classes das β -lactamases e as sequências ancestrais inferidas apresentaram homologia funcional e estrutural. Os modelos tridimensionais apresentaram um reflexo da classificação existente para as β -lactamases de acordo com sua estrutura primária e função. As β -lactamases do tipo OXA, apresentam apenas três motivos conservados e são fortemente influenciadas por efeitos da transferência gênica horizontal. A relação filogenética entre as classes A, C e D foi evidenciada pela presença do domínio

conservado da transpeptidase, também presente nas DD-peptidases, enquanto a classe B forma um grupo independente.

PALAVRAS-CHAVE: Evolução; Genes de Resistência a antibióticos; β -lactamases

ABSTRACT

β -lactamases are enzymes that degrade β -lactam antibiotics, catalyzing the β -lactam ring breaking. One of the first identified enzymes conferred resistance to oxacillin, being classified as OXA β -lactamase. Considering that OXA β -lactamases are a problem for human, animal and environmental health because they are extremely adaptable, this study sought to analyze the evolutionary history of OXA β -lactamases by relating the knowledge about these enzymes to possible events of TGH and its Relations With the phenomenon of the dissemination of resistance. For molecular and evolutionary analyzes, it were selected β -lactamase amino acid sequences of the TEM, VIM, AmpC and OXA types of the GenBank database. The sequence library of 16S rDNA genes was constructed for the bacterial species in which the gene encoding oxacilinase was detected. The amino acid sequences of the β -lactamases and the nucleotide sequences of the 16S rDNA genes were aligned by the MAFFT program, the evolution model was determined through the ProtTest program, and the phylogenetic trees were constructed by the maximum likelihood method using the PhyML program. The ancestral protein sequences were reconstructed using the MEGA 6 program. Three-dimensional protein models of β -lactamase ancestors were generated in the I-Tasser program, the RMSD was calculated among the alpha carbons of the structures, a distance matrix and dendrogram was constructed to visualize the similarity between the enzymes. The phylogenetic analysis of OXA-type β -lactamases showed that they have great diversity, are present in bacteria of the genus *Acinetobacter*, and appear to be strongly influenced by the effects of TGH, presenting several incongruencies in the clusters when compared to the phylogeny Of the 16S RDNA gene. The phylogenetic tree of the OXA-type β -lactamases was consistent with the division of the known OXA β -lactamases groups. The four classes of β -lactamases and the inferred ancestral sequences showed functional and structural homology. The three-dimensional models presented a reflection of the existing classification for β -lactamases according to their primary structure and function. Given the paucity of evolutionary studies on β -lactam resistance genes, these data may contribute to the understanding of the evolution of β -lactam antibiotic resistance genes.

KEY WORDS: Evolution; Antibiotic resistance genes; β -lactamases

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquemas da estrutura química de antibióticos β -lactâmicos _____ 15
- Figura 2: Representantes de cada grupo de OXA β -lactamase, contendo o motivo STFK apresentando os resíduos Ser109 e Thr110 totalmente conservados _____ 26
- Figura 3: Representantes de cada grupo de OXA β -lactamase, contendo o motivo YGN com o resíduo Gly196 conservado em todas as sequências _____ 27
- Figura 4: Representantes de cada grupo de OXA β -lactamase, contendo o motivo KTG apresentando os resíduos Lys259 e Gly261 conservado em todas as sequências ____ 27
- Figura 5: Árvore filogenética referente as sequências proteicas das OXA β -lactamases.
_____ 29
- Figura 6: Árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA de espécies bacterianas que podem produzir blaOXA. _____ 38
- Figura 7: Modelos tridimensionais de cada classe de β -lactamases estudadas, mostrando a homologia estrutural entre cada classe. _____ 45
- Figura 8: Dendograma da distância entre os modelos das proteínas ancestrais em relação as proteínas atuais de cada classe de β -lactamase estudada _____ 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Divisão das β -lactamases conforme classificação de ambler	17
Tabela 2: Identificação das sequências de aminoácidos das β -lactamases utilizadas como referências.....	21
Tabela 3: Modelos evolutivos utilizados para as análises filogenéticas	23
Tabela 4: Sequências ancestrais geradas através das análises filogenéticas individuais das sequências proteicas das oxa β -lactamases	36
Tabela 5: Sequências ancestrais geradas através das análises filogenéticas individuais das sequências proteicas das tem, vim, ampc e oxa β -lactamases.....	42
Tabela 6: Matriz de distância dos valores do rmsd dos carbonos alfa das proteínas ancestrais das β -lactamases	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1C3B	PDB do cristal da enzima AmpC de <i>Escherichia coli</i>
1FCO	PDB do cristal da enzima AmpC de <i>Escherichia coli</i>
2YZ3	PDB do cristal da enzima VIM de <i>Pseudomonas putida</i>
3DTM	PDB do cristal da enzima TEM de <i>Escherichia coli</i>
4IBX	PDB do cristal da enzima TEM de <i>Escherichia coli</i>
4UWO	PDB do cristal da enzima VIM de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
4Z9Q	PDB do cristal da enzima OXA de <i>Acinetobacter baumannii</i>
5FAQ	PDB do cristal da enzima OXA de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Aa	Aminoácido
Ala	Alanina
AnAmpC	Ancestral da AmpC β -lactamase
AnOXA	Ancestral da OXA β -lactamase
AnTEM	Ancestral da TEM β -lactamase
AnVIM	Ancestral da VIM β -lactamase
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
BlastP	Basic Local Alignment Search Tool Protein
CDD	Conserved Domain Database
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
His	Histidina
JTT	Modelo Evolutivo Jones-Taylor-Thornton
K80	Modelo Evolutivo Kimura 2 Parâmetros
kDa	KiloDalton
Leu	Leucina
Lys	Lisina

MAFFT	Multiple Alignment Program for Amino Acid or Nucleotide Sequences
MEGA 6	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
Met	Metionina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OXA	Oxacilinase
PBP	Proteína de Ligação a Penicilina
PDB	Banco de Dados de Proteínas
Phe	Fenilalanina
rDNA	DNA ribossomal
RMSD	Desvio Médio da Raíz Quadrada
Ser	Serina
TGH	Tranferência Gênica Horizontal
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Vlina
WAG	Modelo Evolutivo de Whelan e Goldman

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	20
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS β -LACTAMASES	21
3.2. SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO 16S RDNA DAS BACTÉRIAS RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS OXA	22
3.3. ANÁLISES FILOGENÉTICAS BASEADAS NAS SEQUÊNCIAS PROTEICAS DAS β -LACTAMASES E DOS 16S RDNA	22
3.4. RECONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PROTEICAS ANCESTRAIS DAS β -LACTAMASES	23
3.5. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS ANCESTRAIS REFERENTES AOS GENES DE RESISTÊNCIA CODIFICADORES DAS β -LACTAMASES	24
3.6. INFERÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DOS GENES DE RESISTENCIA OXA.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. DIVERSIDADE DAS OXACILINASES.....	25
4.2. ANÁLISES FILOGENÉTICAS DAS β -LACTAMASES DO TIPO OXACILINASES	28
4.3. RECONSTRUÇÃO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS ANCESTRAIS DAS OXA- β -LACTAMASES	35
4.4. INFERÊNCIA DA TGH ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	37
4.5. ANÁLISE DAS RELAÇÕES EVOLUTIVAS DAS OXACILINASES E DEMAIS CLASSES DE β -LACTAMASES	40
4.6. MODELOS TRIDIMENSIONAIS DAS SEQUÊNCIAS ANCESTRAIS DAS β -LACTAMASES	44
5. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

As bactérias surgiram a mais de dois bilhões de anos e possuem uma enorme diversidade (THOMAZ, 1999). Estes micro-organismos participam de processos ecológicos essenciais, auxiliando na manutenção dos mais variados ecossistemas, além de participarem de processos químicos necessários a outros organismos (BERGMAN et al., 2013; HOCH; FOGEL; KIRCHMAN, 1992; THOMAZ, 1999; VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2010).

A mutação e/ou recombinação, são processos importantes na variabilidade genética bacteriana e auxiliam na aquisição de genes, incluindo genes de resistência aos antibióticos (TENAILLON et al., 2000). A mutação pode ocorrer por deleção, inserção e substituição de pares de bases, alterando a sequência de nucleotídeos no genoma bacteriano e sendo repassada verticalmente entre as linhagens (WIELGOSS et al., 2012). Ademais, a recombinação genética gera novas combinações alélicas e fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) podem ser transferidos entre genomas bacterianos por elementos geneticamente móveis, como integrons e transposons, através da Transferência Gênica Horizontal (TGH) (BROWN, 2003).

A TGH permite a transmissão de genes inteiros, conjunto de genes ou fragmentos grandes de DNA entre regiões ou entre organismos diferentes, podendo ocorrer por três processos distintos: conjugação, transformação e transdução (ALEKSHUN; LEVY, 2007; LEVIN; BERGSTROM, 2000; WARJRI et al., 2015).

Assim, várias forças moldam a evolução dos genomas bacterianos, sendo a TGH um aspecto importante no processo, uma vez que promove a evolução adaptativa bacteriana ao permitir a aquisição de genes importantes. Os genes de resistência aos antibióticos constituem um exemplo, pois podem livremente disseminarem-se entre diferentes habitats e diferentes espécies bacterianas por TGH, favorecendo a disseminação da resistência que resulta em relevantes implicações na área médica (CHAN et al., 2012; DOBRINDT et al., 2004; KARUNASAGAR et al., 2011; KELLEY et al., 2007; LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2008)

Na primeira metade do século XIX, com o agravamento das enfermidades e a Primeira Guerra Mundial, houve um aumento na necessidade da criação de medicamentos para o tratamento das infecções causadas pelas bactérias. Alexander Fleming, durante seus estudos com a bactéria *Staphylococcus aureus*, descobriu acidentalmente a

penicilina, substância produzida pelo fungo *Penicilium notatum*, que apresentava atividade bactericida (BANKSTON, 2009; DAVIES; DAVIES, 2010). A penicilina foi a primeira substância a ser utilizada como antibiótico no tratamento de doenças bacterianas (BANKSTON, 2009).

Os antibióticos são substâncias que podem ser produzidas naturalmente por fungos e bactérias, ou sinteticamente, possuindo duas formas de ação, bactericida e ou bacteriostática, uns matam as bactérias e outros apenas previnem seu crescimento (PANKEY; SABATH, 2004). Além disso, podem ser classificados em grupos de acordo com a sua função: modificadores da permeabilidade da membrana plasmática, inibidores da síntese da parede celular, inibidores da síntese dos ácidos nucleicos e de proteínas e inibidores da síntese de metabólitos essenciais (BAPTISTA, 2013; BASERGA; PETERSEN, 1965; TIPPER; STROMINGER, 1965; WILSON, 2016). Devido a sua importância clínica, os médicos passaram a prescrever o uso de antibióticos como forma de tratamento para várias doenças.

As taxas de mortalidade humana diminuíram com o uso dessas drogas antimicrobianas, porém, as enfermidades continuavam, uma vez que alguns isolados apresentavam resistência aos antibióticos, e de tempos em tempos, tornava-se necessária a criação de novas drogas (BUTLER, 2013; EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013). Assim, o uso desenfreado e desregulado dos antibióticos durante décadas levou ao desenvolvimento de gerações bacterianas resistentes, acelerando o processo de aquisição de genes de resistência, gerando um problema significativo para o tratamento de doenças infecciosas (ANDRADE; LEOPOLDO; HAAS, 2006; DAVIES; DAVIES, 2010; DELEO et al., 2014; O'BRIEN, 2002)..

A produção de antibióticos e o fenômeno da resistência já existiam de forma natural no meio, no entanto, estes processos foram acelerados devido a pressão seletiva proveniente do uso das drogas antimicrobianas (ANDRADE; LEOPOLDO; HAAS, 2006; BAJAJ; SINGH; VIRDI, 2016; DAVIES; DAVIES, 2010; HARGIS et al., 2014; LEE et al., 2003; O'BRIEN, 2002; VON WINTERSDORFF et al., 2016).

Naturalmente produzidos tanto por eucariotos quanto por procariotos, os β -lactâmicos, como as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, foram um dos primeiros grupos de antibióticos a serem descobertos. Além disso, estão entre as drogas mais utilizadas no tratamento de infecções e práticas terapêuticas, sendo

utilizados em associação com outras drogas para um melhor resultado no tratamento (DICKSTEIN et al., 2016; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; NICHOLS; RENSLO; CHEN, 2014; PATERSON; BONOMO, 2005; TOLENTINO, 2009; WILLIAMS, 1999).

Classificados conforme a semelhança, a base da estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos é a presença de um anel β -lactâmico ligado a um radical e a uma cadeia lateral (Figura 1). A penicilina, por exemplo, tem como estrutura básica a presença de um anel tiazolídico ligado a um anel β -lactâmico, ao qual se fixa a uma cadeia lateral (NICHOLS; RENSLO; CHEN, 2014). É a diversidade de radicais e cadeias laterais que promovem o amplo espectro de ação destes antibióticos.

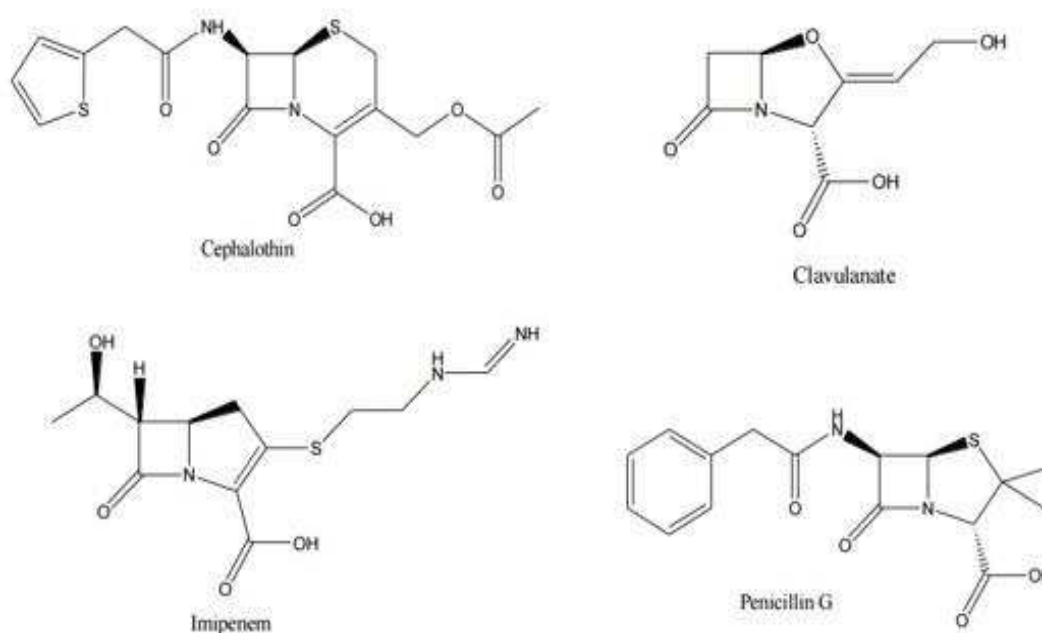


Figura 1: Esquemas das estruturas químicas de antibióticos β -lactâmicos (Adaptado de (NICHOLS; RENSLO; CHEN, 2014))

Os antibióticos β -lactâmicos agem inibindo a síntese da parede celular bacteriana, inibindo a ação da transpeptidase e conseqüentemente impedindo que as ligações cruzadas entre as fitas de peptidoglicanos se formem, levando a lise celular (DAVIES;

DAVIES, 2010). As transpeptidases são membros da família das DD-peptidases ou proteínas de ligação a penicilina (PBP), a partir da qual as β -lactamases podem ter evoluído (GEORGOPAPADAKOU; LIU, 1982; HALL; BARLOW, 2003, 2004; MASSOVA; MOBASHERY, 1998; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

Estudos mostraram a coexistência de produção de antibióticos e genes de resistência em organismos do gênero bacteriano *Streptomyces* (SAGOVA-MARECKOVA et al., 2015). A resistência aos antimicrobianos ocorre pela produção de enzimas que tornam essas drogas ineficazes. As bactérias podem apresentar dois tipos de resistência aos antibióticos, a intrínseca ou natural, presentes em todos os indivíduos de uma determinada espécie, e a adquirida, resultante de mutação ou transferência horizontal, neste caso, quando decorrente de mutação os indivíduos descendentes deste organismo passam a apresentar a resistência intrínseca (BAPTISTA, 2013).

As bactérias podem se tornar resistentes aos antibióticos por mecanismos de alteração da permeabilidade da membrana celular, alteração, substituição ou superprodução do alvo de ação, expulsando a droga de dentro da célula através de bomba de efluxo e por inativação ou modificação da droga por ação enzimática (ALEKSHUN; LEVY, 2007; BAPTISTA, 2013; LAMBERT, 2002; LIVERMORE, 2003; WILSON, 2016). Apesar dos antibióticos possuírem apenas um tipo de ação, as bactérias resistentes geralmente apresentam mais de um tipo de mecanismo de resistência (DAVIES; DAVIES, 2010).

As β -lactamases são enzimas que degradam antibióticos β -lactâmicos, catalisando a quebra do anel β -lactâmico dessas moléculas (FERNANDEZ et al., 2012; MASSOVA; MOBASHERY, 1998). As β -lactamases foram classificadas segundo a homologia proteica em quatro classes (A, B, C, e D) (Tabela 1), e em quatro grupos segundo suas características funcionais e bioquímicas (I, II, III, e IV) (AMBLER, 1980; BUSH, 1989; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995a).

Enzimas classificadas como classe A ou grupo II, hidrolisam penicilinas e cefalosporinas; classe B ou grupo III, carbapenêmicos; classe C ou grupo I, cefalosporinas; classe D, penicilinas e oxacilinas; e grupo IV, penicilinas (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995a; NICHOLS; RENSLO; CHEN, 2014; PATERSON; BONOMO, 2005; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

Tabela 1: Divisão das β -lactamases conforme classificação de Ambler

B-lactamases			
Classe A	Classe B	Classe C	Classe D
TEM	VIM	AmpC	OXA
SHV	IMP	CMY	LCR
CTX	GIM	ATCC	
KPC	SIM	CFE	
VEB		DHA	
GES		FOX	

Fonte: (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995a)

Uma das primeiras enzimas identificadas atuavam essencialmente como penicilinas e conferiam resistência à oxacilina por meio de hidrólise, e por isso foram classificadas como β -lactamases oxacilinas (OXA) (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995a; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006). As OXA β -lactamases pertencentes a classe molecular D, eram originalmente raras e grande parte delas foram identificadas como enzimas codificadas por genes plasmidiais presentes em bactérias Gram-negativas.

As OXA β -lactamases contém entre 243 e 269 resíduos de aminoácidos (aa), com massa molecular variando entre 23 e 35,5 kDa e variam de um grupo para outro pela divergência entre 1 e 21 aminoácidos que podem levar a alterações quanto ao nível de resistência das bactérias (HÉRITIER et al., 2005; HOCQUET et al., 2011; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006). A variação no nível da resistência é utilizada para separar essas enzimas em três subgrupos, 2d que hidrolisam a oxacilina, 2de que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas, e 2df que hidrolisam carbapenêmicos e oxacilinas (BUSH; JACOBY, 2010).

A identificação das OXA β -lactamases é realizada pela numeração em ordem cronológica de descoberta e atualmente existem quatrocentos e noventa e oito variações deste tipo enzimático conforme lista publicada pela *Lahey Clinic* em agosto de 2016 (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>) (BUSH; JACOBY, 2010; EVANS;

AMYES, 2014; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010; QUEENAN; BUSH, 2007). A variabilidade das cadeias de aminoácidos provoca pequenas alterações estruturais nas enzimas, assim, conforme a homologia molecular que as oxacilinases apresentam entre si, é possível dividir as enzimas em grupos *OXA-like* (*OXA-2-like*, *OXA-10-like*, *OXA-23-like*, *OXA-51-like*, entre outros (EVANS; AMYES, 2014; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

A presença de elementos geneticamente móveis, como integrons e transposons, tem formado a base para a disseminação dessas enzimas entre diferentes espécies, como *Shewanella algae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, e *Ralstonia pickettii* (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). Por exemplo, foi observado que quando a sequência de inserção (IS) *Abal* está localizada na região promotora do gene *BlaOXA-23*, bactérias da espécie *A. baumannii* apresentaram uma maior expressão destes genes (EVANS; AMYES, 2014; KARUNASAGAR et al., 2011; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

No Brasil tem sido identificados sequências de β -lactamases pertencentes principalmente aos grupos *OXA-23-like*, *OXA-24/40-like* e *OXA-51-like* (MEDEIROS; LINCOPAN, 2013). Após quatorze anos da identificação da primeira *OXA-23* na Escócia, foi identificada a primeira *OXA-23* em isolados clínicos de *A.baumannii* no Brasil (DALLA-COSTA et al., 2003). Até o ano de 2010, sequências de β -lactamases pertencentes ao grupo das *OXA-58-like* foram identificadas apenas em países da Europa e da Ásia, porém, no ano de 2010, foi identificada a primeira sequência pertencente a este grupo em isolados clínicos de encontrados no Brasil (JOURNAL, 2012).

A distribuição das enzimas de resistência aos β -lactâmicos é relatada em todo o mundo, sendo encontrada em humanos, animais, plantas e no ambiente (ANDRADE; LEOPOLDO; HAAS, 2006; EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013; FLUIT; SCHMITZ, 2004; GIRAUD et al., 2007; KARUNASAGAR et al., 2011; QIN et al., 2010). Algumas sequências de β -lactamases foram identificadas em mais de uma espécie bacteriana, como a *OXA-2*, presentes em *Pseudomonas aeruginosa*, *A. baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia* (DANEL et al., 1997; JORIS et al., 1988; POIREL et al., 2001; SANSCHAGRIN; COUTURE; LEVESQUE, 1995; SUN, 2003).

Nas últimas décadas algumas oxacilinases passaram a conferir resistência às cefalosporinas e emergiram algumas oxacilinases com atividade de carbapenemases,

principalmente identificadas em *A. baumannii* encontradas, principalmente, em ambiente hospitalar (BONNIN et al., 2012; FLUIT; SCHMITZ, 2004; KARUNASAGAR et al., 2011; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

A resistência a carbapenêmicos tem aumentado nos últimos anos, provocando surtos e infecções hospitalares, principalmente por *A. baumannii*. As OXA β -lactamases são encontradas predominantemente em *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, conferindo resistência a antibióticos β -lactâmicos (BROWN; AMYES, 2006; FERNANDEZ et al., 2012; IKONOMIDIS et al., 2007; TSAKRIS et al., 2006; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

Os genes de resistência codificadores das carbapenemases OXA-51 já foram identificados em cromossomos de *A. baumannii*, e sequências de β -lactamases OXA-23, OXA-40, OXA-48 e OXA-58, foram identificadas em plasmídeos desta mesma espécie (BONNIN et al., 2012; BROWN; AMYES, 2005; HÉRITIER et al., 2005; IKONOMIDIS et al., 2007; TURTON et al., 2006; VAHABOGLU et al., 2006; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

Na era dos antibióticos, as β -lactamases mostraram ser extremamente adaptáveis, se tornando um problema para a saúde humana, animal e para o ambiente. A presença de OXA β -lactamases junto a elementos móveis, combinada com a alta pressão seletiva exercida pelos antibióticos e a capacidade de sofrer mutação, facilitam a disseminação destas enzimas entre as mais diversas espécies bacterianas. Portanto, estudos evolutivos sobre os genes de resistência aos β -lactâmicos podem contribuir para a compreensão da evolução dos genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, e para o papel importante que a transferência gênica horizontal em bactérias exerce sobre o fenômeno da disseminação da resistência.

2. OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo realizar estudos evolutivos e de transferência horizontal dos genes de resistência codificadores de β -lactamases do grupo das oxacilinases, e analisar suas relações com o fenômeno da disseminação da resistência aos β -lactâmicos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Buscar e Coletar sequências proteicas das β -lactamases representantes das classes A, B, C e D depositadas no banco de dados *Genbank*;
- II. Buscar e Coletar sequências do gene 16S rDNA referentes as espécies bacterianas selecionadas como portadoras de genes codificadores das enzimas do tipo oxacilinase;
- III. Analisar as relações filogenéticas das sequências proteicas das oxacilinases;
- IV. Reconstruir as sequências ancestrais das β -lactamases representantes das classes A, B, C e D;
- V. Inferir modelos tridimensionais das proteínas ancestrais e verificar a possibilidade de ancestralidade comum entre as diferentes classes de β -lactamases;
- VI. Construir a filogenia taxonômica das bactérias que produzem oxacilinases através das sequências do 16S rDNA;
- VII. Inferir eventos de transferência gênica horizontal das sequências proteicas de resistência a β -lactamase do tipo OXA.

3. METODOLOGIA

3.1. SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS β -LACTAMASES

Para as análises moleculares e evolutivas, foram selecionadas sequências de aminoácidos de quatro β -lactamases representantes de cada uma das classes de acordo com a classificação de Ambler (AMBLER, 1980), no período de julho e agosto do ano de 2014.

As sequências de aminoácidos foram obtidas no banco público de dados *GenBank*, no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (GEER et al., 2009; NCBI, 2009). Para cada classe de β -lactamase foi utilizada uma sequência proteica como referência (Tabela 3), para a busca de outras sequências similares através do *Basic Local Alignment Search Tool Protein* (BlastP) (JOHNSON et al., 2008).

Tabela 2: Identificação das sequências de aminoácidos das β -lactamases utilizadas como referências

β -LACTAMASES	IDENTIFICAÇÃO
TEM	ABM89223.1
VIM	YP_006965573.1
AmpC	ADV18979.1
OXA	AGD91915.1

Fonte:(NCBI, 2009)

As sequências foram alinhadas contra o banco de dados de sequências não redundantes através da ferramenta BlastP, e foram consideradas para este estudo as sequências que apresentaram o valor de expectativa (“e-value”) menor do que e-30, recuperando o limite máximo de mil sequências para cada uma das representantes das

quatro classes de β -lactamases. As sequências foram armazenadas no formato FASTA e salvas no bloco de notas.

As sequências selecionadas correspondentes as β -lactamases dos tipos TEM, VIM, AmpC e OXA, foram revisadas e filtradas para a exclusão das sequências de origem sintética, resultantes de mutagênese induzida, sequências hipotéticas e parciais. Além disso, foram filtradas as sequências idênticas correspondentes as enzimas encontradas na mesma espécie bacteriana, sendo selecionada apenas uma para as análises.

3.2. SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO 16S RDNA DAS BACTÉRIAS RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS OXA

A partir das sequências proteicas das β -lactamases do tipo OXA selecionadas e filtradas para este estudo, foram selecionadas sequências dos genes 16S rDNA referentes às espécies bacterianas nas quais o gene codificador da oxacilinase foi detectado estar presente no seu genoma ou em plasmídeos. As sequências nucleotídicas foram obtidas no banco de dados *GenBank* no site do do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (GEER et al., 2009; NCBI, 2009).

3.3. ANÁLISES FILOGENÉTICAS BASEADAS NAS SEQUÊNCIAS PROTEICAS DAS β -LACTAMASES E DOS 16S RDNA

As sequências de aminoácidos das β -lactamases do tipo TEM, VIM, AmpC e OXA e as sequências nucleotídicas dos genes 16S rDNA foram alinhadas pelo *Multiple Alignment Program for Amino Acid or Nucleotide Sequences* (MAFFT version 6.864) (ALIX; BOUBACAR; VLADIMIR, 2012; KATOH; STANDLEY, 2013), e em seguida foi determinado o modelo evolutivo a ser utilizado para cada grupo de sequências através do *software* ProtTest 3 (Tabela 4) (ABASCAL; ZARDOYA; POSADA, 2005a, 2005b).

Tabela 3: Modelos evolutivos utilizados para as análises filogenéticas

Gene	TEM	VIM	AmpC	OXA	16S
Total de Sequências	232	44	304	181	29
Modelo	JTT	JTT	JTT	WAG	K80
Parâmetro G	0.244	-	1	0.241	1
Parâmetro I	-	0.248	0.253	0.261	-

Fonte:(ABASCAL; ZARDOYA; POSADA, 2005a)

Baseando-se no modelo evolutivo, as árvores filogenéticas foram inferidas pelo método da máxima verossimilhança, utilizando o *software* PhyML no site do Trex (<http://www.trex.uqam.ca/index.php?action=phyml2&project=trex>) (GUINDON; GASCUEL, 2003). As árvores filogenéticas foram inferidas empregando como método de suporte estatístico com réplicas de *bootstrap*.

3.4. RECONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PROTEICAS ANCESTRAIS DAS β -LACTAMASES

As sequências proteicas ancestrais para cada grupo de sequências codificadoras das β -lactamases dos tipos TEM, VIM, AmpC e OXA, foram reconstruídas através do programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), utilizando as árvores filogenéticas geradas pelo método da máxima verossimilhança, que estima o comprimento dos ramos de acordo com o modelo evolutivo e gera possíveis sequências ancestrais para cada nó da árvore filogenética (TAMURA et al., 2011).

Posteriormente, as sequências ancestrais geradas foram analisadas para que fossem encontradas similaridades com subunidades proteicas atuais depositadas no banco de dados *GenBank* e para determinação da presença de domínios funcionais conservados, utilizando as ferramentas *BlastP* e o *Conserved Domain Database* (CDD), respectivamente (JOHNSON et al., 2008; MARCHLER-BAUER et al., 2009, 2011, 2015; MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004).

3.5. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS ANCESTRAIS REFERENTES AOS GENES DE RESISTÊNCIA CODIFICADORES DAS β -LACTAMASES

Para cada sequência ancestral foram gerados modelos tridimensionais utilizando-se o programa I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), que constrói modelos de proteínas com base nas sequências de aminoácidos, realizando o método *threading*, o qual alinha a sequência de estudo com sequências depositadas no banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), e a partir deste, infere a possível estrutura tridimensional da sequência estudada (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; YANG; ZHANG, 2015; ZHANG, 2008).

Os modelos selecionados para cada sequência ancestral foram utilizados para a comparação com modelos estruturais originais de proteínas atuais depositadas no PDB, por meio do programa TM-align (ZHANG; SKOLNICK, 2005). Para cada comparação entre duas proteínas, foi calculado o desvio médio da raiz quadrada (RMSD), que expressa a distância entre duas estruturas proteicas tridimensionais, tomando como parâmetro as coordenadas dos carbonos alfa de cada estrutura.

Os dados do RMSD foram utilizados para a construção de duas diferentes matrizes de distância, sendo uma referente apenas aos modelos tridimensionais das proteínas ancestrais e outra referente aos modelos tridimensionais de proteínas ancestrais com proteínas atuais de cada classe de β -lactamase. Estas foram utilizadas para a construção de dendogramas para visualizar a similaridade entre as estruturas proteicas analisadas utilizando o programa *Tree Inference Neighbour Joining* (SAITOU N, 1987).

3.6. INFERÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DOS GENES DE RESISTÊNCIA OXA

As árvores filogenéticas das sequências proteicas do genes de resistência OXA e nucleotídicas do 16S rDNA foram comparadas para determinar possíveis eventos de transferência gênica do gene OXA entre os organismos analisados. Para isso, foi analisada a história evolutiva do gene OXA e as incongruências entre a filogenia do gene OXA comparada a filogenia referente as espécies bacterianas (RAVENHALL et al., 2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DIVERSIDADE DAS OXACILINASES

No ano de 2006 apenas 121 variantes diferentes das OXA β -lactamases haviam sido identificadas (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006), até fevereiro do ano de 2015 foram identificadas 498 variações das OXA β -lactamases (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>). Neste trabalho foram utilizadas 181 destas variantes. A variação de um ou mais aminoácidos nas sequências proteicas das OXA β -lactamases altera sua resposta aos antibióticos, fazendo com que se tornem mais ou menos eficazes (IKONOMIDIS et al., 2007; POIREL et al., 2001; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

A partir do alinhamento das 181 sequências de aminoácidos correspondentes as diversas oxacilinas selecionadas foi possível observar a variabilidade entre estas sequências. No entanto, todas as sequências variantes das OXAs apresentaram motivos que são bem conservados entre as enzimas da classe D de β -lactamases e essenciais para o mecanismo catalítico das mesmas: STFK, YGN e KTG . É descrito na bibliografia que as OXA β -lactamases apresentam padrões de conservação na sequência de aminoácidos que correspondem a elementos estruturais para a formação do sitio ativo da proteína (EL GARCH et al., 2011; FRÓES et al., 2016; SINGH; SAXENA; SINGH, 2009; TOTH et al., 2016)

O motivo STFK, apresentou os resíduos de serina catalítico (Ser109) e o resíduo de treonina (Thr110) conservados em todas as sequências analisadas. Estes estão entre os resíduos mais conservados nas classes A e D de β -lactamases (Figura 2) (COUTURE; LACHAPELLE; LEVESQUE, 1992; SANSCHAGRIN; COUTURE; LEVESQUE, 1995; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

No motivo STFK, apenas duas sequências de aminoácidos apresentam a substituição da fenilalanina (Phe111) pela tirosina (Tyr), pertencentes a uma OXA-10 presente em *Achromobacter piechaudii* e a uma OXA-62 presente em *Pandorea pnomenusa*. A substituição do motivo STFK para o motivo STYK também foi descrito para uma sequência OXA-50 identificada em *P. aeruginosa* (GIRLICH; NAAS; NORDMANN, 2004a).

1. OXA-51-like	R	A	S	T	E	Y	V	P	A	S	T	F	K	M	L	N	A	L	I	G	L	E	H	H	K	A	T	T	E	
2. OXA-213-like	R	A	S	T	D	Y	I	P	A	S	T	F	K	M	L	N	A	L	I	G	L	E	H	H	K	A	T	T	E	
3. OXA-23-like	R	A	N	T	E	Y	V	P	A	S	T	F	K	M	L	N	A	L	I	G	L	E	N	K	T	D	I	N	E	
4. OXA134-like	R	A	N	T	E	Y	V	P	A	S	T	F	K	M	L	N	A	L	I	G	L	E	N	K	T	D	I	N	E	
5. OXA-143-like	R	A	H	T	E	Y	V	P	A	S	T	F	K	M	L	N	A	L	I	G	L	E	N	H	K	A	T	T	E	
6. OXA-40-like	R	A	Q	T	E	Y	I	P	A	S	T	F	K	M	L	N	A	L	I	G	L	E	N	N	K	A	T	E	K	E
7. OXA-211-like	R	A	Q	T	E	Y	V	P	A	S	T	F	K	M	L	N	A	L	I	G	L	E	H	G	K	A	T	S	T	E
8. OXA-214-like	R	A	K	T	A	Y	I	P	A	S	T	F	K	I	L	N	A	L	I	G	L	E	H	D	E	T	S	E	N	E
9. OXA-229-like	R	A	K	T	E	Y	I	P	A	S	T	F	K	M	L	N	A	L	I	G	L	E	N	A	K	A	T	N	T	E
10. OXA-58-like	R	A	K	T	A	Y	I	P	A	S	T	F	K	I	A	N	A	L	I	G	L	E	N	H	K	A	T	S	T	E
11. OXA-60-like	R	A	A	R	H	I	P	A	S	T	F	K	T	P	N	S	L	I	A	E	F	D	T	G	A	V	R	D	D	G
12. OXA-10-like	R	A	A	K	Q	Y	L	P	A	S	T	F	K	T	P	N	S	L	I	A	L	E	F	G	E	A	E	S	K	D
13. OXA-5-like	R	S	G	E	G	R	L	P	A	S	T	F	K	I	A	N	S	L	I	A	L	E	F	G	V	V	Q	D	P	D
14. OXA-48-like	R	A	N	Q	A	F	L	P	A	S	T	F	K	T	P	N	S	L	I	A	L	D	L	G	V	V	K	D	E	H
15. OXA-2-like	R	S	K	Y	P	Y	S	P	A	S	T	F	K	T	P	H	L	E	A	L	D	A	G	A	V	R	D	E	F	

Figura 2: Representantes de cada grupo de OXA β -lactamase, contendo o motivo STFK apresentando os resíduos Ser109 e Thr110 totalmente conservados

O motivo STFK também contém a presença de um aminoácido atípico ou indeterminado no lugar do resíduo da lisina (Lys112) de uma sequência OXA-58 presente em *A. baumannii*. Alterações no resíduo da lisina no motivo STFK levam a diminuição do nível de expressão e da atividade enzimática, tornando a enzima praticamente inativa (EVANS; AMYES, 2014; VERMA et al., 2011).

O motivo YGN na posição 194 a 197, no qual 22,6% das sequências tinham a substituição da tirosina (Tyr) pela fenilalanina (Phe), e 2,2% e tinham a substituição da asparagina (Asn) pela tirosina(Tyr), serina(Ser), glutamato(Glu) ou metionina(Met) (Figura 3). Este motivo é responsável pela eficiência catalítica das serina β -lactamases, sendo necessário para a formação da ponte hidrofóbica juntamente com o motivo KTG, e mantendo a estabilidade da enzima (EL GARCH et al., 2011; TOTH et al., 2016).

A substituição da tirosina pela fenilalanina no motivo YGN também foi descrito para sequências de OXA-23, -40, -143, e -229, (BONNIN et al., 2012; EL GARCH et al., 2011). O motivo YGN também apresentou a inserção de uma arginina (Arg195) na sequência da OXA-209 presente em *Riemerella anatipestifer*. (CHEN et al., 2012).

1. OXA-51-like	G	L	E	L	M	S	K	E	V	K	R	V	G	Y	-	G	N	A	D	I	G	I	G	V	D	N	F	W	L	V	
2. OXA-213-like	G	L	D	L	M	S	K	E	V	K	R	I	G	F	-	G	N	A	N	I	G	S	K	V	D	D	F	W	L	V	
3. OXA-23-like	G	L	D	L	M	S	K	E	V	K	R	I	G	F	-	G	N	A	E	I	G	Q	Q	V	D	N	F	W	L	V	
4. OXA134-like	G	L	D	L	M	S	K	E	V	K	R	I	G	F	-	G	N	A	E	I	G	Q	Q	V	D	N	F	W	L	V	
5. OXA-143-like	G	L	D	L	M	S	K	E	V	K	R	V	G	F	-	G	N	M	N	I	G	T	Q	V	D	N	F	W	L	V	
6. OXA-40-like	G	L	S	L	M	S	K	E	V	K	R	V	V	F	-	G	N	E	N	I	G	H	Q	V	D	N	F	W	L	S	
7. OXA-211-like	G	L	D	L	M	S	K	E	V	K	R	I	G	F	-	G	N	Q	S	I	G	T	V	V	D	N	F	W	L	V	
8. OXA-214-like	G	L	D	L	M	A	K	E	V	K	R	V	G	F	-	G	N	A	E	I	G	Q	Q	V	D	N	F	W	L	I	
9. OXA-229-like	G	L	E	L	M	R	E	E	V	K	R	V	G	F	-	G	N	A	E	I	G	Q	Q	V	D	N	F	W	L	V	
10. OXA-58-like	G	E	S	L	M	S	E	L	Q	R	I	G	F	Y	-	G	N	Q	S	I	G	T	E	V	D	D	F	W	L	K	
11. OXA-60-like	G	F	E	R	M	A	Y	V	D	A	F	I	G	F	Y	-	G	N	R	O	L	G	S	V	I	D	D	F	W	L	R
12. OXA-10-like	G	A	E	R	M	A	Y	V	N	R	F	I	G	F	Y	-	G	N	R	N	I	S	G	G	I	D	D	F	W	L	T
13. OXA-5-like	G	E	R	M	D	Y	L	E	E	L	I	G	F	Y	-	G	N	E	D	I	G	G	G	I	D	D	F	W	L	T	
14. OXA-48-like	G	E	A	R	M	S	K	M	L	H	A	F	I	G	F	Y	-	G	N	E	D	I	S	G	V	D	D	F	W	L	D
15. OXA-2-like	G	E	D	K	A	R	Y	L	K	K	L	I	G	F	Y	-	G	N	A	D	S	S	S	G	D	Y	W	L	I	E	

Figura 3: Representantes de cada grupo de OXA β -lactamase, contendo o motivo YGN com o resíduo Gly196 conservado em todas as seqüências

O motivo KTG, altamente conservado entre as serina β -lactamases também foi observado, na posição 259 a 261, este motivo possui função importante na formação de uma ponte hidrofóbica responsável pela atividade catalítica da enzima, semelhante a função da tríade SDN presente em β -lactamases da classe A (COUTURE; LACHAPELLE; LEVESQUE, 1992; SANSCHAGRIN; COUTURE; LEVESQUE, 1995; TOTH et al., 2016; TSUKAMOTO et al., 1990), apresentando o resíduo de lisina (Lys259) e glicina (Gly261), conservado em todas as sequencias (Figura 4).

1. OXA-51-like	E	E	K	N	G	N	K	I	Y	A	K	S	G	V	-	G	-	-	N	D	V	D	E	Q	V	G	W	L	I	G		
2. OXA-213-like	E	E	K	N	G	R	K	I	Y	A	K	S	G	V	-	G	-	-	N	D	V	D	E	Q	V	G	W	L	I	G		
3. OXA-23-like	E	E	S	N	G	Y	K	I	F	G	K	T	G	V	-	A	-	-	M	D	I	K	E	Q	V	G	W	L	I	G		
4. OXA134-like	E	E	S	N	G	Y	K	I	F	G	K	T	G	V	-	A	-	-	M	D	I	K	E	Q	V	G	W	L	I	G		
5. OXA-143-like	K	E	F	N	G	S	K	I	Y	A	K	S	G	V	-	G	-	-	M	D	V	T	E	Q	V	G	W	L	I	G		
6. OXA-40-like	D	V	I	N	G	N	K	I	Y	A	K	S	G	L	-	G	-	-	I	N	K	T	E	Q	V	G	W	L	I	G		
7. OXA-211-like	E	Q	K	P	N	Y	K	L	Y	A	K	S	G	V	-	G	-	-	M	D	L	E	E	Q	V	G	W	L	I	G		
8. OXA-214-like	D	E	I	R	G	T	K	V	Y	A	K	S	G	V	-	G	-	-	M	D	I	T	E	Q	V	G	W	L	I	G		
9. OXA-229-like	E	R	R	G	D	S	K	L	Y	A	K	S	G	V	-	G	-	-	M	D	V	E	E	Q	V	G	W	L	I	G		
10. OXA-58-like	E	R	R	G	E	N	R	L	Y	A	K	S	G	V	-	G	-	-	M	A	V	D	E	Q	V	G	W	L	I	G		
11. OXA-60-like	E	Q	Q	G	D	A	A	L	Y	A	K	T	G	V	-	-	-	A	T	E	Y	Q	S	O	I	G	W	L	I	G		
12. OXA-10-like	E	E	T	P	D	Y	R	L	S	G	K	T	G	V	-	-	-	A	T	E	Y	Q	S	O	I	G	W	L	I	G		
13. OXA-5-like	T	K	V	G	D	A	V	I	H	A	K	S	G	L	L	-	-	-	K	E	Q	G	S	L	G	W	L	I	G	M	V	
14. OXA-48-like	E	A	N	G	D	Y	I	I	R	A	K	T	G	V	-	-	-	S	T	R	I	E	D	W	I	G	W	L	I	G		
15. OXA-2-like	E	A	G	R	N	W	L	R	A	K	T	G	V	E	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	M	G	W	L	I	G

Figura 4: Representantes de cada grupo de OXA β -lactamase, contendo o motivo KTG apresentando os resíduos Lys259 e Gly261 conservado em todas as sequências

O resíduo treonina (Thr), do motivo KTG, apresentou substituição em 69,6% pelo resíduo serina (Ser). A substituição do motivo KTG pelo motivo KSG foi descrita em sequências de OXA-23, -27, -40, -51, -58, -211, -213, e -214 (BROWN; YOUNG; AMYES, 2005; FIGUEIREDO et al., 2012; GIRLICH; NAAS; NORDMANN, 2004a; HÉRITIER et al., 2005). A treonina (Thr) pode não ser essencial para a reação enzimática, uma vez que sua substituição não inviabiliza a ação da enzima, porém, sua substituição pelo resíduo valina (Val) resulta em uma diminuição da afinidade de β -lactamases da classe C pelos antibióticos cefalotina e cefaloridina (TSUKAMOTO et al., 1990).

Outros cinco resíduos conservados que se apresentam completamente conservados entre as sequências analisadas e que não pertencem aos três motivos observados são o da Alanina (Ala108), o resíduo Alanina (Ala164), a Serina (Ser168), o Triptofano (Trp275) e a Arginina (Arg310). A variabilidade dos resíduos de aminoácidos produz novos subtipos de enzimas em um mesmo grupo gênico, conferindo modificação da resistência dos organismos aos antibióticos, por exemplo, a falta da Leucina (Leu) na posição 165 em OXA-145, aumenta a resistência a cefepime, cefotaxime e aztreonam, e diminui a resistência a amoxicilina, piperacilina e ticarcilina (BROWN; AMYES, 2005; FERNANDEZ et al., 2012; HÉRITIER et al., 2005; HOCQUET et al., 2011; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

4.2. ANÁLISES FILOGENÉTICAS DAS β -LACTAMASES DO TIPO OXACILINASES

A árvore filogenética das 181 sequências das OXA β -lactamases foi inferida pelo método da máxima verossimilhança e usando cem réplicas de *bootstrap* (Figura 5). A árvore filogenética das sequências proteicas das OXA β -lactamases selecionadas para este estudo foram agrupadas em dezessete clados, mostrando a ampla diversidade dessas enzimas e a relação entre elas (EVANS; AMYES, 2014; FIGUEIREDO et al., 2012; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). A grande maioria das sequências referentes aos genes de resistência *blaOXA* estão presentes em bactérias pertencentes ao filo Proteobactéria, em especial da classe Gammaproteobactéria, do gênero *Acinetobacter*, principalmente a espécie *A. baumannii*. Apenas duas sequências proteicas foram encontradas em bactérias do filo Bacteroidetes, a *R. anatipestifer* e a *Z. profunda* (FEDERHEN, 2015).

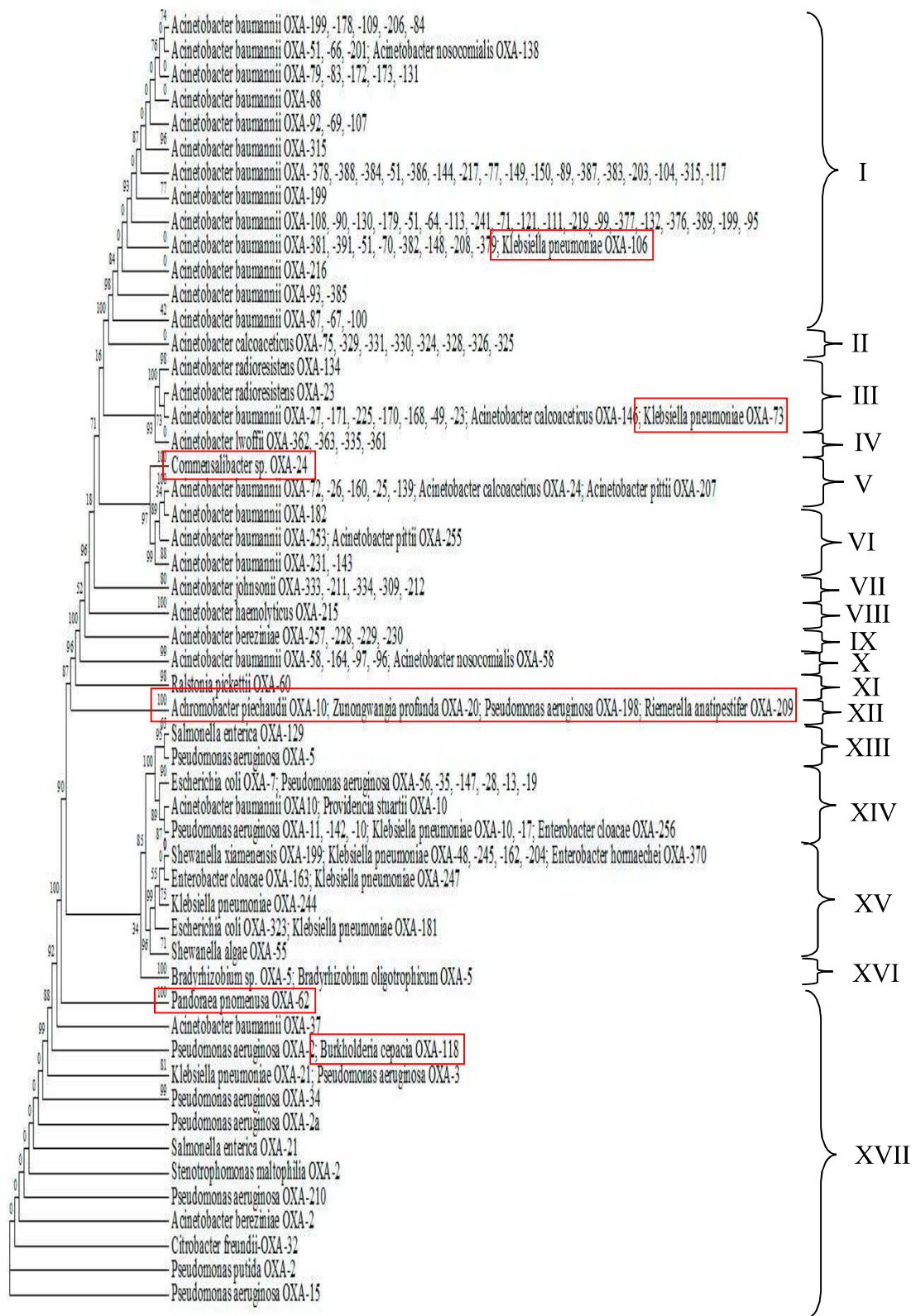


Figura 5: Árvore filogenética referente as sequências proteicas das OXA β-lactamases. Dezesete agrupamentos foram identificados por algarismos romanos, pertencentes a 16 grupos das OXA, sendo o grupo I das OXA-51-like, o grupo II das OXA-213-like, o grupo III das OXA-23-like, o grupo IV das OXA-134a-like, o grupo V das OXA-24/40-like, o grupo VI das OXA-143-like, o grupo VII das OXA-211-like, o grupo VIII das OXA-214-like, o grupo IX das OXA-229-like, o grupo X das OXA-58-like, o grupo XI das OXA-60-like, o grupo XII de novas variantes, o grupo XIV das OXA-10-like, os grupos XIII e XVI das OXA-5-like, o grupo XV das OXA-48-like, e o grupo XVII das OXA-2-like.

O agrupamento I é formado por sessenta e cinco variantes do grupo OXA-51-like, presentes principalmente em *A. baumannii* (96.9%), e suportado por *bootstrap* de 98%. As variantes deste grupo foram encontradas principalmente em *A. baumannii*, no entanto, também foi observado as variações OXA-138, presente em *Acinetobacter nosocomialis*, e OXA-106, presente em *K. pneumoniae*. O grupo das OXA-51-like apresentam resistência a carbapenems, imipenem, meropenem, cefalotina, ampicilina-sulbactama e outros antibióticos (JOURNAL, 2012).

O maior grupo das OXA β -lactamase pertencente ao grupo das OXA-51-like, são geralmente relatadas em *A. baumannii*, sendo descrito como intrínseco ao cromossomo desta espécie, assim como suas variantes OXA -64, -71, -77, -84, -100, -113, -172, -208 e -241, e sempre sendo correlacionados em análises filogenéticas (BROWN; AMYES, 2005; EVANS; AMYES, 2014; EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013; FERNANDEZ et al., 2012; HÉRITIER et al., 2005; IKONOMIDIS et al., 2007; TURTON et al., 2006; VAHABOGLU et al., 2006; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

Em estudo filogenético anterior foi mostrado que a evolução das OXAs do grupo funcional das carbapenases está sobretudo confinada a diferentes espécies de *Acinetobacter* e o clado formado pelas OXA-51-like foi o que apresentou menor divergência entre as variantes das OXAs carbapenases estudadas (PAL; TRIPATHI, 2016).

O agrupamento II é formado por oito variantes do grupo OXA-213-like. Este agrupamento é formado apenas por *Acinetobacter calcoaceticus*, sendo suportado por um *bootstrap* de 98%. As variantes OXA-324, -325, 326, -328, -329, -330 e -331 encontradas em *A. calcoaceticus* foram anteriormente descritas como sendo do grupo das OXA-213-like. A sequências de aminoácidos dessas variantes apresentaram aproximadamente de 93% a 97% de similaridade com a sequência OXA-213 (ZANDER et al., 2014).

O agrupamento III é formado por onze variantes do grupo OXA-23-like e é suportado por um *bootstrap* de 100%. As enzimas deste grupo são frequentemente encontradas em plasmídios e tornaram-se determinantes de resistência adquirida a carbapenems mais comumente presentes em *A. baumannii* e também em outras espécies de *Acinetobacter* (EVANS; AMYES, 2014; ZANDER et al., 2014). Enzimas pertencentes

a este grupo apresentam resistência a carbapenems, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (MEDEIROS; LINCOPAN, 2013).

Os genes de várias OXA-23-like foram identificados nos genomas de isolados de *Acinetobacter radioresistens* e a comparação do conteúdo GC do gene *blaOXA-23* de *A. radioresistens* com o conteúdo médio do genoma de *A. baumannii* indica que os genes *blaOXA-23* ocorrem naturalmente em *A. radioresistens* e foram adquiridos recentemente por *A. baumannii* (BONNIN et al., 2012; EVANS; AMYES, 2014; FIGUEIREDO et al., 2010)

Quatro variantes, todas identificadas em *Acinetobacter lwoffii* formam o agrupamento IV e pertencem ao grupo das OXA-134a-like. As OXAs do grupo OXA-134a-like são descritas na literatura como de ocorrência natural na espécie *A. lwoffii* além disso este grupo apresenta 63% de identidade com o grupo OXA-23-like (BONNIN et al., 2012; EVANS; AMYES, 2014; FIGUEIREDO et al., 2010, 2012). Pode-se notar claramente na árvore filogenética das OXAs deste estudo (Fig. 5) que as variantes do grupo OXA-23-like e OXA-134a-like formam um clado suportado por um *bootstrap* de 93%

O agrupamento V pertence ao grupo das OXA-24/40-like, é formado por oito variantes e suportado por um *bootstrap* de 100%. Sete das variantes da OXA-24/40-like estão presentes no gênero *Acinetobacter*, apenas uma das sequências, a OXA-24, estava presente na espécie *Commensalibacter sp.*

A OXA-40 foi primeiramente nomeada como OXA-24 ao ser identificada em isolados na Espanha em 1997, porém posteriormente foi renomeada para OXA-40, e conseqüentemente o nome do grupo foi renomeado para OXA-24/40-like (D'ANDREA et al., 2009; EVANS; AMYES, 2014; POIREL; NORDMANN, 2006). As β -actamases do grupo das OXA-24/40-like conferem resistência principalmente a cefalosporinas e carbapenems de terceira e quarta geração (MEDEIROS; LINCOPAN, 2013)

O agrupamento VI pertence ao grupo das OXA-143-like e possui cinco variantes, as OXA-143, -231, -182, -253, presentes em *A. baumannii*, e a variante OXA-255, presente em *Acinetobacter pittii*. As enzimas pertencentes ao grupo das OXA-143-like, encontradas em plasmídios, foram descritas apenas nessas duas espécies de *Acinetobacter* (EVANS; AMYES, 2014; HIGGINS et al., 2009; MOSTACHIO et al., 2012). A OXA-

182, presente em *A. baumannii*, se agrupa com as sequências referentes ao grupo das OXA-24/40-like, apresentando um *bootstrap* de 34%.

O agrupamento das OXA-143-like e OXA-24/40-like com as OXA-143-like apresenta suporte de 97% de *bootstrap*. A proximidade entre os grupos OXA-143-like e OXA-24/40-like observada no presente estudo, já foi relatada em outros estudos (EVANS; AMYES, 2014). O gene *blaOXA-143* apresenta aproximadamente 80% de similaridade com outras enzimas do grupo OXA-24/40-like (HIGGINS et al., 2009).

O agrupamento VII é formado por cinco variantes do grupo das OXA-211-like, e é suportado por um *bootstrap* de 100%. Todas presentes em *Acinetobacter johnsonii*. Na literatura, estas enzimas são descritas em sua maioria presentes no cromossomo da espécie *Acinetobacter johnsonii* (EVANS; AMYES, 2014; FIGUEIREDO et al., 2012).

O agrupamento VIII é formado por uma OXA-215, presente em *Acinetobacter haemolyticus* e apresentando um *bootstrap* de 96%. Esta variante pertence ao grupo OXA-214-like, sendo encontrada apenas em *Acinetobacter haemolyticus* (EVANS; AMYES, 2014).

O agrupamento IX pertence ao grupo das OXA-229-like, sendo formado por quatro variantes, todas encontradas em *Acinetobacter bereziniae*, e apresentando um *bootstrap* de 99%. As enzimas pertencentes aos grupos OXA-211-like, OXA-214-like e OXA-229-like foram identificadas recentemente, destas, as enzimas pertencentes aos grupos OXA-211-like e OXA-214-like, apresentam aumento na atividade contra imipenens (EVANS; AMYES, 2014; FIGUEIREDO et al., 2012).

O agrupamento X é formado por cinco variantes do grupo das OXA-58-like, e apresenta um suporte de *bootstrap* de 98%. O subtipo OXA-58 foi encontrado tanto em *A. baumannii* quanto em *A. nosocomialis*. É descrito que o grupo das OXA-229-like apresenta 66% de identidade com as enzimas do grupo OXA-58-like, ambos os grupos não apresentam atividade contra ceftazidima, cefotaxima e cefepime (BONNIN et al., 2012).

O agrupamento XI é formado apenas por OXA-60 pertencentes ao grupo OXA-60-like, sendo encontrada apenas em *R. pickettii* e apresentando um suporte de *bootstrap* de 100%. A comparação do conteúdo GC entre o genoma da espécie *R. pickettii* e o gene

blaOXA-60 indica que estes genes ocorrem naturalmente nessa espécie (GIRLICH; NAAS; NORDMANN, 2004b).

O agrupamento XII é formado por novas variantes de OXAs que possuem baixa identidade com a maioria das β -lactamases de classe D, apresenta suporte de *bootstrap* de 65%, e é formado por uma OXA-10 encontrada em *Achromobacter piechaudii*, uma OXA-20 encontrada em *Z. profunda*, uma OXA-198 encontrada em *P. aeruginosa*, e uma OXA-209 encontrada em *R. anatipestifer*. Estas OXAs não se enquadram em nenhum outro subgrupo conhecido de OXAs e não apresentam muita identidade entre si, apresentando apenas 33 sítios conservados entre as sequências de aminoácidos.

Pertencente a um novo grupo das β -lactamases da classe D, a OXA-198, apresentam baixa identidade com sequências dos demais grupos de OXA β -lactamases, e oferecem resistência principalmente a penicilinas e alguns carbapenems (EL GARCH et al., 2011). A primeira identificação de β -lactamases em *R. anatipestifer* é referente a OXA-209, encontrada em plasmídeo, e apresentando 80% de identidade com OXA-10 identificadas em *Bacterioides sp.* (CHEN et al., 2012).

O agrupamento XIII pertence ao grupo das OXA-5-like, com suporte de 95% de *bootstrap*, e é formado por uma OXA-129 encontrada em *Salmonella enterica* e por uma OXA-5 encontrada em *P. aeruginosa*. As sequências de aminoácidos das OXA-5 e OXA-129 apresentam menos de 81% de identidade com as variantes OXA-10-like (POIREL et al., 2010).

O agrupamento XIV é formado por variantes OXA-10-like, apresentando suporte de 89% de *bootstrap*, é formado por quinze variantes, a maioria encontradas principalmente em *P. aeruginosa*, mas também identificadas em *A. baumannii* e em enterobactérias. A OXA-10, já foi identificada em plasmídeos presentes nas espécies *Providencia stuartii* e *P. aeruginosa* (EVANS; AMYES, 2014; POIREL et al., 2004; VILLA et al., 2013).

As enzimas pertencentes ao grupo das OXA-10-like são bastante difundidas entre as espécies bacterianas gram-negativas, sendo encontrada frequentemente em *P. aeruginosa*, e os genes codificadores destas enzimas são geralmente encontrados em elementos móveis como plasmídios, transposons e integrons (CHEN et al., 2012; EL GARCH et al., 2011; POIREL et al., 2001; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010; PORTO et al., 2010; QIN et al., 2010).

O agrupamento XV é formado por doze variações do grupo OXA-48-like, é restrito as bactérias da família Enterobacteriaceae, principalmente *K. pneumoniae*, e apresentando um suporte de 96% de *bootstrap*. Foi descrito que este grupo, apesar de possuir os motivos YGN e KTG conservados, não apresenta a ponte hidrofóbica em seu sítio ativo, porém outras regiões da enzima apresentam a característica de ser hidrofóbica (DOCQUIER et al., 2009; EVANS; AMYES, 2014). Foi proposto que espécies do gênero *Shewanella* seriam provavelmente a hospedeira original destas enzimas, devido a quantidade de enzimas não nomeadas e relacionadas encontradas nestas espécies (EVANS; AMYES, 2014).

O agrupamento XVI reúne duas sequências identificadas como OXA-5, encontradas no gênero *Bradyrhizobium*, e apresentando suporte de 100% de *bootstrap*. Essas sequências não formam um grupo com as sequências do agrupamento XIII e o alinhamento das sequências OXA-5 identificadas em *Bradyrhizobium* apresentam apenas 34 sítios conservados com as sequências OXA-5 de *P. aeruginosa* e da OXA-129 de *S. enterica*.

Os agrupamentos XIII, XIV, XV e XVI referentes aos grupos OXA-10-like, OXA-5-like e OXA-48-like, formam um clado com baixo suporte de 34% de *bootstrap*. Este agrupamento ocorre em razão da homologia estrutural que estes grupos possuem, apresentando uma trajetória evolutiva diferenciada dos demais grupos de OXA β -lactamases (COUTURE; LACHAPELLE; LEVESQUE, 1992; DOCQUIER et al., 2009; EVANS; AMYES, 2014).

As últimas quinze sequências, formam o grupo XVII e pertencem ao grupo das OXA-2-like, formadas pelos subtipos OXA -34, -32, -2, -210, -3, -21, -62 e -15, encontradas em *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *A. baumannii*, *A. bereziniae*, *Burkholderia cepacia*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. enterica* e *Pandorea pnomenusa*, todas possuindo baixos valores de *bootstrap*.

As enzimas OXA-2-like formam um grupo distinto e apresentam uma baixa homologia com os demais grupos de OXA β -lactamases, sugerindo que este grupo tenha sido um dos primeiros a se divergirem (EVANS; AMYES, 2014; JORIS et al., 1988; PEREIRA; NETHSRLANDS, 1995).

Desta forma, a análise da árvore filogenética baseada nas sequências proteicas das OXA β -lactamases, confirmou que a formação dos ramos estão em congruência com a divisão das OXA β -lactamases em grupos, divididos de acordo com as homologias estruturais, apresentando valores de *bootstrap* entre 65% e 100% em cada agrupamento observado (COUTURE; LACHAPELLE; LEVESQUE, 1992; DOCQUIER et al., 2009; EVANS; AMYES, 2014).

A grande diversidade das OXA β -lactamases ocorre em razão dos processos evolutivos que estas enzimas sofreram no decorrer dos anos, diminuindo a similaridade e ampliando o espectro de ação destas enzimas (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995a; FRÓES et al., 2016; JACOBY, 2006; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

Inicialmente as OXA β -lactamases apresentavam resistência apenas a penicilinas e a oxacilinas, contudo, atualmente são encontradas variações enzimáticas que possuem ação contra cefalosporinas, cefotaximas, carbapenêmicos, imipenêmicos, entre outros antibióticos (BONNIN et al., 2012; BUSH, 1989; DOCQUIER et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2012; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

4.3. RECONSTRUÇÃO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS ANCESTRAIS DAS OXA β -LACTAMASES

A partir da análise filogenética das OXAs foram geradas duas sequências ancestrais hipotéticas que representam a origem de toda a diversidade atual dessas enzimas (Tabela 4). As sequências ancestrais reconstruídas foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados do *GenBank*, utilizando a ferramenta *BlastP*, para analisar prováveis semelhanças com as sequências atuais.

A sequência ancestral, denominada AnOXA1, apresentou 64% de identidade com outras enzimas OXAs da família OXA-60 identificada em *R. pickettii* e outras espécies de *Ralstonia* (JOHNSON et al., 2008). A sequência ancestral, denominada AnOXA2, apresentou 58% de identidade com outras enzimas OXAs da família OXA-10 identificadas em bactérias gram-negativas como *E.coli* e *P. aeruginosa* (JOHNSON et al., 2008). Esses resultados mostram que as oxacilinas evoluíram, pelo menos, a partir de duas sequências ancestrais diferentes.

Tabela 4: Sequências ancestrais geradas através das análises filogenéticas individuais das sequências proteicas das OXA β -lactamases

β -lactamase	Sequência
AnOXA 1 242 aa	AASLVSTQEQEVRNDKKLFD EAGVKGTFVLYDAQNNKTYVN DPAKAKKRYLPASTFKIPNSLIALETGAVKDEQVFKWDGKPRP FKAWERDMTLREAMQVSAVPVYQEIARRIGPERMQKYVNRFD YGNRQIGSAIDQFWLKGPLKISAIEEVQFVRRLLALKQLPFPKPT QQMVKEMMLIEQQGDYTLYAKTGWQIGWWVGWVERPGNVY AFALNIDMPNENDMAKRMQLTKQILKELGIF
AnOXA 2 242 aa	AAPLVASTEIQEVRNWKKLFD EEGVKGTFVLYDAQNNQYYTN DAARAKKRYLPASTFKIPNSLIALETGAVKDEHVFKWDGKPRS FKAWERDQTLRSAMQVSAVPVYQEIARRIGPERMQKYL NKFN YGNRDIGGGIDQFWLDGQLRISAIEQVDFLRRLLYLNKLPFSERT QRMVKEMMIIEQTPDYILHAKTGWQIGWWVGWVERPGNVYF FALNIDMPNENDL PARMQITKQILKDLGIL

aa = aminoácidos

As duas primeiras sequências de OXA β -lactamases identificadas apresentavam o motivo STFK conservado, assim como grande parte das enzimas pertencentes a esta família, porém, possuíam apenas 48% de homologia entre suas sequências (EVANS; AMYES, 2014). Assim como as sequências atuais estudadas, as sequências ancestrais inferidas das enzimas OXA β -lactamases também apresentaram os motivos STFK, YGN e KTG conservados.

As sequências proteicas das OXA β -lactamases pertencentes a classe D apresentam baixa similaridade entre si, apresentando menos sítios conservados que as demais classes de β -lactamases (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995a; FRÓES et al., 2016; JACOBY, 2006; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006)

Foi, então, analisada a presença dos domínios funcionais conservados para cada sequência ancestral das OXA β -lactamases reconstruída. Ambas as sequências ancestrais da mostraram a presença do domínio conservado transpeptidase da família das proteínas de ligação à penicilina, sendo o sítio ativo de serina conservado em todos os membros desta família (AMBLER, 1980; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995b; FRÓES et al., 2016; HOCQUET et al., 2011).

O domínio conservado da transpeptidase das sequências ancestrais das β -lactamases do tipo OXA apresentou o parâmetro de confiabilidade significativa, com E-

value maior que e^{-30} . A presença do domínio conservado da transpeptidase confere uma homologia estrutural entre as proteínas pertencentes a classe D das β -lactamases com outras proteínas que possuem o mesmo domínio conservado, como as DD-peptidases e proteínas pertencentes as classes A e C de β -lactamases (HALL; BARLOW, 2003).

Apesar da presença de três motivos conservados pertencentes ao domínio das transpeptidases em ambas as ancestrais a baixa homologia entre as sequências proteicas indicam a possibilidade das OXA β -lactamases de terem evoluído de pelo menos duas sequências ancestrais. Ainda, a identificação do domínio conservado da transpeptidase nas OXA β -lactamases indica uma ancestralidade comum com as demais enzimas pertencentes a família das serina β -lactamases e com as DD-peptidases (HALL; BARLOW, 2003, 2004).

4.4. INFERÊNCIA DA TGH ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Além da diversidade, os genes codificadores das OXAs também sofrem transferência horizontal. A topologia da árvore filogenética referente ao 16S rDNA apresentou congruência com a taxonomia esperada dos organismos, onde é possível observar a separação dos grupos a nível de filo, classe e família (Figura 6) (FEDERHEN, 2015). A topologia da árvore filogenética referente as sequências proteicas das OXA β -lactamases, por sua vez, não apresentou congruência com a filogenia taxonômica dos grupos estudados (Figura 5).

Algumas espécies não se agrupam por famílias ou classes. Bactérias das classes Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria e do filo Bacteroidetes se encontram agrupadas entre as bactérias da classe Gammaproteobacteria formando agrupamentos com baixos suportes de *bootstrap*. A comparação da árvore filogenética dos genes 16S rDNA com a árvore das OXA β -lactamases apresenta várias incongruências, como o fato das enterobactérias estarem separando as espécies do gênero *Pseudomonas*, pertencentes a classe Gammaproteobacteria, porém não entéricas, agrupando-se com elas.

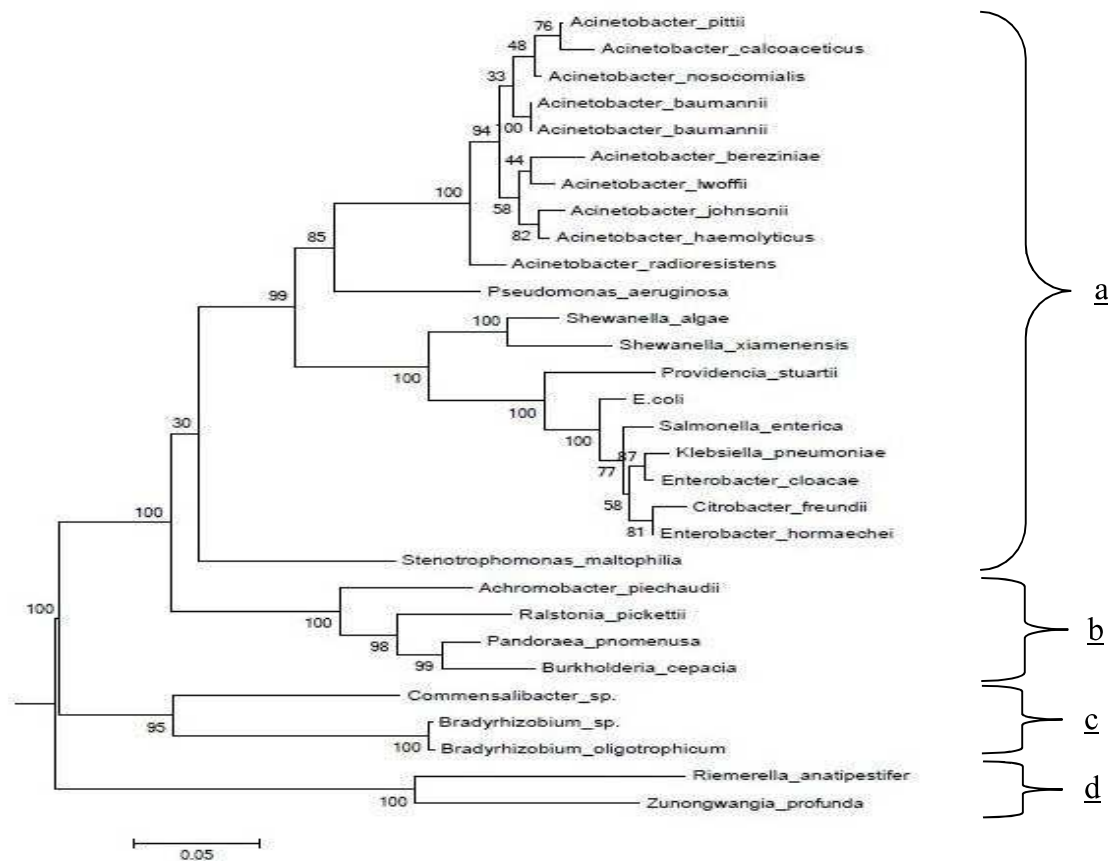


Figura 6: Árvore filogenética baseada nas seqüências nucleotídicas do gene 16S rDNA de espécies bacterianas que podem produzir BlaOXA. Na árvore do 16S rDNA, a nível de classe, se observa a divisão de quatro ramos. O agrupamento a possui o maior número de espécies bacterianas selecionadas, formando a classe das Gammaproteobacteria. O agrupamento b e c são referentes as classes Betaproteobacteria e Alphaproteobacteria, respectivamente. Os organismos mais distantes filogeneticamente, por sua vez, formam o agrupamento d, pertencentes a classe Flavobacteria, e ao filo Bacteroidetes.

O primeiro agrupamento incongruente com a filogenia dos organismos presente na árvore filogenética das enzimas OXA β -lactamases é referente a seqüência OXA-106 presente na espécie *K. pneumoniae* (VAIDYANATHAN, V., SRINIVASAN, V.B. AND GOVINDAN, 2012) que se agrupa com seqüências pertencentes ao grupo das OXA-51-like presentes na espécie *A. baumannii*.

Genes que codificam as enzimas do grupo das OXA-51-like são descritos como intrínsecos a espécie *A. baumannii*, podendo ser encontrados também em *A. nosocomialis* (EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013; IKONOMIDIS et al., 2007; KARUNASAGAR et al., 2011; SAFARI et al., 2015). As β -lactamases comumente detectadas na espécie *K. pneumoniae*, por sua vez, pertencem principalmente ao grupo das OXA-48-like

(ÇETINKOL et al., 2016; CUZON et al., 2008; LAURENT et al., 2004; STOLLE et al., 2013).

A segunda incongruência entre as árvores filogenéticas também é referente a espécie *K. pneumoniae*, que se agrupa com a espécie *A. baumannii* no grupo das OXA-23-like. Frequentemente encontrada em plasmídios, as enzimas pertencentes ao grupo das OXA-23-like tem sido relatadas na espécie *K. pneumoniae* (EVANS; AMYES, 2014; EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013; TURTON et al., 2006).

A terceira incongruência é a presença da espécie bacteriana *Commensalibacter sp.* da classe das Alphaproteobacteria dentro do agrupamento do gênero *Acinetobacter*, que pertencem a classe das Gammaproteobacteria. A sequência proteica presente na espécie *Commensalibacter sp.* pertence ao grupo das OXA-24/40-like e apresenta suporte de 97% de *bootstrap* na formação do agrupamento com as demais OXA-24/40-like e com as OXA-143-like.

Os genes codificadores das enzimas do grupo OXA-24/40-like são geralmente encontrados em cromossomos ou plasmídios presentes nos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas* (D'ANDREA et al., 2009; EVANS; AMYES, 2014; POIREL; NORDMANN, 2006). A bactéria *Commensalibacter sp.* além de se agrupar em meio à outras espécies do gênero *Acinetobacter* está distante das espécies do gênero *Bradyrhizobium* que também são Alphaproteobactérias e agrupam-se juntas compartilhando a presença do gene codificador da OXA-5. Assim a presença do gene OXA-24 no genoma de *Commensalibacter* indica que ele pode ter sido adquirido por TGH.

Uma quarta incongruência é formada pelo agrupamento de espécies filogeneticamente distantes que apresentam sequências pertencentes a um novo grupo de OXA β -lactamases e suporte de 65% de *bootstrap*, indicando que estas enzimas podem ter sido adquiridas por TGH. O grupo é formado pelas espécies *A. piechaudii*, pertencente a classe das Betaproteobacteria, *P. aeruginosa* pertencente a classe das Gammaproteobacteria, e *Z. profunda* e *R. anatipestifer*, pertencentes a classe Flavobacteriia e ao filo Bacteroidetes.

A quinta incongruência é referente as sequências pertencentes ao grupo das OXA-2-like, que não formam um agrupamento na árvore filogenética, e estão presentes em

bactérias pertencentes principalmente ao gênero *Pseudomonas* (Figura 13). Enzimas pertencentes a este grupo de β -lactamases além de não apresentarem alta homologia entre si, também são frequentemente encontradas em transposons e integrons (PEREIRA; NETHSRLANDS, 1995; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

As incongruências entre as árvores baseadas nas sequências proteicas das OXA β -lactamases e nas sequências do gene 16S rDNA permitiram a inferência de possíveis eventos de transferência horizontal desses genes de resistência. A filogenia obtida com o gene 16S rDNA tende a mostrar a relação evolutiva entre as bactérias devido as características destes genes de serem homólogos e altamente conservados apresentando alguns domínios variáveis, possuem evolução mais lenta comparados aos genes codificadores de proteínas (PATWARDHAN; RAY; ROY, 2014; WADE, 2002).

É esperado encontrar incongruências entre as árvores, pois a filogenia das sequências das OXA β -lactamases reflete particularmente a história evolutiva do próprio gene (WADE, 2002). Os genes de resistência codificadores das OXA β -lactamase são extremamente diversos e muitas vezes são carregados em plasmídeos ou aparecem próximos a elementos móveis o que facilita a TGH dos mesmos (PEREIRA; NETHSRLANDS, 1995; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

Portanto, a análise entre as árvores filogenéticas confirmou que a topologia da árvore baseada nas sequências das enzimas OXA β -lactamases difere significativamente da árvore baseada no gene 16S rDNA. Muitos dos ramos formados na filogenia baseada nas OXA β -lactamases apresentaram baixos valores de *bootstrap* (<30), enquanto que os ramos da árvore baseada no 16S rDNA apresentaram altos valores de *bootstrap*. Essas diferenças nas topologias das árvores e os dados encontrados de outros estudos sobre os genes codificadores das OXA β -lactamase mostram que muitos destes genes estão sujeitos a transferência horizontal gênica. Consequentemente, o processo da TGH apresenta importante impacto na disseminação da resistência aos β -lactâmicos.

4.5. ANÁLISE DAS RELAÇÕES EVOLUTIVAS DAS OXACILINASES E DEMAIS CLASSES DE β -LACTAMASES

Devido as divergências entre as sequências proteicas das enzimas das diferentes classes de β -lactamases, torna-se impossível realizar uma análise filogenética entre todas

as classes (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995a; HALL; BARLOW, 2003). Assim, foi utilizado o método de reconstrução da sequência ancestral como estratégia para a análise da evolução molecular das diferentes classes de β -lactamases.

As TEM β -lactamases, pertencentes a classe A, contém entre 273 e 301 resíduos de aminoácidos (aa), e variam entre si pela divergência entre 1 e 18 aminoácidos. Substituições na sequência de aminoácidos levam a alterações quanto a resistência aos antibióticos (PINHEIRO, 2013; QUEENAN; BUSH, 2007; SALVERDA; DE VISSER; BARLOW, 2010). As sequências analisadas neste estudo apresentaram 62 sítios conservados, dentre eles os resíduos de serina (Ser81), a treonina (Thr82), e a lisina (Lys84), pertencentes ao motivo STFK, apenas duas sequências apresentaram modificação da fenilalanina (Phe) pela histidina (His), na posição 83.

Pertencente a classe B, as VIM β -lactamases contém entre 265 e 345 resíduos de aminoácidos (aa) e variam de um para outro pela modificação entre 1 e 17 aminoácidos que podem levar a alterações estruturais, e resultar na alteração da ligação da enzima com o substrato (DOCQUIER et al., 2003; PINHEIRO, 2013). As sequências referentes as enzimas VIM apresentaram 179 resíduos conservados, dentre eles o motivo HFHDD, da posição 193 a 197, que é necessário para a funcionalidade da enzima (MURPHY et al., 2003).

As AmpC β -lactamases, pertencentes a classe C, contém entre 361 e 404 resíduos de aminoácidos (aa). Estas enzimas fazem parte das serina β -lactamases, possuindo o motivo conservado SXXK e um motivo homólogo ao SXD das β -lactamases da classe A, o YAN (PINHEIRO, 2013; PRATT, 2016). As sequências proteicas referentes as AmpC apresentaram 169 sítios conservados, dentre eles dois resíduos serina (Ser130 e Ser132), e a lisina (Lys133), pertencentes ao motivo SXXK na posição 130 a 133, e o resíduo alanina (Ala217) e o resíduo asparagina (Asn218), pertencentes ao motivo YAN.

Para cada conjunto de sequências proteicas das classes de β -lactamases analisadas filogeneticamente foram reconstruídas duas sequências ancestrais, conforme as ramificações das árvores filogenéticas de cada tipo enzimático, visto que as árvores geradas pelo *software* PhyML não apresentaram um único nó enraizando as árvores. Essas sequências foram identificadas como AnTEM 1, AnTEM 2, AnVIM 1, AnVIM 2, AnAmpC 1, AnAmpC 2, AnOXA 1 e AnOXA 2 (Tabela 6).

Tabela 5: Sequências ancestrais geradas através das análises filogenéticas individuais das sequências proteicas das TEM, VIM, AmpC e OXA β -lactamases

β -lactamases	Sequência
AnTEM 1 268 aa	MQHFRLCLIPLFAALPAFAHPATLDTVKDAEDQLNARVGYAELDLAS GKMLDSYRPEERFPMMS STFK VLLCGAVLSRVDAGQEQLDRRIHYRQ NDLVEYSPVTEKHLTDGMTVGELCSAAITMS SDNTA ANLLLSTIGGPS GLTAFLR KTG DHVTRLDRWETELNEALPGDERDTTTPPEAMAQTLHN LLTGKILTAASQQQLMDWMEADKVAGPLLRVLPAGWFIADKTGA GERGSRGIVAALGPDGKPSRIVVIYLTETQATMDERN
AnTEM 2 268 aa	MQHFRLCLIPLLAALPVFAHPATLDTIKDAESQLNGRVGYAELDLAS GKMLDSYRPDERFPMMS STFK VLLCGAVLARVDAGQEQLDRRIHYRQ NDLVEYSPVTEKHLADGMTVGELCSAAITMS SDNTA ANLLLSTIGGPS GLTAFLR KTG DHVTRLDRWETELNEALPGDERDTTTPESMAQTLHN LLTGKALSAASQQQLMRWMEMDKVAGPLLRVLPAGWFIADKTGA GERGSRGIVAALGPDGKPSRIVVIYLTGTQATMDERN
AnVIM 1 266 aa	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLY QIADGVWSHIATQSFDAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTVA LLAEIEKQIGLPVTRS VSTHFHDDR RVGGVDVLRAGVATYASPSTRR LAEAEAGNEVPTHSLLEGLSSSGDAVRFPGVELFYPGAHHSTDNLVVYV PSANVLYGGCAVHELSTASAGNVADADLAEWPTSVERIQQHYPEAE VVIPGHGLPGGLDLLQHTANVVKAHNRSVAE
AnVIM 2 266 aa	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLY QIADGVWSHIATQSFDAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAA LLAEIEKQIGLPVTRAV STHFHDDR RVGGVDVLR
AnVIM 2 266 aa	AGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPHTSLEGLSSSGDAVRFPGVELFYPG AAHSTDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTASAGNVADADLAEWPT SVERIQQHYPEAEVVIPGHGLPGGLDLLQHTANVVKAHNRSVAE
AnAmpC 1 377 aa	MFKTTLCALLITASCSTFAAPQQINDIVHRTITPLIEQQKIPGMVAVI YQGKPYFTWGYADIAKKQPVTQQTLFELG SVSK TFTGVVGGDAIA RGEIKLSDPTTKYWPELTAKQWNGITLLHLATYTAGGLPLQVPDEVK SSDLLRFYQNWQPAWAPGTQRL YAN SSIGLFGALAVKPSGLSFEQA MQTRVFQPLKLNHTWINVPPAEEKNYAWGYREGKAVHVSPGALDA ETYGVKSTIEDMACWVRSNMNPRDINDKTLQGGIQLAQSRYWQTGD MYQGLGWEMLDWPVNPDIIVNG SDN KIALAARPVKAITPPTPAVRAS WVH KTG ATGGFGSYVAFIPEKELGIVMLANKNYPNPARVAAAQIL NALQ
AnAmpC 2 377 aa	MFKTTLCALLITASCSTFAAPQQINDIVHRTITPLIEQQKIPGMVAVI YQGKPYFTWGYADIAKKQPVTQQTLFELG SVSK TFTGVVGGDAIA RGEIKLSDPTTKYWPELTAKQWNGITLLHLATYTAGGLPLQVPDEVK SSDLLRFYQNWQPAWAPGTQRL YAN SSIGLFGALAVKPSGLSFEQA MQTRVFQPLKLNHTWINVPPAEEKNYAWGYREGKAVHVSPGALDA ETYGVKSTIEDMACWVRSNMNHRDINDKTLQGGIQLAQSRYWQTG DMYQGLGWEMLDWPVNPDIIVNG SDN KIALAARPVKAITPPTPAVR ASWVH KTG ATGGFGSYVAFIPEKELGIVMLANKNYPNPARVAAAQIL NALQ

aa = aminoácidos

As sequências ancestrais reconstruídas neste estudo foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados do *GenBank*, utilizando a ferramenta *BlastP*, para analisar prováveis semelhanças com as sequências atuais. Para cada classe das β -lactamases foram obtidos resultados de similaridade, destacando-se os cinco primeiros resultados do *BlastP* para cada classe.

Para as sequências ancestrais AnTEM 1 e AnTEM 2, foi observada a similaridade com β -lactamases da família TEM, todas identificadas em bactérias da família das Enterobacteriaceae. Encontrada principalmente em bactérias gram-negativas, as TEM β -lactamases aparecem presentes em transposons e plasmídios (BRADFORD, 2001; PARTRIDGE; HALL, 2005; PINHEIRO, 2013).

As sequências ancestrais das enzimas TEM β -lactamases também apresentaram os motivos STFK e KTG conservados, as ancestrais das AmpC β -lactamases os motivos SXXK e YAN, e as ancestrais das VIM β -lactamases o motivo HFHDD. O motivo SXXK das AmpC deriva do motivo STFK presente nas serinas β -lactamases, apresentando a conservação dos sítios serina e lisina mantendo a funcionalidade da enzima (FRÓES et al., 2016; PRATT, 2016).

As sequências ancestrais AnAmpC 1 e AnAmpC 2, apresentaram similaridade de 99% com sequências de enzimas β -lactamases da classe C encontradas em bactérias da espécie *E. coli*. Para as sequências ancestrais AnVIM 1 e AnVIM 2, foi observada a similaridade com sequências de proteínas metalo- β -lactamases encontradas em bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae.

Foi, então, analisada a presença dos domínios funcionais conservados para cada sequência ancestral reconstruída. Ambas as sequências ancestrais da TEM β -lactamase mostraram a presença do domínio conservado transpeptidase da família das proteínas de ligação à penicilina, sendo o sítio ativo de serina conservado em todos os membros desta família. Este domínio também está presente nas ancestrais AnAmpC 1, AnAmpC 2, AnOXA 1 e AnOXA 2.

As classes A e C, assim como a classe D, também pertencem a família das serinas β -lactamases apresentando domínio conservado da transpeptidase contendo o resíduo serina catalítico no sítio ativo da enzima (AMBLER, 1980; BERTONCHELI; HÖRNER,

2008; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995b; FRÓES et al., 2016; HOCQUET et al., 2011).

O domínio conservado da transpeptidase, presente nas serina β -lactamases, possui importante papel na síntese da parede celular bacteriana e apresenta três motivos conservados, o SXXK, o SXN e o KTG observados nas sequências AnAmpC 1, AnAmpC 2, AnOXA 1, AnOXA 2, AnTEM 1 e AnTEM 2 (EVANS; AMYES, 2014; FEDAROVICH; NICHOLAS; DAVIES, 2012; MACHEBOEUF et al., 2006; MASSOVA; MOBASHERY, 1998; SAUVAGE et al., 2008; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

A classe B, pertence a família das metalo β -lactamases, apresenta domínio da super família das metalo- β -lactamase contendo o motivo conservado HXHXD que coordena a atividade da enzima juntamente com ions zinco, para a formação de uma ponte hidrofóbica, mantendo a atividade catalítica da enzima de quebrar o anel β -lactâmico dos antibióticos (AMBLER, 1980; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995b; MURPHY et al., 2003; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

Esse domínio foi identificado nas sequências AnVIM 1 e AnVIM 2. As β -lactamases da classe B divergem das demais classes de β -lactamases por não apresentarem o motivo conservado SXXK, no entanto, o motivo conservado HFHDD apresenta atividade semelhante ao SXXK, viabilizando a formação da via hidrolítica e assim conferindo resistência aos antibióticos que não são inibidos pelas serinas β -lactamases (MURPHY et al., 2003; SINGH; SAXENA; SINGH, 2009).

Portanto, a análise das sequências ancestrais das β -lactamases indica que existe uma divisão entre estas enzimas de acordo com o mecanismo de ação em duas famílias, a família das serinas β -lactamases e a família das metalo β -lactamases.

4.6. MODELOS TRIDIMENSIONAIS DAS SEQUÊNCIAS ANCESTRAIS DAS β -LACTAMASES

O Programa I-Tasser apresentou cinco possíveis modelos estruturais para cada uma das sequências das proteínas ancestrais, o qual apenas um foi selecionado para a continuidade das análises quanto a homologia proteica das β -lactamases (Figura 7),

levando em conta o modelo que apresentou melhor homologia com as sequências na análise do *Treading*.

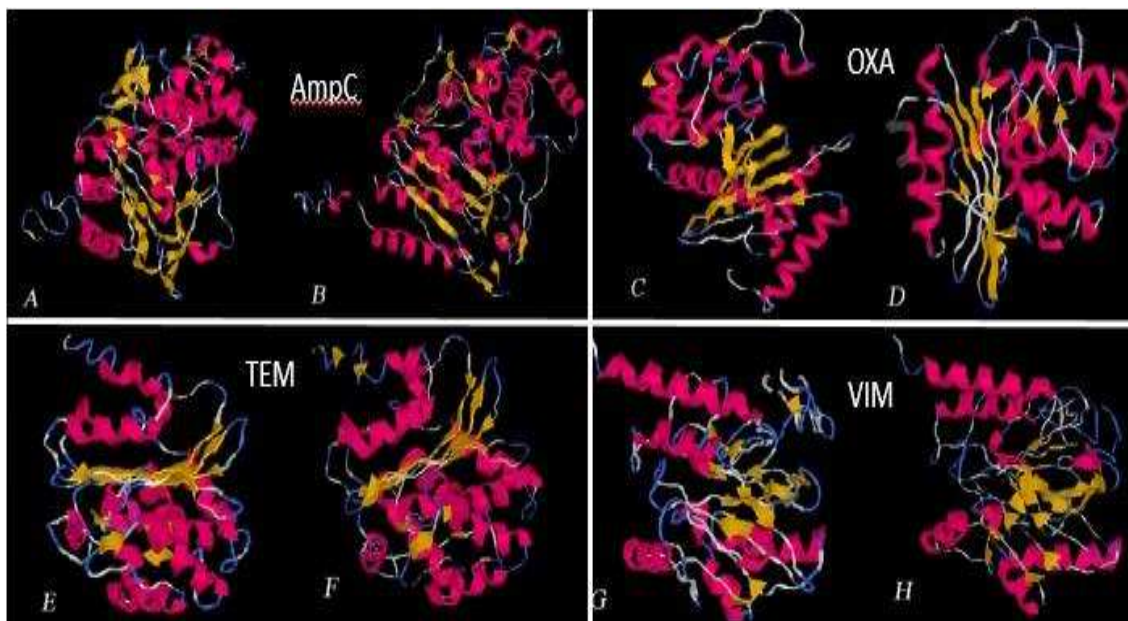


Figura 7: **A.** Modelo tridimensional da AnAmpC 1. **B.** Modelo tridimensional da AnAmpC 2. **C.** Modelo tridimensional da AnOXA 1. **D.** Modelo tridimensional da AnOXA 2. **E.** Modelo tridimensional da AnTEM 1. **F.** Modelo tridimensional da AnTEM 2. **G.** Modelo tridimensional da AnVIM 1. **H.** Modelo tridimensional da AnVIM 2

Devido as divergências entre as sequências de aminoácidos das diferentes classes de β -lactamases, não é possível realizar uma análise filogenética entre todas as classes. É possível, contudo, utilizar a homologia estrutural das β -lactamases para analisar a filogenia do grupo por meio das semelhanças entre as subunidades. Para isso é necessária a construção de um dendograma obtido a partir de uma matriz de distância construída com os valores obtidos da raiz quadrada média das distâncias (RMSD) entre os carbonos alpha das proteínas (HALL; BARLOW, 2003; WOOD; PEARSON, 1999; ZHANG; SKOLNICK, 2005).

Os modelos estruturais das proteínas ancestrais foram usados para a comparação de similaridades entre elas, utilizando os valores do RMSD entre duas estruturas proteicas sobrepostas, para a construção de uma matriz de distância referente à similaridade entre as estruturas proteicas (Tabela 6).

Tabela 6: Matriz de Distância dos valores do RMSD dos carbonos alfa das proteínas ancestrais das β -lactamases

	An OXA1	An OXA2	An TEM1	An TEM2	An VIM1	An VIM2	An AmpC1	An AmpC2
AnOXA 1	0.00							
AnOXA 2	1.37	0.00						
AnTEM 1	3.47	3.49	0.00					
AnTEM 2	3.47	3.49	0.74	0.00				
AnVIM 1	5.97	5.70	5.88	6.20	0.00			
AnVIM 2	5.94	5.84	6.36	5.91	1.63	0.00		
AnAmpC 1	3.77	3.63	4.12	4.16	6.06	6.01	0.00	
AnAmpC 2	3.72	3.62	4.10	4.15	6.01	6.12	1.12	0.00

A análise da matriz de distância dos valores do RMSD das ancestrais das β -lactamases indica que também existe uma divisão estrutural entre as enzimas da família das serinas β -lactamases e da família das metalo β -lactamases. As estruturas tridimensionais referentes as proteínas ancestrais da classe B, AnVIM 1 e AnVIM 2, são as que mais se distanciam dos modelos proteicos das demais classes de β -lactamases, apresentando em média valores de RMSD de 5.70 a 5.97 para as estruturas proteicas das AnOXA, 6.01 a 6.12 para as estruturas proteicas das AnAmpC, e 5.88 a 6.36 para as estruturas proteicas das AnTEM.

A sobreposição entre as estruturas proteicas das AnTEM com as AnOXA apresentaram valores de RMSD entre 3.47 a 3.49, e a sobreposição entre as estruturas das proteínas AnTEM e AnAmpC apresentaram valores de RMSD variando entre 4.10 a 4.16. Estes valores de RMSD indicam que as enzimas pertencentes a classe A das β -lactamases são mais similares as enzimas pertencentes a classe D que as enzimas pertencentes a classe C.

Foi descrito que, os modelos estruturais de proteínas pertencentes a classe A possuem mais similaridade com proteínas pertencentes a classe D que com estruturas pertencentes a classe C, e que estas três classes de β -lactamases também apresentam homologia com as proteínas de ligação a penicilina (PBPs) ou DD-peptidases (BRANDT et al., 2017; FRÓES et al., 2016; HALL; BARLOW, 2003; MEDEIROS, 1997; PINHEIRO, 2013).

Estudos mostraram que, apesar de se tratar de classes diferentes, as estruturas proteicas das serina β -lactamases apresentam aminoácidos homólogos em regiões equivalentes aos aminoácidos da DD-peptidase (HALL; BARLOW, 2003). Por meio de análise do RMSD entre as estruturas das DD-peptidases com as β -lactamases, foi observado que as DD-peptidases são as prováveis ancestrais das serina β -lactamases (HALL; BARLOW, 2003, 2004; JORIS et al., 1988).

Os modelos das proteínas ancestrais também foram comparados com estruturas proteicas atuais de proteínas depositadas no banco de dados PDB, mostrando similaridade com β -lactamases atuais correspondentes a suas respectivas classes. Foram selecionadas duas proteínas com similaridade às sequências ancestrais de cada classe para a construção da matriz de distância.

A partir destas sequências foram selecionados os modelos tridimensionais destas proteínas atuais das classes das β -lactamases do tipo TEM, VIM, AmpC e OXA, para comparação de similaridade com os modelos ancestrais. Com os dados da Matriz de distância do RMSD das proteínas ancestrais com as proteínas atuais, foi construído um dendograma para analisar a filogenia das β -lactamases com base na homologia estrutural (Figura 8).

No dendograma construído com base nos valores do RMSD dos modelos tridimensionais, as β -lactamases ancestrais se agruparam respectivamente com as proteínas recentes referentes a suas classes, formando quatro grupos. Através dos

modelos tridimensionais podemos observar um reflexo da classificação existente para as β -lactamases de acordo com sua estrutura primária (AMBLER, 1980; HALL; BARLOW, 2003), ou de acordo com sua função (BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995b; HALL; BARLOW, 2003).

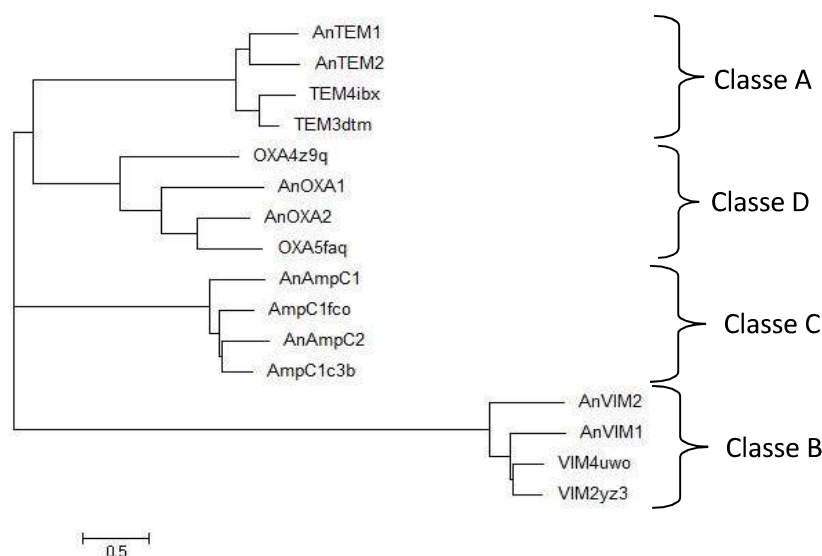


Figura 8: Dendrograma da distância entre os modelos das proteínas ancestrais em relação as proteínas atuais de cada classe de β -lactamase estudada

Assim como mostrado na análise dos modelos tridimensionais das proteínas ancestrais das β -lactamases, o dendrograma das estruturas ancestrais com as estruturas atuais também indica uma ancestralidade comum entre as classes A e D. O agrupamento entre as enzimas β -lactamases do tipo AmpC, classe C, e do tipo VIM, classe B, formam ramos independentes.

Os domínios conservados SXXK e KXG moldam o sítio ativo das estruturas tridimensionais das proteínas, diminuindo a distância entre as classes de β -lactamases por interações a nível atômico, assim, as enzimas das classes A, C e D de β -lactamases são agrupadas pela proximidade das estruturas secundárias, apresentando RMSD entre 3.47 e 4.16 (FLUIT; SCHMITZ, 2004; HALL; BARLOW, 2003, 2004; JORIS et al., 1988; SANSCHAGRIN; COUTURE; LEVESQUE, 1995).

Portanto, os dados estruturais e funcionais referentes as sequências das TEM, AmpC e OXA β -lactamases indicam que estas possuem uma ancestralidade comum com

as PBPs, assim, a família das serina β -lactamases podem ter derivado de uma única enzima com função relacionada a síntese da parede celular bacteriana (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; FERNANDEZ et al., 2012; HALL; BARLOW, 2003; HARGIS et al., 2014; JORIS et al., 1988; MEDEIROS, 1997). As β -lactamases da classe B, no entanto, são agrupadas separadamente das demais classes, apresentando uma independência evolutiva caracterizada pela presença do domínio conservado da super família das metalo- β -lactamase contendo o motivo conservado HXHXD.

5. CONCLUSÃO

A análise das sequências proteicas do gene de resistência a β -lactamases do tipo OXA mostram que estão presentes principalmente no gênero *Acinetobacter*, possuem uma grande diversidade, apresentando três motivos bem conservados e uma variabilidade de resíduos de aminoácidos, produzindo novos subtipos de enzimas e permitindo a resistência das bactérias a diversos antibióticos. A comparação entre a filogenia das OXA β -lactamases e o 16S rDNA mostrou que elas são influenciadas por efeitos da transferência gênica horizontal..

A análise estrutural realizada pelos valores do RMSD apresentaram resultados coerentes com as classificações quanto a estrutura primária e quanto a função, propostas por Ambler e Bush, respectivamente, aproximando as enzimas das classes A, C e D. A relação filogenética entre as classes A, C e D foi evidenciada pela conservação dos três motivos presente nas serina β -lactamases e do domínio conservado da transpeptidase, também presente nas DD-peptidases.

As β -lactamases da classe B, no entanto, formaram um grupo independente, pois, apesar da semelhança funcional apresentada pela atividade catalítica destas enzimas com as demais classes, a ausência do domínio conservado da transpeptidase altera a estrutura tridimensional da enzima. No entanto, a presença do domínio da super família das metalo- β -lactamase, com o motivo conservado HXHXD que requer ions de zinco para a formação da via hidrolítica, sugere que estas seguiram por uma via evolutiva distinta.

Por fim, é importante a realização de estudos mais aprofundados para assegurar a provável ancestralidade comum das quatro classes das β -lactamases, a qual parece estar ligada aos motivos conservados e associada com a função enzimática da síntese da parede celular bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; POSADA, D. ProtTest : Selection of best-fit models of protein evolution What can I use ProtTest for ? – Introduction The program : using ProtTest. **Bioinformatics**, v. 21, n. September, p. 1–17, 2005a.
- ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; POSADA, D. **ProtTest ManualBioinformatics**, 2005b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647292>>
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037–1050, 2007.
- ALIX, B.; BOUBACAR, D. A.; VLADIMIR, M. T-REX: A web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. 573–579, 2012.
- AMBLER, R. P. The Structure of β -Lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.
- ANDRADE, D. DE; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. Ocorrência de bactérias multiresistentes em um centro de Terapia Intensiva de Hospital brasileiro de emergências. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 27–33, 2006.
- BAJAJ, P.; SINGH, N. S.; VIRDI, J. S. Escherichia coli β -lactamases: What really matters. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 1–14, 2016.
- BANKSTON, J. Nossa capa: Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 5, p. I–I, 2009.
- BAPTISTA, M. G. D. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. **Dissertação de Mestrado, Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde**, p. 51, 2013.
- BASERGA, R.; PETERSEN, R. D. E. R. 0. Inhibition of DNA synthesis in Ehrlich ascites cells by actinomycin D, II. The presynthetic block in the cell cycle. **DEPARTMENT OF PATHOLOGY, NORTHWESTERN UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL**, v. 54, n. 1963, 1965.
- BERGMAN, B. et al. Trichodesmium - a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 3, p. 286–302, 2013.
- BERTONCHELI, C. D. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. v. 44, 2008.
- BONNIN, R. A. et al. Biochemical and genetic characterization of carbapenem-hydrolyzing β -lactamase OXA-229 from *Acinetobacter bereziniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3923–3927, 2012.
- BRADFORD, P. Extended spectrum betalactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. **Clinical Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 933–951, 2001.
- BRANDT, C. et al. In silico serine β -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species. **Nature Publishing Group**, n.

August 2016, p. 1–13, 2017.

BROWN, J. R. Ancient horizontal gene transfer. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 2, p. 121–132, 2003.

BROWN, S.; AMYES, S. OXA β -lactamases in *Acinetobacter*: The story so far. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 1–3, 2006.

BROWN, S.; AMYES, S. G. B. The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 4, p. 326–328, 2005.

BROWN, S.; YOUNG, H. K.; AMYES, S. G. B. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 1, p. 15–23, 2005.

BUSH, K. Characterization of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 3, p. 259–263, 1989.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995a.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995b.

BUTLER, T. Review article: Plague gives surprises in the first decade of the 21st century in the United States and worldwide. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 4, p. 788–793, 2013.

ÇETINKOL, Y. et al. The investigation of oxacillinase / metallo-beta-lactamase genes and clonal analysis in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. p. 48–53, 2016.

CHAN, J. Z.-M. et al. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 302, 2012.

CHEN, Y. P. et al. Detection of florfenicol resistance genes in *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and geese. **Veterinary Microbiology**, v. 154, n. 3–4, p. 325–331, 2012.

COUTURE, F.; LACHAPELLE, J.; LEVESQUE, R. C. Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D β -lactamases. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1693–1705, 1992.

CUZON, G. et al. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing β -lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3463–3464, 2008.

D'ANDREA, M. M. et al. Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3528–3533, 2009.

- DALLA-COSTA, L. M. et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba , Brazil. v. 41, n. 7, p. 3403–3406, 2003.
- DANEL, F. et al. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 β -lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 785–790, 1997.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.
- DELEO, F. R. et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 13, p. 4988–93, 2014.
- DICKSTEIN, Y. et al. Multicentre open-label randomised controlled trial to compare colistin alone with colistin plus meropenem for the treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative infections (AIDA): a study protocol. **BMJ Open**, v. 6, n. 4, p. e009956, 2016.
- DOBRINDT, U. et al. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 414–424, 2004.
- DOCQUIER, J. D. et al. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 257–266, 2003.
- DOCQUIER, J. D. et al. Crystal Structure of the OXA-48 β -Lactamase Reveals Mechanistic Diversity among Class D Carbapenemases. **Chemistry and Biology**, v. 16, n. 5, p. 540–547, 2009.
- EL GARCH, F. et al. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4828–4833, 2011.
- EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241–263, 2014.
- EVANS, B. A.; HAMOUDA, A.; AMYES, S. G. B. The rise of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 2, p. 223–38, 2013.
- FEDAROVICH, A.; NICHOLAS, R. A.; DAVIES, C. Unusual conformation of the SxN motif in the crystal structure of penicillin-binding protein A from *Mycobacterium tuberculosis*. v. 100, n. 2, p. 130–134, 2012.
- FEDERHEN, S. Type material in the NCBI Taxonomy Database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D1086–D1098, 2015.
- FERNANDEZ, A. et al. Expression of OXA-type and SFO-1 β -lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 1877–1884, 2012.
- FIGUEIREDO, S. et al. OXA-134, a naturally occurring carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Acinetobacter lwoffii*. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy, v. 54, n. 12, p. 5372–5375, 2010.

FIGUEIREDO, S. et al. Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolyzing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 9, p. 907–913, 2012.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Resistance integrons and super-integrons. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 4, p. 272–288, 2004.

FRÓES, A. M. et al. Distribution and Classification of Serine β -Lactamases in Brazilian Hospital Sewage and Other Environmental Metagenomes Deposited in Public Databases. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. November, p. 1–15, 2016.

GEER, L. Y. et al. The NCBI BioSystems database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL.1, 2009.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; LIU, F. Y. Penicillin-binding proteins in bacteria. **Annals of Internal Medicine**, v. 96, n. 4, p. 502–504, 1982.

GIRAUD, E. et al. Legumes Symbioses: Absence of Nod Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. **Science**, v. 316, n. 5829, p. 1307–1312, 2007.

GIRLICH, D.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa* These include : Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2043–2048, 2004a.

GIRLICH, D.; NAAS, T.; NORDMANN, P. OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Ralstonia pickettii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4217–4225, 2004b.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696–704, 2003.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Structure-based phylogenies of the serine β -lactamases. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, n. 3, p. 255–260, 2003.

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

HARGIS, J. C. et al. Can molecular dynamics and QM/MM solve the penicillin binding protein protonation puzzle? **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 5, p. 1412–1424, 2014.

HÉRITIER, C. et al. Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase of *Acinetobacter baumannii* Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4174–9, 2005.

HIGGINS, P. G. et al. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase

in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5035–5038, 2009.

HOCH, M. P.; FOGEL, M. L.; KIRCHMAN, D. L. Isotope fractionation associated with ammonium uptake by a marine bacterium. **Limnology and Oceanography**, v. 37, n. 7, p. 1447–1459, 1992.

HOCQUET, D. et al. Ceftazidime-hydrolysing β -lactamase OXA-145 with impaired hydrolysis of penicillins in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1745–1750, 2011.

IKONOMIDIS, A et al. Low genetic diversity of the intrinsic OXA-51-like class D carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 5, p. 877–881, 2007.

JACOBY, G. A. Beta-lactamase nomenclature. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1123–1129, 2006.

JOHNSON, M. et al. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Web Server issue, 2008.

JORIS, B. et al. The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 dd-peptidase family. **Biochemical Journal**, v. 250, n. 2, p. 313–324, 1988.

JOURNAL, B. First occurrence of. p. 243–246, 2012.

KARUNASAGAR, A. et al. Prevalence of OXA-type carbapenemase genes and genetic heterogeneity in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from Mangalore, India. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 4, p. 239–246, 2011.

KATO, K.; STANDLEY, D. 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.

KELLEY, S. T. et al. Phylogenetic diversity of Pasteurellaceae and horizontal gene transfer of leukotoxin in wild and domestic sheep. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 13–23, 2007.

LAMBERT, P. A. Mechanism of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **J R Soc Med**, v. 95, n. 41, p. S22-26, 2002.

LANGILLE, M. G. I.; HSIAO, W. W. L.; BRINKMAN, F. S. L. Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 329, 2008.

LAURENT, P. et al. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebs. pneu.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2004.

LEE, K. et al. Diversity of TEM-52 extended-spectrum β -lactamase-producing nontyphoidal *Salmonella* isolates in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 493–496, 2003.

LEVIN, B. R.; BERGSTROM, C. T. Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 6981–5, 2000.

- LIVERMORE, D. M. Bacterial Resistance : Origins , Epidemiology , and Impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. Suppl 1, p. 11–23, 2003.
- MACHEBOEUF, P. et al. Penicillin binding proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 5, p. 673–691, 2006.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: Specific functional annotation with the Conserved Domain Database. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, 2009.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: A Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 1, 2011.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI’s conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 2015.
- MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: Protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. WEB SERVER ISS., 2004.
- MASSOVA, I.; MOBASHERY, S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 1–17, 1998.
- MEDEIROS, A. A. Recent increases in resistance: mechanisms and organisms. Evolution and Dissemination of β -Lactamases Accelerated by Generations of β -Lactam Antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. Suppl 1, p. 19–45, 1997.
- MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N. Oxacillinase (OXA) -producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil : clinical and environmental impact and therapeutic options. p. 391–405, 2013.
- MOSTACHIO, A. K. et al. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 5, p. 396–401, 2012.
- MURPHY, T. A et al. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 582–587, 2003.
- NCBI. **GenBank Growth**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/genbankstats.html>.
- NICHOLS, D. A.; RENSLO, A. R.; CHEN, Y. Fragment-based inhibitor discovery against β -lactamase. **Future Med Chem**, v. 6, n. 164, p. 413–427, 2014.
- O’BRIEN, T. F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34 Suppl 3, n. Suppl 3, p. S78–S84, 2002.
- PAL, A.; TRIPATHI, A. An in silico approach to elucidate structure based functional evolution of oxacillinase. **Computational Biology and Chemistry**, v. 64, p. 145–153, 2016.
- PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial

- Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864–870, 2004.
- PARTRIDGE, S. R.; HALL, R. M. Evolution of Transposons Containing bla TEM Genes. **Society**, v. 49, n. 3, p. 1267–1268, 2005.
- PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum β -Lactamases : a Clinical Update. **Society**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.
- PATWARDHAN, A.; RAY, S.; ROY, A. Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. **Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology**, v. 2, n. 2, p. 1–9, 2014.
- PEREIRA, A.; NETHSRLANDS, T. Molecular Characterization of the. **Society**, v. 7, n. December, p. 2115–2127, 1995.
- PINHEIRO, H. M. H. **XENOLOGY OF BETA-LACTAMASES: ASSOCIATION OF ITS GENETIC SOURCES AND PUTATIVE PLEIOTROPISM**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE LISBOA, 2013.
- POIREL, L. et al. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 447–453, 2001.
- POIREL, L. et al. Molecular Analysis of Metallo- β -Lactamase Gene bla SPM-1 - Surrounding Sequences from Disseminated *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Recife , Brazil Molecular Analysis of Metallo- β -Lactamase Gene bla SPM-1 -Surrounding Sequences from Disseminated Pseu. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1406–9, 2004.
- POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 24–38, 2010.
- POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 826–836, 2006.
- PORTO, A. et al. A novel OXA-10-like β -lactamase is present in different Enterobacteriaceae. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 2, p. 228–229, 2010.
- PRATT, R. F. β -Lactamases: Why and How. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 18, p. 8207–8220, 2016.
- QIN, Q.-L. et al. The complete genome of *Zunongwangia profunda* SM-A87 reveals its adaptation to the deep-sea environment and ecological role in sedimentary organic nitrogen degradation. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 247, 2010.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.
- RAVENHALL, M. et al. Inferring Horizontal Gene Transfer. **PLoS Computational Biology**, v. 11, n. 5, p. 1–16, 2015.
- ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature protocols**, v. 5, n. 4, p. 725–738, 2010.

- SAFARI, M. et al. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units (ICU). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 4, p. 424–429, 2015.
- SAGOVA-MARECKOVA, M. et al. Phylogenetic relatedness determined between antibiotic resistance and 16S rRNA genes in actinobacteria. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 81, 2015.
- SAITOU N, N. M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees'. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- SALVERDA, M. L. M.; DE VISSER, J. A. G. M.; BARLOW, M. Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: Experimental reconstruction and clinical relevance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1015–1036, 2010.
- SANSCHAGRIN, F.; COUTURE, F.; LEVESQUE, R. C. Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 887–893, 1995.
- SAUVAGE, E. et al. The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 234–258, 2008.
- SINGH, R.; SAXENA, A.; SINGH, H. Identification of group specific motifs in beta-lactamase family of proteins. **Journal of biomedical science**, v. 16, p. 109, 2009.
- STOLLE, I. et al. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2802–2808, 2013.
- SUN, T. Comparison of β -lactamases of classes A and D: 1.5-Å crystallographic structure of the class D OXA-1 oxacillinase. **Protein Science**, v. 12, n. 1, p. 82–91, 2003.
- TAMURA, K. et al. MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood , Evolutionary Distance , and Maximum Parsimony Methods Research resource. v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TENAILLON, O. et al. Mutators and sex in bacteria: conflict between adaptive strategies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 19, p. 10465–10470, 2000.
- THOMAZ, S. M. O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. **Perspectivas da Limnologia no Brasil**, p. 147–167, 1999.
- TIPPER, D. J.; STROMINGER, J. L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 54, n. 4, p. 1133–1141, 1965.
- TOLENTINO, F. M. Detecção e Identificação dos genes de beta-lactamases blaSHV, blaTEM e blaCTX-M em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo. p. 66p, 2009.

- TOTH, M. et al. Class D β -lactamases do exist in Gram-positive bacteria. **Nat Chem Biol**, v. 1, n. 1, p. 23–30, 2016.
- TSAKRIS, A. et al. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 6, p. 981–983, 2006.
- TSUKAMOTO, K. et al. Function of the conserved triad residues in the class C β -lactamase from *Citrobacter freundii* GN346. **FEBS Letters**, v. 271, n. 1–2, p. 243–246, 1990.
- TURTON, J. F. et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, n. 1, p. 72–77, 2006.
- VAHABOGLU, H. et al. High prevalence of OXA-51-type class D β -lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: Co-existence with OXA-58 in multiple centres. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 537–542, 2006.
- VAIDYANATHAN, V., SRINIVASAN, V.B. AND GOVINDAN, R. Phenotypic and Genotypic characterization of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from tertiary hospital in Chennai, India. **Molecular Biology Division, Institute of Microbial Technology, Sector-39A, Chandigarh, Sector-39A, Chandigarh, Chandigarh 160036, India**, 2012.
- VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of “unculturable” bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, n. 1, p. 1–7, 2010.
- VERMA, V. et al. Hydrolytic mechanism of OXA-58 enzyme, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 43, p. 37292–37303, 2011.
- VILLA, L. et al. Reversion to susceptibility of a carbapenem-resistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 11, p. 2482–2486, 2013.
- VON WINTERSDORFF, C. J. H. et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–10, 2016.
- WADE, W. Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 95, p. 81, 2002.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373–383, 2006.
- WARJRI, I. et al. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases (blaCTX-M-1 and blaSHV) producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Mizoram. **Veterinary World**, v. 8, n. 5, p. 599–604, 2015.
- WIELGOSS, S. et al. Mutation rate dynamics in a bacterial population reflect tension between adaptation and genetic load. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, v. 110, n. 1, p. 222–227, 2012.
- WILLIAMS, J. D. β -Lactamases and β -lactamase inhibitors. **International journal of antimicrobial agents**, v. 12, p. S3–S7, 1999.

WILSON, D. N. The ABC of Ribosome-Related Antibiotic Resistance. v. 7, n. 3, p. 16–18, 2016.

WOOD, T. C.; PEARSON, W. R. Evolution of Protein Sequences and Structures. 1999.

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W174-181, 2015.

ZANDER, E. et al. Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing class D b -lactamases in Acinetobacter spp . other than Acinetobacter baumannii. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 4, p. 375–377, 2014.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 40, 2008.

ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 7, p. 2302–2309, 2005.