



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica  
referente ao Edital: PIC/PIBIC  
04/2022

**Título do projeto:** Prospecção de transportadores do tipo ABC de aquisição de metais de transição a partir do proteoma de bactérias ESKAPE.

**Palavras-chave do projeto:** bactérias ESKAPE, transportadores ABC, fatores de virulência, vacinas, antibióticos.

**Área do conhecimento do projeto:** Bioquímica - Bioquímica dos Microrganismos

**Bolsista:** Sim. PIC/PIBIC.

Santo André

01 de julho de 2022

### **Avaliação da aluna**

A aluna está comigo desde 2020 (edital de PDPD) e agora está finalizando seu projeto de iniciação científica. Em todo este tempo trabalhando juntas, pude perceber a aluna responsável e comprometida com o trabalho, além de um ser humano amigável e apaixonado pelo que faz. Ela já demonstra autonomia e maturidade no desempenho de muitas tarefas, na proposição de análises e até na escrita científica. Seus relatórios são sempre bem escritos e embasados. As análises que ela fará neste projeto são relevantes e desafiadoras, mas tenho certeza de que a aluna realizará com primazia, principalmente porque os projetos realizados por ela envolviam análises proteômicas de uma das bactérias ESKAPE, a *Klebsiella pneumoniae*. Por todas as questões apresentadas anteriormente, eu recomendo a aprovação da bolsa da aluna para a realização do projeto em questão.

## Resumo

O escopo do projeto consiste no estudo teórico de proteínas transportadoras de metais de transição do tipo ABC, envolvidas na sobrevivência de bactérias ESKAPE no hospedeiro. Trata-se de bactérias de grande importância no cenário nosocomial, especialmente após a aquisição de genes de resistência a antibióticos, mas que também são responsáveis por infecções na comunidade. Por essa razão, estudar esses aspectos da biologia destas bactérias constitui um intento relevante e promissor.

De certa forma, pode-se dizer que este projeto é uma continuação dos estudos da aluna, realizados no âmbito do programa PDPD e da IC, onde vários fatores de virulência foram selecionados do proteoma de *Klebsiella pneumoniae*, depositado no UniProt. No projeto de PDPD, foi feita uma boa busca bibliográfica sobre a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, aspectos das infecções causadas por ela, incidência de casos e dados proteômicos – de forma preliminar. Na Iniciação científica, diversas ferramentas, disponibilizadas principalmente no Portal Expsy, foram utilizadas para caracterizar as proteínas em termos de dados físico-químicos, estruturais e funcionais. Além disso, foram buscados ortólogos por meio de alinhamentos em bancos de dados. No momento, como o projeto está em andamento, a busca por epitopos será realizada ainda e as análises no Portal Expsy estão sendo finalizadas.

Neste projeto, objeto desta análise, serão buscados no proteoma das bactérias ESKAPE proteínas de ligação a metais de transição que façam parte de transportadores do tipo ABC. Estas proteínas serão caracterizadas por ferramentas de Bioinformática para determinar aspectos físico-químicos, distribuição de domínios e epitopos, além da estrutura de RNA mensageiro e análise de códons preferenciais. Visa-se com isso contribuir para o metaloma destas espécies.

Há grandes possibilidades de que os resultados desse trabalho sirvam de subsídio para projetos maiores, uma vez que essa é uma parte da linha de pesquisa da orientadora que está iniciando. Também pretende-se utilizar esses dados de forma complementar a dados experimentais futuros com as proteínas deste estudo.

**Palavras-chave do projeto:** *bactérias ESKAPE, transportadores ABC, fatores de virulência, vacinas, antibióticos*

## 1. Introdução e Justificativa

### 1.1. Bactérias ESKAPE

ESKAPE é um acrônimo para algumas espécies de bactérias resistentes a drogas, que circulam em hospitais. Elas são a quintessência de transmissão, aquisição de resistência e adaptação patogênica. *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies do gênero *Enterobacter* compõem este grupo de patógenos (Rice, 2008). Bactérias ESKAPE utilizam uma variedade de mecanismos moleculares para evitar a ação de moléculas antimicrobianas, como alteração de estrutura, inativação ou modificação na sua capacidade de se ligar a alvos moleculares, menor permissividade para acumular drogas e maior habilidade para exportá-las, formação de biofilmes etc. (Santajit e Indrawattana, 2016).

Bactérias ESKAPE estão envolvidas em processos de transferência gênica horizontal, que são responsáveis pelo espalhamento de cassetes de resistência. Estas sequências poderiam potencialmente conferir características patogênicas a bactérias residentes simbióticas ou comensais. De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde - PAHO (2021), mau uso de antibióticos, durante a pandemia de SARS-CoV2, também contribuiu para este cenário de disseminação de infecções causadas por espécies bacterianas multirresistentes. Nesse sentido, a WHO (2019a) estima que resistência antimicrobiana, encontrada não só em bactérias, mas também em vírus, fungos e parasitas, estava entre as dez maiores ameaças à saúde pública em 2019. Um relatório similar, preparado pelo CDC (2019), classificou bactérias do gênero Enterobacteriaceae como um desafio urgente. Certamente, o período pós-pandêmico não mostrará um horizonte distinto do descrito anteriormente. Dessa forma, dado o cenário imposto por infecções causadas por bactérias ESKAPE, é essencial monitorar e controlar o uso de drogas antimicrobianas em humanos e animais.

Várias iniciativas – com uma ampla faixa de efetividade – têm sido descritas no tratamento de infecções por bactérias ESKAPE, de antibióticos de variado espectro até terapia fotodinâmica (revisado em Mulani et al., 2019). Embora estes tratamentos ofereçam vias alternativas para lidar com esta questão, população vulnerável, como os mais velhos e os

grupos de crianças, além de indivíduos imunocomprometidos, ainda permanece como os mais suscetíveis a se infectarem e desenvolverem sintomas severos.

De acordo com a WHO (2019b), condições neonatais foram a 5ª causa global de mortes devido a doenças transmissíveis em 2019. Em países de baixa renda, estas doenças foram a causa majoritária de óbitos. Países nestas condições econômicas são classificados pelo Banco Mundial como aqueles cuja renda anual per capita é de até US\$ 1025,00. Como exemplo, um estudo do tipo coorte, realizado em 12 localidades de 7 países em desenvolvimento asiáticos e africanos, analisou a incidência de sepse neonatal causada por alguns patógenos bacterianos (Sands et al., 2021). O projeto BARNARDS, do inglês *Burden of Antibiotic Resistance in Neonates from Developing Societies*, mostrou que *K. pneumoniae* (o K do acrônimo ESKAPE) foi a espécie Gram-negativa mais isolada na amostra. Surpreendentemente, dados mostraram que todos os isolados bacterianos eram multirresistentes a drogas.

Nesse sentido, estima-se, com base em modelos preditivos, que linhagens de bactérias do gênero Enterobacteriaceae - *Escherichia coli* e *K. pneumoniae* - foram responsáveis por mais de 5 milhões de episódios infecciosos da corrente sanguínea e os isolados resistentes a carbapenem causaram mais de meio milhão de mortes, somente em 2014 (Temkim et al., 2018). Certamente, a emergência de clones resistentes mais recentes tem contribuído para resultados ainda piores.

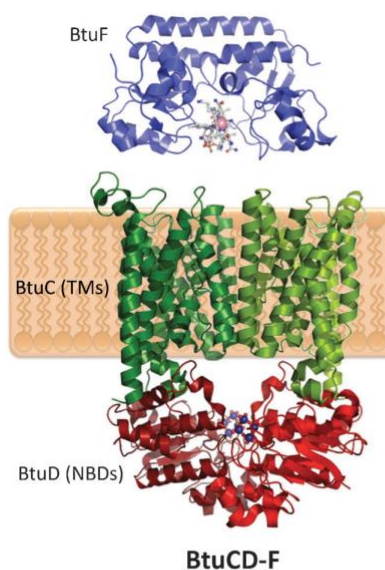
## **1.2. Transportadores do tipo ABC**

Os transportadores ABC (ATP-binding cassette) fazem parte da superfamília mais abundante de proteínas e agem na importação e exportação de substâncias como íons, açúcares, aminoácidos, proteínas e complexos polissacarídeos, além de participar da regulação de diversos processos celulares (Higgins, 2001). Os com função de importadores geralmente estão presentes em organismos procariotos, são dependentes da ligação com algum substrato e são responsáveis pela nutrição da bactéria. Os exportadores podem ser encontrados em células procarióticas ou eucarióticas e desempenham o papel de jogar para o meio extracelular substâncias prejudiciais a ela e secretar toxinas. E a última classe de transportadores ABC são os reguladores que agem no reparo de DNA, tradução e regulação de expressão gênica (Dassa & Bouige, 2001). Neste projeto, serão estudados os importadores de metais de transição de bactérias ESKAPE.

Os transportadores ABC são proteínas de alta afinidade ancoradas na membrana interna da célula e realizam diferentes interações com substratos para os quais são específicos. Esta especificidade é determinada pelo receptor situado na membrana externa, que está em contato com o meio externo no caso das bactérias. O tipo de substrato que eles conduzem através da membrana externa, periplasma e membrana interna quando são importadores de metais de transição são aqueles essenciais para a célula, como ferro, zinco, manganês, níquel e cobalto e somente os metais fundamentais para o metabolismo são captados porque não é vantajoso utilizar energia para aqueles não essenciais (Klein & Lewinson, 2011).

Os transportadores ABC são constituídos por no mínimo três subunidades e cada uma delas é codificada por um gene diferente. As subunidades são: domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD, do inglês *Nucleotide Binding Domain*) que funciona como uma ATPase, permease transmembrana (TM, do inglês *Transmembrane permease*) e uma proteína hidrofílica de ligação ao substrato (SBP, do inglês *Substrate Binding Protein*), tendo os dois primeiros papéis de homodímeros, ou seja, é uma molécula composta por dois monômeros idênticos (Klein & Lewinson, 2011). Estes componentes descritos estão ilustrados na Figura 1.

**Fig. 1** Modelo do transportador ABC, BtuCD-F. Os monômeros idênticos da permease transmembrana e do domínio de ligação ao nucleotídeo estão representados respectivamente pelos tons de verde e vermelho; a porção azul representa a proteína de ligação ao substrato. As esferas azuis estão localizadas no local onde as duas moléculas de ATP devem se ligar para que o transporte ocorra. *Imagem modificada de Klein & Lewinson (2011).*



O que determina a que tipo de substrato o transportador do tipo ABC será específico é a proteína de ligação ao substrato (SBP), o que torna inviável o transporte de metais se esta proteína está ausente. A permease transmembrana também contribui para a seleção do substrato, mas esta contribuição é muito pequena em relação à SBP (Klein & Lewinson, 2011). As proteínas SBP de transportadores ABC de aquisição de metais de transição, presentes em bactérias ESKAPE, serão alvo deste estudo. Este trabalho, de caráter exploratório, servirá de base para futuros estudos do nosso grupo de forma experimental.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo deste projeto é caracterizar as proteínas ligantes de metais de transição de transportadores ABC, por meio de ferramentas de Bioinformática.

### **2.2. Objetivos específicos**

O presente projeto tem os seguintes objetivos específicos:

1. Selecionar proteínas de interesse do proteoma de bactérias ESKAPE no Uniprot;
2. Fazer alinhamentos das sequências das proteínas selecionadas no BlastP;
3. Buscar características interessantes das proteínas por meio de ferramentas do portal Expasy, Pfam, etc;
4. Usar ferramentas de predição de estrutura secundária de pelo menos um ligante de cada organismo.
5. Buscar epitopos das proteínas no software Immune Epitope e NetMHCpan 4.1.

## **3. Metodologia**

### **3.1. Seleção das proteínas no site UNIPROT**

No início do projeto serão selecionadas, pelo menos uma proteína (por bactéria) ligante de ferro, manganês, zinco, níquel, cobalto e outros metais que se mostrarem interessantes durante a análise. Para isso, serão acessados proteomas depositados no Uniprot

– link: <https://www.uniprot.org>, seção: Proteomes, das bactérias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e pelo menos uma espécie do gênero *Enterobacter*. Nessa busca, será utilizado o proteoma de referência com o maior número de sequências anotadas, cujo CPD (Complete Proteome Detector) seja o mais favorável. Alguns proteomas têm sido selecionados, manualmente ou por algoritmo, como proteomas de referência, que cobrem organismos modelo bem estudados e outros organismos de interesse para pesquisa biomédica e filogenia (Uniprot website, 2021). O índice CPD é um algoritmo que analisa a completude e a qualidade das sequências depositadas e pode assumir alguns “valores”, como Standard, Close to standard e Outlier. Será dada preferência para os que se enquadram nessa categoria de Standard. O BUSCO Score também será considerado, que consiste na análise da qualidade do genoma, em termos de conteúdo de ortólogos simples e dupla cópia.

### **3.2. Pesquisa da localização celular**

Nosso interesse primário é investigar se as proteínas podem ser possíveis antígenos vacinais, que possam ser alvos para efetores imunes, especialmente para anticorpos neutralizantes (bloqueadores de função) e opsozinantes (recrutadores de fagócitos e de sistema complemento). Ainda que proteínas da família SBP sejam primordialmente de superfície, a análise será feita para confirmar esta localização, uma vez que em alguns casos, a anotação pode gerar alguma confusão. Esta confusão ocorre pois, muitas vezes, buscam-se os 3 componentes do transportador em sequências contíguas do genoma, formando um operon. No caso da MntC (Manganese transport protein) de *S. aureus*, por exemplo, a sequência aparece distante de uma permease e uma ATPase. Sendo assim, serão buscadas proteínas de superfície, que sejam ancoradas à membrana, por meio dos softwares Proteus2 (Montgomerie *et al.*, 2008) disponível em <http://www.proteus2.ca/proteus2/> e Phobius (Käll, Krogh e Sonnhammer, 2004), disponível em <https://phobius.sbc.su.se/>. Serão evitadas proteínas com domínios transmembrana, por dois motivos: a) proteínas SBP são necessariamente periféricas, ou seja, não atravessam a membrana e b) uma das perspectivas futuras é expressar as proteínas desse projeto, pelo menos as mais promissoras, em sistema recombinante. Sabe-se que proteínas com longos trechos hidrofóbicos são difíceis de produzir e de assumirem sua conformação nativa, ou seja, a estrutura tridimensional esperada.



Todas as sequências, selecionadas na etapa descrita em 3.1 e analisadas quanto à presença de domínios transmembrana (fator de exclusão), serão avaliadas quanto à presença de peptídeo sinal, utilizando software SignalP-5.0, disponível no link: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> e o 6.0, disponível no link: <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>, que conta com novas funcionalidades (Teufel et al., 2022). As análises nas duas versões serão comparadas. As proteínas que apresentarem peptídeo sinal de exportação para superfície da membrana externa (fator de inclusão) serão confirmadas para as etapas subsequentes. Nesta etapa, serão buscados artigos para obter mais informações destas proteínas nos sites de buscas de artigos: Scielo ([www.scielo.org](http://www.scielo.org)) e NCBI-Pubmed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)). A conservação destas proteínas também será buscada em publicações que apresentam o *core genome* das bactérias, ou seja, aquelas sequências que aparecem em todos ou quase todos os isolados das linhagens das bactérias de interesse.

### **3.3. Alinhamento das sequências selecionadas utilizando BlastP e QuickBlastP**

As proteínas selecionadas nos itens anteriores serão alinhadas com sequências do Banco de Dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando a ferramenta Protein Basic Local Alignment Search Tool – BLASTp e pelo QuickBlastP, disponível no link: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>, com exclusão da bactéria que possui a proteína, em busca de possíveis ortólogos, ou seja, sequências homólogas em outros (micro)organismos. Aquelas com maior *hit*, que possuírem o *e-value* mais favorável (menor valor), serão avaliadas. A análise adicional pelo Quick-BlastP ocorrerá porque o algoritmo desta ferramenta considera somente sequências com similaridade acima de 50%. Este é um fator de corte bastante adequado para inferir homologia, no nosso caso, ainda que alguns autores considerem similaridade de 30% suficiente para atribuir homologia a duas sequências (Pearson, 2013). Serão utilizados tanto os dados adquiridos no BlastP quando os obtidos no QuickBlastP.

### 3.4. Busca de características interessantes das proteínas em sites de análises proteômicas

A partir da sequência de aminoácidos das proteínas, disponível no portal NCBI (National Center for Biotechnology Information – [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ou no próprio Uniprot, em formato FASTA, alguns parâmetros teóricos serão obtidos como: pI (ponto isoelétrico), massa molecular, composição de aminoácidos, estabilidade, coeficiente de extinção molar, dentre outros. Estas ferramentas estão disponíveis no portal de proteômica Expasy (Expert Protein Analysis System): [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch).

A busca por domínios na sequência será feita com o programa Pfam, no site: <http://pfam.xfam.org>. A sequência também será buscada no NCBI-Protein ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/)). Na própria entrada da anotação da proteína, será consultada a opção, no menu à direita: *Identify conserved domains*. Os dados obtidos no Pfam e no NCBI serão comparados, a fim de se obter informações acuradas sobre os domínios das proteínas e se elas pertencem a alguma família, com ortólogos mais caracterizados. Esta busca é interessante, porque muitas SBPs são proteínas *moonlighting*. De acordo com Jeffery (2017) em tradução própria:

Proteínas *moonlighting* exibem mais de uma função bioquímica ou biofísica relevante em apenas uma cadeia polipeptídica. Nesta classe de proteínas multifuncionais, as funções múltiplas não são devidas a fusões genéticas ou múltiplos fragmentos proteolíticos. Centenas de proteínas deste tipo foram identificadas até o momento e incluem um conjunto diverso de proteínas com uma grande variedade de funções. Algumas participam de processos bioquímicos múltiplos utilizando um bolsão de sítio ativo para catálise e uma parte diferente da superfície da proteína para interagir com outras proteínas. Proteínas *moonlighting* desempenham um papel central em muitas doenças e o desenvolvimento de novos tratamentos poderia ser beneficiado por mais informação voltada a questões atuais, por exemplo, como algumas são direcionadas a localizações celulares múltiplas e como uma simples função pode ser alvo de drogas sem impactar uma outra função não envolvida na doença.

A comparação dos códons presentes nos genes das proteínas e da frequência de utilização em *Escherichia coli*, sistema recombinante de expressão utilizado no laboratório da orientadora, será feita com base na tabela disponível em: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=199310>. Essa análise dará subsídios para inferir-se se os códons utilizados para as bactérias constituem um desafio biotecnológico para produção recombinante, em vista da disponibilidade de tRNAs específicos

no sistema de expressão. Para isso, a sequência de DNA ou RNA será buscada das anotações genômicas destas bactérias no NCBI-Genomes: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>.

A predição da estrutura do RNA mensageiro será feita utilizando-se o software RNAstructure 5.0, que pode utilizar ferramenta online ou baixada no computador, disponível no link: <https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>. A sequência de códons e a estrutura do RNA são dois fatores que podem impactar a produção recombinante das proteínas, um objetivo futuro desta pesquisa. Serão verificadas as formações de *hairpin* na iniciação de tradução.

A predição de estrutura secundária das proteínas de interesse será feita pela ferramenta JPred4, disponível no link: <https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>. Estes primeiros dados estruturais poderão ser complementados em breve, com o auxílio de um colaborador, por simulações de estruturas tridimensionais. Nessa simulação, poderão ser utilizadas estruturas depositadas no RCSB-PDB, disponível no link: <https://www.rcsb.org>, caso as proteínas de interesse possuam ortólogos bem caracterizados.

### **3.5. Avaliação de epitopos das proteínas selecionadas**

Para avaliar a imunogenicidade destas proteínas, a fim de estimar a sua eficiência como antígeno vacinal, frente a MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) de classe I e II, a presença de epitopos será determinada utilizando-se o software Immune Epitope Database, disponível em: <http://www.iedb.org/>. Os MHCs de Classe I e II são utilizados, grosso modo, em respostas imunes direcionadas a antígenos produzidos dentro das células por patógenos intracelulares e àqueles circulantes no meio extracelular, respectivamente. A maioria das bactérias extracelulares possuem algum estágio da patogênese dentro das células, por isso, é importante obter esses dados para os dois tipos de complexos.

A ferramenta também fornece epitopos para linfócitos B e T. Todos os peptídeos que são fornecidos já são calculados com base na capacidade deles se complexarem ao MHC de classe I ou II. O cálculo adicional por categoria - epitopo de células T ou B - se refere à capacidade desses peptídeos (complexados ao MHC) se ligarem ao TCR ou dos peptídeos livres serem ligados ao receptor de célula B (BCR). Também há a opção de serem obtidos epitopos lineares (sequência contígua de aminoácidos) ou conformacionais (sequência formada espacialmente por aminoácidos não contíguos).

Outro programa que será utilizado para comparar com o Immune Epitope será o NetMHCpan 4.1, disponível no link: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>. Nessa ferramenta, também é possível selecionar os tipos de MHC, mas não só sendo de classe I ou II, mas os alelos de humanos e outros organismos, que sejam de interesse. Ele dá o resultado dos peptídeos de alta e baixa afinidade.

A análise nessas ferramentas será muito útil para inferir que regiões das proteínas podem ser utilizadas em vacinas de subunidades, onde trechos das proteínas sejam utilizados ao invés da sequência completa.

#### **4. Viabilidade do projeto, resultados esperados e perspectivas**

Por ser um projeto de Bioinformática, a aluna poderá realizá-lo em qualquer horário ou local, desde que tenha disponível um computador de capacidade mínima de processamento e uma Internet de boa qualidade. As ferramentas a serem utilizadas são ferramentas que a orientadora já utilizou e pelo menos o banco de dados de proteomas (Uniprot) e várias ferramentas do Expasy, a aluna também já teve contato, por ter analisado em seus projetos de PDPD e de IC (ainda em andamento). A aluna também cursou Bioquímica e pretende se matricular em disciplinas de Bioinformática no próximo quadrimestre, onde ela conseguirá consolidar seus conhecimentos sobre proteínas. De qualquer forma, a candidata já está estudando os temas que serão importantes para o bom andamento do projeto.

Espera-se, com este projeto, abrir novos caminhos em relação à linha de pesquisa relacionada aos estudos destas bactérias patogênicas. A partir dessa pesquisa exploratória envolvendo o proteoma das bactérias, estudos experimentais podem se estabelecer ou outras abordagens de Bioinformática, como modelagem da estrutura tridimensional das proteínas e construção de árvores filogenéticas destas e outras proteínas destes microrganismos, além de inferir a ocorrência de possíveis proteínas *moonlighting* ainda não caracterizadas.

## 5. Cronograma do projeto

O presente projeto seguirá o cronograma a seguir.

Etapas do projeto	Set/22	Out/22	Nov/22	Dez/22	Jan/23	Fev/23	Mar/23	Abr/23	Mai/23	Jun/23	Jul/23	Ago/23	Set/23
Etapa 3.1	√	√	√										
Etapa 3.2	√	√	√										
Etapa 3.3			√	√	√								
Elaboração de Relatório parcial						√	√						
Etapa 3.4							√	√	√				
Etapa 3.5									√	√	√		
Relatório final e pôster no Simpósio de IC												√	√

## 6. Referências

- CDC (2019) Antibiotic Resistance Threats in the United States. Link: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso: 02/04/2022.
- Dassa E, Bouige P (2001) The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.*, v. 152, p. 211-229.
- Higgins CF (2001) ABC transporters: physiology, structure, and mechanism – an overview. *Res. Microbio.*, v. 152, p. 205-210.
- Jeffery CJ (2017) Protein moonlighting: what is it, and why is it important? *Phil. Trans. R. Soc. B373*: 20160523. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0523>
- Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL (2004) A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *J. Mol. Biol.* 338, 1027–1036.
- Klein JS, Lewinson O. (2011) Bacterial ATP-driven transporters of transition metals: physiological roles, mechanisms of action, and roles in bacterial virulence. *Metallomics*, v. 3, p. 1098-1108.
- Montgomerie S, Cruz JA, Shrivastava S, Arndt D, Berjanskii M, David S. Wishart (2008) PROTEUS2: a web server for comprehensive protein structure prediction and structure-based annotation. *Nucleic Acids Research*, 36. doi:10.1093/nar/gkn255
- Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR (2019) Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol.*, 10: 539. doi: 10.3389/fmicb.2019.00539. eCollection 2019.

- PAHO (2021) Americas report surge in drug-resistant infections due to misuse of antimicrobials during pandemic. Link: <https://www.paho.org/en/news/17-11-2021-americas-report-surge-drug-resistant-infections-due-misuse-antimicrobials-during>. Acesso: 01/04/2022.
- Pearson WR (2013) An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Curr Protoc Bioinformatics.*, June 03: doi:10.1002/0471250953.bi0301s42.
- Rice LB (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE, *J. Infect. Dis.*, 197, 1079–1081. DOI: 10.1086/533452
- Sands K, Carvalho MJ, Portal E, Thomson K, Dyer C (2021) Characterization of antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria that cause neonatal sepsis in seven low- and middle-income countries. *Nature Microbiology*, 6: 512–523. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00870-7>
- Santajit S. and Indrawattana N. (2016) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens., *Biomed Res Int.*: 2475067. doi: 10.1155/2016/2475067
- Temkin E., Fallach N., Almagor J., Gladstone B. P., Tacconelli E. et al. (2018) Estimating the number of infections caused by antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 2014: a modelling study. *The Lancet*, 6: e969-979.
- Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR et al. (2022) SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nat Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>
- Uniprot website, 2021 – Proteomes. Disponível no link: [www.uniprot.org/proteomes](http://www.uniprot.org/proteomes). Acesso em 09/06/2021.
- WHO (2019a) Ten Threats to Global Health in 2019. Link: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Acesso: 02/04/2022.
- WHO (2019b) The top 10 causes of death. Link: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso: 03/04/2022.