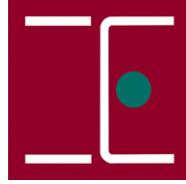


- Instituto Politécnico de Lisboa -

- Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa –



Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

2º ano

***EPIGENETIC DIVERGENCE OF
STAPHYLOCOCCUS AUREUS PHENOTYPIC
RESISTANT PROFILES AND
EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE MODULATOR
EFFECT***

MESTRANDA: ANA RITA BOIEIRO DE MIRA

ORIENTADORA: PROF^a. DOUTORA EDNA RIBEIRO – ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA / INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA / CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA - H&TRC

ORIENTADOR: PROF. SÉRGIO PAULINO – INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DR. RICARDO JORGE

Novembro, 2021

- Instituto Politécnico de Lisboa -
- Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa –
Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

***EPIGENETIC DIVERGENCE OF
STAPHYLOCOCCUS AUREUS PHENOTYPIC
RESISTANT PROFILES AND
EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE MODULATOR
EFFECT***

MESTRANDA: ANA RITA BOIEIRO DE MIRA

ORIENTADORA: PROF^a. DOUTORA EDNA RIBEIRO – ESCOLA SUPERIOR
DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA / INSTITUTO POLITÉCNICO DE
LISBOA / CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA - H&TRC

ORIENTADOR: PROF. SÉRGIO PAULINO – INSTITUTO NACIONAL DE
SAÚDE DR. RICARDO JORGE

JURI: PROF^a. DOUTORA CATARINA PRISTA – INSTITUTO SUPERIOR DE
AGRONOMIA

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Novembro, 2021

Direitos de cópia

Autorizo a Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa o direito de arquivar e publicar a presente dissertação e de a divulgar em repositórios científicos para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao autor e ao editor.

Copyright© 2021 – Ana Rita Boieiro de Mira

Agradecimentos

Com esta tese pretendo terminar mais um ciclo, nestes anos atípicos que vivemos com a pandemia persistente, que dificultou bastante a realização desta, e desse modo, torna esta conquista ainda mais valiosa para mim. Quero agradecer a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, e que nunca desistiram de mim, mesmo nos momentos em que eu tinha desistido de mim mesma.

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, prof^a. Doutora Edna Ribeiro, que sempre acreditou nas minhas capacidades, me acompanhou de forma incessante e esteve presente e disponível, de forma constante, para me ajudar e orientar.

Ao Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia H&TRC que foi uma ajuda fundamental para a realização de toda a metodologia e análise de resultados, disponibilizando as suas instalações, materiais e auxílio dos vários membros, aos quais estou profundamente agradecida.

À minha mãe que nunca me deixou desistir, dando-me forças para prosseguir. À minha família e namorado que estiveram por perto quando precisava que acreditassem em mim. Às minhas estrelas no céu que sei que olharam por mim este tempo todo.

Por fim, obrigada a mim própria, que começando a trabalhar no início do desenvolvimento da tese para ajudar nesta pandemia emergente, com horários completamente exaustantes, carreguei o computador para todo o lado, li em todos os tempos mortos, dei o máximo possível para poder entregar um trabalho que me deixasse orgulhosa.

Obrigada.

Resumo

A resistência antimicrobiana de patógenos humanos, como em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), é descrita pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um desafio global à saúde. A Epigallocatequina-3-galato (EGCG), o principal constituinte do chá verde, tem sido descrita como eficaz na reversão do fenótipo de resistência ao MRSA *in vivo*, demonstrando ter um efeito sinérgico contra diferentes antibióticos em estirpes isoladas de infecções hospitalares e de colonização da nasofaringe *in vitro*.

Neste estudo, pretende-se avaliar divergências epigenéticas entre *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e MRSA, estirpes associadas a infecções comensais (N=9) e nosocomiais (N=10) e o potencial efeito modulador induzido pela exposição à EGCG em moduladores epigenéticos, concretamente, *OrfX*, uma metiltransferase ribossomal estafilocócica. Adicionalmente, foram também avaliados os efeitos induzidos em *SpdC*, um regulador pleiotrópico da expressão génica, e *WalKR* um sistema de regulação génica crucial para a virulência e adaptação ambiental de *S. aureus*.

Em estirpes que diferem no seu perfil de resistência, origem e sinergismo da EGCG com diferentes antibióticos, foram obtidos os níveis transcricionais dos moduladores epigenéticos selecionados, através da extração de RNA bacteriano, conversão em cDNA e quantificação pela técnica de *quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR), com posterior tratamento estatístico.

Os resultados obtidos demonstram que diferentes fenótipos de resistência estão associados com expressões transcricionais divergentes dos genes moduladores epigenéticos em estudo e reversão do fenótipo de resistência pela EGCG, particularmente para o gene *OrfX*. Neste estudo é demonstrado o potencial da EGCG para tratamento antimicrobiano e/ou como adjuvante terapêutico contra microrganismos resistentes aos antibióticos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; Resistência Antimicrobiana; Epigallocatequina-3-galato; Moduladores epigenéticos.

Abstract

The antimicrobial resistance of human pathogens, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), is described by the World Health Organization (WHO) as a global health challenge. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the main constituent of green tea, has been described as effective in reversing the MRSA resistance phenotype *in vivo*, demonstrating to have a synergistic effect against different antibiotics in strains isolated from hospital infections and nasopharynx colonization *in vitro*.

This study aims to evaluate epigenetic divergences between methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and MRSA, strains associated with commensal (N=9) and nosocomial infections (N=10) and the potential modulatory effect induced by exposure to EGCG in epigenetic modulators, namely, *OrfX*, a staphylococcal ribosomal methyltransferase. In addition, the effects induced in *SpdC*, a pleiotropic regulator of gene expression, and *WalkR*, which is crucial for the virulence and environmental adaptation of *S. aureus*, have also been evaluated.

In strains that differ in their resistance profile, source, and synergism of EGCG with different antibiotics, the transcriptional levels of the selected epigenetic modulators were obtained through the extraction of bacterial RNA, conversion into cDNA and quantification by the qRT-PCR technique, with subsequent statistical treatment.

The results obtained demonstrate that divergent resistant phenotypes correlate with divergent transcriptional expression of epigenetic modulator genes, and reversion of the resistant phenotype by EGCG, particularly *OrfX*. The study also showed the potential of EGCG as a therapeutic antimicrobial agent and/or therapeutic co-adjuvant, against antibiotic resistant microorganisms.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Antimicrobial resistance; Epigallocatechin-3-gallate; Epigenetic modulators.

Índice Geral

1. Introdução.....	1
2. Estado de Arte.....	3
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>).....	3
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA).....	4
2.1.2 <i>Healthcare-acquired</i> MRSA (HA-MRSA) e <i>Community-acquired</i> MRSA (CA-MRSA).....	5
2.2 Antibióticos e o seu mecanismo de ação em <i>S. aureus</i>	7
2.3 Epigalocatequina-3-galato (EGCG).....	7
2.3.1 Sinergismo com antibióticos.....	8
2.3.2 EGCG e o seu potencial epigenético.....	9
2.4 Modulação epigenética.....	9
2.4.1 OrfX rRNA metiltransferase.....	9
2.4.2 O sistema <i>WalkR</i> e o novo fator de virulência <i>spdC</i>	10
3. Objetivos.....	11
4. Materiais e Métodos.....	13
4.1 Tipo de estudo.....	13
4.2 Caracterização das estirpes analisadas.....	14
4.3 Procedimento laboratorial.....	18
4.3.1 Preparação das estirpes.....	18
4.3.1.1 Estirpes congeladas.....	18
4.3.1.2 Cultura das estirpes.....	18
4.3.2 Extração de RNA.....	18
4.3.3 Quantificação de RNA.....	19
4.3.4 Conversão para cDNA.....	19
4.3.5 qRT-PCR.....	20
4.4 Considerações éticas e legais.....	21

4.5 Financiamento.....	21
5. Resultados.....	23
5.1 Estirpes isoladas da flora comensal analisadas.....	23
5.1.1 MSSA	23
5.1.1.1 Modulador epigenético <i>Spdc</i>	24
5.1.1.2 Modulador epigenético <i>WalR</i>	24
5.1.1.3 Modulador epigenético <i>OrfX</i>	25
5.1.2 MRSA	25
5.1.2.1 Modulador epigenético <i>Spdc</i>	25
5.1.2.2 Modulador epigenético <i>WalR</i>	26
5.1.2.3 Modulador epigenético <i>OrfX</i>	26
5.2 Estirpes isoladas de infeções agudas hospitalares analisadas.....	27
5.2.1 MSSA	27
5.2.1.1 Modulador epigenético <i>Spdc</i>	27
5.2.1.2 Modulador epigenético <i>WalR</i>	27
5.2.1.3 Modulador epigenético <i>OrfX</i>	28
5.2.2 MRSA	28
5.2.2.1 Modulador epigenético <i>Spdc</i>	29
5.2.2.2 Modulador epigenético <i>WalR</i>	29
5.2.2.3 Modulador epigenético <i>OrfX</i>	30
5.3 Estirpes isoladas da flora comensal após sementeira 24h sem exposição.....	30
5.3.1 MSSA	30
5.3.1.1 Modulador epigenético <i>Spdc</i>	30
5.3.1.2 Modulador epigenético <i>WalR</i>	31
5.3.1.3 Modulador epigenético <i>OrfX</i>	32
5.3.2 MRSA	32
5.3.2.1 Modulador epigenético <i>Spdc</i>	32
5.3.2.2 Modulador epigenético <i>WalR</i>	33

5.3.2.3 Modulador epigenético <i>OrfX</i>	33
5.4 Estirpes isoladas de infeções agudas hospitalares, após sementeira 24h sem exposição.....	34
5.4.1 MSSA	34
5.4.1.1 Modulador epigenético <i>Spdc</i>	34
5.4.1.2 Modulador epigenético <i>WalR</i>	35
5.4.1.3 Modulador epigenético <i>OrfX</i>	35
5.4.2 MRSA	35
5.4.2.1 Modulador epigenético <i>Spdc</i>	36
5.4.2.2 Modulador epigenético <i>WalR</i>	36
5.4.2.3 Modulador epigenético <i>OrfX</i>	37
5.5 Análise estatística dos resultados.....	37
6. Discussão e conclusões	45
6.1 Discussão.....	45
6.2 Conclusões.....	48
7. Limitações do estudo e perspetivas futuras	49
8. Referências bibliográficas.....	51
9. Anexos	59
Anexo I – Protocolo de extração de RNA	59
Anexo II – Protocolo de conversão em cDNA.....	63
Anexo III – Aprovação do Conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa	66

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Diferenciação de estirpes HA-MRSA e CA-MRSA	6
Tabela 4.1 - Caracterização das estirpes analisadas e respectivas amostras biológicas	15
Tabela 4.2 - Descrição das estirpes quanto à sua origem, fenótipo de resistência à meticilina e aos antibióticos testados	16
Tabela 4.3 - Descrição das estirpes quanto ao sinergismo da EGCG com os vários antibióticos testados	17
Tabela 5.1 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, previamente congeladas, para o gene <i>SpdC</i>	24
Tabela 5.2 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, previamente congeladas, para o gene <i>WalR</i>	24
Tabela 5.3 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, previamente congeladas, para o gene <i>OrfX</i>	25
Tabela 5.4 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, previamente congeladas, para o gene <i>SpdC</i>	25
Tabela 5.5 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, previamente congeladas, para o gene <i>WalR</i>	26
Tabela 5.6 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, previamente congeladas, para o gene <i>OrfX</i>	26
Tabela 5.7 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA nosocomiais, previamente congeladas, para o gene <i>SpdC</i>	27
Tabela 5.8 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA nosocomiais, previamente congeladas, para o gene <i>WalR</i>	28
Tabela 5.9 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, previamente congeladas, para o gene <i>OrfX</i>	28
Tabela 5.10 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, previamente congeladas, para o gene <i>SpdC</i>	29
Tabela 5.11 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, previamente congeladas, para o gene <i>WalR</i>	29
Tabela 5.12 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, previamente congeladas, para o gene <i>OrfX</i>	30
Tabela 5.13 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, após gelose, para o gene <i>SpdC</i>	31

Tabela 5.14 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, após gelose, para o gene <i>WaiR</i>	31
Tabela 5.15 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, após gelose, para o gene <i>OrfX</i>	32
Tabela 5.16 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, após gelose, para o gene <i>SpdC</i>	32
Tabela 5.17 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, após gelose, para o gene <i>WaiR</i>	33
Tabela 5.18 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, previamente congeladas, para o gene <i>OrfX</i>	33
Tabela 5.19 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA nosocomiais, após gelose, para o gene <i>SpdC</i>	34
Tabela 5.20 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA nosocomiais, após gelose, para o gene <i>WaiR</i>	35
Tabela 5.21 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, previamente congeladas, para o gene <i>OrfX</i>	35
Tabela 5.22 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, após gelose, para o gene <i>SpdC</i>	36
Tabela 5.23 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, após gelose, para o gene <i>WaiR</i>	36
Tabela 5.24 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, após gelose, para o gene <i>OrfX</i>	37

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Estrutura da parede celular de <i>S. aureus</i> e os seus fatores de virulência. .	3
Figura 2.2 - Prevalência de MRSA (%).	5
Figura 2.3 - Impacto do sistema de dois componentes <i>WalkR</i> na virulência do <i>S. aureus</i>	10
Figura 4.1 - Protocolo de extração de RNA, NZY Total RNA Isolation kit, nzytech™ ..	19
Figura 4.2 - Desenho da placa de PCR.....	20

Índice de Gráficos

Gráfico 5.1 – Expressão relativa dos genes <i>OrfX</i> , <i>SpdC</i> e <i>WalR</i> para as estirpes MSSA (A) e MRSA (B) comensais	38
Gráfico 5.2 – Expressão relativa dos genes <i>OrfX</i> , <i>SpdC</i> e <i>WalR</i> para as estirpes MSSA (A) e MRSA (B) comensais, após sementeira e 24h de incubação	40
Gráfico 5.3 – Expressão relativa dos genes <i>OrfX</i> , <i>SpdC</i> e <i>WalR</i> para as estirpes MSSA (A) e MRSA (B) nosocomiais, previamente congeladas	42
Gráfico 5.4 – Expressão relativa dos genes <i>OrfX</i> , <i>SpdC</i> e <i>WalR</i> para as estirpes MSSA (A) e MRSA (B) nosocomiais, após sementeira e 24h de incubação	43

Abreviaturas

attB – *attachment site B*

β-lactâmicos – Beta-lactâmicos

CA-MRSA – *Community-acquired MRSA*

Ct – *cycle threshold*

cDNA – *complementary DNA* (ácido desoxirribonucleico complementar)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DNTMs – DNA metiltransferases

EGCG – Epigallocatequina-3-galato

HA-MRSA – *Healthcare-acquired MRSA*

HATs – histonas acetilases

HDACs – histonas desacetilases

LA-MRSA – *Land stock-acquired MRSA*

MIC – Concentração mínima inibitória

mRNA – RNA mensageiro

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível à metilina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBP – proteína de ligação à penicilina

qRT-PCR – *Quantitative real-time polymerase chain reaction*

RNA – *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rRNA – RNA ribossomal

SCC mec – *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*

1. Introdução

A resistência antimicrobiana de patógenos humanos, como em *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), é descrita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um desafio global à saúde.(1–4) O MRSA é um dos agentes infecciosos mais importantes em humanos, sendo conhecido mundialmente como causa de inúmeras hospitalizações e mortes, por sépsis e infecções pneumocócicas.(2–6) Adicionalmente, tem a capacidade de colonizar assintomaticamente humanos, constituindo, nestes portadores saudáveis, um reservatório na comunidade, aumentando, conseqüentemente, o risco de propagação e desenvolvimento de infecções associadas com maior gravidade.(7–9)

Estudos recentes sugerem que a Epigallocatequina-3-galato (EGCG), o principal constituinte do chá verde, é eficaz na reversão do fenótipo de resistência do MRSA e que tem um potencial antimicrobiano e efeito sinérgico significativos em associação com diferentes antibióticos contra estirpes isoladas de infecções hospitalares e de colonização da nasofaringe.(5,10–13)

Compostos naturais, como a EGCG, podem afetar significativamente a estabilidade do genoma, mRNA e a expressão de proteínas, sendo reconhecidos como potenciais moduladores epigenéticos.(14,15) De facto, os benefícios para a saúde, associados à EGCG, têm sido relacionados aos seus efeitos epigenéticos, pois esses compostos são capazes de atuar tanto sobre histonas acetil transferases (HATs) como histonas desacetilases (HDACs), regular a acetilação de histonas e proteínas da cromatina não-histonas e afetar a metilação do DNA.(14,15)

Em *Staphylococci*, o gene *orfX* codifica uma metiltransferase ribossomal, produzida de forma constitutiva durante o crescimento bacteriano, cuja inserção se dá no complexo *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*), que contém o gene *mecA*, responsável pela resistência aos beta-lactâmicos (β -lactâmicos) nos MRSA.(16,17)

Ainda, o sistema de dois componentes *WalkR*, fundamental na rápida adaptação de *S. aureus* a diversas condições ambientais e modulador da resistência aos antimicrobianos, regula, positivamente, a expressão do gene *spdC*, um novo fator de virulência em *S. aureus*.(18–20)

A tese de mestrado da Dr^a. Ana Sofia Zeferino, intitulada “Potencial antimicrobiano da Epigallocatequina-3-galato do Chá Verde contra MRSA de isolados Hospitalares e da Comunidade”, que recorreu a isolados de infeções nosocomiais e estirpes comensais em voluntários saudáveis, comprovou a eficácia da EGCG na reversão do fenótipo de resistência.(21) Neste sentido, surge a necessidade de avaliar, com base nas características de modulação epigenética da EGCG, qual a divergência epigenética induzida pela EGCG em fenótipo de resistência em *S. aureus*, nomeadamente nos genes seleccionados *orfX*, *WalkR* e *spdC*.

2. Estado de Arte

2.1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Staphylococcus aureus trata-se de uma bactéria oportunista Gram-positiva, com formato de cocos com tendência a rearranjar-se em grupos descritos como “em cacho de uvas”.(6,7,22–25) Este coloniza a pele e está presente na nasofaringe de cerca de 30% da população, sendo que a colonização se apresenta como um fator de risco para infecção, que, frequentemente, ocorre com a mesma estirpe de *S. aureus*.(2,3,6,26–29)

As infecções por *S. aureus* são das mais comuns nos humanos, provocando múltiplas infecções, nomeadamente, bacteriemia, endocardite infecciosa, infecções da pele e dos tecidos moles (e.g. impetigo, foliculites, furúnculos, celulite), artrite séptica, infecções pulmonares (e.g. pneumonia e empiema), síndrome do choque tóxico, infecções do trato urinário, entre outras.(6,7,24,25,27,29–31)

De acordo com a estirpe e com o local de infecção, estas bactérias podem provocar infecções invasivas e/ou mediadas por toxinas.(2,6,25,29–31) Os seus fatores de virulência permitem a evasão à resposta imunitária do hospedeiro, com a produção de uma cápsula antifagocítica, sequestro dos anticorpos do hospedeiro ou dissimulação dos antígenos por parte da proteína A, formação de biofilmes, capacidade de sobreviver dentro das células e bloqueio do processo de quimiotaxia dos leucócitos (**Figura 2.1**). (6,26–29,32)

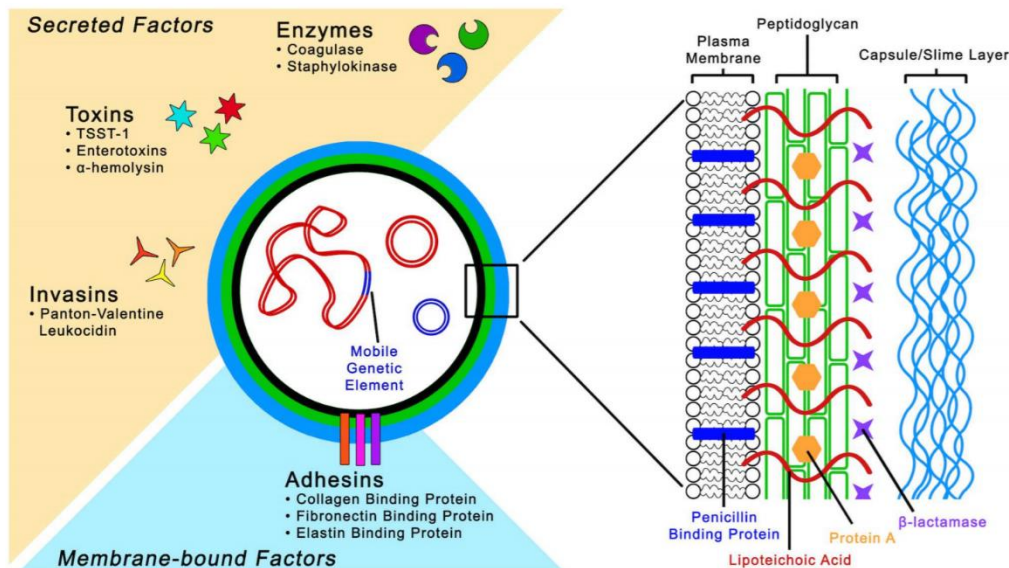


Figura 2.1 - Estrutura da parede celular de *S. aureus* e os seus fatores de virulência, adaptado de Kong et al., 2016 (32).

Os superantígenos constituem outro fator de virulência, importante no desenvolvimento de endocardite infecciosa, sépsis, assim como a síndrome do choque tóxico. (6,26,28,29,32) Por sua vez, a leucocidina Pantón-Valentine e a alfa-hemolisina, conjuntamente com a suprarreferida proteína A, encontram-se associadas com infecções pulmonares (**Figura 2.1**). (6,26,29,32)

2.1.1 *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA)

A resistência a antimicrobianos na patogênese bacteriana apresenta-se como um desafio global, associado a elevadas taxas de morbidade e mortalidade.(1,4,26) Durante as últimas décadas, o surgimento da resistência aos antibióticos em bactérias patogênicas tornou-se um problema de importância crescente para a saúde pública.(4,26,31) Reconhece-se que os genes promotores da resistência aos antibióticos estão, atualmente, presentes não só em patógenos clínicos, mas também em bactérias comensais, assim como bactérias do ambiente.(4,24,26,31) Estes formam um reservatório propício para a aquisição de genes via transferência horizontal, contribuindo para a propagação de estirpes comensais e ambientais multirresistentes, que constituem um risco para o desenvolvimento de infecções severas, como sépsis, endocardite e pneumonia.(4,24,31)

Os MRSA constituem estirpes resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo a penicilina e cefalosporinas.(24,30,33) As proteínas de ligação à penicilina (PBP) são enzimas que se encontram ligadas à membrana celular, constituindo os alvos para a ligação dos antibióticos β -lactâmicos.(24,30,33)

Durante a sua evolução, *S. aureus* adquiriu, via transferência genética horizontal, o complexo *SCCmec*, onde se insere o gene *mecA* que codifica a proteína modificada de ligação à penicilina 2 (PBP2).(2,3,6,24–27,34) Esta atribui-lhe resistência a antibióticos β -lactâmicos (oxacilina, estreptomicina, tetraciclina, eritromicina, etc.), através da diminuição da afinidade da ligação dos antibióticos ao seu recetor na bactéria.(2,3,24,25,27,33)

A prevalência de MRSA na Europa aumenta do norte para o sul, com países como Portugal, Espanha, Itália e Grécia, no sul europeu, a atingir percentagens de 25-50% de prevalência de MRSA, comparativamente a valores inferiores a 5%, no norte europeu, como é o exemplo da Noruega e Suécia (**Figura 2.2**). (26) Na Europa relata-se uma alta diversidade genética de clones da comunidade, com alto risco de se introduzirem no ambiente hospitalar, associados a uma elevada frequência de isolados positivos para a leucocidina de Panton-Valentine. (35)

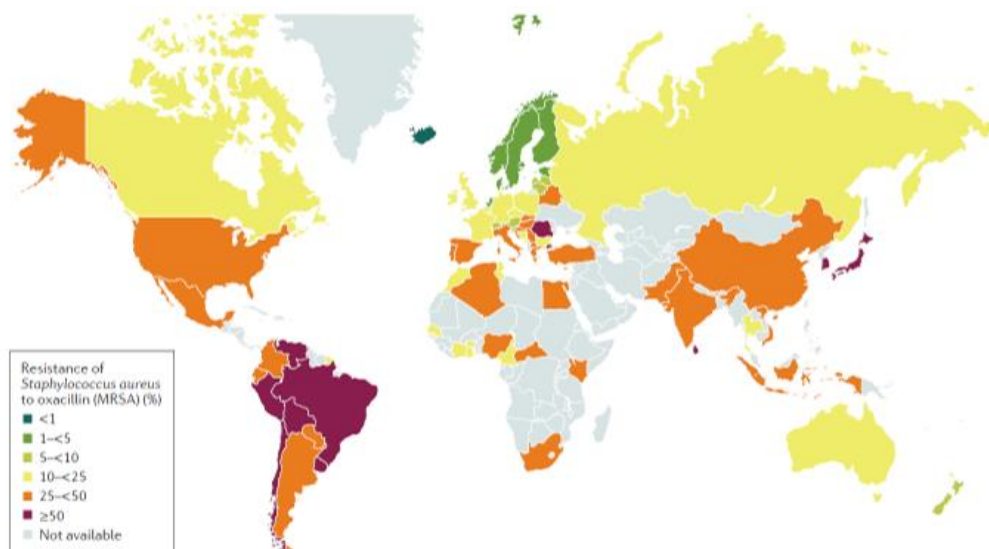


Figura 2.2 - Prevalência de MRSA (%), no mundo, em 2018, adaptado de Lee et al., 2018 (26).

2.1.2 *Healthcare-acquired* MRSA (HA-MRSA) e *Community-acquired* MRSA (CA-MRSA)

Tipicamente, a aquisição de uma infeção por MRSA ocorre numa unidade de cuidados de saúde, hospital ou unidade de longa duração, sendo nosocomial na sua origem. (36,37) Neste contexto, surgem os *Healthcare-acquired* MRSA (HA-MRSA), com três grandes reservatórios, nomeadamente, os pacientes, os profissionais de saúde e o ambiente inanimado. (26,30,36,37) Cerca de 1/3 dos pacientes que adquirem MRSA em contexto hospitalar, desenvolvem infeções pelo mesmo microrganismo. (6,26,27,36)

Os *Community-acquired* MRSA (CA-MRSA) são estirpes propagadas na comunidade com origem provável em estirpes originalmente disseminadas em ambiente hospitalar. (26,28,36-38) Por outro lado, indivíduos portadores de CA-MRSA servem também de reservatório para a transmissão e disseminação novamente para o

hospital.(26,36,39,40) O *Center of Disease Control* (CDC) define os CA-MRSA como um microrganismo isolado num ambiente não hospitalar ou num paciente dentro das primeiras 48 horas após admissão.(40) Estes não podem ter qualquer história de colonização ou infeção prévia por MRSA, de internamento ou estadias prolongadas em unidades de longa duração, ausência de dispositivos prostéticos, diálise ou cirurgias.(40) Estas estirpes adquiridas na comunidade representam a causa mais identificada de infeções da pele e dos tecidos moles.(36,37,41)

As estirpes CA-MRSA diferem significativamente das HA-MRSA, no que diz respeito a) à configuração do complexo *SCCmec* que codifica a resistência à meticilina; b) à resistência a outras classes de antibióticos transportados por plasmídeos; c) à taxa de crescimento; d) à presença de toxinas e/ou fatores de virulência e e) ao local e mecanismo de infeção, afetando diferentes grupos de risco (**Tabela 2.1**).(2,3,26,36,38,39,41)

Tabela 2.1 - Diferenciação de estirpes HA-MRSA e CA-MRSA(2,3,42,6,26–28,30,36,38,39)

Fator/Estirpe	HA-MRSA	CA-MRSA
Resistência a antibióticos	Multirresistente	Somente aos β -lactâmicos
Infeções	Invasivas, como sépsis, pneumonia, endocardite infecciosa, e infeções do trato urinário e da ferida cirúrgica	Pele e tecidos moles (abcessos, foliculite, pústulas)
População-alvo	Pacientes imunocomprometidos, com histórico recente de hospitalização, pacientes em diálise, residentes em unidades de cuidados continuados, etc.	Indivíduos jovens, saudáveis, sem fator de risco para HA-MRSA
Outros fatores de risco	Dispositivos invasivos (cateteres, algalias, tubos endotraqueais) pela capacidade de formação de biofilmes	Contacto próximo com portadores de MRSA, partilha de itens pessoais, trauma na pele, higiene pobre, sobrepopulação, exposição frequente a antibióticos, acesso limitado à saúde

Conhecem-se cinco tipos de *SCCmec*, que variam em tamanho, composição genética, padrões de resistência antimicrobiana e prevalência relativa nos dois grupos de MRSA.(36,39) As estirpes CA-MRSA possuem, geralmente, os complexos *SCCmec* IV e V, associados com os genes que codificam para a leucocidina de Panton-Valentine.(26,30,36,38) Enquanto, as estirpes HA-MRSA encontram-se relacionadas com os complexos *SCCmec* I, II e III, associados à multirresistência antimicrobiana, característica dos HA-MRSA.(30,36,38,39)

Ainda assim, a distinção entre ambas apresenta-se cada vez menos clara, pois com a evolução da epidemiologia da CA-MRSA, esta tem emergido como causa de epidemias hospitalares, em infecções nosocomiais.(2,27,37)

2.2 Antibióticos e o seu mecanismo de ação em *S. aureus*

Os principais alvos dos antibióticos em *Staphylococci* são o envelope celular, o ribossoma e os ácidos nucleicos.(10,33,34,43) As estirpes do presente estudo foram, previamente, sujeitas à ação de quatro antibióticos para a avaliação do sinergismo com a EGCG e definição do seu fenótipo de resistência: amoxicilina, tetraciclina, gentamicina e imipenem.

Os β -lactâmicos, onde incluímos a amoxicilina e o imipenem (pertencente ao subgrupo dos carbapenemos), inibem a síntese de peptidoglicano.(33,43–47) Estes têm como alvo as PBP, cuja ligação induz a perda de viabilidade e lise, através da ativação de processos autolíticos na bactéria.(33,44,45,47,48) O imipenem é resistente a algumas β -lactamases, estando indicado em multirresistências.(33,45,48)

A gentamicina é um antibiótico de largo espectro da classe dos aminoglicosídeos.(12,33,43,45,49) O mecanismo de ação destes antibióticos consiste na sua ligação à subunidade ribossomal 30S, incapacitando a bactéria de sintetizar proteínas.(12,33,45,46)

A tetraciclina é um antibiótico de largo espectro que inibe o crescimento bacteriano através da inibição da tradução, com ligação ao ribossoma, interferindo na síntese de proteínas.(5,33,43,46,50)

2.3 Epigalocatequina-3-galato (EGCG)

O chá verde, um produto extraído da planta *Camelia sinesis*, possui elevadas concentrações de compostos fenólicos, nomeadamente, a epigalocatequina-3-galato

(EGCG), epicatequina galato, epicatequina, galatocatequina e galocatequina galato.(13,51–54)

As catequinas do chá verde têm uma ação direta nas bactérias, provocando danos na membrana celular, inibição da síntese de ácidos gordos, inibição da atividade enzimática entre outros, sendo que a maioria dos estudos se foca no seu sinergismo com antibióticos e nos seus efeitos epigenéticos.(10,13,52,55,56)

Entre os inúmeros benefícios da EGCG para a saúde, destacam-se os seus efeitos enquanto agente antioxidante, anti-inflamatório, anticarcinogénico, promotor da saúde cardiovascular e oral e o seu potencial antimicrobiano.(5,10,13,14,53–55,57) Este último foi demonstrado contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (e.g. *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Enterococcus* spp.), alguns fungos (e.g. *Candida albicans*) e vírus (e.g. HIV, *Herpes simplex*, *Influenza*).(10,13)

Particularmente em *S. aureus*, o tratamento com EGCG provoca alterações ao nível do envelope celular e inibição proteica, induzindo dano celular.(56,58,59) A EGCG ao interferir com as proteínas da membrana celular e com o próprio peptidoglicano, contribui para a diminuição de vários fatores de virulência, nomeadamente, a produção de biofilmes.(59)

2.3.1 Sinergismo com antibióticos

O termo sinergismo é aplicado se o efeito terapêutico combinado de dois ou mais componentes é superior aos seus efeitos individuais.(5,10,60) A combinação com componentes naturais melhora ou facilita a interação do antibiótico com o seu alvo no microrganismo, prevenindo a emergência da resistência.(10,11,14,60)

A combinação de antibióticos, como a tetraciclina, ampicilina/sulfabactam, penicilina, antibióticos β -lactâmicos, carbapenemos e gentamicina, com a EGCG mostrou reduzir a concentração mínima inibitória (MIC) dos antibióticos e aumentar a suscetibilidade dos MRSA a estes, revelando um elevado potencial sinérgico.(5,10–13,44,61,62)

A EGCG e os antibióticos β -lactâmicos atuam conjuntamente nos MRSA, ligando-se diretamente ao peptidoglicano e provocando, assim, a rutura da parede celular. (47,56,61)

2.3.2 EGCG e o seu potencial epigenético

A dieta pode influenciar os mecanismos epigenéticos provocando alterações na expressão génica sem alterar a sequência de DNA, afetando a estabilidade do genoma e a expressão de mRNA e proteínas.(10,14)

Foi demonstrado que a EGCG interage com DNA metiltransferases (DNMTs), HATs e HDACs, como modulador de alterações epigenéticas.(14,55) Em estudos relacionados com a carcinogénese, foi comprovada a ação da EGCG na indução da reativação epigenética de genes silenciados ou inibição epigenética de oncogenes, através da inibição de DNMTs ou da atividade de HDACs.(55) Os principais alvos moleculares descritos são marcas epigenéticas acetilação das histonas H3 e H4, H3K27m3, HDAC, entre outros.(14)

2.4 Modulação epigenética

A Epigenética é a área da biologia que estuda mudanças herdáveis na função génica/fenótipo que não estão relacionadas a mudanças na estrutura primária do DNA.(63–65) Os mecanismos epigenéticos *major* em humanos são a metilação do DNA, modificação de histonas e a expressão de micro RNAs não codificantes regulatórios.(55,65) Estas modificações são potencialmente reversíveis, com o ambiente, a dieta ou intervenções farmacológicas a participarem nesta modulação epigenética.(66)

No presente estudo foram selecionadas 3 entidades, comprovadamente relacionadas com a regulação epigenética nas bactérias, com maior ou menor especificidade para *S. aureus*, cuja pertinência é descrita em seguida.

2.4.1 OrfX rRNA metiltransferase

O gene *orfX* foi descrito como específico dos *Staphylococci*.(16,17) Este codifica uma metiltransferase ribossomal estafilocócica dos ribossomas 70S, cujo substrato é a S-adenosil-L-metionina.(16,17)

Este gene está conservado em todos os *Staphylococci*, o que sugere que se trate de um gene essencial, sendo produzido de forma constitutiva durante o crescimento bacteriano.(16,17) Foi inicialmente estudado devido ao facto de no seu C' terminal se dar a inserção do complexo *SCCmec*, que contém o gene *mecA*, como descrito anteriormente, responsável pela resistência aos β -lactâmicos nos MRSA.(16,17)

2.4.2 O sistema *WalkR* e o novo fator de virulência *spdC*

O sistema *WalkR* trata-se de um sistema de dois componentes, conhecidos por serem cruciais para a rápida adaptação de *S. aureus* a um largo espectro de condições ambientais, sendo por isso, considerados moduladores epigenéticos.(18–20) Este sistema controla o metabolismo da parede celular, através da produção de autolisinas.(18–20)

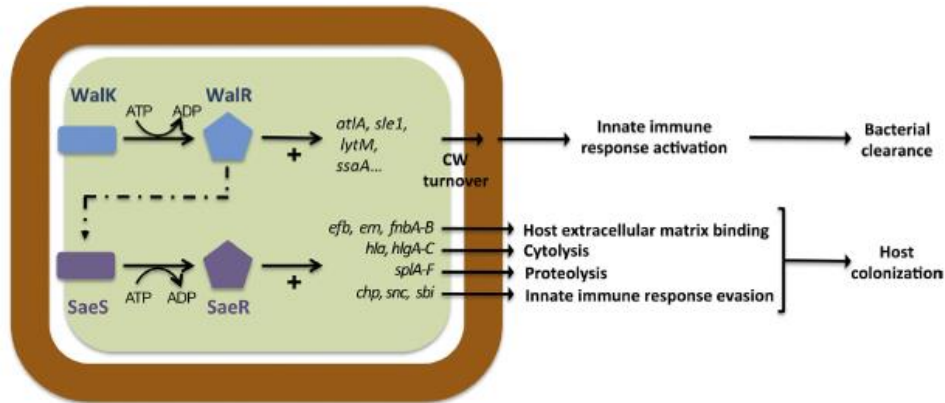


Figura 2.3 - Impacto do sistema de dois componentes *WalkR* na virulência do *S. aureus* adaptado de Delauné et al., 2012 (19).

O gene *spdC* codifica a proteína SpdC, uma proteína de membrana, envolvida em processos de sinalização celular.(20) O sistema *WalkR* regula positivamente a expressão do gene *spdC* e a proteína SpdC, por sua vez, diminui a expressão de genes do sistema *WalkR*.(20) Em estudos recentes, Poupel e os seus colaboradores descreveram a proteína SpdC como um novo fator de virulência em *S. aureus*.(20) Mutantes para o gene *spdC* apresentaram uma capacidade diminuída para a formação de biofilmes e uma expressão reduzida de múltiplos genes de virulência.(20)

A regulação entre estas duas entidades é fundamental na homeostase do envelope celular da bactéria, na primeira linha de defesa e proteção contra o hospedeiro e às condições a que está sujeito, na regulação de vários fatores de virulência e na resposta à ação de antibióticos e no desenvolvimento de resistências.(20)

3. Objetivos

Após evidência da eficácia da EGCG na reversão do fenótipo de resistência em *S. aureus in vitro* na tese suprarreferida, decorre a necessidade de compreender quais as divergências epigenéticas associadas a este fenómeno.(21) Para tal, esta investigação concorre para o objetivo geral da avaliação das divergências epigenéticas induzidas pela EGCG em genes de modulação epigenética associados a fenótipo de resistência em *S. aureus*, concretamente no gene *orfX*, no sistema de dois componentes *WalkR* e no novo fator de virulência *spdC*, em isolados de infeções nosocomiais e estirpes comensais de voluntários saudáveis, antes e após subcultura em gelose de sangue e incubação por 24h, a 37°C.

Os objetivos específicos para este estudo consistem em:

- Análise da expressão génica de *orfX*, *WalkR* e *spdC*, através da obtenção dos seus níveis transcricionais pela técnica de *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR), em *S. aureus* sensíveis à metilina (MSSA) e MRSA, isolados da flora comensal de voluntários saudáveis;
- Análise da expressão génica de *orfX*, *WalkR* e *spdC*, através da obtenção dos seus níveis transcricionais pela técnica de qRT-PCR, em MSSA e MRSA, isolados de infeções nosocomiais;
- Análise da expressão génica de *orfX*, *WalkR* e *spdC*, através da obtenção dos seus níveis transcricionais pela técnica de qRT-PCR, em MSSA e MRSA, isolados da flora comensal de voluntários saudáveis, após subcultura em gelose de sangue, 24h, a 37°C;
- Análise da expressão génica de *orfX*, *WalkR* e *spdC*, através da obtenção dos seus níveis transcricionais pela técnica de qRT-PCR, em MSSA e MRSA, isolados de infeções nosocomiais, após subcultura em gelose de sangue, 24h, a 37°C;
- Análise estatística para comparação dos níveis transcricionais obtidos, com recurso ao teste de *t student*.

4. Materiais e Métodos

Esta investigação decorre da tese de mestrado intitulada “Potencial antimicrobiano da Epigallocatequina-3-galato do Chá Verde contra MRSA de isolados Hospitalares e da Comunidade” da autoria da investigadora Dr^a. Ana Sofia Zeferino.(21) As conclusões obtidas na dissertação suprarreferida permitiram colocar a hipótese de que a EGCG tem potencial epigenético em fenótipos de resistência em *S. aureus*. A metodologia aplicada pretendeu avaliar as diferenças transcricionais em moduladores epigenéticos entre estirpes bacterianas que diferem na sua resistência antimicrobiana, nomeadamente MSSA e MRSA, previamente isoladas de infeções nosocomiais e da flora comensal da nasofaringe de voluntários saudáveis.

A técnica-base foi a qRT-PCR para a obtenção dos níveis transcricionais de conhecidos moduladores epigenéticos em *S. aureus*, sendo eles: *orfX*, *spdC* e *WalkR*. Primeiramente, procedeu-se à extração de RNA, seguida da sua quantificação e conversão em cDNA para utilização na qRT-PCR. Deste modo, os níveis transcricionais obtidos foram avaliados, comparados e correlacionados com os dados relatados sobre o perfil de resistência fenotípica das estirpes, a sua origem e efeito modulador resistente à EGCG.

4.1 Tipo de estudo

Este estudo classifica-se como:

- Observacional porque não sofre qualquer manipulação pelo investigador, limitando-se a observar e analisar;
- Descritivo-correlacional, visto que se pretende descrever a existência de moduladores epigenéticos e correlacioná-los com o seu perfil de resistência, origem e sinergismo observado previamente com o EGCG contra os vários antibióticos;
- Transversal porque apenas foi efetuada uma medição dos níveis transcricionais dos genes selecionados durante o estudo.

Quanto às variáveis, estas dizem respeito a:

- Perfil de Resistência das estirpes de *S. aureus*, classificando-se como nominal, bivariada, obtendo como valores MSSA (sensível) e MRSA (resistente);

- Origem das estirpes, classificando-se como nominal e bivariada, obtendo como valores Flora comensal e Infecções nosocomiais;
- Sinergismo com EGCG e os antibióticos, classificando-se como nominal e bivariada, com valores como observado e não observado;
- Níveis transcricionais dos moduladores epigenéticos selecionados (*orfX*, *spdC* e *WalkR*), classificando-se como variáveis quantitativas, na escala de razão, com valores obtidos após o tratamento estatístico dos dados obtidos a partir da qRT-PCR.

4.2 Caracterização das estirpes analisadas

O método de amostragem é não probabilístico, de seleção racional visto que as estirpes foram selecionadas com base nos resultados obtidos na tese de mestrado intitulada “Potencial Antimicrobiano a Epigallocatequina-3-Galato do Chá Verde contra MRSA de Isolados Hospitalares e da Comunidade”, da Dr.^a Ana Sofia Zeferino, com as características consideradas pertinentes para o estudo.(21)

As estirpes consistem em 9 isolados com origem comensal, nomeadamente 4 MSSA e 5 MRSA, e 10 estirpes com origem nosocomial, com 5 MSSA e 5 MRSA, previamente sujeitas à exposição a EGCG e avaliação do sinergismo com diversos antibióticos (**Tabela 4.1, Tabela 4.2**).

Tabela 4.1 - Caracterização das estirpes analisadas e respectivas amostras biológicas, adaptado de Zeferino et al. 2020 (21)

Origem	Fenótipo de resistência à meticilina	Estirpe analisada	Amostra biológica
Comensais	MSSA	CC4	Exsudado nasofaríngeo
		MB6	
		MB10	
		MB17	
	MRSA	MB2	
		MB12	
		MB5	
		VFXB14	
		VFXB16	
Nosocomiais	MSSA	3	Expetoração
		5	Expetoração
		13	Exs. Superficial Aspirado Mama
		15	Expetoração
		16	Expetoração
	MRSA	7	Exs. Purulento de úlcera pé direito
		9	Expetoração
		18	Lavado broncoalveolar
		31	Hemocultura
		22	Biópsia de úlcera de pressão

Tabela 4.2 - Descrição das estirpes quanto à sua origem, fenótipo de resistência à meticilina e aos antibióticos testados, adaptado de Zeferino et al. 2020 (21)

Origem	Fenótipo de resistência à Meticilina	Estirpes	Imipenem (10µg)	Tetraciclina (30µg)	Gentamicina (30µg)	Amoxicilina (25µg)
Comensais	MSSA	CC4	S	S	S	R
		MB6	S	S	S	R
		MB10	S	S	S	R
		MB17	S	S	S	S
	MRSA	MB2	S	S	S	R
		MB12	R	S	S	R
		MB5	S	S	S	S
		VFXB14	S	S	S	R
		VFXB16	S	S	S	R
	Nosocomiais	MSSA	3	S	S	S
5			S	S	S	R
13			S	S	S	S
15			S	NA	S	R
16			S	S	R	R
MRSA		7	S	S	S	R
		9	R	S	R	R
		18	S	S	R	R
		31	S	NA	R	R
		22	R	S	S	R

*S-Sensível e R- Resistente

Relativamente ao sinergismo observado com a EGCG, temos que o fenótipo de resistência a uns antibióticos reverteu na sua totalidade, outros reverteram até ou a partir de certa concentração de EGCG e alguns não alteraram o seu fenótipo (Tabela 4.2).

Tabela 4.3 - Descrição das estirpes quanto ao sinergismo da EGCG com os vários antibióticos testados, adaptado de Zeferino et al. 2020 (21)

Origem	Fenótipo de resistência à Meticilina	Estirpes	Sinergismo com a EGCG
Comensais	MSSA	CC4	IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX R reversão com EGCG \geq 50 μ g/mL
		MB6	IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX R reversão total
		MB10	IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX R sem reversão
		MB17	IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX S
	MRSA	MB2	IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX R reversão total
		MB12	IMIP R reversão total; TETRA S; GENTA S; AMOX R sem reversão
		MB5	IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX S
		VFXB14	IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX R sem reversão
		VFXB16	IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX R reversão com EGCG \geq 100 μ g/mL
	Nosocomiais	MSSA	3
5			IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX R reversão com EGCG \geq 50 μ g/mL
13			IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX S
15			IMIP S; TETRA NA; GENTA S; AMOX R sem reversão
16			IMIP S; TETRA S; GENTA R sem reversão; AMOX R sem reversão
MRSA		7	IMIP S; TETRA S; GENTA S; AMOX R sem reversão
		9	IMIP R; TETRA S; GENTA R reversão total; AMOX R sem reversão
		18	IMIPS; TETRA S; GENTA R reversão total; AMOX R sem reversão
		31	IMIP S; TETRA NA; GENTA R reversão com EGCG \geq 100 μ g/mL; AMOX sem reversão
		22	IMIP R sem reversão; TETRA S; GENTA S; AMOX R sem reversão

*IMIP – Imipenem (10µg); TETRA – Tetraciclina (30µg); GENTA – Gentamicina (30µg); AMOX – Amoxicilina (25µg); S-Sensível e R- Resistente; Destacadas a vermelho apresentam-se as estirpes mais resistentes dentro de cada grupo de estirpes.

4.3 Procedimento laboratorial

4.3.1 Preparação das estirpes

4.3.1.1 Estirpes congeladas

Os isolados encontravam-se congelados em 10% glicerol a -20°C. Numa primeira fase, procedeu-se ao descongelamento das estirpes em gelo seco, de forma gradual, provocando o menor dano possível nas mesmas.

4.3.1.2 Cultura das estirpes

De modo, a avaliar a transmissão das características epigenéticas em estudo para a descendência, os mesmos métodos foram aplicados às estirpes após serem semeadas em gelose de sangue, com 24h de incubação, a 37°C. A extração de RNA foi realizada partir das colónias isoladas, elevando o número de extrações para o dobro. Desta forma, contabiliza-se um total de 38 eluídos – 19 diretamente provenientes das colónias congeladas e armazenadas, e outros 19 eluídos derivados da cultura e respetiva sementeira das mesmas.

4.3.2 Extração de RNA

O RNA total foi extraído, recorrendo ao *NZY Total RNA Isolation kit*, da nzytech™, de acordo com as instruções do fabricante (**Figura 4.1, Anexo I**). Este método utiliza um tampão de lise desnaturante, contendo tiocianato de guanidina, que inativa as RNases celulares, para garantir a obtenção de moléculas de RNA intactas. O etanol adicionado permite a ligação seletiva do RNA total na membrana de sílica enquanto as impurezas são removidas. Para prevenir a contaminação com DNA, a solução de DNase I é adicionada à membrana de sílica. Por fim, é obtido um eluído de RNA puro, numa solução aquosa livre de RNases. Este *kit* está desenhado para a sua utilização em estirpes bacterianas.

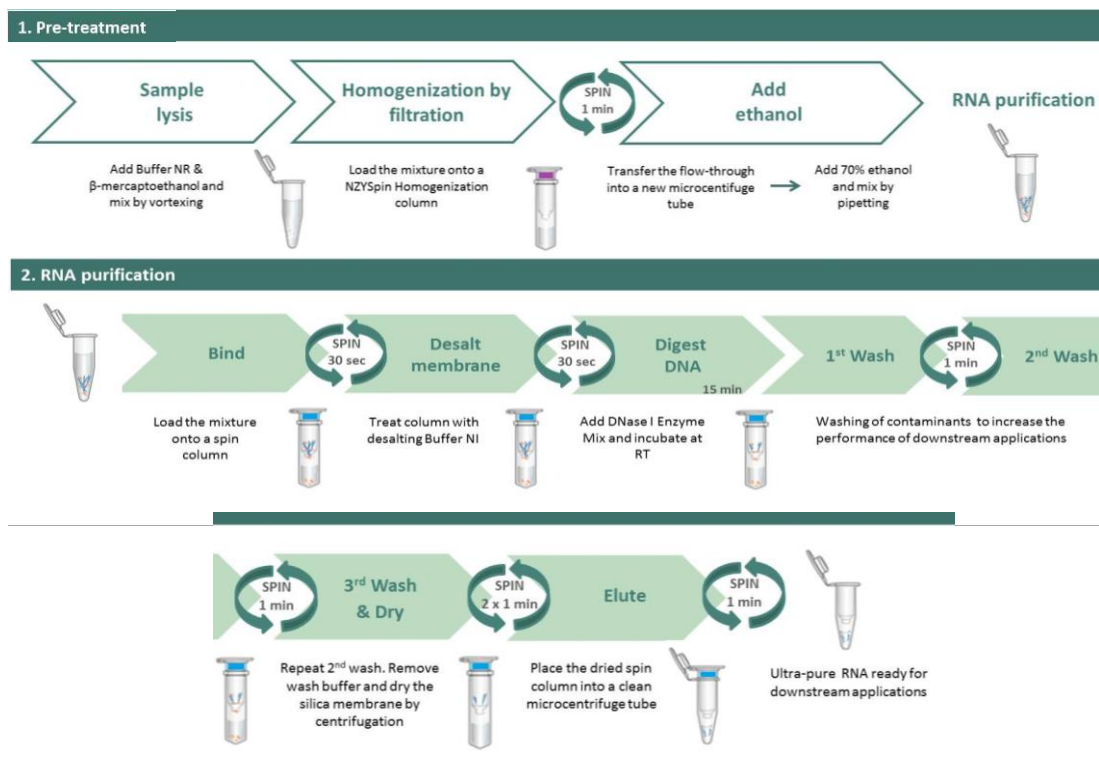


Figura 4.1 - Protocolo de extração de RNA, NZY Total RNA Isolation kit, nzytech™

4.3.3 Quantificação de RNA

Foi determinada a concentração de RNA em todos os isolados, através de espectrofotometria em microvolumes, no equipamento *NanoDrop One*® da *ThermoFisher*™, contra um branco de água. Este equipamento permite, para além da obtenção da concentração de RNA (ng/ μ L), o cálculo das razões de absorvâncias A260/280, que controla a qualidade da extração de RNA, com valores ótimos próximos de 2.0 para o RNA “puro”, e A260/230 que pode indicar a contaminação com diversos compostos, como fenóis, guanidina, partículas magnéticas, hidratos de carbono e proteínas. Os valores desta última variam, geralmente, entre 1.8 e 2.2.

4.3.4 Conversão para cDNA

Depois de obtidas as concentrações de RNA adequadas para cada estirpe, foi possível calcular o volume necessário para a normalização do conteúdo em RNA utilizado em 100ng, com diluição em água livre de RNases. 100ng de RNA total de cada estirpe foram reversamente transcritos em cDNA, recorrendo aos reagentes *Applied Biosystems*™ *TaqMan*™ *Reverse Transcription* (*Invitrogen*™, *Thermo Fisher Scientific Inc.*), com hexâmeros aleatórios como *primers*, numa reação RT (*Reverse-Transcriptase*) reduzida, de acordo com as instruções do fabricante (**Anexo II**). As reações RT

decorreram nas seguintes condições: 25°C por 10 min, 37°C por 30 min, 95°C por 5 min, mantendo a 4°C, no termociclador.

4.3.5 qRT-PCR

O qRT-PCR realizou-se no equipamento *Connect™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-rad) para quantificar a expressão génica. Cada reação foi executada em triplicado utilizando *SYBR Green Mastermix* (Bio-rad), *Primer Forward*, *Primer Reverse* e água livre de RNases, num volume final de 20µl. Para cada triplicado foram utilizados 3,25 µL de cDNA, e para o 16sRNA foram utilizados 0,3 µL. Foram realizados PCRs controlo para todas as combinações de *primers* sem *template* (**Figura 4.2**). As condições dos ciclos foram as seguintes: 95°C por 3 minutos; e 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos, com leitura por fluorescência.

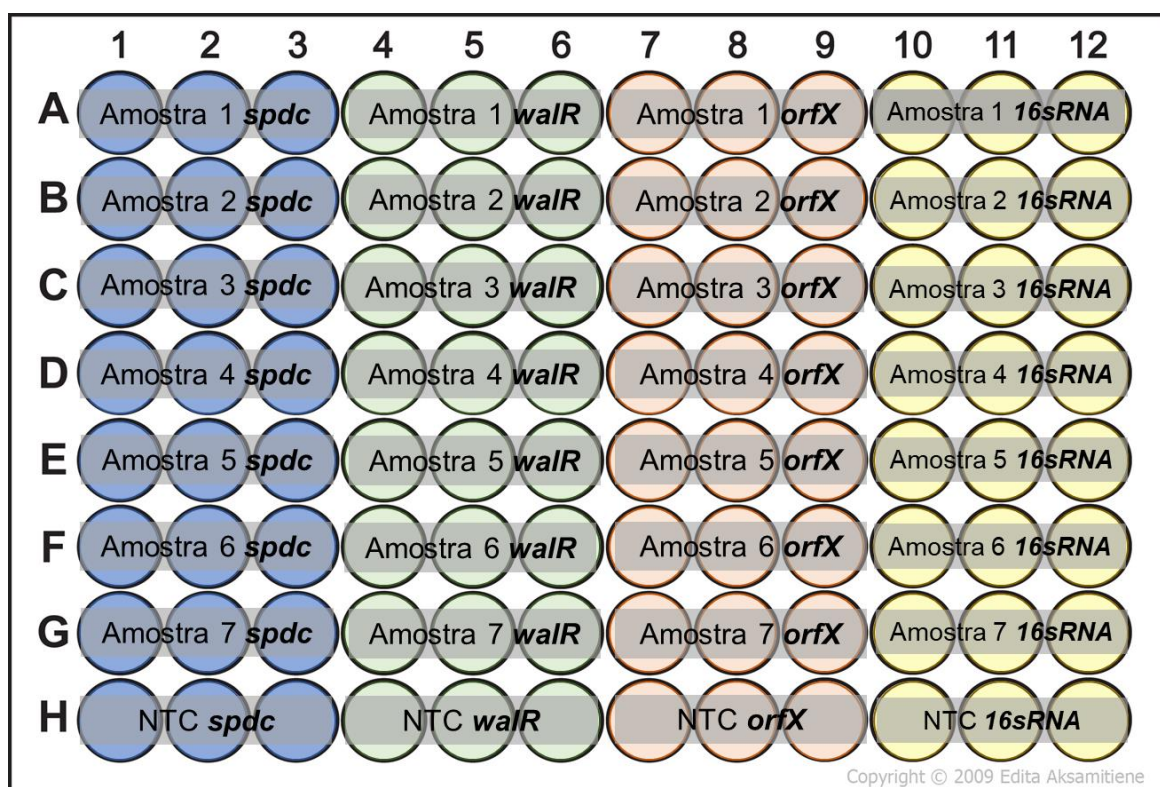


Figura 4.2 - Desenho da placa de PCR (NTC – No-template control) O mesmo replicou-se sucessivamente para as 38 estirpes em estudo.

A quantificação relativa foi realizada pela normalização dos ciclos *threshold* (**Ct**) dos genes-alvo com o **Ct** médio de 16S rRNA, pelo cálculo de ΔCt , para cada uma das medições. Foi usado como controlo interno o 16S rRNA por ser um gene de manutenção

celular (*housekeeping gene*). A transcrição dos genes alvo foi comparada em relação a este gene, sendo o basal.

Os níveis transcricionais foram analisados calculando $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{c/tratamento} - \text{média } \Delta Ct_{controle}$), com recurso ao software Microsoft Excel. Foram definidos grupos de estirpes a analisar, com base na sua origem e fenótipo de resistência à Meticilina, nomeadamente, comensais MSSA, comensais MRSA, nosocomiais MSSA e nosocomiais MRSA. De entre estes, foi selecionada a estirpe que se apresentou como mais resistente, segundo o antibiograma realizado previamente, em relação à qual se compararam os níveis transcricionais dos vários moduladores epigenéticos, representando o controlo na expressão matemática suprarreferida (média ΔCt controlo). As médias dos Cts obtidas para cada gene e respetiva estirpe contribuíram para o cálculo do ΔCt c/tratamento. As diferenças significativas foram obtidas utilizando o teste de t *Student*.

4.4 Considerações éticas e legais

Este trabalho decorre do projeto de mestrado da Dr^a. Ana Sofia Zeferino, intitulado “Potencial Antimicrobiano a Epigallocatequina-3-Galato do Chá Verde contra MRSA de Isolados Hospitalares e da Comunidade”, aprovado em conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, com a ref: CE-ESTeSL-Nº.18-2019. O presente estudo tem base no conjunto de amostras cedido pela investigação suprarreferida, sendo que não há necessidade de obter consentimentos informados, pois não foram tratados quaisquer dados pessoais.

A presente investigação foi aprovada pelo conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa com a referência CE-ESTeSL-Nº. 20-2020 (**Anexo III**).

4.5 Financiamento

O estudo decorreu no Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia H&TRC, localizado na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa do Instituto Politécnico de Lisboa, financiado pelo projeto IDI&CA 2020 - Modulação de resistência e divergência epigenética em perfis de fenotípicos resistentes de *Staphylococcus aureus* (EpiResisSA).

Os autores e o H&TRC agradecem o apoio nacional da FCT/MCTES através das UIDB/05608/2020 e UIDP/05608/2020.

5. Resultados

Para a exposição dos resultados obtidos, as estirpes analisadas foram agrupadas consoante a sua origem, comensal ou nosocomial, e fenótipo de resistência à Meticilina e, ainda, separadas de acordo com o seu tratamento: obtidas diretamente das estirpes congeladas, ou através da sua sementeira em gelose de sangue, após 24 horas de incubação. Deste modo, reconhecem-se oito grupos distintos, sob os quais irão ser apresentados os resultados, sendo eles MSSA comensais, MRSA comensais, MSSA nosocomiais e MRSA nosocomiais, obtidos diretamente das estirpes congeladas, e os mesmos 4 grupos para as estirpes após cultura em gelose de sangue.

Os níveis transcricionais para os 3 moduladores epigenéticos, foram obtidos através de um primeiro cálculo de ΔCt , normalizando os Cts obtidos para cada triplicado das estirpes e gene, com o gene de manutenção celular 16sRNA. Em seguida, foi calculado o $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt c/tratamento - média ΔCt controlo), onde foram selecionadas, dentro de cada grupo suprarreferido, as estirpes mais resistentes, com base no seu antibiograma e sinergismo com a EGCG, observado previamente (21).

A representação dos dados exposta contempla a média do $\Delta\Delta Ct$ e respetivo desvio padrão para cada estirpe, permitindo a observação da distribuição dos dados dentro do mesmo grupo, relativamente à estirpe mais resistente. Posteriormente, para avaliar a significância dos níveis transcricionais dos vários genes, procedeu-se à realização do teste *t Student*, para comparação de médias.

5.1 Estirpes isoladas da flora comensal analisadas

Iniciando pelos resultados obtidos diretamente das estirpes congeladas, estes estão apresentados em dois grupos distintos: MSSA (CC4, MB6, MB10 e MB17) e MRSA (MB2, MB5, MB12, VFXB14, VFXB16). Para cada um deles, serão tidos em conta os 3 moduladores epigenéticos testados, *Spdc*, *WalR* e *OrfX*.

5.1.1 MSSA

Neste primeiro grupo, temos as estirpes MSSA de origem comensal, no qual a estirpe MB10 se apresenta como a mais resistente, apresentando resistência à amoxicilina (25 μ g), sem reversão de fenótipo de resistência com exposição à EGCG.

5.1.1.1 Modulador epigenético *SpdC*

Relativamente à estirpe mais resistente, MB10, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na **tabela 5.1**.

Tabela 5.1 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, previamente congeladas, para o gene *SpdC*

Estirpes	CC4	MB6	MB17
Média $\Delta\Delta Ct$	-10,865	4,615	4,980
Desvio padrão	0,16263456	0,261629509	1,145512986

Observa-se que a estirpe CC4, com reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25 μ g) após exposição a pelo menos 50 μ g/mL de EGCG, tem níveis transcricionais de *spdC* bastante inferiores à estirpe mais resistente. Por outro lado, as estirpes totalmente sensíveis ou com reversão total do fenótipo de resistência à amoxicilina (25 μ g) após exposição à EGCG (MB6 e MB17), apresentam níveis transcricionais superiores à estirpe resistente, semelhantes entre si.

5.1.1.2 Modulador epigenético *WalR*

Relativamente à estirpe mais resistente, MB10, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, previamente congeladas, para o gene *WalR*

Estirpes	CC4	MB6	MB17
Média $\Delta\Delta Ct$	7,875	1,845	17,292
Desvio padrão	0,098995	0,084853	0

Verifica-se um aumento generalizado dos níveis transcricionais de *WalR*, relativamente à estirpe mais resistente, com o maior valor alcançado na estirpe MB17, totalmente sensível aos antibióticos.

5.1.1.3 Modulador epigenético *OrfX*

Relativamente à estirpe mais resistente, MB10, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, previamente congeladas, para o gene *OrfX*

Estirpes	CC4	MB6	MB17
Média $\Delta\Delta Ct$	3,895	1,470	19,210
Desvio padrão	0,190918831	0,098994949	0,098994949

Tal como observado para o gene *WalR*, aqui também se verifica um aumento generalizado dos níveis transcricionais de *OrfX*, destacando-se a estirpe mais sensível que obteve o valor mais elevado (MB17).

5.1.2 MRSA

Neste segundo grupo, temos as estirpes MB2, MB12, MB5, VFXB14 e VFXB16, MRSA de origem comensal, no qual a estirpe VFXB14 se apresenta como a mais resistente, apresentando resistência à amoxicilina (25 μ g), sem reversão de fenótipo de resistência com exposição à EGCG.

5.1.2.1 Modulador epigenético *SpdC*

Relativamente à estirpe mais resistente, VFXB14, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, previamente congeladas, para o gene *SpdC*

Estirpes	MB2	MB12	MB5	VFXB16
Média $\Delta\Delta Ct$	20,690	2,740	4,740	3,430
Desvio padrão	6,420529573	0,240416306	0,141421356	0,127279221

Em todas as estirpes foi verificado um aumento dos níveis transcricionais de *spdC* em comparação com a estirpe mais resistente, destacando-se em particular a estirpe MB2, com reversão total do fenótipo de resistência à amoxicilina (25 μ g), após exposição à EGCG.

5.1.2.2 Modulador epigenético *WalR*

Relativamente à estirpe mais resistente, VFXB14, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, previamente congeladas, para o gene *WalR*

Estirpes	MB2	MB12	MB5	VFXB16
Média $\Delta\Delta Ct$	2,430	2,400	7,045	3,158
Desvio padrão	0,487903679	0,120208153	0	0,176162803

Verifica-se um aumento generalizado dos níveis transcricionais de *WalR*, relativamente à estirpe mais resistente, com o maior valor alcançado na estirpe MB5, totalmente sensível aos antibióticos.

5.1.2.3 Modulador epigenético *OrfX*

Relativamente à estirpe mais resistente, VFXB14, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, previamente congeladas, para o gene *OrfX*

Estirpes	MB2	MB12	MB5	VFXB16
Média $\Delta\Delta Ct$	3,265	3,860	20,160	5,998
Desvio padrão	0,509116882	0,219203102	0,657609307	0,136503968

Tal como observado para o gene *WalR*, aqui também se verifica um aumento generalizado dos níveis transcricionais de *OrfX*, destacando-se a estirpe mais sensível, MB5, que atinge o valor mais elevado, 4-6X superior às restantes estirpes do grupo.

5.2 Estirpes isoladas de infecções agudas hospitalares analisadas

Em seguida, são apresentados os resultados obtidos diretamente das estirpes congeladas, para as estirpes de origem nosocomial, divididos em dois grupos distintos, com base no seu fenótipo de resistência à meticilina: MSSA (3, 5, 13, 15, 16) e MRSA (7, 9, 18, 31, 22). Para cada um deles, serão tidos em conta os 3 moduladores epigenéticos testados, *Spdc*, *WalR* e *OrfX*.

5.2.1 MSSA

Neste primeiro grupo, temos as estirpes MSSA de origem nosocomial, no qual a estirpe 16 se apresenta como a mais resistente, apresentando-se como sensível ao imipenem (10µg) e tetraciclina (30µg), e resistente à gentamicina (30µg) e amoxicilina (25µg), sem reversão do fenótipo de resistência, após exposição à EGCG.

5.2.1.1 Modulador epigenético *Spdc*

Relativamente à estirpe mais resistente, estirpe 16, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA nosocomiais, previamente congeladas, para o gene *SpdC*

Estirpes	3	5	13	15
Média $\Delta\Delta Ct$	6,376	0,708	14,373	4,248
Desvio padrão	0,110151411	0,487903679	0,834386002	0,007071068

Verifica-se um aumento dos níveis transcricionais nas restantes estirpes, relativamente à estirpe mais resistente. O valor mais elevado foi o da estirpe 13, que se revela como mais sensível a todos os antibióticos, destacando-se das restantes.

5.2.2.2 Modulador epigenético *WalR*

Relativamente à estirpe mais resistente, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA nosocomiais, previamente congeladas, para o gene *WalR*

Estirpes	3	5	13	15
Média $\Delta\Delta Ct$	0,935	-0,050	2,063	-1,377
Desvio padrão	0,06363961	0,212837967	0,064291005	0,116761866

Na generalidade, observam-se níveis transcricionais reduzidos. A estirpe que revela maior nível transcricional de *WalR* corresponde à mais sensível (estirpe 13).

5.2.2.3 Modulador epigenético *OrfX*

Relativamente à estirpe mais resistente, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, previamente congeladas, para o gene *OrfX*

Estirpes	3	5	13	15
Média $\Delta\Delta Ct$	0,687	2,867	1,280	-2,160
Desvio padrão	0,169705627	0,15132746	0,056862407	0,140118997

Tal como observado para o gene *WalR*, aqui também se verifica que os valores dos níveis transcricionais se encontram reduzidos. O valor mais baixo encontra-se para a estirpe 15, sem reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25 μ g) após exposição à EGCG.

5.2.2 MRSA

Neste segundo grupo, temos as estirpes 7, 9, 18, 31 e 22, MRSA de origem nosocomial, no qual a estirpe 22 se apresenta como a mais resistente, apresentando-se como sensível à gentamicina (30 μ g) e tetraciclina (30 μ g), no entanto, como resistente tanto ao imipenem (10 μ g) como à amoxicilina (25 μ g), sem reversão do fenótipo de resistência após exposição à EGCG.

5.2.2.1 Modulador epigenético *SpdC*

Relativamente à estirpe mais resistente, estirpe 22, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, previamente congeladas, para o gene *SpdC*

Estirpes	7	9	18	31
Média $\Delta\Delta Ct$	1,417	1,317	1,340	1,280
Desvio padrão	0,230289673	0,537804177	0,494974747	0,848528137

Em todas as estirpes se verifica um pequeno aumento dos níveis transcricionais de *SpdC* em comparação com a estirpe mais resistente, revelando valores semelhantes entre as estirpes.

5.2.2.2 Modulador epigenético *WalR*

Relativamente à estirpe mais resistente, estirpes 22, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.11.

Tabela 5.11 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, previamente congeladas, para o gene *WalR*

Estirpes	7	9	18	31
Média $\Delta\Delta Ct$	1,375	1,765	1,750	1,865
Desvio padrão	0,261629509	0,035355339	0,056568542	0,6151829

Observa-se um pequeno aumento generalizado dos níveis transcricionais de *WalR*, relativamente à estirpe mais resistente.

5.2.2.3 Modulador epigenético *OrfX*

Relativamente à estirpe mais resistente, estirpe 22, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.12.

Tabela 5.12 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, previamente congeladas, para o gene *OrfX*

Estirpes	7	9	18	31
Média $\Delta\Delta Ct$	2,455	1,628	1,580	2,965
Desvio padrão	0,098994949	0,377403409	0,219203102	0,353553391

Tal como observado para os genes *spdC* e *WalR*, aqui também se verifica um pequeno aumento generalizado dos níveis transcricionais de *OrfX*. Nos MRSA nosocomiais, previamente congelados, observa-se que as variações intragrupais são reduzidas, comparativamente aos outros conjuntos de estirpes já apresentados.

5.3 Estirpes isoladas da flora comensal após sementeira 24h sem exposição

Posteriormente foram recolhidos os resultados obtidos para as mesmas estirpes da flora comensal, após sementeira em gelose de sangue. Os grupos mantêm-se iguais aos apresentados acima.

5.3.1 MSSA

Neste primeiro grupo, a estirpe MB10 mantêm-se como a mais resistente, apresentando resistência à amoxicilina (25 μ g), sem reversão de fenótipo de resistência com exposição à EGCG.

5.3.1.1 Modulador epigenético *Spdc*

Relativamente à estirpe mais resistente, MB10, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.13.

Tabela 5.13 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, após gelose, para o gene *SpdC*

Estirpes	CC4	MB6	MB17
Média $\Delta\Delta Ct$	-10,690	1,935	-7,345
Desvio padrão	0,296984848	0,530330086	0,16263456

Observa-se que a estirpe CC4, com reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25 μ g) após exposição a pelo menos 50 μ g/mL, tem níveis transcricionais de *spdC* bastante inferiores, em comparação com a estirpe mais resistente, tal como sucedia na sua correspondência, previamente congelada. Também a estirpe MB6, com reversão total do fenótipo de resistência à amoxicilina (25 μ g), após exposição à EGCG, mantém os seus níveis transcricionais superiores à estirpe mais resistente. No entanto, a estirpe MB17, mais sensível, apresenta uma conversão dos seus níveis transcricionais, passando de valores positivos, para valores bastante mais baixos, relativamente à estirpe mais resistente.

5.3.1.2 Modulador epigenético *WalR*

Relativamente à estirpe mais resistente, MB10, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.14.

Tabela 5.14 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, após gelose, para o gene *WalR*

Estirpes	CC4	MB6	MB17
Média $\Delta\Delta Ct$	0,730	2,247	4,480
Desvio padrão	0,16563011	2,093036072	0,25540817

Observa-se um aumento generalizado dos níveis transcricionais de *WalR*, relativamente à estirpe mais resistente, com o maior valor alcançado na estirpe MB17, totalmente sensível aos antibióticos. Deste modo, mantém-se o padrão observado nas estirpes previamente congeladas.

5.3.1.3 Modulador epigenético *OrfX*

Relativamente à estirpe mais resistente, MB10, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.15.

Tabela 5.15 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, após gelose, para o gene *OrfX*

Estirpes	CC4	MB6	MB17
Média $\Delta\Delta Ct$	3,937	1,767	3,227
Desvio padrão	0,153948043	0,169705627	0,346987031

Tal como observado para o gene *WalR*, aqui também se verifica um aumento generalizado dos níveis transcricionais de *OrfX*, porém menos acentuado que nas estirpes previamente congeladas.

5.3.2 MRSA

Neste segundo grupo, a estirpe VFXB14 permanece como a mais resistente, apresentando resistência à amoxicilina (25 μ g), sem reversão de fenótipo de resistência com exposição à EGCG.

5.3.2.1 Modulador epigenético *SpdC*

Relativamente à estirpe mais resistente, VFXB14, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.16.

Tabela 5.16 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, após gelose, para o gene *SpdC*

Estirpes	MB2	MB12	MB5	VFXB16
Média $\Delta\Delta Ct$	13,109	-3,466	0,491	2,114
Desvio padrão	0,120208153	0,098994949	0,143643076	0,240416306

Por um lado, destaca-se novamente a estirpe MB2 com reversão total do fenótipo de resistência à amoxicilina (25 μ g), após exposição à EGCG, com um aumento acentuado dos níveis transcricionais de *spdC*. Por outro lado, observa-se uma diminuição dos níveis transcricionais da estirpe MB12, com reversão total do fenótipo de resistência ao

imipenem (10µg) após exposição à EGCG, sem reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25µg), relativamente aos resultados obtidos nas estirpes previamente congeladas.

5.3.2.2 Modulador epigenético *WaiR*

Relativamente à estirpe mais resistente, VFXB14, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.17.

Tabela 5.17 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, após gelose, para o gene *WaiR*

Estirpes	MB2	MB12	MB5	VFXB16
Média $\Delta\Delta Ct$	0,848	-3,350	1,058	3,020
Desvio padrão	0,14571662	0,007071068	0,076376262	0,120208153

Destaca-se o resultado obtido para a estirpe MB12, com reversão total do fenótipo de resistência ao imipenem (10µg) após exposição à EGCG, sem reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25µg), com uma diminuição acentuada dos níveis transcricionais de *WaiR*, relativamente aos resultados obtidos nas estirpes previamente congeladas. Também para a estirpe MB5, totalmente sensível, se observa uma diminuição dos níveis transcricionais de *WaiR*, em comparação às previamente congeladas.

5.3.2.3 Modulador epigenético *OrfX*

Relativamente à estirpe mais resistente, VFXB14, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.18.

Tabela 5.18 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA comensais, previamente congeladas, para o gene *OrfX*

Estirpes	MB2	MB12	MB5	VFXB16
Média $\Delta\Delta Ct$	1,403	-2,450	4,470	5,990
Desvio padrão	0,509116882	0,219203102	0,657609307	0,136503968

Destaca-se novamente neste conjunto, a estirpe MB12 com reversão total do fenótipo de resistência ao imipenem (10µg) após exposição à EGCG, sem reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25µg), cujos níveis transcricionais diminuíram acentuadamente, relativamente às estirpes congeladas.

5.4 Estirpes isoladas de infecções agudas hospitalares, após sementeira 24h sem exposição

Em seguida, são apresentados os resultados obtidos para as estirpes obtidas por meio de sementeira das previamente congeladas, em gelose de sangue. As estirpes de origem nosocomial, continuam a ser divididas em dois grupos distintos, com base no seu fenótipo de resistência à metilina.

5.4.1 MSSA

Neste primeiro grupo, temos as estirpes 3, 5, 13, 15 e 16, MSSA de origem nosocomial, no qual a estirpe 16 se mantém como a mais resistente.

5.4.1.1 Modulador epigenético *Spdc*

Relativamente à estirpe mais resistente, estirpe 16, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.19.

Tabela 5.19 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA nosocomiais, após gelose, para o gene *SpdC*

Estirpes	3	5	13	15
Média $\Delta\Delta Ct$	6,015	2,205	12,900	7,333
Desvio padrão	0,16263456	0,06363961	0	0,25146239

Verifica-se um aumento dos níveis transcricionais nas restantes estirpes, relativamente à estirpe mais resistente, mantendo um padrão semelhante ao observado nas estirpes congeladas. Do mesmo modo, é a estirpe 13, mais sensível, que apresenta o maior nível transcricional de *spdC*.

5.4.1.2 Modulador epigenético *WalR*

Relativamente à estirpe mais resistente, estirpe 16, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.20.

Tabela 5.20 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA nosocomiais, após gelose, para o gene *WalR*

Estirpes	3	5	13	15
Média $\Delta\Delta Ct$	-0,135	0,440	-3,640	2,383
Desvio padrão	0,049497475	0,028284271	0,113137085	0,065064071

Na generalidade, observam-se níveis transcricionais reduzidos, tal como verificado para as estirpes congeladas. No entanto, a estirpe 13, mais sensível, diminuiu os seus níveis transcricionais, relativamente à congelada.

5.4.1.3 Modulador epigenético *OrfX*

Relativamente à estirpe mais resistente, estirpe 16, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.21.

Tabela 5.21 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MSSA comensais, previamente congeladas, para o gene *OrfX*

Estirpes	3	5	13	15
Média $\Delta\Delta Ct$	0,280	3,595	-3,795	2,235
Desvio padrão	0,106066017	0,169705627	0,036055513	0,29816103

O valor mais baixo encontra-se para a estirpe 13, mais sensível, cujo nível de transcrição de *orfX* diminuiu relativamente à respetiva estirpe congelada. Por outro lado, a estirpe 15 revelou um aumento dos níveis de transcrição de *orfX*, relativamente à congelada.

5.4.2 MRSA

Neste segundo grupo, temos as estirpes MRSA de origem nosocomial, obtidas a partir da sementeira das estirpes previamente congeladas, em gelose de sangue. Neste grupo, a estirpe 22 mantém-se como a mais resistente.

5.4.2.1 Modulador epigenético *SpdC*

Relativamente à estirpe mais resistente, estirpe 22, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.22.

Tabela 5.22 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, após gelose, para o gene *SpdC*

Estirpes	7	9	18	31
Média $\Delta\Delta Ct$	0,885	2,445	4,913	1,290
Desvio padrão	0,049497475	0,38890873	0,325627599	0,084852814

Pode concluir-se que se observa o mesmo padrão que nas estirpes congeladas, com um ligeiro aumento dos níveis de transcrição de *spdC*.

5.4.2.2 Modulador epigenético *WalR*

Relativamente à estirpe mais resistente, estirpe 22, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.23.

Tabela 5.23 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, após gelose, para o gene *WalR*

Estirpes	7	9	18	31
Média $\Delta\Delta Ct$	0,130	1,590	4,727	1,235
Desvio padrão	0,056568542	0,169705627	0,105987421	0,106066017

Observa-se um pequeno aumento generalizado dos níveis transcricionais de *WalR*, relativamente à estirpe mais resistente. No que diz respeito às estirpes congeladas, observa-se um aumento dos níveis transcricionais da estirpe 18, com reversão do fenótipo de resistência à gentamicina (30 μ g) e sem reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25 μ g), após exposição à EGCG.

5.4.2.3 Modulador epigenético *OrfX*

Relativamente à estirpe mais resistente, estirpe 22, obteve-se a média do $\Delta\Delta Ct$ e desvio padrão para as restantes estirpes, cujos valores podem ser observados na tabela 5.24.

Tabela 5.24 - Média $\Delta\Delta Ct$ e Desvio padrão relativamente aos MRSA nosocomiais, após gelose, para o gene *OrfX*

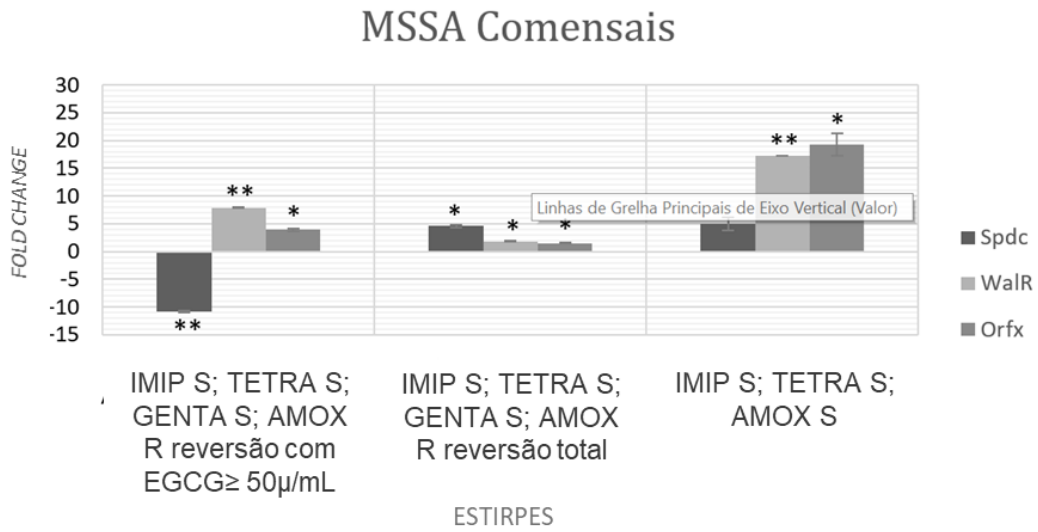
Estirpes	7	9	18	31
Média $\Delta\Delta Ct$	0,475	1,035	4,790	1,760
Desvio padrão	0,06363961	0,134350288	0,04	0,127279221

Relativamente à estirpe mais resistente, observa-se um aumento dos níveis transcricionais. Em comparação com as estirpes congeladas, observa-se uma diminuição generalizada dos níveis transcricionais, com exceção da estirpe 18, com reversão do fenótipo de resistência à gentamicina (30 μ g) e sem reverão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25 μ g), após exposição à EGCG, na qual se observa um aumento dos mesmos.

5.5 Análise estatística dos resultados

Após obtenção dos níveis transcricionais dos moduladores epigenéticos em estudo do conjunto de estirpes, procedeu-se à análise das diferenças estatísticas entre as várias estirpes e aquela mais resistente. Para tal, recorreu-se ao teste do *t Student* para comparação de médias, considerando $p < 0.01$, significativamente diferente.

A



B

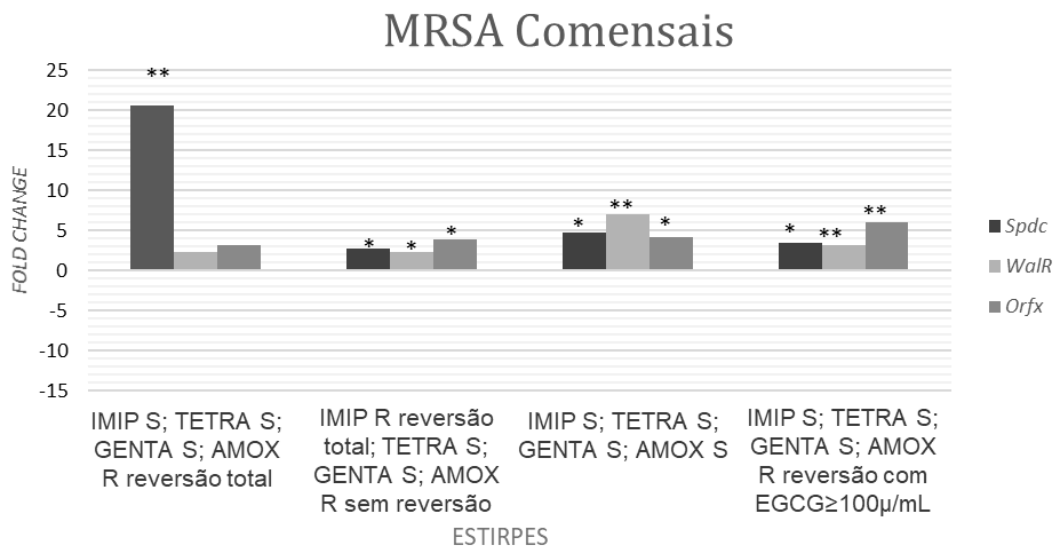


Gráfico 5.1 – Expressão relativa dos genes *OrfX*, *SpdC* e *WalR* para as estirpes MSSA (A) e MRSA (B) comensais. 16S rRNA foi utilizado como gene de manutenção celular e a quantificação relativa foi realizada para normalização dos Cts. As barras de erro representam o desvio padrão entre os tratamentos independentes e os triplicados de qRT-PCR. Os valores estatísticos significativos, que foram comparados com as estirpes mais resistentes e calculados com o teste *t de Student*, são ilustrados como: * p < 0,01 e ** p < 0,001.

Através do gráfico 5.1, observa-se que, após exposição à EGCG, os fenótipos mais sensíveis apresentam padrões de expressão génica diferentes, quando comparados com as estirpes mais resistentes.

Nas estirpes MSSA, destaca-se a estirpe MB17, sensível a todos os antibióticos, com um aumento generalizado dos moduladores epigenéticos analisados, e um aumento estatisticamente significativo para *WalR* e *OrfX* (1.85 ± 0.1 ; 1.5 ± 0.1 ; $p < 0.01$ respetivamente).

A estirpe MB6, com reversão total do fenótipo de resistência à amoxicilina (25µg), apresenta os níveis transcricionais dos três genes, *SpdC*, *WalR* e *OrfX* aumentados (1.62 ± 0.26 ; 1.85 ± 0.1 ; 1.5 ± 0.1 ; $p < 0.01$ respetivamente). A estirpe CC4, com uma reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25µg) após exposição à EGCG a partir de uma concentração de 50 µg/ml, por outro lado, apresenta níveis de *SpdC* significativamente diminuídos (10.865 ± 0.16 $p < 0.001$) e os níveis de *WalR* e *OrfX* elevados (7.88 ± 0.1 $p < 0.001$ e 3.9 ± 0.2 $p < 0.01$, respetivamente).

Comparativamente às estirpes MSSA, observa-se o mesmo padrão nas estirpes MRSA. A estirpe MB5, sensível a todos os antibióticos testados, apresenta níveis transcricionais de *SpdC* e *OrfX* aumentados (4.74 ± 0.14 ; 1.23 ± 0.65 ; $p < 0.01$ respetivamente) e *WalR*, de forma mais significativa (6.8 ± 0.28 ; $p < 0.01$).

Por outro lado, a estirpe MB2, com reversão total do fenótipo de resistência à amoxicilina (25µg), apenas apresenta os níveis de *SpdC* significativamente elevados (20.7 ± 6.4 $p < 0.001$). A estirpe MB12, com reversão do fenótipo de resistência ao imipenem (10µg) e sem qualquer efeito por parte da EGCG na resistência à amoxicilina (25µg), apresenta os níveis de *WalR* e *OrfX* aumentados (2.74 ± 0.24 ; 2.4 ± 0.12 ; 3.86 ± 0.22 ; $p < 0.01$, respetivamente). Por fim, a estirpe VFXB16, que apresentou reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25µg) após exposição a concentrações de 100 µg/ml de EGCG, apresentou níveis de transcrição elevados para os três moduladores epigenéticos, *SpdC*, *WalR* e *OrfX* (3.43 ± 0.13 ; $p < 0.01$; 3.15 ± 0.17 ; 5.99 ± 0.14 ; $p < 0.001$, respetivamente).

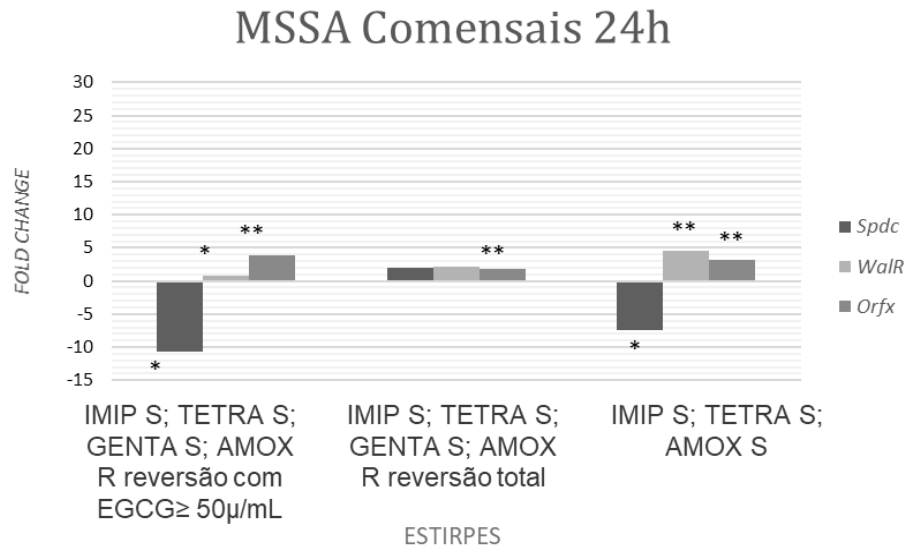
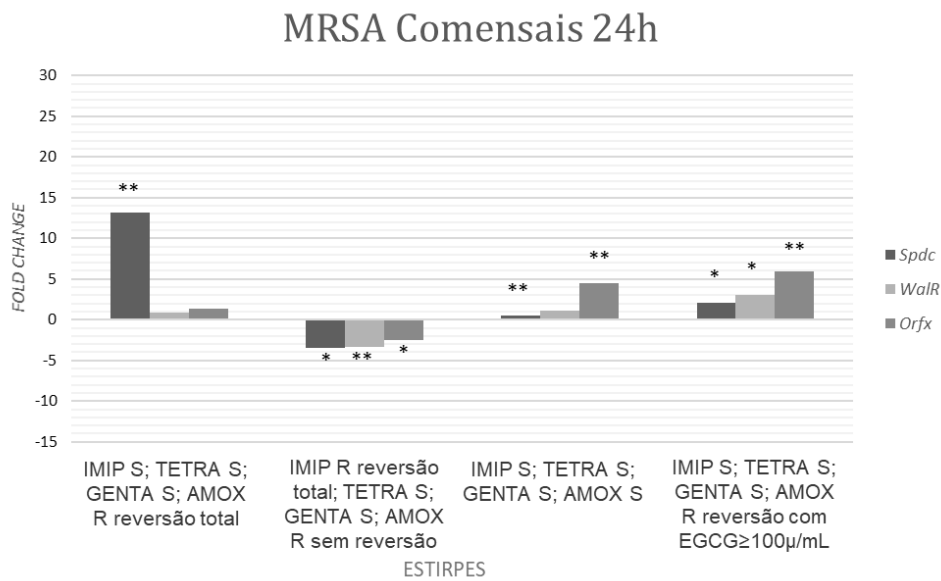
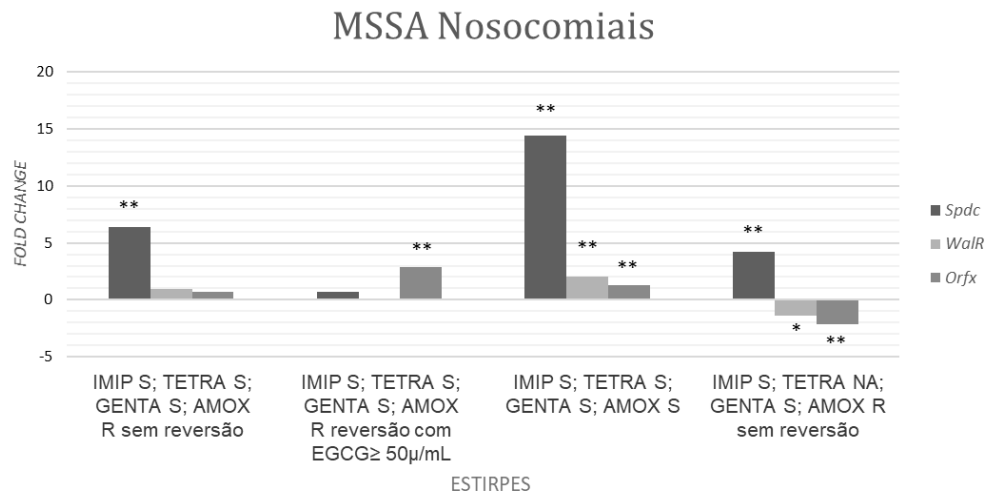
A**B**

Gráfico 5.2 – Expressão relativa dos genes *OrfX*, *SpdC* e *WalR* para as estirpes MSSA (A) e MRSA (B) comensais, após sementeira e 24h de incubação. 16S rRNA foi utilizado como gene de manutenção celular e a quantificação relativa foi realizada para normalização dos Cts. As barras de erro representam o desvio padrão entre os tratamentos independentes e os triplicados de qRT-PCR. Os valores estatísticos significativos, que foram comparados com as estirpes mais resistentes e calculados com o teste *t de Student*, são ilustrados como: * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$.

A análise dos níveis transcricionais dos três genes testados nas estirpes após sementeira e 24h de incubação, sem exposição à EGCG, revelou que os padrões de expressão foram mantidos, de forma geral. (Gráfico 5.2) Contudo, relativamente às estirpes MSSA, a estirpe MB6 apenas manteve o aumento dos níveis de *OrfX* (1.77 ± 0.17 ; $p < 0.001$) e a estirpe MB17 sofreu uma diminuição acentuada dos níveis de *SpdC* (-7.35 ± 0.16 ; $p < 0.01$).

No que diz respeito às estirpes MRSA, observaram-se alterações na estirpe MB12, cujos níveis de transcrição dos três genes, *Spdc*, *WalR* e *OrfX*, passaram a estar diminuídos, relativamente à estirpe mais resistente (-3.47 ± 0.1 ; $p < 0.01$ -3.35 ± 0.007 ; $p < 0.001$ -2.45 ± 0.15 ; $p < 0.01$ respetivamente).

A



B

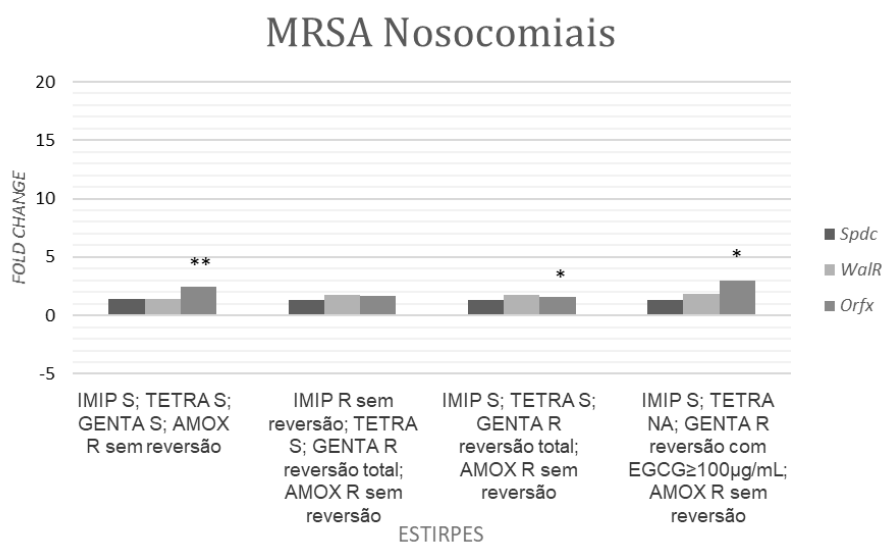


Gráfico 5.3 – Expressão relativa dos genes *OrfX*, *SpdC* e *WalR* para as estirpes MSSA (A) e MRSA (B) nosocomiais, previamente congeladas. 16S rRNA foi utilizado como gene de manutenção celular e a quantificação relativa foi realizada para normalização dos Cts. As barras de erro representam o desvio padrão entre os tratamentos independentes e os triplicados de qRT-PCR. Os valores estatísticos significativos, que foram comparados com as estirpes mais resistentes e calculados com o teste *t de Student*, são ilustrados como: * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$.

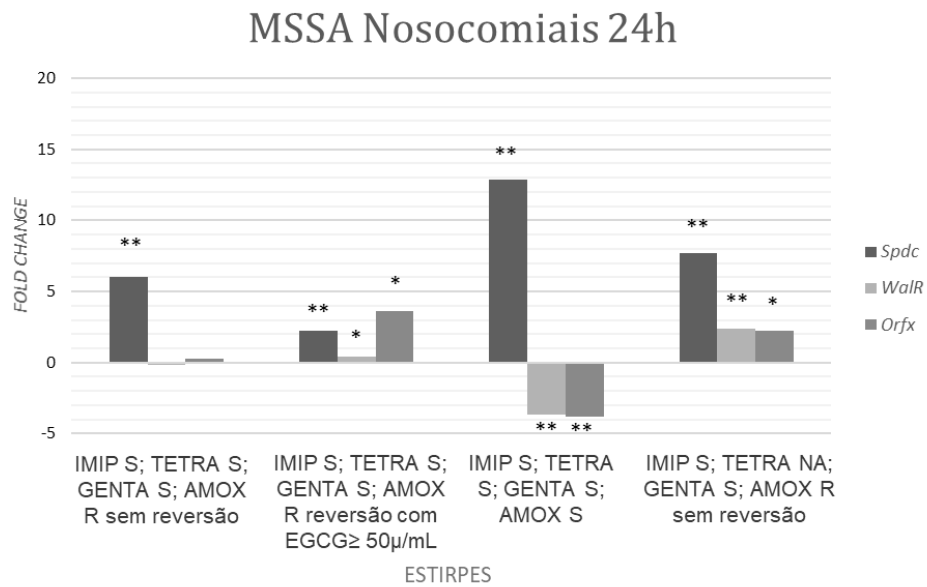
Em comparação com as estirpes comensais, nas de origem nosocomial os níveis de transcrição dos genes testados atingem níveis mais baixos, especialmente o *WalR* e o *OrfX*, sendo mais discreto o efeito da exposição à EGCG, nos mesmos.

Relativamente às estirpes MSSA, a estirpe 13, sensível a todos os antibióticos testados, revelou um aumento generalizados dos níveis transcricionais de *Spdc*, *WalR* e *Orfx* (14.37 ± 0.83 ; 2.06 ± 0.06 ; 1.3 ± 0.06 ; $p < 0.001$ respetivamente). A estirpe 3 sensível ao imipenem (10 μ g), tetraciclina (30 μ g) e gentamicina (30 μ g), mas resistente à amoxicilina (25 μ g), sem reversão do fenótipo após exposição à EGCG, apenas demonstrou um aumento significativo dos níveis transcricionais de *SpdC* (6.38 ± 0.11 $p < 0.001$). A estirpe 5, que apresentou reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25 μ g) após exposição a uma concentração de 50 μ g/ml de EGCG, apenas teve um aumento significativo dos níveis de *OrfX* (2.87 ± 0.15 $p < 0.001$).

Na estirpe 15, sensível ao imipenem (10 μ g), tetraciclina (30 μ g) e gentamicina (30 μ g), mas com resistência à amoxicilina (25 μ g), sem reversão da mesma, após exposição à EGCG, observou-se um aumento dos níveis de *SpdC* (4.25 ± 0.007 ; $p < 0.001$), acompanhados, porém, por uma diminuição da expressão transcricional de *WalR* e *OrfX* (-1.377 ± 0.12 $p < 0.01$; -2.16 ± 0.14 ; $p < 0.001$, respetivamente).

A expressão transcricional nas estirpes MRSA evidenciaram um menor efeito da exposição à EGCG nos níveis transcricionais dos genes analisados, com valores menos discrepantes entre si. Nas estirpes 7, 18 e 31, com fenótipos de resistência variáveis entre si, apenas os níveis de *OrfX* se encontraram aumentados, relativamente à estirpe mais resistente (MR7: 2.46 ± 0.098 $p < 0.001$; M18: 1.6 ± 0.22 $p < 0.01$; MR31 2.97 ± 0.35 $p < 0.001$). Na estirpe 9 não foram observados quaisquer efeitos nos níveis de transcrição dos moduladores analisados.

A



B

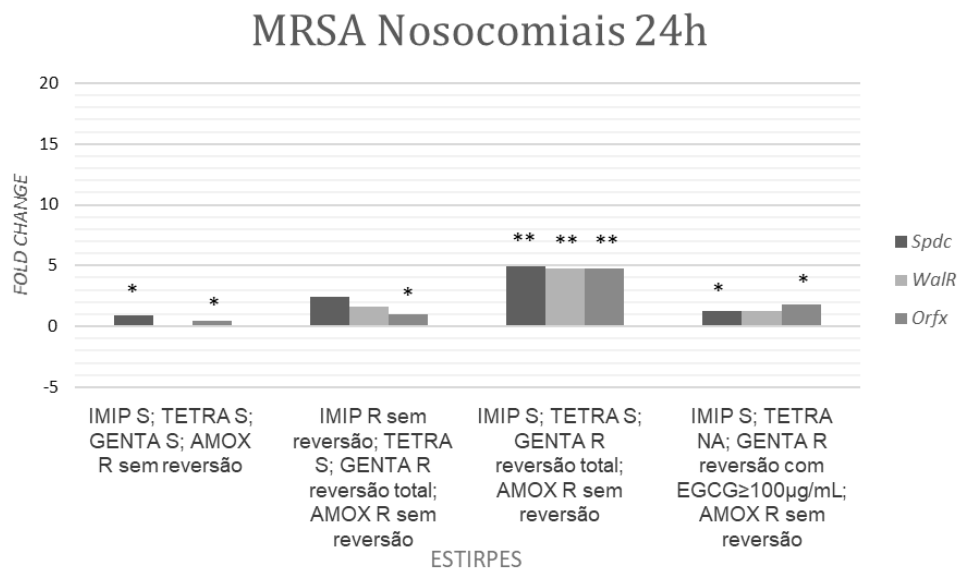


Gráfico 5.4 – Expressão relativa dos genes *OrfX*, *SpdC* e *WalR* para as estirpes MSSA (A) e MRSA (B) nosocomiais, após sementeira e 24h de incubação. 16S rRNA foi utilizado como gene de manutenção celular e a quantificação relativa foi realizada para normalização dos Cts. As barras de erro representam o desvio padrão entre os tratamentos independentes e os triplicados de qRT-PCR. Os valores estatísticos significativos, que foram comparados com as estirpes mais resistentes e calculados com o teste *t de Student*, são ilustrados como: * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$.

Após 24 horas de subcultura em gelose de sangue, sem exposição à EGCG, os padrões de expressão transcricional foram mantidos na sua generalidade, porém com algumas alterações. (Gráfico 5.4) A estirpe 3 manteve os níveis de *SpdC* aumentados (6.05 ± 0.16 $p < 0.001$); a estirpe 5 continuou a demonstrar um aumento dos níveis de *OrfX* (3.6 ± 0.17 $p < 0.01$), e sofreu um aumento adicional dos níveis de *SpdC* e *WalR* (2.2 ± 0.06 , 0.4 ± 0.03 $p < 0.01$, respetivamente).

Por outro lado, a estirpe 13 manteve o aumento de *SpdC* (13 ± 0.17 ; $p < 0.001$), contudo observou-se uma diminuição dos níveis de *WalR* e *OrfX* (-3.6 ± 0.12 ; -3.8 ± 0.04 ; $p < 0.001$ respetivamente). Como verificado inicialmente, a estirpe 15 manteve os níveis de *SpdC* aumentados (7.7 ± 0.25 ; $p < 0.001$), acompanhados, após subcultura, pelo aumento da expressão transcricional de *WalR* e *SpdC* (2.38 ± 0.07 $p < 0.001$; 2.24 ± 0.29 ; $p < 0.01$, respetivamente).

No que diz respeito às estirpes MRSA, o aumento generalizado dos níveis transcricionais de *OrfX* foi mantido, nomeadamente em 7, 9, 18 e 31 (0.48 ± 0.06 $p < 0.01$; 1.04 ± 0.13 $p < 0.01$; 4.8 ± 0.04 $p < 0.001$; 1.76 ± 0.12 $p < 0.01$, respetivamente). No entanto, as estirpes 7 e 31 também demonstraram um aumento significativo dos níveis transcricionais de *SpdC* (0.89 ± 0.05 ; 1.3 ± 0.08 ; $p < 0.01$, respetivamente), e na estirpe 18, o aumento de *SpdC* é acompanhado pelo aumento de *WalR* também (*SpdC*: 4.9 ± 0.32 , *WalR*: 4.73 ± 0.1 ; $p < 0.001$).

6. Discussão e conclusões

6.1 Discussão

O presente estudo tinha como principal objetivo a avaliação das divergências epigenéticas induzidas pela exposição à EGCG nos genes *spdC*, *WalR* e *orfX*, moduladores epigenéticos, associados a diferentes fenótipos de resistência em *S. aureus*.

A OMS descreve a resistência aos antimicrobianos como um desafio global e persistente na saúde, sendo que durante a última década tem existido uma preocupação crescente na resistência aos antimicrobianos por microrganismos patogênicos para o ser humano.(1,4) A vigilância epidemiológica global demonstrou que os MRSA representam um problema em todos os continentes e países, com aumento da mortalidade e exigência de antibióticos de última linha que afetam a economia dos países.(1,4)

Staphylococcus aureus trata-se de um patógeno oportunista, cujas propriedades biológicas permitem que tenha a capacidade de colonizar a população saudável de forma assintomática, possibilitando a transmissão para outras áreas do corpo, outras pessoas, ou, até mesmo, contaminando comida e as superfícies, após contacto. (7,37,67,68) As estirpes nosocomiais de MRSA são, geralmente, multirresistentes, associadas aos complexos *SCCmec* tipo I, II ou III, clinicamente tratados com a combinação de dois antibióticos orais. (23–27). Este microrganismo encontra-se largamente distribuído na comunidade, incluindo MRSA, devido à sua capacidade de evolução e adaptação a diferentes ambientes, o que leva ao uso intensivo da antibioterapia.(32,40,68) Os antibióticos disponíveis para o tratamento destas infeções diferem nos seus modos de ação, atuando, nomeadamente, ao nível da inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese proteica, inibição da produção de ácidos nucleicos, e inibição do metabolismo. (10,33,34,43) Porém, perante as resistências crescentes, verificadas em contexto terapêutico, surge a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas, tendo-se tornado, nos dias de hoje, o foco das investigações na área, baseadas na utilização de produtos naturais, como a EGCG.

Os resultados obtidos demonstram que diferentes fenótipos de resistência estão associados com diferentes expressões transcricionais dos moduladores epigenéticos testados, sendo mais evidente nas estirpes mais sensíveis.

Nas estirpes comensais denota-se uma maior sensibilidade à exposição à EGCG, comparativamente às estirpes nosocomiais, estas últimas revelando níveis transcricionais com valores mais discrepantes entre si, e consideravelmente aumentados, ou diminuídos. Tal poderá dever-se ao facto destas estirpes comensais apresentarem menos multirresistências, como se pode observar na Tabela 4.1, e de, tipicamente, evidenciarem uma menor virulência, visto que estão na origem de colonizações e não infeções. Para além disso, sabe-se que durante a progressão de *S. aureus* de uma colonização, assintomática, para um patógeno invasivo, responsável por infeções nosocomiais, o microrganismo adquire fatores de virulência como genes para produção de adesinas, genes para evasão imunitária e toxinas.(29) A estirpes nosocomiais apresentam, tipicamente, multirresistências aos antibióticos, representando um desafio para as terapêuticas atuais.

O sistema de dois componentes *WalKR* é essencial para a viabilidade de *S. aureus*, participando ativamente no metabolismo da parede celular. (18,19,46) O *WalR* regula positivamente a autólise, produção de biofilmes e a atividade alfa-hemolítica.(19,20) Regula também genes major de virulência, como o *spdC*.(19,20) Por outro lado, a ativação constitutiva de *WalR* diminui fortemente a virulência de *S. aureus*, induzindo uma resposta inflamatória precoce no hospedeiro, que inclui recrutamento de neutrófilos e aumento do níveis de citocinas.(19) Deste modo, é garantida uma rápida eliminação da bactéria e a diminuição da virulência.(19)

Nas estirpes comensais, relativamente ao *WalR*, este atinge o seu nível de transcrição mais elevado nas estirpes mais sensíveis, obtendo um valor de 17.98 ± 0 em MSSA e 7.05 ± 0 em MRSA. Porém, nas estirpes com origem nosocomial, a exposição à EGCG não afetou os padrões transcricionais, sugerindo que as estirpes em estudo apresentam uma elevada virulência, interferindo com o fenótipo de resistência aos antibióticos, uma vez que nenhuma delas demonstrou total reversão do fenótipo de resistência, após exposição à EGCG. Ainda assim, nas estirpes nosocomiais MSSA, mais sensíveis, o gene *WalR* atingiu o seu valor máximo, neste grupo de estirpes (2.06 ± 0.06). No presente estudo, a EGCG teve uma grande influência nos níveis transcricionais de *WalR* nas estirpes comensais, com fenótipos mais sensíveis, contribuindo para a sua baixa virulência.

O gene *spdC* foi o único que se apresentou como diminuído relativamente à estirpe mais resistente, naquelas de origem comensal, nomeadamente na estirpe CC4, com reversão do fenótipo de resistência à amoxicilina (25µg) após exposição a concentrações de 50

$\mu\text{g/ml}$ de EGCG. Por outro lado, nas estirpes nosocomiais, os níveis transcricionais de *SpdC* atingiram os seus valores mais elevados, especialmente nas estirpes MSSA (14.37 ± 0.83). Após subcultura de 24h em gelose de sangue, a análise da expressão génica do *SpdC* manteve, na generalidade, os resultados obtidos.

O produto do gene *SpdC* regula de forma negativa o sistema *WalkR* e níveis de transcrição de *SpdC* reduzidos estão associados com baixa virulência e sensibilidade aumentada aos antibióticos β -lactâmicos.(20) No entanto, não foi possível estabelecer uma associação significativa entre os níveis de transcrição do gene *SpdC* e o fenótipo de resistência descrito.

Quanto ao gene *OrfX*, nas estirpes comensais MSSA, observou-se uma expressão aumentada da metiltransferase ribossomal estafilocócica, principalmente nas estirpes mais sensíveis, atingindo, nestas, um valor máximo de 19.21 ± 1.99 . Este facto reproduz-se para as estirpes comensais MRSA, novamente as mais sensíveis, com um valor de 20.16 ± 0.66 . Nas estirpes nosocomiais, especialmente nas estirpes MRSA, observou-se um aumento significativo da expressão desta metiltransferase ribossomal, atingindo um valor máximo de 2.97 ± 0.35 .

Estirpes comensais com reversão do fenótipo de resistência *in vitro* revelaram também uma correlação entre a exposição à EGCG e os níveis transcricionais de *OrfX*, com valores oscilando entre 1.5 ± 0.1 e 6 ± 0.14 . Esta expressão diminui após subcultura 24h, em gelose de sangue, na ausência de EGCG, sugerindo um efeito direto da exposição, contudo mantendo o mesmo padrão de expressão observado previamente.

O gene *OrfX* encontra-se conservado em todos os estafilococos, sendo produzido de forma constitutiva durante o crescimento bacteriano. (16,17) Este tem sido objeto de estudo pelo facto do complexo *SCCmec* se inserir no seu terminal C', no *attachment site* (*attB*). (16,22,69) Boundy e colaboradores monitorizaram o gene *OrfX* através da técnica de *Western blot*, demonstrando que esta inserção no *attB* não tinha qualquer efeito na expressão do gene ou na síntese da proteína. (16,69) Deste modo, a suscetibilidade de *S. aureus* à oxacilina, mediada pelo gene *mecA* no complexo *SCCmec* não é afetada pela inativação do *OrfX*, explicando os resultados semelhantes obtidos para ambos MSSA e MRSA. (22,69)

Presume-se que o produto do gene *OrfX* desempenhe um papel importante no crescimento e sobrevivência bacterianos, uma vez que está presente em todos os genomas de estafilococos coagulase-positivos ou coagulase-negativos

sequeenciados.(16,17,34) O gene *OrfX* metila ribossomas 70S, constituindo uma metiltransferase ribossomal do tipo *RlmH*. (17) A metilação ribossomal nas bactérias providencia tanto uma resistência moderada aos antibióticos como determina a suscetibilidade aos mesmos. (16,17,34) Os resultados do presente estudo sugerem que a metilação mediada pelo *OrfX* é afetada pela exposição à EGCG, sendo fundamental na definição da reversão do fenótipo de resistência como modulador epigenético.

Em estudos recentes, Kitichalmkiat e seus colaboradores, conduziram um estudo semelhante, realizando uma análise *microarray* em *S. aureus* com e sem 500 µg/L de EGCG.(70) Foram identificados os genes com expressões diferentes e as suas alterações nos níveis transcricionais confirmadas utilizando a técnica RT-qPCR.(70) Tal como no presente estudo, com exposição à EGCG, a análise dos autores resultou no aumento e diminuição da transcrição de 75 e 72 genes, respetivamente.(70) Foram observados aumentos significativos da transcrição em genes relacionados com o transporte membranar, enquanto que os genes que envolvem a produção de toxinas e resposta ao stress exibiram uma transcrição diminuída. (70) Através da medição do potencial membranar das bactérias tratadas com e sem EGCG, os autores também concluíram que a EGCG diminui acentuadamente o potencial de membrana, indicando dano da membrana celular.(70)

6.2 Conclusões

O efeito modulador da EGCG demonstrou um maior impacto nas estirpes de origem comensal, de forma significativa nos genes moduladores epigenéticos *WalR* e *OrfX*. O processo de metilação promovido pelo produto do gene *OrfX* revelou-se significativamente correlacionado com os perfis fenotípicos de resistência aos antibióticos, observados. A ação deste composto natural nestas estirpes revela-se extremamente importante por evitar a propagação das mesmas na comunidade, diminuindo o risco de infeção com origem em estirpes colonizadoras.

Em suma, de um modo geral, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a exposição à EGCG tem a capacidade de alterar a expressão de genes-chave na modulação epigenética e de resposta aos antibióticos nos *S.*, associados a diferentes perfis de resistência.

7. Limitações do estudo e perspectivas futuras

Como limitações deste estudo reconhece-se a utilização de um número de estirpes reduzido, sendo que o ideal seria aumentar este número em estudos futuros, possibilitando uma análise estatística mais completa. Não foi possível obter a genotipagem das estirpes selecionadas, de modo a avaliar a presença de genes moduladores assim como a caracterização dos fatores de virulência.

Sugere-se o alargamento do espectro de antibióticos utilizados, com especial incidência naqueles com interesse na prática clínica e que tenham como alvo a parede celular, possivelmente aumentando o sucesso na reversão do fenótipo de resistência em sinergismo com a EGCG. Para além disso, tendo em conta os resultados obtidos, deve investir-se na análise um maior número de genes, de forma a averiguar a existência de novos efeitos moduladores da EGCG em *S. aureus*.

A inovação neste estudo prende-se com a observação, *in vitro*, de divergências epigenéticas, em estirpes comensais e nosocomiais, de perfis fenotípicos resistentes de *S. aureus*, incidindo em genes com potencial epigenético, associados à exposição à EGCG.

A necessidade emergente de identificar novas soluções no combate às infeções bacterianas, nomeadamente, às provocadas por *S. aureus*, justifica o estudo de novos compostos, com poucos ou nenhuns efeitos secundários, que atuem tanto em infeções agudas do meio hospitalar, como na diminuição do surgimento de infeções na comunidade. Neste sentido, a grande perspectiva futura prende-se com o reconhecimento da EGCG, pelas entidades reguladoras dos medicamentos, a nível nacional e internacional, enquanto composto antimicrobiano e/ou coadjuvante terapêutico.

8. Referências bibliográficas

1. Antibiotic resistance [Internet]. WHO. 2018. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
2. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):1–103.
3. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:577–601.
4. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health [Internet].* 2017;10(4):369–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
5. Novy P, Rondevaldova J, Kourimska L, Kokoska L. Synergistic interactions of epigallocatechin gallate and oxytetracycline against various drug resistant *Staphylococcus aureus* strains in vitro. *Phytomedicine.* 2013;20:432–5.
6. Ondusko DS, Nolt D. *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Rev.* 2018;39(6):287–98.
7. Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus Aureus* [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2020. Available from: <http://europepmc.org/books/NBK441868>
8. Jordan D, Simon J, Fury S, Moss S, Giffard P, Maiwald M, et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by veterinarians in Australia. *Aust Vet J.* 2011;89(5):152–9.
9. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB FSABC surveillance (ABCs) MI. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA.* 2007;298(15):1763–71.
10. Reygaert WC. The antimicrobial possibilities of green tea. *Front Microbiol.* 2014;5(August):1–8.
11. Hu Z, Zhao W, Asano N, Yoda Y, Hara Y, Shimamura T. Epigallocatechin Gallate Synergistically Enhances the Activity of Carbapenems against Methicillin-

- Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(2):558–60.
12. Khasru A, Saha K, Rahman J, Ara R, Rahman A, Kanti S, et al. Antibacterial activities of green tea crude extracts and synergistic effects of epigallocatechingallate (EGCG) with gentamicin against MDR pathogens. *Heliyon*. 2019;5(July).
 13. Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E. Anti-infective properties of (EGCG), a component of green tea. *Br J Pharmacol*. 2013;168:1059–73.
 14. Vahid F, Zand H, Mirshekarlou EN, Naja R, Hekmatdoost A. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases : A review. *Gene*. 2015;562:8–15.
 15. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(12):1807–21.
 16. Boundy S, Safo MK, Wang L, Musayev FN, Farrell HCO, Rife JP, et al. Characterization of the *Staphylococcus aureus* rRNA Methyltransferase Encoded by *orfX* , the Gene Containing the Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCC *mec*) Insertion Site *. *J Biol Chem*. 2013;288(1):132–40.
 17. Bitrus AA, Zunita Z, Khairani-Bejo S, Othman S, Ahmad Nadzir NA. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and characterization of the attachment site (*attB*) of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolates. *Microb Pathog* [Internet]. 2018;123(July):323–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.033>
 18. Ji Q, Chen PJ, Qin G, Deng X, Hao Z, Wawrzak Z, et al. Structure and mechanism of the essential two-component signal transduction system WalkR in *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun*. 2016;7(Mar).
 19. Delauné A, Dubrac S, Blanchet C, Poupel O, Mäder U, Hiron A, et al. The WalkR System Controls Major Staphylococcal Virulence Genes and Is Involved in Triggering the Host Inflammatory Response. *Infect Immun*. 2012;80(10):3438–53.
 20. Poupel O, Proux C, Jagla B, Msadek T, Dubrac S. SpdC , a novel virulence factor

- , controls histidine kinase activity in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* 2018;14(3):1–32.
21. Severino AS. Potencial antimicrobiano da epigallocatequina-3-galato do chá verde contra MRSA de isolados hospitalares e da comunidade [Internet]. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, IPL; 2020. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.21/12747>
 22. Miragaia M. Factors contributing to the evolution of Meca-mediated β -lactam resistance in staphylococci: Update and new insights from whole genome sequencing (WGS). *Front Microbiol.* 2018;9(NOV):1–16.
 23. Babel BS, Decker CF. Microbiology and Laboratory Diagnosis of MRSA. *Disease-a-Month* [Internet]. 2008;54(12):769–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.disamonth.2008.09.006>
 24. Carretto E, Visiello R, Nardini P. Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Pet-to-Man Travel Staphylococci A World Prog.* 2018;85(Pt 1):225–35.
 25. Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog.* 2002;85(Pt 1):1–14.
 26. Lee AS, Lencastre H De, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4(May):1–23.
 27. Turner N, Sharma-Kuinkel B, Maskarinec S, Eichenberger E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(February):203–18.
 28. Laux C, Peschel A, Krismer B. *Staphylococcus aureus* Colonization of the Human Nose and Interaction with Other Microbiome Members. *Microbiol Spectr.* 2018;7(2):1–10.
 29. Jenkins A, An Diep B, Mai TT, Vo NH, Warrenner P, Suzich J, et al. Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. *MBio.* 2015;6(1):1–10.
 30. Boswihi SS, Udo EE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : An update on the epidemiology , treatment options and infection control. *Curr Med Res Pract* [Internet]. 2018;1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmrp.2018.01.001>

31. Mehraj J, Witte W, Akmatov M, Layer F, Werner G, Krause G. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;398:55–87.
32. Kong EF, Johnson JK, Jabra-Rizk MA. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. *PLoS Pathog*. 2016;12(10):1–7.
33. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* . Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;(December 2016):1–20.
34. Osterman IA, Dontsova OA, Sergiev P V. rRNA Methylation and Antibiotic Resistance. *Biochem*. 2020;85(11):1335–49.
35. Rolo J, Miragaia M, Turlej-Rogacka A, Empel J, Bouchami O, Faria NA, et al. High genetic diversity among community-associated *staphylococcus aureus* in europe: Results from a multicenter study. *PLoS One*. 2012;7(4).
36. Chavez TT, Decker CF. Health Care-Associated MRSA Versus Community-Associated MRSA. *Disease-a-Month* [Internet]. 2008;54(12):763–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.disamonth.2008.09.004>
37. Byers DK, Decker CF. The Changing Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Disease-a-Month* [Internet]. 2008;54(12):756–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.disamonth.2008.09.005>
38. Vysakh R, Jeya M. A Comparative Analysis of Community Acquired and Hospital Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*. *J Clin Diagnostic Res*. 2013;7(7):1449–1342.
39. Kluytmans-VandenBergh MFQ, Kluytmans JAJW. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(Suppl. 1):9–15.
40. Maree CL, Daum RS, Boyle-Vavra S, Matayoshi K, Miller LG. Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates and Healthcare-Associated Infections. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2007 Feb;13(2):236–42. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/2/06-0781_article.htm
41. Mf B, Sa M, Mlrs C. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA- MRSA): molecular background, virulence , and relevance for public

- health. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2011;17(4):378–86.
42. Gelatti LC, Becker AP, Bonamigo RR, D'Azevedo PA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination. *An Bras Dermatol*. 2009;84(5):501–6.
 43. Rayner C, Munckhof WJ. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Intern Med J*. 2005;35:S3–16.
 44. Hu Z, Zhao W, Hara Y, Shimamura T. Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulfabactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48:361–4.
 45. Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. *b*-Lactams : chemical structure , mode of action and mechanisms of resistance. 2013;
 46. Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Struelens MJ, Tulkens PM. The bacterial envelope as a target for novel anti-MRSA antibiotics. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(3):124–34.
 47. Zhao W, Hu Z, Okubo S, Hara Y. Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(6):1737–42.
 48. Amador P, Prude C. *B*-Lactams : chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol*. 2013;24:7–17.
 49. Chaves BJ, Tadi P. Gentamicin [Internet]. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491482>
 50. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2010 Sep;299(3):C539–48. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00047.2010>
 51. Vahid F, Zand H, Nosrat-Mirshekarlou E, Najafi R, Hekmatdoost A. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: A review. *Gene*. 2015;562(1):8–15.
 52. Haghjoo B, Lee LH, Habiba U, Tahir H, Olabi M, Chu T. The synergistic effects of green tea polyphenols and antibiotics against potential pathogens. *Adv Biosci*

- Biotechnol. 2013;4:959–67.
53. Martini N. Green tea. *J Prim Health Care*. 2016;8(4):381–2.
 54. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(12):1807–21.
 55. Negri A, Naponelli V, Rizzi F, Betuzzi S. Molecular Targets of Epigallocatechin-Gallate. *Nutrients*. 2018;10(1936).
 56. Reygaert WC. Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *Biomed Res Int [Internet]*. 2018 Jul 17;1–9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/9105261/>
 57. Chu C, Deng J, Man Y, Qu Y. Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. *Biomed Res Int*. 2017;
 58. Kitichalermkiat A, Kurahachi M, Nonaka A, Nakayama M, Shimatani K, Shigemune N, et al. Effects of Epigallocatechin Gallate on Viability and Cellular Proteins of *Staphylococcus aureus*. *Food Sci Technol Res*. 2019;25(2):277–85.
 59. Blanco AR, Sudano-roccaro A, Spoto GC, Nostro A, Rusciano D. Epigallocatechin Gallate Inhibits Biofilm Formation by Ocular Staphylococcal Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(10):4339–43.
 60. Ayaz M, Ullah F, Sadiq A, Ullah F, Ovais M, Ahmed J, et al. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. *Chem Biol Interact*. 2019;308(May):294–303.
 61. Stapleton PD, Shah S, Anderson JC, Hara Y, Hamilton-miller JMT, Taylor PW. Modulation of B-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;23:462–7.
 62. Roccaro AS, Blanco AR, Giuliano F, Rusciano D, Enea V. Epigallocatechin-Gallate Enhances the Activity of Tetracycline in Staphylococci by Inhibiting Its Efflux from Bacterial Cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):1968–73.
 63. Fernando L, Duarte D, Nacional M. Epigénese e Epigenética. *Horizontes Antropológicos*. 2016;22(46):425–53.
 64. Adhikari S, Curtis PD. DNA methyltransferases and epigenetic regulation in

- bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40(March):575–91.
65. Gianfredi V, Nucci D, Vannini S, Villarini M, Gianfredi V, Nucci D, et al. In vitro Biological Effects of Sulforaphane (SFN), Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), and Curcumin on Breast Cancer Cells: A Systematic Review of the Literature. *Nutr Cancer.* 2017;
 66. Link A, Balaguer F, Goel A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2010;80(12):1771–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.036>
 67. Ribeiro E, Clérigo A. Assessment of staphylococcus aureus colonization in bakery workers.pdf. *Vertentes e Desafios Segurança.* 2017;
 68. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019;17(4):203–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
 69. Noto MJ, Kreiswirth BN, Monk AB, Archer GL. Gene acquisition at the insertion site for SCCmec, the genomic island conferring methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2008;190(4):1276–83.
 70. Kitichalermkiat A, Katsuki M, Sato J, Sonoda T, Masuda Y, Honjoh K ichi, et al. Effect of epigallocatechin gallate on gene expression of *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2020;22:854–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.006>

Anexo I – Protocolo de extração de RNA



NZY Total RNA Isolation kit

Catalogue number: MB13402, 50 columns

Description

NZY Total RNA Isolation kit is designed for the easy purification of total RNA of highest integrity (longer than 200 bases) from a variety of sources such as animal tissues, bacteria cells and cell cultures. This method uses a denaturing lysis buffer containing guanidine thiocyanate, which inactivates cellular RNases, to ensure the recovery of intact RNA molecules. Ethanol is added to provide selective binding of total RNA into the silica membrane column and impurities are efficiently washed away. To prevent the contamination with DNA, a DNase I solution is directly added onto the silica membrane of the binding column. High-quality RNA is then eluted in RNase-free water. RNA is ready to use for applications like Reverse Transcriptase (RT) PCR, qPCR, in vitro translation or cDNA synthesis.

The NZY Total RNA Isolation kit is optimized to isolate up to 70 µg of RNA/column with an A_{260}/A_{280} ratio between 1.9 and 2.1 from up to 30 mg of animal tissue, 1×10^9 bacteria cells or 5×10^6 of cultured cells. We suggest not exceeding the maximum recommended starting material to prevent a reduction in yield and purity.

Storage conditions and reagents preparation

All kit components can be stored at room temperature (20-25 °C), and are stable till the expiry date.

Before use, add 0.550 mL of RNase-free water to the DNase I vial. DNase I is sensitive to physical denaturation so do not vortex but instead mix gently by inverting the tube. The reconstituted DNase I should be stored at -20 °C and is stable for 6 months. Add 50 mL of 100% molecular biology grade ethanol to the NWR2 bottle. Buffers NR and NWR1 contain guanidine salts. Wear gloves and goggles when using this kit.

System Components

Component	Volume (50 preps)
Buffer NR	25 mL
Buffer NI	25 mL
Buffer NWR1	15 mL
Buffer NWR2 (concentrate)	12.5 mL
RNase-free Water	15 mL
Digestion buffer	5 mL
DNase I (lyophilized)	1 vial
NZYSpin Homogenization Columns (purple rings)	50
NZYSpin Binding Columns (blue rings)	50
Collection tubes (2 mL)	150
Collection tubes (1.5 mL)	50

Guidelines for using NZY Total RNA Isolation kit

- RNA preparation using NZY Total RNA isolation kit can be performed at room temperature. However, isolated RNA should be treated with care because RNA is very sensitive to trace contaminations of RNases. Be certain not to introduce any RNases during the whole purification process. **Wear gloves at all times during RNA preparation and change gloves frequently.** To ensure RNA stability store pure RNA at -20 °C for short-term or at -70 °C for long-term.
- We suggest preparing the Digestion Mix before starting the RNA isolation protocol. For each isolation prepare the exact amount of Digestion mixture required as follows:

DNase I (reconstituted)	10 µL
Digestion buffer	90 µL

Mix by gentle pipetting. Store this mixture on ice.

- Optimal amounts of sample material to use in the preparation of RNA using the NZY Total RNA isolation kit are presented in Table 1.

Table 1. Amount of samples material.

Sample	Amount
Tissue	Up to 30 mg
Cultured cells	Up to 5×10 ⁶ cells
Bacterial cells	Up to 10 ⁹ cells

Protocol for purification of total RNA from animal tissues or cells

I. Sample preparation

Tissue samples: Cut up to 30 mg tissue sample (see table 1) into small pieces, and place it in a RNase-free microcentrifuge tube. Proceed with step II.

Cultured cells: Pellet up to 5×10⁶ cultured cells (see table 1) at 6,000 *xg* for 5 min at 4 °C. Discard supernatant and add buffer NR directly to cell pellet. Proceed with step II.

Bacterial cells: Pellet up to 10⁹ bacteria cells (see table 1) at 6,000 *xg* for 5 min at 4 °C. Discard the supernatant completely and add buffer NR directly to cell pellet. Proceed with step II.

II. Preparation of total RNA

1. Add 350 µL of buffer NR and 3.5 µL β-mercaptoethanol to the cell pellet or to the disrupted tissue. Vortex vigorously.

Note: *The lysate may be passed through a needle fitted to a syringe to reduce the viscosity.*

2. Apply the lysate into an NZYSpin Homogenization column (purple ring) placed in a 2 mL collection tube. Centrifuge for 1 min at 11,000 *xg*. **Save the flow-through.**
3. Transfer the flow-through into a new 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 350 µL of 70% ethanol and mix immediately by pipetting up and down. **Do not centrifuge.**
4. Pipette the lysate and load in an NZYSpin Binding column (blue ring). Centrifuge at 11,000 *xg* for 30 s. Discard the flow-through and place the column into a new collection tube.
5. Add 350 µL of Buffer NI and centrifuge at 11,000 *xg* for 30 s. Discard the flow-through and place the column back into the collection tube.
6. For each isolation, prepare the Digestion Mix in a sterile 1.5 mL microcentrifuge tube (as previously explained). Apply 95 µL of the Digestion Mix directly into the centre of the silica membrane of NZYSpin Binding column (blue ring) and incubate at room temperature for 15 min.
7. Add 200 µL of Buffer NWR1 and centrifuge for 1 min at 11,000 *xg*. Discard the flow-through and place the column in a new collection tube.
8. Add 600 µL of Buffer NWR2 and centrifuge at 11,000 *xg* for 1 min. Discard the flow-through and place the column back in the collection tube.

Note: *Ensure that absolute ethanol was added to Buffer NWR2 before use.*


9. Repeat wash with 250 μ L of Buffer NWR2 and centrifuge at 11,000 xg for 2×1 min to dry the column membrane. Discard the flow-through.
10. Place the NZYSpin Binding Column in a clean 1.5 mL RNase-free microcentrifuge tube. Add 40-60 μ L RNase-free water directly to the column membrane. Centrifuge at 11,000 xg for 1 min to elute the RNA. Store the RNA at -20 $^{\circ}$ C for short-term or at -70 $^{\circ}$ C for long-term.

Quality control assay

Functional assay

All components of NZY Total RNA isolation kit are tested following the isolation protocol described above. The purification system must isolate 50-70 μ g of total RNA/column.

V1901

Certificate of Analysis	
Test	Result
Functional assay	Pass
Approved by: 	
Patricia Ponte Senior Manager, Quality Systems	

For research use only



Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
 Tel.: +351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com

Anexo II – Protocolo de conversão em cDNA

Thermo
SCIENTIFIC

PRODUCT INFORMATION

Thermo Scientific
RevertAid RT Kit

#K1691 500 rxns

Lot ___ Expiry Date ___

Store at -20°C


www.thermoscientific.com/onebio

COMPONENTS OF THE KIT

	#K1691 500 rxns
RevertAid RT Kit	
RevertAid RT (200 U/μL)	5 × 120 μL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL)	5 × 120 μL
5X Reaction Buffer 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT	5 × 500 μL
10 mM dNTP Mix	4 × 250 μL
Random Hexamer Primer, 100 μM	5 × 120 μL
Water, nuclease-free	6 × 1.25 mL

CERTIFICATE OF ANALYSIS

RT-PCR using 100 fg of control GAPDH RNA and control primers generated a prominent 496 bp product on 1% agarose gel after ethidium bromide staining.

Quality authorized by:  Jurgita Zilinskiene

Rev.1

DESCRIPTION

The Thermo Scientific™ RevertAid™ RT Kit is a complete system for efficient synthesis of first strand cDNA from mRNA or total RNA templates. The kit uses RevertAid Reverse Transcriptase (RT), which has lower RNase H activity compared to AMV reverse transcriptase. The enzyme maintains activity at 42-50 °C and is suitable for synthesis of cDNA up to 13 kb.

The recombinant Thermo Scientific™ RiboLock™ RNase Inhibitor, supplied with the kit, effectively protects RNA from degradation at temperatures up to 55 °C.

First strand cDNA synthesized with this system can be directly used as a template in PCR or real-time PCR. It is also ideal for second strand cDNA synthesis or linear RNA amplification. Radioactively and non-radioactively labeled nucleotides can be incorporated into first strand cDNA for use as a probe in hybridization experiments, including microarrays.

IMPORTANT NOTES

Avoiding ribonuclease contamination

RNA purity and integrity are essential for synthesis of full-length cDNA. RNA can be degraded by RNase A, which is a highly stable contaminant found in any laboratory environment.

General recommendations to avoid RNase contamination:

- DEPC-treat all tubes and pipette tips to be used in cDNA synthesis or use certified nuclease-free labware.
- Wear gloves when handling RNA and all reagents, as skin is a common source of RNases. Change gloves frequently.
- Use RNase-free reagents, including high quality water (e.g., Water, nuclease-free, #R0581).
- Use RiboLock RNase Inhibitor (provided with the kit) to protect RNA from the activity of RNases.
- Keep all kit components tightly sealed when not in use. Keep all tubes tightly closed during the reverse transcription reaction.

Template RNA

Total cellular RNA isolated by standard methods is suitable for use with the kit. Purified RNA must be free of salts, metal ions, ethanol and phenol to avoid inhibiting the cDNA synthesis reaction. Trace contaminants can be removed by ethanol precipitation of the RNA followed by two washes of the pellet with cold 75% ethanol.

For RT-PCR applications, template RNA must be free of DNA contamination. Prior to cDNA synthesis, RNA can be treated with DNase I, RNase-free (#EN0521) to remove trace amounts of DNA. Always perform a control (RT-minus) reaction which includes all components for RT-PCR except for the reverse transcriptase enzyme.

Removal of genomic DNA from RNA preparations

1. Add to an RNase-free tube:

RNA	1 µg
10X Reaction Buffer with MgCl ₂	1 µL
DNase I, RNase-free (#EN0521)*	1 µL (1U)
Water, nuclease-free	to 10 µL

* Do not use more than 1 U of DNase I, RNase-free per 1 µg of RNA.

2. Incubate at 37 °C for 30 min.
3. Add 1 µL 50 mM EDTA and incubate at 65 °C for 10 min. RNA hydrolyzes during heating with divalent cations in the absence of a chelating agent (1). Alternatively, use phenol/chloroform extraction.
4. Use the prepared RNA as a template for reverse transcriptase.

RNA sample quality

Assess RNA integrity prior to cDNA synthesis. The most common method is denaturing agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. If both 18S and 28S rRNA appear as sharp bands after electrophoresis of total eukaryotic RNA, the RNA is considered to be intact. The 28S rRNA band should be approximately twice as intense as the 18S rRNA. Any smearing of rRNA bands is an indication of degraded mRNA. If this occurs, a new sample of total RNA should be prepared.

RNA quantity

- Use 0.1 ng - 5 µg of total RNA or 10 pg - 500 ng of poly(A) mRNA to generate first strand cDNA as the initial step of a two-step RT-PCR protocol.
- Use 1 µg of isolated mRNA to generate first strand cDNA for second-strand synthesis and subsequent cloning reactions.

PROTOCOLS

Please read the Important Notes before starting.

I. First Strand cDNA Synthesis

After thawing, mix and briefly centrifuge the components of the kit. Store on ice.

1. Add the following reagents into a sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Template RNA	total RNA	0.1 ng - 5 µg
	or poly(A) mRNA	10 pg - 0.5 µg
	or specific RNA	0.01 pg - 0.5 µg
Primer*	Random Hexamer primer	1 µL
Water, nuclease-free		to 12 µL
Total volume		12 µL

*1 µL of 100 µM Oligo(dT)₁₈ primer (#SO131) or gene-specific primer (15-20 pmol) can also be used.

2. *Optional.* If the RNA template is GC-rich or contains secondary structures, mix gently, centrifuge briefly and incubate at 65 °C for 5 min. Chill on ice, spin down and place the vial back on ice.

3. Add the following components in the indicated order:

5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
RevertAid RT (200 U/µL)	1 µL
Total volume	20 µL

4. Mix gently and centrifuge briefly.

5. For oligo(dT)₁₈ or gene-specific primed cDNA synthesis, incubate for 60 min at 42 °C.

For random hexamer primed synthesis, incubate for 5 min at 25 °C followed by 60 min at 42 °C.

Note. For GC-rich RNA templates the reaction temperature can be increased up to 45 °C.

6. Terminate the reaction by heating at 70 °C for 5 min.

The reverse transcription reaction product can be directly used in PCR applications or stored at -20 °C for less than one week. For longer storage, -70 °C is recommended

II. PCR Amplification of First Strand cDNA

The product of the first strand cDNA synthesis can be used directly in PCR or qPCR. The volume of first strand cDNA synthesis reaction mixture should not comprise more than 1/10 of the total PCR reaction volume.

Normally, 2 µL of the first strand cDNA synthesis reaction mixture is used as template for subsequent PCR in 50 µL total volume.

CONTROL REACTIONS

Positive and negative control reactions should be used to verify the results of the first strand cDNA synthesis steps.

- **Reverse transcriptase minus (RT-) negative control** is important in RT-PCR or RT-qPCR reactions to assess for genomic DNA contamination of the RNA sample. The control RT- reaction contains every reagent for the reverse transcription reaction except for the RT enzyme.
- **No template negative control (NTC)** is important to assess for reagent contamination. The NTC reaction contains every reagent for the reverse transcription reaction except for RNA template.

(Continued on reverse page)

TROUBLESHOOTING

Low yield or no RT-PCR product

Degraded RNA template.

RNA purity and integrity is essential for synthesis of full-length cDNA. Always assess the integrity of RNA prior to cDNA synthesis. Sharp 18S and 28S RNA bands should be visible after denaturing agarose gel electrophoresis of total eukaryotic RNA. Follow general recommendations to avoid RNase contamination.

Low template purity.

Trace amounts of agents used in RNA purification protocols may remain in solution and inhibit first strand synthesis, e.g., SDS, EDTA, guanidine salts, phosphate, pyrophosphate, polyamines, spermidine. To remove trace contaminants, re-precipitate the RNA with ethanol and wash the pellet with 75% ethanol.

Insufficient template quantity.

Increase the amount of template to the recommended level. Following DNase I treatment, terminate the reaction by heat inactivation in the presence of EDTA (to bind magnesium ions), RNA hydrolyzes during heating in the absence of a chelating agent (1).

Incorrect primer choice.

Use the correct primer for the RNA template. Use the random hexamer primer instead of the oligo(dT)₁₈ primer with bacterial RNA or RNA without a poly(A) tail. Ensure sequence-specific primers are complementary to 3'-end of the template RNA.

GC rich template.

If the RNA template is GC rich or is known to contain secondary structures, increase the temperature of the reverse transcription reaction up to 45°C.

RT-PCR product longer than expected

RNA template is contaminated with DNA.

Amplification of genomic DNA containing introns. Perform DNase I digestion prior reverse transcription. To avoid amplification of genomic DNA, design PCR primers on exon-intron boundaries.

RT-PCR product in negative control

RNA template is contaminated with DNA.

PCR product in the negative control (RT-) indicates the reaction is contaminated with DNA. Perform DNase I digestion prior reverse transcription.

Reference

1. Wiame, I., et al., Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation, *BioTechniques*, 29, 252-256, 2000.

PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals.

Please refer to www.thermoscientific.com/onebio for Material Safety Data Sheet of the product.

© 2013 Thermo Fisher Scientific, Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

Anexo III – Aprovação do Conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

RESPOSTA CE - Divergência epigenética dos perfis fenotípicos resistentes do *Staphylococcus aureus* e efeito modulador da EGCG



Remetente Conselho de Ética da ESTeSL <conselhodeetica@estesl.ipl.pt>
Para <edna.ribeiro@estesl.ipl.pt>
Cc <2015184@alunos.estesl.ipl.pt>
Data 2020-06-24 10:17

REFERÊNCIA INTERNA DO PROJETO: CE-ESTeSL-Nº. 20-2020 - Ana Rita Boeiro de Mira

TÍTULO DO DE PROJETO: Divergência epigenética dos perfis fenotípicos resistentes do *Staphylococcus aureus* e efeito modulador da EGCG

TIPO DE PROJETO/ESTUDO: Mestrado de Tecnologias Clínico-laboratoriais

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Ana Rita Boeiro de Mira

ORIENTADORES: Edna Soraia Gregório Ribeiro

INSTITUIÇÃO PROMOTORA: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa/IPL

INSTITUIÇÃO(ÕES) ENVOLVIDAS: na

RECEBIDO: 16 abril 2020

Exma. Senhora Professora Doutora Edna Ribeiro,
Exma. Senhora Dr.ª. Ana Rita Boeiro de Mira, estudante de mestrado

Após análise do projeto supracitado o Conselho de Ética (CE) da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL) considerou que, uma vez que se pretende usar bactérias em arquivo obtidas em projeto anterior com parecer positivo pelo CE, existe o integral respeito pelos princípios éticos consensuais e pelas normas legais aplicáveis, sendo, por isso, emitido por unanimidade um parecer favorável.

Lembramos ainda que todos os estudos que envolvem a autorização dos participantes e a recolha de amostras e dados anonimizados e/ou codificados têm de cumprir com o estabelecido no Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados de 27 de abril de 2016.

Por último, solicita-se também que, ao abrigo do artº 19 da Lei 21/2014 de 16 de abril e do disposto no nº23 da atual versão da Declaração de Helsínquia, dê igualmente conhecimento ao Conselho de Ética da ESTeSL do relatório final com as conclusões do estudo, de eventuais alterações ao protocolo de investigação e demais informações tidas por relevantes.

Aproveitamos ainda para desejar o maior sucesso no desenvolvimento deste trabalho.

Com os melhores cumprimentos,

Prof.ª. Coordenadora Helena Soares
Presidente do Conselho de Ética da ESTeSL
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
Av. D. João II, lote 4.69.01, 1990-096 Lisboa
Tel. 218 980 447; Fax. 218 980 460

