

**LETÍCIA BUSATO MIGLIORINI**

**Papel dos mecanismos de reparo de DNA na resposta de  
*Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos Ciprofloxacina e  
Ceftazidima**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2017

**Letícia Busato Migliorini**

**Papel dos mecanismos de reparo de DNA na resposta de  
*Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos Ciprofloxacina e  
Ceftazidima**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Rodrigo da Silva Galhardo

Versão Original

São Paulo

2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Migliorini, Leticia Busato  
Papel dos mecanismos de reparo de DNA na  
resposta de *Pseudomonas aeruginosa* aos  
antimicrobianos Ciprofloxacina e Ceftazidima. /  
Leticia Busato Migliorini; orientador Rodrigo da  
Silva Galhardo. -- São Paulo, 2017.  
78 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --  
Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências  
Biomédicas.

1. Antibióticos. 2. Resistência bacteriana. 3.  
Resposta SOS. 4. Lesões oxidativas. 5. *Pseudomonas*  
*aeruginosa*. I. da Silva Galhardo, Rodrigo,  
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Letícia Busato Migliorini

Título da Dissertação: Papel dos mecanismos de reparo de DNA na resposta de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos Ciprofloxacina e Ceftazidima.

Orientador(a): Rodrigo da Silva Galhardo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

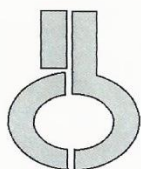
**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....  
Nome:.....  
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....  
Nome:.....  
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....  
Nome:.....  
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....  
Nome:.....  
Instituição:.....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **736/15** referente ao projeto intitulado: "*Papel dos mecanismos de reparo de DNA na resposta de Pseudomonas aeruginosa aos antimicrobianos Ciprofloxacina e Cefotaxima*" sob a responsabilidade de **Letícia Busato Migliorini**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 15 de abril de 2015.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre ter conduzido meus passos, pelas oportunidades durante a trajetória, pelo discernimento frente aos desafios e por colocar pessoas no meu caminho, com as quais tenho a oportunidade de aprender e compartilhar a vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo, pelo acolhimento, dedicação, resiliência, companheirismo e ensinamentos que me fizeram amadurecer profissionalmente. Agradeço a oportunidade de ter feito parte deste grupo de pesquisa e à excelente orientação que será sempre lembrada com grande apreço.

Aos amigos de laboratório, Frank, Marina, Marco, Raquel e Juliana pela amizade, compreensão e colaboração durante estes anos.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Marilis do Valle Marques, pelas sugestões durante os seminários e aos colegas de laboratório Alexandre, Laura, Rodolfo, Naara, Larissa, Júlia pela amizade e ajuda.

Ao Dr. Jesús Blazquéz, pela sua contribuição científica para com a Universidade Estadual de Maringá, à cordial recepção de professores desta Instituição e a mim em seu laboratório em Madri, no qual tive a oportunidade de aprender e conhecer ótimas pessoas que me auxiliaram em todos momentos, Alfredo, Meri e Samuel.

Aos professores da banca de qualificação, Prof. Dr. Nilton Lincopan, Prof. Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Café Ferreira, Prof. Dr. Frederico Gueiros Filho, à Prof. Dr<sup>a</sup>. Regina Baldini e aos seus alunos Gian e Thais pelas sugestões, críticas e ajuda que enriqueceram este trabalho.

Aos funcionários do ICB, Gisele, Naide, Isabel, Celso, Alexandre e D. Francisca e aos funcionários da biblioteca que dentro das suas funções contribuem para que a ciência aconteça.

Aos amigos de São Paulo, Carol, Cely, Éder, Felipe, Fernando, Lilian, Maria, Vagner, Raul, Renata pela amizade, risadas e companheirismo. Ao grupo Expresso Riso e aos pacientes que fizeram meus dias mais humanos. Minha eterna gratidão à vocês.

Aos meus amigos de Maringá, Aline, Anne, Fernanda, Cláudia, Leda, Erick, Ewerton, Vera, Ernandes, Pati e Mateus e aos meus afilhados Vítor e Gustavo por comemorarem comigo cada conquista e estarem presentes em todas elas. Agradeço à Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Bronharo Tognim por todo exemplo e incentivo que me fizeram seguir nesta área do início da minha graduação até hoje.

Aos meus primos, Gabi, Gustavo, Bruno, Pedro, Enzo e Laura e tios (as) Adriana, Helmuth, Alessandra, Fábio, Rejane e Ivanor por toda força e torcida em todos os momentos.

Aos meus avós, Onório, Eleda, Ilse e Albano (*in memoriam*) por todos os valores ensinados e pela oportunidade de receber de vocês a sabedoria.

E finalmente, aos meus pais, Álvaro e Rosane e meu irmão Ricardo pelo amor incondicional e pela linda amizade. Por me ensinarem a lutar pelo que anseio e nunca desistir dos meus sonhos. Sou grata a vocês pela educação e valores que aprendi em casa. Devo a vocês esta conquista.

À Capes pelo auxílio financeiro durante os seis primeiros meses de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida no país, referente ao processo 2015/18886-0. E pela Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), referente ao processo 2016/18979-1.

Obrigada a todos.



## RESUMO

MIGLIORINI, L. B. **Papel dos mecanismos de reparo de DNA na resposta de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos Ciprofloxacina e Ceftazidima.** 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

*Pseudomonas aeruginosa* é um importante patógeno oportunista humano que tem emergido como um dos principais agentes de infecções nosocomiais. A resistência de *P. aeruginosa* aos antibióticos é um problema de saúde pública mundial. As ações diretas ou indiretas provocadas pelos antibióticos, como a formação de espécies reativas de oxigênio, podem levar à ativação de respostas mutagênicas que regulam a expressão de polimerases de baixa fidelidade, que atuam na Síntese Translesão de DNA (TLS). Neste trabalho, nós avaliamos a resposta de *P. aeruginosa*, frente à Ceftazidima (CAZ) e Ciprofloxacina (CIP). Nossos dados demonstram que CAZ, não induz a resposta SOS e nem mutagênese em *P. aeruginosa*, diferentemente de CIP. Demonstramos que as três polimerases de TLS estão envolvidas na mutagênese induzida por CIP e peróxido de hidrogênio. Além disso, observamos que a perda de qualquer uma das polimerases alterou significativamente o espectro de mutações espontâneas e induzidas por CIP. As mutações predominantes são de deleções curtas na cepa selvagem, e a proporção deste tipo de mutação é reduzida nos mutantes de polimerases, sugerindo que essas polimerases são responsáveis pelo surgimento destas deleções, e que possuem funções redundantes neste processo mutagênico. Assim, demonstramos que as polimerases de TLS são importantes para a mutagênese induzida por CIP em *P. aeruginosa*, e podem estar implicadas na mutagênese adaptativa e, conseqüentemente, na resistência bacteriana.

**Palavras-chave:** Antibióticos. Resistência bacteriana. Resposta SOS. Lesões oxidativas. *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

MIGLIORINI, L. B. **Role of DNA repair mechanisms in the response of *Pseudomonas aeruginosa* to the antimicrobials Ciprofloxacin and Ceftazidime.** 2017. 77 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

*Pseudomonas aeruginosa* is an important human opportunistic pathogen that has emerged as a major agent of nosocomial infections. *P. aeruginosa* resistance to antibiotics is a worldwide public health problem. The direct or indirect actions caused by antibiotics, such as the formation of reactive oxygen species, may lead to the activation of mutagenic responses that regulate the expression of low fidelity polymerases that act on Translesion DNA Synthesis (TLS). In this work, we evaluated the response of *P. aeruginosa* to Ceftazidime (CAZ) and Ciprofloxacin (CIP). Our data demonstrate that CAZ does not induce neither SOS response nor mutagenesis in *P. aeruginosa*, unlike CIP. We demonstrate that the three TLS polymerases are involved in mutagenesis induced by CIP and hydrogen peroxide, but in the latter, in smaller proportions. In addition, we report that the loss of any of the polymerases significantly altered the spectrum of spontaneous and CIP-induced mutations. The predominant mutations are short deletions in the wild-type strain, and the proportion of this mutation type is reduced in the polymerase mutants, suggesting that these polymerases are responsible for the deletions and that have redundant functions in this mutagenic process. In this sense, we show that the TLS polymerases are important for CIP-induced mutagenesis in *P. aeruginosa*, and may be involved in adaptive mutagenesis and, consequently, in bacterial resistance.

**Keywords:** Antibiotics. Bacterial resistance. SOS Response. Oxidative lesions. *Pseudomonas aeruginosa*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-oxoG - 8-oxoguanina

AMI – Amicacina

BER - Reparo por excisão de bases (base excision repair)

BHI - Brain Heart Infusion

CAZ – Ceftazidima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIP – Ciprofloxacina

CLSI - Clinical Laboratory Standards International

COL - Colistina

DNA - ácido desoxirribonucleico

gDNA – DNA genômico

dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO600 - densidade óptica a 600 nanômetros

FC – Fibrose cística

FM – Frequência de mutantes

HR – Recombinação homóloga (Homologous recombination)

LB - Luria-Bertani

Mb - megabase(s)

MER - Meropenem

MH - Mueller-Hinton

MMC – Mitomicina C

MMS - Methyl methanesulfonate

NER – Reparo por excisão de nucleotídeos (Nucleotide excision repair)

PBPs - Proteínas ligadoras de Penicilina (*Penicillin-binding Proteins*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*)

rpm - rotações por minuto

ssDNA – Fita simples de DNA (single-stranded DNA )

Sub-CIM – Concentrações subinibitórias de Ciprofloxacina

TLS – Síntese translesão de DNA ( Translesion synthesis)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

UV – Luz Ultra-violeta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - As diferentes origens das concentrações sub-inibitórias de antibióticos.....	20
<b>Figura 2</b> - A interação primária alvo-droga e a produção de ROS.....	23
<b>Figura 3</b> - Impacto dos antibióticos na população bacteriana. ....	25
<b>Figura 4</b> - Sistema GO.....	28
<b>Figura 5</b> - Indução qualitativa da Resposta SOS com Ciprofloxacina (CIP) e Ceftazidima (CAZ) .....	47
<b>Figura 6</b> - Indução da Resposta SOS com diferentes $\beta$ -lactâmicos na linhagem de PA14 carreando a fusão transcricional <i>PrecA::luxCDABE</i> .....	49
<b>Figura 7</b> - Medida da luminescência em PA14 <i>PrecA::luxCDABE</i> sob diferentes concentrações de CAZ e tempos de exposição.....	50
<b>Figura 8</b> - Medida da luminescência em PA14 <i>PrecA::luxCDABE</i> , sob diferentes concentrações de CAZ e meios de cultura.....	50
<b>Figura 9</b> - Frequências de mutantes induzido por CAZ, em FOS.. ....	50
<b>Figura 10</b> - Frequências de mutantes induzido por CAZ, em ESTP. ....	52
<b>Figura 11</b> - Indução qualitativa da Resposta SOS com Ciprofloxacina (CIP) e Ceftazidima (CAZ). ....	53
<b>Figura 12</b> - Indução da Resposta SOS com diferentes $\beta$ -lactâmicos na linhagem de PA01 carreando a fusão transcricional <i>PrecA::luxCDABE</i> .....	53
<b>Figura 13</b> - Medida da luminescência em PA01 <i>PrecA::luxCDABE</i> com CAZ.....	54
<b>Figura 14</b> - Perfis de indução de mutagênese induzida por ½ CIM de CIP em PA14 e nas cepas mutantes nas polimerases de TLS, PA14:: <i>dinB</i> MrTn7, PA14 $\Delta$ <i>imuAB/dnaE2</i> ( $\Delta$ OP), PA14:: <i>dnaE2</i> MrTn7 e PA14:: <i>polB</i> MrTn7, em FOS.....	57
<b>Figura 15</b> - Perfis de indução de mutagênese induzida por ½ CIM de CIP em PA14 e nas cepas mutantes nas polimerases de TLS, PA14:: <i>dinB</i> MrTn7, PA14 $\Delta$ <i>imuAB/dnaE2</i> ( $\Delta$ OP), PA14:: <i>dnaE2</i> MrTn7 e PA14:: <i>polB</i> MrTn7, em ESTP.....	57

**Figura 16** - Perfis de indução de mutagênese induzida por 25mM de Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em PA14 e nas cepas mutantes nas polimerases de TLS, PA14::*dinB*MrTn7, PA14Δ*imuAB/dnaE2* (ΔOP), PA14::*dnaE2*MrTn7 e PA14::*polB*MrTn7..... 64

**Figura 17** - Hipótese sobre os mecanismos moleculares que levam à mutagênese induzida por CIP.....67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas neste trabalho.....	33
<b>Tabela 2</b> – Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizadas neste trabalho .....	33
<b>Tabela 3</b> - Antimicrobianos utilizados neste trabalho .....	34
<b>Tabela 4</b> - Plasmídeos utilizados neste trabalho .....	35
<b>Tabela 5</b> – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho .....	36
<b>Tabela 6</b> - Concentração Inibitória Mínima para todas as linhagens .....	45
<b>Tabela 7</b> - Frequência dos tipos de mutações encontradas no <i>glpT</i> .....	60
<b>Tabela 8</b> - Tipos de mutações e suas posições no gene <i>glpT</i> de mutantes FOS <sup>R</sup> de PA14 .....	61
<b>Tabela 9</b> - Tipos de mutações e suas posições no gene <i>glpT</i> de mutantes FOS <sup>R</sup> de PA14 <i>dinB::MrTn7</i> . .....	62
<b>Tabela 10</b> - Tipos de mutações e suas posições no gene <i>glpT</i> de mutantes FOS <sup>R</sup> de PA14 <i>dnaE2::MrTn7</i> . .....	62
<b>Tabela 11</b> - Tipos de mutações e suas posições no gene <i>glpT</i> de mutantes FOS <sup>R</sup> de PA14 <i>polB::MrTn7</i> . .....	63

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	18
<b>1.2 Antimicrobianos</b> .....	19
<b>1.3 Estresse oxidativo: um mecanismo de ação comum aos antibióticos?</b> .....	21
<b>1.4 Resposta bacteriana ao estresse</b> .....	24
1.4.1 <i>Reparo de danos oxidativos</i> .....	25
1.4.2 <i>Resposta SOS</i> .....	28
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
<b>3.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento</b> .....	33
<b>3.2 Agentes antimicrobianos</b> .....	34
<b>3.3 Plasmídeos</b> .....	35
<b>3.4 Oligonucleotídeos</b> .....	35
<b>3.5 Preparo das bactérias quimiocompetentes</b> .....	36
<b>3.6 Transformação de células competentes por choque térmico e seleção dos mutantes</b>	37
<b>3.7 Técnicas de Biologia Molecular</b> .....	37



3.7.1 Extração de DNA genômico de PA14.....	37
3.7.2 Extração de DNA plasmidial.....	38
3.7.3 Eletroforese em gel de agarose .....	38
3.7.4 Técnica de SLIC- Cloning (Clonagem independente de ligação e sequenciamento) .....	38
<b>3.8 Conjugação de Escherichia coli S-17 com PA14.....</b>	<b>39</b>
<b>3.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....</b>	<b>40</b>
<b>3.10 Determinação da frequência de mutantes.....</b>	<b>41</b>
<b>3.11 Análise da indução da resposta SOS pela exposição aos antimicrobianos.....</b>	<b>42</b>
3.11.1 Medida de luminescência .....	42
<b>3.12 Mutagênese induzida ROS em <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>3.13 Análise do espectro de mutações provocadas por CIP.....</b>	<b>43</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Papel dos mecanismos de reparo na resistência de <i>P. aeruginosa</i> aos antimicrobianos.. .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Indução da Resposta SOS e mutagênese por <math>\beta</math>-lactâmicos em <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3 Mutagênese induzida por CIP em <i>P. aeruginosa</i> .....</b>	<b>55</b>
4.3.1 Papel das polimerases propensas a erros .....	55
<b>4.4 Espectro de mutação provocado por CIP em <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>59</b>

<b>4.5 Envolvimento das polimerases propensas a erros na mutagênese induzida ROS em <i>P. aeruginosa</i></b> .....	63
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* pertence à classe das *Gammaproteobacterias*, a qual compreende um grande e diversificado grupo de bactérias ubíquas encontradas no solo, água, plantas e animais, e também conhecidas por apresentarem grande plasticidade genética e versatilidade metabólica (GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003).

Dentre as espécies pertencentes a esta classe, *Pseudomonas aeruginosa* representa um importante patógeno oportunista humano que tem emergido como uma das principais causas de infecções nosocomiais (GOLDBERG, 2010; OSMAN et al., 2010; VINCENT, 2003). Na América Latina, *Pseudomonas* spp. é responsável por 31,2% dos casos de pneumonia, 13,8% das infecções da pele e dos tecidos moles e 7,5% das infecções de corrente sanguínea (GALES et al., 2012).

Em geral, *P. aeruginosa* é responsável por 11,0 a 13,8 % das infecções hospitalares. Sendo que em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) pode chegar a 20%, incluindo a participação de isolados multirresistentes, o que vem dificultando o controle da infecção nesse ambiente (SUAREZ et al., 2011). As taxas de isolados de *P. aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas, por exemplo, já chegam a 30%, segundo dados do SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (SADER et al., 2014)

A alta prevalência de *P. aeruginosa* pode se dar pela capacidade em formar biofilme e manter-se viável por muito tempo em superfícies abióticas, como cateteres e equipamentos hospitalares (EL-KHOLY et al., 2012). Além disso, a alta resistência intrínseca e adquirida a antimicrobianos apresentada por esta bactéria, dificulta a sua erradicação do ambiente hospitalar (WOLTER et al., 2009; YORDANOV; STRATEVA, 2009).

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva que provoca aumento da viscosidade de secreções das vias aéreas inferiores, facilitando infecções crônicas, principalmente por *P. aeruginosa* (FIRMIDA, 2011; LYCZAK; CANNON; PIER, 2002). Dados recentes mostram que 80% dos pacientes com FC não resistem à insuficiência respiratória causada pela infecção crônica por esta bactéria (BHAGIRATH et al., 2016).

Ademais, para sobreviver no ambiente pulmonar, *P. aeruginosa* deve suportar diversos tipos de estresse, como: estresse osmótico, deficiência nutricional, competição com outros microrganismos, estresse oxidativo, etc. Para isso, alterações no perfil de expressão

gênica ocorrem, adaptando essa bactéria as condições de estresse (GOODMAN et al., 2004). Devido à persistência da infecção e à terapia prolongada com antimicrobianos, há relatos de isolados hipermutadores, os quais possuem deficiência em diferentes sistemas de reparo de DNA. Sendo que alguns podem acumular altos níveis de 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosina (8-oxodG) (CIOFU et al., 2005; FOWLER et al., 2003) tornando-os mais propensas à adquirir mutações, que os deixam adaptados ao estresse e muitas vezes resistentes à terapêutica (DÖRING et al., 2000; OLIVER et al., 2000).

*P. aeruginosa* possui um genoma de 6,3 Mb e comporta uma grande versatilidade metabólica que permite a rápida adaptação a uma gama de estresses, dentre eles os antimicrobianos (GOH et al., 2002; OLSON et al., 2000).

## 1.2 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são compostos amplamente utilizados na clínica médica contra infecções bacterianas. Para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, dois antimicrobianos amplamente empregados são: Ciprofloxacina (CIP) e Ceftazidima (CAZ) (HAWKEY, 2003; VAN BAMBEKE et al., 2005).

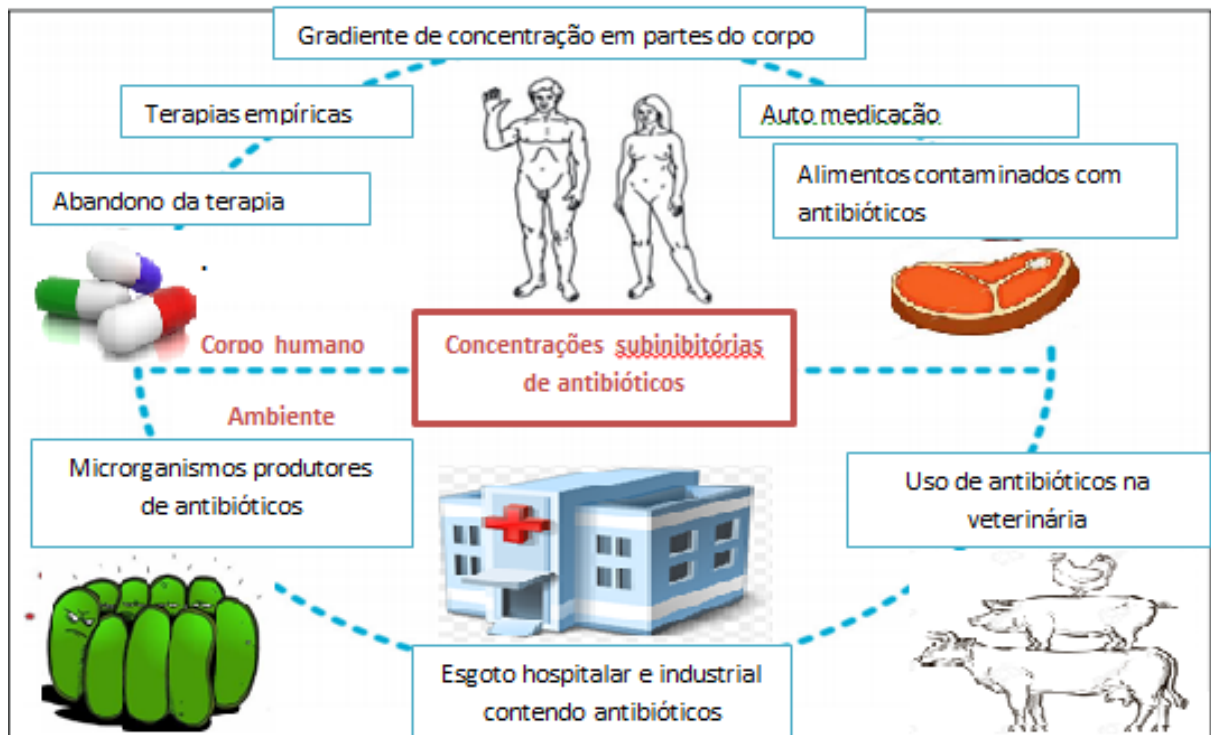
A CAZ é uma Cefalosporina que pertence à classe dos beta-lactâmicos. Este grupo de antibióticos tem em comum uma estrutura central, o anel beta-lactâmico, que interage com as Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBPs), inibindo a sua função. As PBPs são transpeptidases responsáveis pela ligação cruzada entre as cadeias peptídicas do peptídeoglicano, que confere rigidez a parede celular e protege a bactéria de variações osmóticas do meio. Logo, o efeito bactericida da CAZ se dá pela inibição da síntese e perda de rigidez da parede celular bacteriana (BECEIRO; TOMAS; BOU, 2013; DRAWZ; BONOMO, 2010; GUIMARÃES, 2010).

A CIP pertence à classe das Fluoroquinolonas de segunda geração. É o quimioterápico mais utilizado em todo mundo devido ao seu amplo espectro de atividade (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014; KIFFER et al., 2011). Seu efeito bactericida consiste na interação e consequente inibição da atividade das enzimas DNA girase e DNA topoisomerase IV. Estas são topoisomerase do tipo II, que promovem o superenovelamento do DNA, importante para o desenvolvimento bacteriano (DRLICA; ZHAO, 1997; HAWKEY, 2003). Como consequência desta inibição, quebras duplas na fita de DNA são formadas. Como causadores de danos no DNA, os antimicrobianos desta classe são reconhecidos como

indutores da resposta celular a danos no DNA, a resposta SOS (DRLICA et al., 2008; DRLICA; ZHAO, 1997) que será estudada ao longo deste trabalho.

A medicina veterinária vem utilizando os antimicrobianos para tratamento de infecções, mas também como promotores de crescimento em animais. O aumento do consumo e, conseqüentemente, da eliminação de antimicrobianos no meio tem provocado diversos impactos no ecossistema (GUARDABASSI et al., 2008), já que 30-90% desses fármacos ingeridos por animais e humanos são excretados intactos ao ambiente (Figura 1). Logo concentrações subinibitórias de antimicrobianos são encontradas no solo e água (HUANG et al., 2005; LIU et al., 1999; PLETZ et al., 2004).

Essas concentrações subletais presentes no meio ambiente ou geradas em certos compartimentos do corpo devido a fatores farmacocinéticos da droga, que criam gradientes de concentração, podem promover alterações na fisiologia bacteriana: morfologia, virulência, resistência e habilidade para produzir variações genéticas. Apesar de serem concentrações baixas de antimicrobianos, quando mantidas, podem funcionar como força seletiva selecionando cepas com baixo e alto nível de resistência ou ainda cepas hipermutadoras (BAQUERO; TEDIM; COQUE, 2013; DAVIES; SPIEGELMAN; YIM, 2006; GMLLBERG et al., 2011; LORIAN, 1975).



**Figura 1** - As diferentes origens das concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos. Dos compartimentos do corpo a resíduos industriais, pecuários e hospitalares. Fonte: modificado de Blázquez, 2012.

### 1.3 Estresse oxidativo: um mecanismo de ação comum aos antibióticos?

Além do mecanismo de ação específico de cada antimicrobiano, um dos efeitos comuns que podem contribuir para a sua letalidade, é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em bactérias (KOHANSKI et al., 2007). O radical hidroxila é uma espécie reativa de oxigênio extremamente reativa com substratos orgânicos, incluindo a molécula de DNA, resultando principalmente na retirada de átomos de hidrogênio do açúcar desoxirribose e adição de ligações insaturadas em bases nucleotídicas (HALLIWELL, 1999). ROS podem resultar em severos danos à molécula de DNA, dentre eles, quebras nas fitas do DNA e perda de bases, sendo altamente genotóxicos, o que contribui para o potencial mutagênico e efeito citotóxico destes compostos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; IMLAY; CHIN; LINN, 1988). Uma importante lesão no DNA provocada por ROS é a oxidação da guanina, levando à formação de 8-oxoguanina (8-oxoG), que devido a conformação alterada, é capaz de parear-se com resíduos de adenina, resultando em mutações de transversão após a replicação, contribuindo para o aumento da taxa de mutação em bactérias (FRIEDBERG et al., 2006).

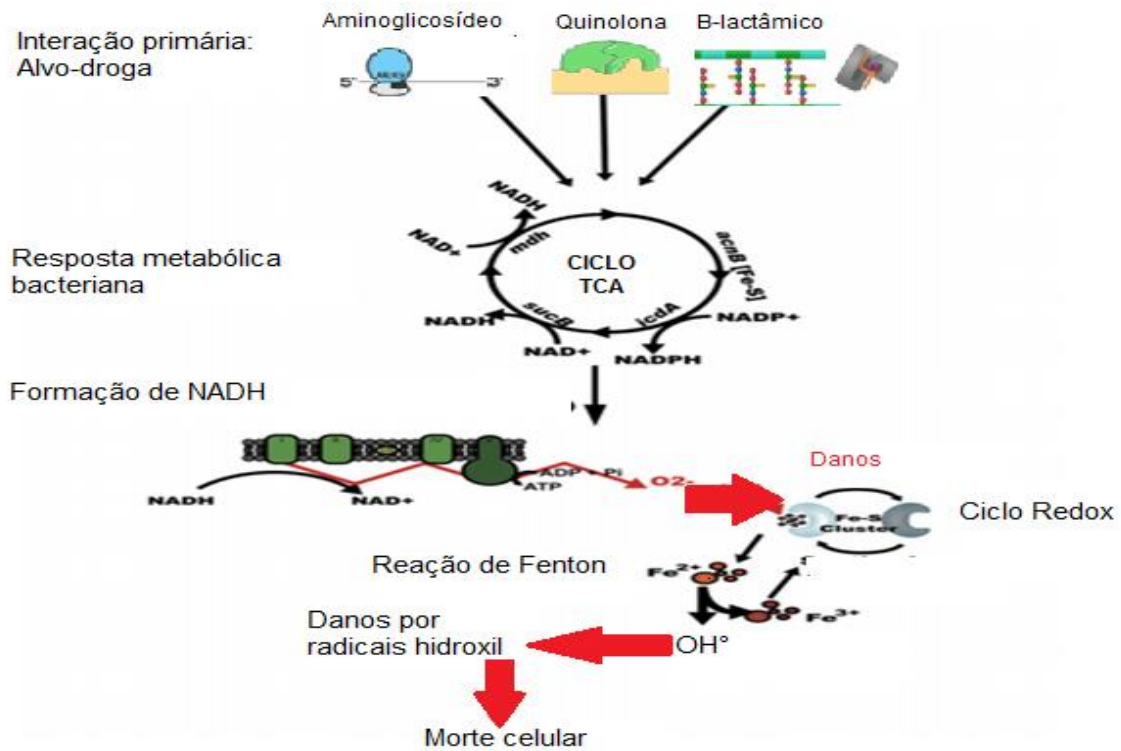
Kohanski e colaboradores demonstraram que as três principais classes de antimicrobianos bactericidas (fluoroquinolonas, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos) tem a capacidade de induzir a formação de radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) via reação química de Fenton, em *E. coli*. A interação primária sítio específica do antibiótico estimula a oxidação de NADH, via hiperativação da cadeia transportadora de elétrons, levando a formação de superóxidos. Os superóxidos danificam grupamentos ferro-enxofre, liberando o íon  $\text{Fe}^{2+}$  para oxidação na reação de Fenton. A Reação de Fenton leva à formação de radicais hidroxila que danificam DNA, lipídeos e proteínas contribuindo para a morte celular. Por isso, acredita-se que o estresse oxidativo pode contribuir para o efeito bactericida dos antimicrobianos (DWYER; KOHANSKI; COLLINS, 2009; KOHANSKI, 2007) (Figura 2).

Assim, uma vez que a bactéria possui genes que reparam os danos oxidativos, estes sistemas poderiam eliminar o dano, diminuindo a eficácia do antimicrobiano. Neste sentido, é interessante analisar o comportamento dos mutantes em vias de reparo de estresse oxidativo quanto à sua sensibilidade aos antimicrobianos. Uma vez que estes mutantes não reparam danos oxidativos, em teoria, o acúmulo destes seria altamente letal para as células, tornando-os mais sensíveis.

Cabe ressaltar que o envolvimento do estresse oxidativo na atividade bactericida dos antimicrobianos é um tema controverso. Alguns autores reportaram para *E. coli*, que a atividade bactericida de  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, sob condições

anaeróbicas e aeróbicas, mantiveram-se iguais (KEREN et al., 2013; LIU; IMLAY, 2013). Os mutantes com deficiência em atividades de peroxidase e catalases não apresentaram maior sensibilidade do que a cepa parental. Inclusive mostraram que a atividade respiratória não foi suficientemente alterada para contribuir para a toxicidade via aumento do estresse oxidativo. Assim, suportam a ideia que a letalidade destes compostos é devido ao mecanismo de ação específico de cada antimicrobiano, como inibição da síntese da parede celular, síntese proteica e replicação do DNA e não necessariamente pela produção de ROS testados por eles (LIU; IMLAY, 2013).

Por outro lado, os agentes oxidantes, independente de contribuírem para a ação bactericida de antimicrobianos, podem contribuir para a mutagênese, causando danos às bases de DNA que podem ser pareadas erroneamente com outras bases, ou mesmo promovendo quebras na dupla fita de DNA que é um sinal para a ativação de respostas à danos, como a SOS. Esta por sua vez, compreende polimerases de baixa fidelidade que ignoram a lesão no DNA e dão sequência à replicação de DNA, inserindo aleatoriamente os nucleotídeos à fita nascente. Por isso, torna-se importante conhecer se os antimicrobianos, de uma maneira direta ou indireta, ativam respostas mutagênicas em bactérias, já que as mutações estão associadas à resistência bacteriana.



**Figura 2** - A interação primária alvo-droga e a produção de ROS. Aminoglicosídeo com o ribossomo, quinolona com DNA girase e beta-lactâmico com PBP podem estimular a oxidação de NADH via cadeia transportadora de elétrons que é dependente do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). A hiperativação da cadeia transportadora de elétrons estimula a formação de superóxidos. Os superóxidos danificam os grupos ferro-enxofre, tornando Fe<sup>2+</sup> disponível para oxidação via reação de Fenton. Fonte: Modificado de Kohanski, 2007.

Além dos antimicrobianos, que são o foco principal deste trabalho, utilizamos outro agente genotóxico, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para avaliar o papel das polimerases propensas a erros e comparar a resposta de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos e à ROS.

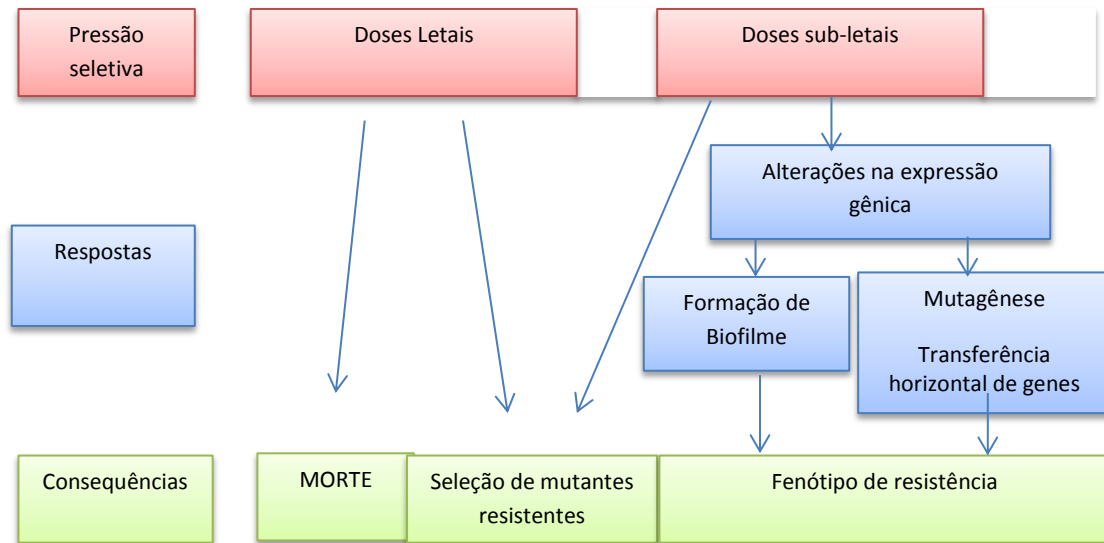
O peróxido de hidrogênio é um importante composto químico que se difunde facilmente através da membrana celular, e atua como um forte oxidante quando decomposto a radical hidroxila [ $\cdot$ OH] por íons Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>1+</sup> na reação de Fenton (FRIEDBERG et al., 2006). As ROS podem também ser geradas indiretamente através da hidrólise da molécula de água por radiações ionizantes (FRIEDBERG et al., 2006) e através do contato da bactéria com alguns antimicrobianos bactericidas, com beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (DWYER et al., 2007; KOHANSKI et al., 2007, 2008).



#### 1.4 Resposta bacteriana ao estresse

As bactérias respondem diferentemente a estresses letais e subletais (Figura 3). Em *E. coli*, sob concentrações letais de antimicrobianos (ampicilina), peróxido de hidrogênio e choque térmico (45°C), há diminuição do metabolismo energético e da síntese de proteínas não essenciais, supressão do crescimento e divisão celular, redirecionando energia para manutenção e reparo celular (KALDALU et al., 2004; ASAKURA et al., 2009; JOZEF CZUK et al., 2010). Já em concentrações sub-letais de antimicrobianos, não há grande redução do crescimento nem morte celular, demonstrando que as bactérias são capazes de ajustar o perfil de expressão gênica e metabolismo para responder ao estresse induzido e manter o rápido crescimento. A exposição a sub-CIM de antimicrobianos é algo que merece atenção, também por promover a tolerância cruzada a muitos outros tipos de estresse (UV, MMS e outras classes de antibióticos) que não o relacionadas com o estresse indutor, tudo isso sem alterar o metabolismo celular, a ponto da bactéria conseguir se proliferar normalmente carregando todo tipo de mutação (BATTESTI; MAJDALANI; GOTTESMAN, 2011; MATHIEU et al., 2016).

Cirz e colaboradores reportaram também que concentrações subinibitórias de ciprofloxacina promovem mutagênese em *E. coli*, através da mesma via que UV e raios X e gamma, pela indução de polimerases propensas a erros (CIRZ et al., 2005a). Logo, acredita-se em um núcleo geral de resposta bacteriana a estresse a qual é ativada por diferentes indutores, conduzindo a mesma resposta e que podem promover uma tolerância cruzada, inclusive a antimicrobianos (MATHIEU et al., 2016). Na clínica médica isso é relevante, uma vez que a exposição à sub-CIM de um antimicrobiano pode promover a tolerância à outras drogas, já que podem partilhar do mesmo núcleo de respostas.



**Figura 3** - Impacto dos antibióticos na população bacteriana. Fonte: modificado de Laureti, 2013.

Por muito tempo acreditou-se que a resistência aos antimicrobianos, clinicamente relevante, era consequência da exposição bacteriana a concentrações acima da CIM, a qual poderia selecionar as variantes resistentes pré-existentes na população (MATHIEU et al., 2016; GMLLBERG et al., 2011). Porém, diversos estudos com fusão de gene repórter, estudos genéticos clássicos e análises de transcriptoma tem demonstrado que a exposição a concentrações sub-MIC de antibióticos desencadeiam alterações nos perfis transcricionais e fenótipos de diversas espécies bacterianas, dentre elas *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e que podem desencadear respostas adaptativas que conduzem a resistência aos antimicrobianos (DAVIES; SPIEGELMAN; YIM, 2006; GMLLBERG et al., 2011; GUTIERREZ et al., 2013a; LORIAN, 1975; MATHIEU et al., 2016).

Dentre estas respostas bacterianas que podem ser desencadeadas frente à exposição aos antimicrobianos, estão a indução de estresse oxidativo, respostas de reparo de DNA e mutagênicas, dentre elas, a resposta SOS (BAHAROGLU; MAZEL, 2014; GUTIERREZ et al., 2013).

#### 1.4.1 Reparo de danos oxidativos

Para reparar danos oxidativos, as bactérias detêm mecanismos de reparo, como o sistema de reparo de 8-oxoguanina (Sistema GO). Este sistema tem como função remover danos oxidativos da guanina ou do pool de nucleotídeos, aumentando a fidelidade durante a replicação e diminuindo a ocorrência de mutações (MICHAELS et al., 1992; MICHAELS;

MILLER, 1992; MILLER; MICHAELS, 1996).

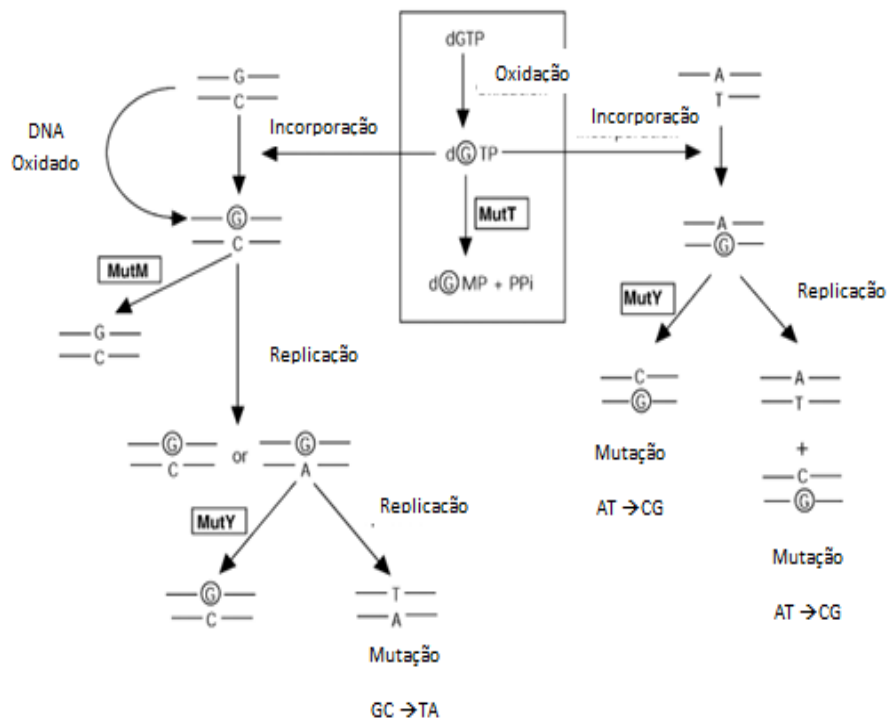
O sistema GO é composto por três proteínas MutM, MutY e MutT (Figura 4). Em *E. coli*, a glicosilase MutM atua em 8-oxoG, eliminando-a, caso ela esteja pareada com uma C (citosina). Se não for reparada, em subsequentes eventos de replicação, pode haver pareamento, preferencialmente, com A (adenina), e consequente transversão G·C → T·A, mais comum em mutantes em *mutM*. A proteína MutY também é uma glicosilase, porém atua sobre a adenina erroneamente pareada com a 8-oxoG, eliminando-a. Caso não seja eliminada, ocorre com mais frequência a transversão G·C → T·A, semelhante ao observado mutantes em *mutM*. A proteína MutT tem uma atividade de hidrolase e atua no pool de nucleotídeos, hidrolisando preferencialmente (8-oxodGTP) à sua forma monofosfatada (8-oxodGMP), que não pode ser incorporada durante a replicação pela polimerase replicativa, prevenindo a incorporação desta base oxidada no DNA (FRIEDBERG et al., 2006; NEELEY et al., 2007). Em *E. coli*, a polimerase alfa pode parear 8-oxodGTP com adenina e citosina com a mesma eficiência (MAKI; SEKIGUCHI, 1992). A inativação de *mutT* leva a um aumento do pareamento de A/8-oxodGTP, que no próximo evento de replicação resultará no pareamento de T com a A. Portanto, o evento mais frequente são as transversões A·T → C·G. Estes são considerados mutadores fortes com aumento de até 10.000 vezes as taxas de mutação em *E. coli* (FOWLER et al., 2003; FOWLER; SCHAAPER, 1997; SCHAAPER; BOND; FOWLER, 1989).

*P. aeruginosa* possui um sistema GO semelhante ao descrito para *E. coli*, porém, a inativação de *mutT* em *P. putida* demonstra um sutil aumento na frequência de mutação espontânea, aproximadamente duas vezes, um fenótipo brando quando comparado a *E. coli* (OLIVER, 2002). Para tentar explicar essa perda da característica de mutador forte, tem sido observado, por anotações de genoma, que *P. putida* e *P. aeruginosa* possuem 12 homólogos de *mutT* que podem atuar na prevenção de danos, semelhantemente à MutT de *E. coli* (FRIEDBERG et al., 2006). Em *P. aeruginosa*, diferentemente de *E. coli*, foram identificados três diferentes tipos de transversões para mutantes em *mutM*: C·G→T·A, A·T→G·C e A·T→T·A. Em cepas mutantes em *mutY* foi observado, principalmente, a transversão G·C→T·A, condizentes com a função da glicosilase de remover a adenina pareada erroneamente com 8-oxodGTP. E, por fim, nas cepas mutantes em *mutT* foi observado unicamente a transição G·C→A·T. Isto é explicado pelo fato que os 12 homólogos de *mutT* podem prevenir as transversões A·T→C·G (SANDERS; SUDHAKARAN; SUTTON, 2009).

Em pacientes com FC, a inflamação crônica pulmonar é decorrente da liberação de proteases e radicais de oxigênio por neutrófilos (ALIPOUR et al., 2009; HMLL et al., 1997). Isto resulta em uma pressão seletiva capaz de selecionar linhagens mutadoras de *P. aeruginosa*, ou seja, com frequência de mutação (FM) aumentada. Estudos demonstraram que isolados hipermutadores possuem maior acúmulo de 8-oxodGTP, devido a mutações de perda de função em genes de reparo GO (CIOFU et al., 2005; FOWLER et al., 2003; MICHAELS et al., 1992). Porém, não apresenta um efeito tão exacerbado na FM, quando comparado com dados de *E. coli* (FOWLER et al., 2003). É importante notar que estes fenótipos hipermutadores tem maior probabilidade de proporcionar o surgimento de isolados resistentes aos antibióticos antipseudomonais, incluindo CAZ e CIP, por aumento de expressão de outros mecanismos de resistência também, como beta-lactamases e bombas de efluxo, respectivamente (HENRICHFREISE et al., 2007; OLIVER et al., 2004; PLASENCIA et al., 2007). Isolados clínicos de *P. aeruginosa* com mutações em genes do sistema GO e, conseqüentemente, fenótipo hipermutador já foram relatados em pacientes com FC (MANDSBERG et al., 2009; POOLE, 2008). Além disso, também foram encontradas linhagens mutadoras com deficiência em genes relacionado ao reparo de bases mal pareadas, que é responsável por corrigir erros de replicação (OLIVER et al., 2000).

Outro mecanismo que também pode estar envolvido no reparo de danos oxidativos é a via de reparo por excisão de bases (BER) (KROKAN; BJORÅS, 2013). Em *E. coli*, esta via desempenha um papel importante na remoção de danos oxidativos, como 8-oxoG, os quais podem causar uma leve distorção na molécula de DNA (DAVID; O'SHEA; KUNDU, 2007). O BER é iniciado por uma DNA glicosilase que reconhece a lesão e remove a base danificada, deixando um sítio abásico,apurínico/apirimidínico (AP). Posteriormente, estes sítios AP são reconhecidos e processados pelas AP endonucleases que cortam a extremidade 5' do esqueleto açúcar-fosfato, deixando a extremidade 3' livre para que a polimerase I e a ligase reparem a lesão. Em *E. coli*, uma das principais AP endonucleases é a exonuclease III codificada pelo gene *xthA*, que é importante para o reparo de lesões oxidativas (HÄRING et al., 1994; HORNBACK; ROOP; II, 2006; SHAFIROVICH et al., 2016).

Em *E. coli*, o sistema GO e BER são amplamente estudados e muito se conhece a desses sistemas em resposta aos antibióticos. Porém, em *P. aeruginosa*, torna-se necessário aprofundar mais no estudo destes mecanismos e como eles interferem na resposta de *P. aeruginosa* frente aos antimicrobianos.



**Figura 4** - Sistema GO. Conseqüências da incorporação e pareamento de 8-oxodGTP com C e A, e o papel dos genes *mutT* ou *mutY* e *mutM* para evitar transversoões A · T → C · G e G · C → T · A, respectivamente. O 8-oxoG é representado por um círculo G. Oxidação de G a 8-oxoG enquanto no DNA também ocorre, potencialmente levando a transversoão G · C → T · A (lado esquerdo). Fonte: Modificado de Fowler, 2003.

#### 1.4.2 Resposta SOS

É bem conhecido atualmente que o principal mecanismo de indução da resposta SOS é a formação de fita simples de DNA (ssDNA) (KELLEY, 2006; MICHEL, 2005). A formação de ssDNA pode se dar por problemas durante a replicação ou por agentes externos que causam danos, como: UV, radiação gamma, MMS, MMC, ROS e antimicrobianos (DWYER et al., 2007a; FUJII; ISOGAWA; FUCHS, 2006; JENA, 2012; POHLHAUS; KREUZER, 2005; WADHAWAN; GAUTAM; SHARMA, 2013).

A proteína RecA é recrutada a ssDNA pelos complexos RecBCD ou RecFOR. O RecBCD reconhece quebras e extremidades na dupla fita de DNA, e atua na formação de um substrato de ssDNA para RecA. RecFOR reconhece pequenos espaços e lacunas, e recruta RecA para este local de ssDNA. RecA se liga a ssDNA na forma de um nucleofilamento que catalisa a auto-proteólise do repressor LexA. LexA reprime os genes que pertencem ao regulon de SOS, através da ligação em sequência específica de LexA nos promotores dos genes (BAHAROGLU; MAZEL, 2014). A sequência consenso para a ligação de LexA varia

entre as bactérias, em *Beta* e *Gammaproteobacteria* é CTGTN<sub>8</sub>ACAG (ERILL et al., 2003), em *P. aeruginosa* a sequência consenso é CTGTATAAATATACAG (CIRZ et al., 2006) e em *E. coli*, TACTGTATATATATACAGTA (WADE et al., 2005).

O número e os tipos de genes regulados pela resposta SOS variam muito entre as bactérias. O regulon SOS de *E. coli* compreende em torno de 40 genes (COURCELLE et al., 2001). Em *Bacillus subtilis*, uma bactéria gram-positiva, o regulon SOS é composto por 33 genes, sendo somente oito homólogos aos de *E. coli* (AU et al., 2005). Em *P. aeruginosa*, o regulon SOS é limitado a 15 genes (CIRZ et al., 2006a).

As três principais vias de reparo ou tolerância aos danos regulados pela resposta SOS em *E. coli* são: recombinação homóloga (HR), reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e síntese translesão (TLS). Em *E. coli*, na HR, RecBCD e RecFOR recrutam RecA, as quais reconhecem a simples fita de DNA. A indução da HR pode levar a rearranjos cromossômicos através da recombinação entre sequências similares. A segunda via, NER, realiza o reparo em dupla fita de DNA por meio do complexo UvrABC. Este complexo reconhece a lesão e recruta a helicase UvrD para remover a sequência de DNA contendo a lesão que será reconstituída pela Polimerase I (KISKER; KUPER; VAN HOUTEN, 2013). A via de NER também é importante para o reparo de lesões oxidativas (SHAFIROVICH et al., 2016).

A TLS é realizada por diferentes DNA polimerases em *E. coli*: PolV (*umuCD*), PolIII (*polB*) e PolIV (*dinB*). Estas polimerases replicam o DNA danificado incorporando uma base aleatória frente à lesão, a qual a DNA polimerase replicativa (Pol III) não pode replicar. São consideradas polimerases propensas a erros, pois não possuem atividade revisora e são altamente mutagênicas. Por isso, a indução da TLS pode levar ao aumento da frequência de mutação como parte da resposta SOS (FIJALKOWSKA; SCHAAPER; JONCZYK, 2012; FRIEDBERG; WAGNER; RADMAN, 2002; NAPOLITANO et al., 2000; NOHMI et al., 1988; PAGÈS; FUCHS, 2003).

Mais especificamente em *P. aeruginosa*, a resposta SOS difere em partes da de *E. coli*, *B. subtilis* e outras Gamma-proteobactérias. Por exemplo, genes importantes para o reparo por excisão de nucleotídeos, como *uvrA* e *uvrB* escapam da regulação por LexA, bem como *ruvA* e *ruvB* importantes para recombinação (AU et al., 2005; CIRZ et al., 2006a; COURCELLE et al., 2001). Além disso, foi demonstrado por Cirz e colaboradores que homólogos de *dinB* de *E. coli*, em *P. aeruginosa*, são induzidos por agentes genotóxicos, como CIP, e participam da TLS, porém de maneira independente de LexA, estando em concordância com o observado em outras bactérias, mostrando que a regulação de *dinB* por LexA é mais uma exceção do que uma regra (BROOKS; MOVAHEDZADEH; DAVIS, 2001; CIRZ et al., 2006b; TEGOVA et

al., 2004). Também em *E. coli*, foi descrito que *polB* é regulado por LexA e foi induzido com CIP ao contrário de *polB* de *P. aeruginosa* onde não foi observado indução pelo mesmo antimicrobiano (ERILL et al., 2003).

*P. aeruginosa*, assim como várias espécies de bactérias, não possui homólogos de *umuDC*. Em contrapartida, possuem um operon regulado por LexA contendo *imuA*, *imuB* e *dnaE2*, que estão envolvidos em síntese translesão (GALHARDO et al., 2005). Este operon possui papel importante na mutagênese induzida por UV e MMC em *Caulobacter crescentus* e *Mycobacterium tuberculosis* e na mutagênese induzida por UV em *P. aeruginosa* (BOSHOF et al., 2003; CIRZ et al., 2006b; GALHARDO et al., 2005; SANDERS et al., 2006a). Porém, não se conhece o envolvimento desta polimerase codificada pelo operon *imuAB/dnaE2*, na mutagênese induzida por CIP, o que torna interessante tal investigação.

Um estudo recente feito por Jatsenko e colaboradores, revelou o possível papel de DnaE2 (ImuC) e DinB na TLS de bases metiladas e sítios abásicos induzidos por MMS e a consequente mutagênese, em *P. aeruginosa* e *P. putida*. Foi observada a importância de ImuC na proteção contra a citotoxicidade induzida por MMS em *P. aeruginosa*, porém atuando como uma polimerase secundária a DinB, devido maior precisão na replicação de DinB comparada a ImuC. Além disso, foi observado que a integridade dos três produtos do operon *imuAB/dnaE2* (*imuABC*) em *Pseudomonas* sp., da mesma maneira que em *C. crescentus* e *M. tuberculosis* (GALHARDO et al., 2005; WARNER et al., 2010) são essenciais para o apropriado funcionamento do sistema (JATSENKO et al., 2017).

É bem conhecido que os antimicrobianos aumentam a mutagênese em *E. coli* via indução de polimerases propensas a erros (PEREZ-CAPILLA et al., 2005). Seja por danos diretos no DNA, como os causados por CIP ou indiretos, associados à produção de ROS pelos  $\beta$ -lactâmicos, os antimicrobianos são considerados agentes promotores de mutagênese em bactérias, via ativação da resposta SOS. CIP, como já reportado, é um forte indutor da resposta SOS, mesmo em concentrações sub-CIM (THI et al., 2011; YSERN et al., 1990). Para *P. aeruginosa* foi demonstrado a indução desta resposta SOS e mutagênese associada à exposição aos  $\beta$ -lactâmicos e a ciprofloxacina (BLÁZQUEZ et al., 2006; GUTIERREZ et al., 2013).

Em *E. coli*, as polimerases propensas a erros PolII (codificada por *polB*), PolIV (*dinB*) e PolV (*umuC*) são bem caracterizadas quanto o seu envolvimento na mutagênese frente a uma gama de antimicrobianos, inclusive aquela mediada por CIP (CIRZ et al., 2006; NAPOLITANO et al., 2000; POWER; PHILLIPS, 1992). *P. aeruginosa*, por sua vez, possui genes homólogos aos genes *polB* e *dinB* de *E. coli* que codificam essas polimerases propensas

a erros, porém pouco se sabe sobre o envolvimento dessas polimerases na mutagênese induzidas CIP em *P. aeruginosa*. Em particular, o papel do operon *imuAB/dnaE2*, presente em *P. aeruginosa* e outras bactérias, mas ausente em *E. coli*, ainda não foi estudado no que diz respeito à mutagênese induzida por antibióticos. Neste caso, torna-se interessante avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na mutagênese mediado por CIP e compreender o papel das diferentes polimerases de *P. aeruginosa*.



## 2 OBJETIVOS

Este trabalho propõe avaliar o papel dos mecanismos de reparo de DNA e síntese translesão em resposta à diferentes antimicrobianos, em especial Ciprofloxacina e Ceftazidima, em *Pseudomonas aeruginosa*. Para isso, foram utilizadas as seguintes abordagens:

- Determinar a participação de mecanismos de reparo de DNA, em especial daqueles envolvidos em reparo de lesões oxidativas, na resistência intrínseca às principais drogas de escolha para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*. Para este fim, determinamos a sensibilidade das cepas selvagem e mutantes nos genes *uvrA*, *xthA*, *mutM*, *mutT* e *mutY* a estes antibióticos.
- Avaliar o papel das diferentes polimerases de *P. aeruginosa* na mutagênese induzida por CAZ e CIP. Para tal, a linhagem selvagem PA14 e cepas mutantes nos genes *dinB*, *polB* e *dnaE2* e um mutante com deleção limpa no operon *imuAB/dnaE2*, foram avaliadas quanto à mutagênese induzida por CIP e CAZ.
- Avaliar o papel das diferentes polimerases de *P. aeruginosa* na mutagênese induzida por estresse oxidativo. A cepa selvagem e cepas mutantes nos genes *dinB*, *polB* e *dnaE2* e mutante no operon *imuAB/dnaE2*, foram avaliadas quanto à mutagênese induzida por peróxido de hidrogênio.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento

As cepas utilizadas neste trabalho estão descritas nas Tabelas 1 e 2. Utilizamos a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, bem como as cepas mutantes provenientes da PA14 Transposon Insertion Mutant library (<http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgibin/pa14/home.cgi>). A linhagem PA14, bem como as linhagens provenientes da biblioteca foram gentilmente cedidas pelos Professores Jesús Blazquez, do Centro Nacional de Biotecnologia e Dr<sup>a</sup>. Regina Baldini, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

As cepas foram estocadas na coleção do Laboratório de Genética Molecular Bacteriana (ICB II - USP) em caldo Luria Bertani adicionado de 20% de glicerol (Merck, Darmstadt, Germany), e armazenadas em freezer a -80 °C.

As linhagens de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram cultivadas a 37 °C com agitação de 200 rpm. Foram utilizados os meios Luria Bertani – LB (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,5 - Difco Laboratories, Sparks, Md, USA) e Mueller-Hinton - MH (Difco Laboratories, Sparks, Md, USA). Quando necessário foram acrescentados antimicrobianos ao meio, sendo descritos na Tabela 3.

**Tabela 1- Cepas de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho**

Cepas	Genótipo relevante	Origem
DH5 $\alpha$	<i>supE44 lacU169 (80 lacZ M15) hsdR 17 recA 1 endA 11 gyrA 96 thi-1 relA1.</i>	Invitrogen
S-17	294::RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7).	Simon; Priefer; Puhler (1983)

**Tabela 2 – Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas neste trabalho**

Cepas	Genótipo relevante	Origem
UCBPP-PA14	Cepa parental	(Rahme et al., 1995)
RSG35	PA14 <i>dinB</i> ::MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	(Liberati et al., 2006)
RSG37	PA14 <i>dnaE2</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	(Liberati et al., 2006)

Continua

**Tabela 2 – Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas neste trabalho**

Continuação

<b>RSG37</b>	PA14 <i>polB</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	(Liberati et al., 2006)
<b>RSG36</b>	PA14 <i>mutM</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	(Liberati et al., 2006)
<b>RSG39</b>	PA14 <i>mutT</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	(Liberati et al., 2006)
<b>RSG40</b>	PA14 <i>mutY</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	(Liberati et al., 2006)
<b>RSG41</b>	PA14 <i>uvrA</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	(Liberati et al., 2006)
<b>RSG42</b>	PA14 <i>xthA</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	(Liberati et al., 2006)
<b>RSG287</b>	PA14 <i>ΔimuAB/dnaE2</i>	Este trabalho
<b>RSG286</b>	PA14 <i>ΔimuA</i>	Este trabalho
<b>PA14 <i>recA-lux</i></b>	PA14 <i>PrecA::luxCDABE</i>	Coleção do laboratório
<b>PA14 <i>lexA-lux</i></b>	PA14 <i>PlexA::luxCDABE</i>	Coleção do laboratório
<b>PAO1 <i>recA-lux</i></b>	PAO1 <i>PrecA::luxCDABE</i>	Coleção do laboratório
<b>PAO1 <i>lexA-lux</i></b>	PAO1 <i>PlexA::luxCDABE</i>	Coleção do laboratório

### 3.2 Agentes antimicrobianos

**Tabela 3 - Antimicrobianos utilizados neste trabalho**

Continua

Antibióticos	Concentração estoque	Concentração utilizada
ÁCIDO NALIDÍXICO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)	10 mg/mL	30 µg/mL
AMPICILINA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) – AMP	10 mg/mL	10 µg/mL
AMICACINA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) - AMI	10 mg/mL	8 µg/mL
CARBENICILINA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) - CARB	50 mg/mL	300 µg/mL
CIPROFLOXACINA (Bayer)	2 mg/mL	0,03 µg/mL
CEFTAZIDIMA (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)	2 mg/mL	4 µg/mL
COLISTINA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) - COL	2 mg/mL	4 µg/mL

Continuação

GENTAMICINA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) - GEN	30 mg/mL	30 µg/mL
FOSFOMICINA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) - FOS	50 mg/mL	128 µg/mL
ESTREPTOMICINA (Calbiochem-novabiochem - Califórnia - USA) - ESTP	50 mg/mL	400 µg/mL
MEROPENEM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) - MER	10 mg/mL	8 µg/mL

### 3.3 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste trabalho para as clonagens estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4 - Plasmídeos utilizados neste trabalho**

Plasmídeo	Descrição	Fonte/Referência
<b>pEX18Ap</b>	Amp <sup>r</sup> ou Carb <sup>r</sup> ; vetor de clonagem	(Hoang et al., 1998)
<b>pimuAB/dnaE2del</b>	Segmento para deleção em fase do operon <i>imuAB/dnaE2</i> .	Este trabalho
<b>pimuA<sub>del</sub></b>	Segmento para deleção em fase do gene <i>imuA</i>	Este trabalho

### 3.4 Oligonucleotídeos

Todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho para as clonagens do operon *imuAB/dnaE2*, do gene *imuA* e a amplificação do plasmídeo inteiro, pEX18Ap, para a realização da técnica de SLIC (descrita posteriormente), estão listados na tabela 5. Foram desenhados com o auxílio do software Primer 3 e sintetizados pela empresa Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

**Tabela 5 – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho**

Gene	Identificação do oligonucleotídeo	Sequência (5' → 3')	Hibridação °C
<i>imuA</i>	ImuA_1-2_fwd	<u>cctgcaggtcgactctagaggtcctggccggcgcgca</u>	72.0
	ImuA_1-2_rev	<u>ggccgcctcacacggcggactggcctttccag</u>	72.0
	ImuA_3-4_fwd	<u>gtccgccgtgtgagggccatgctctggg</u>	72.0
	ImuA_3-4_rev	<u>attcgagctcggtagccggggcggcctccaggcgac</u>	72.0
<i>imuAB/dnaE2</i>	ImuOp_1-2_fwd	<u>cctgcaggtcgactctagaggtcctggccggcgcgca</u>	72.0
	ImuOp_1-2_rev	<u>ctttgtctcacacggcggactggcctttccag</u>	72.0
	ImuOp_3-4_fwd	<u>gtccgccgtgtgagacaagaagggcagctcgag</u>	70.5
	ImuOp_3-4_rev	<u>attcgagctcggtagccgggtcctgggctgaagccgg</u>	70.5
<i>pex18Ap</i>	<u>pex18_fwd</u>	cccgggtaccgagctcgaat	70.5
	<u>pex18_rev</u>	ctctagagtcgacctgcaggc	70.5
<i>glpT</i>	glpT-P14-F1	agcggagctcgcgatgttc	55
	glpT-P14-R1	tcagccggcttgctcgg	55

### 3.5 Preparo das bactérias quimiocompetentes

Para tornar as células DH5 $\alpha$  e S17-1 de *E. coli* quimiocompetentes, utilizamos a técnica descrita por Hanahan (1993). Uma colônia isolada da bactéria obtida de uma placa recente de LB ágar foi inoculada em 2 ml de meio LB e mantida sob agitação constante a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Deste pré-inóculo, foi realizada uma diluição 1:100 em 100 mL de LB, que foi mantida a 37 °C sob agitação por cerca de 3 horas até atingir uma DO<sub>600</sub> entre 0,5 e 0,6. O frasco contendo a cultura foi transferido para um recipiente com gelo e foi acrescentado 0,5 mL de MgCl<sub>2</sub> 1 M. As culturas foram transferidas para tubos de polipropileno previamente resfriados e mantidas em repouso por 15 minutos. Em seguida, as células foram precipitadas por centrifugação durante 12 minutos, a 4 °C e 3000 x g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano foi gentilmente ressuspensionado em 10 ml de solução RF I (100 mM KCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 30 mM de acetato de potássio; 10 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 15% glicerol; pH 5,8), e mantido em gelo por 15 minutos. O inóculo foi novamente centrifugado a 3000 x g por 12 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensionadas em 2 ml de solução RF II (10 mM Na-MOPS; 10 mM KCl; 75

mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 15% glicerol; pH 6,8). Alíquotas de 100 µL da suspensão bacteriana foram distribuídas em microtubos e estocadas a -80°C (HANAHAN, 1983).

### **3.6 Transformação de células competentes por choque térmico e seleção dos mutantes**

Primeiramente as células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes mantidas a -80 °C foram descongeladas em gelo por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 µL do DNA de interesse em 50 µL de *E. coli* DH5α quimiocompetentes. Esta suspensão foi mantida em gelo por 40 minutos. Após isso, foi realizado o choque térmico nas seguintes condições: 45 segundos a 42 °C e 2 minutos em gelo. Imediatamente a bactéria foi recuperada em 1 mL de meio LB e incubada a 37 °C por uma hora.

Após a incubação, a bactéria foi centrifugada por 1 minuto a 4000 x g e ressuspendida em 100 µL de LB líquido. Alíquotas de 50 µL foram plaqueadas em duas placas de meio LB sólido contendo Ampicilina e X-gal. As placas foram incubadas a 37°C por 12 horas.

### **3.7 Técnicas de Biologia Molecular**

#### *3.7.1 Extração de DNA genômico de PA14*

A extração de DNA genômico de PA14 foi feita da seguinte maneira: Crescimento da bactéria em cultura líquida de 3 mL por 16 horas. Centrifugação 1.5 mL dessa cultura a 12000 x g por 2 minutos. Descarte do sobrenadante e adição de 400 µL de Tampão de Lise (40mM Tris-Acetato pH 7,8; 20 mM NaOAc; 1mM EDTA; 1% SDS) ao sedimento e ressuspendimento por pipetagem. Adição de 132 µL de 5 M NaCl (etapa crítica, ao adicionar o NaCl, homogeneizar o melhor possível). Centrifugação 10-20 min, 4 °C, 12000 x g. Recuperação do sobrenadante e adição de 500 µL de clorofórmio. Inversão dos tubos até ficarem leitosos, centrifugação por 3 minutos, 12000 x g, 4 °C ou a temperatura ambiente. Recuperação da fase aquosa (parte superior), sem pegar a interface. Adição de 1 mL de etanol 100% gelado. Centrifugação por 15 minutos, 12000 x g, 4 °C. Descarte do sobrenadante. Lavagem do pellet 2 vezes com 1 mL de etanol 70%, centrifugando cada vez por 5 minutos a 4 °C. Secagem do sedimento no Speed Vac e ressuspendimento em 50-100 µL de TE + 20 µg/mL RNase.

### 3.7.2 Extração de DNA plasmidial

Para extração de DNA plasmidial de interesse em pequena escala, foi utilizado o Kit da “Wizard® Plus SV Minipreps” (Promega) conforme instruções do fabricante.

### 3.7.3 Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de DNA cromossomal e plasmidial extraídos e amplicons foram verificados em gel de agarose 0,8% em tampão de corrida TBE 0,5 X (89 mM Tris base, 89 mM Ácido bórico, 0,5 M EDTA) e utilizando-se 1 kb Plus DNA ladder (Life Technologies) como marcador de peso molecular. A condição padrão da eletroforese foi de 100 Volts por 30 minutos. O gel, após eletroforese, foi submetido a uma solução contendo Brometo de Etídeo (0,5 µg/mL) para identificação das bandas de DNA amplificadas pela PCR, sob luz UV.

### 3.7.4 Técnica de SLIC- Cloning (Clonagem independente de ligação e sequenciamento)

Esta técnica de clonagem é baseado na atividade exonuclease 3' → 5' da T4 DNA polimerase. Esta enzima retira nucleotídeos das extremidades dos fragmentos e vetor de interesse, deixando-os complementares. Por isso, é dispensada a etapa de ligação (JEONG et al., 2012).

Utilizamos esta técnica para clonar as regiões flanqueadoras do gene *imuA* e do operon *imuAB/dnaE2*, no vetor pEX18Ap, para posterior deleção em fase dos mesmos. Primeiramente, o vetor de clonagem precisa ser linearizado por restrição enzimática ou PCR. Neste trabalho, foi utilizado o pEX18Ap como vetor de clonagem e o mesmo foi linearizado por PCR utilizando os oligonucleotídeos: pex18\_fwd e pex18\_rev (Tabela 5). As regiões flanqueadoras ao gene de interesse precisam ser amplificadas por PCR com oligonucleotídeos que contenham 15 pb homólogos às extremidades do vetor linearizado. Em seguida, o vetor linearizado e os insertos das regiões flanqueadoras são misturados e incubados a temperatura ambiente por 2 minutos e 30 segundos com a T4 DNA polimerase para que ocorra a retirada dos nucleotídeos das extremidades dos produtos, deixando as regiões 5' livres. Imediatamente, esta reação é colocada em gelo por 10 minutos para o anelamento das extremidades homólogas e posteriormente são transformadas em *E. coli* DH5α, como descrito na seção 3.6.

Neste trabalho, as amplificações das sequências franqueadoras dos genes e a linearização do plasmídeo foram feitas com a enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs – New England). As reações foram feitas para um volume final de 50 µL, sendo: 10 µL de 5 X Q5 Tampão de Reação; 10 µL de 5 X Q5 High GC Enhancer; 1 µL de uma mistura de dNTPs (0,2 mM) (Life Technologies Ltda, São Paulo, SP., Brasil); 2,5 µL de cada oligonucleotídeo utilizado (10 pmol); 0,5 µL da enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase; 1 µL de DNA genômico (200 – 500 µg) e água Milli-Q® estéril para completar o volume.

A condição padrão da PCR foi realizada em 98 °C por 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 50 – 72 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos. Após 35 ciclos a reação permaneceu a 72 °C por 2 minutos e foi mantida a 4 °C. Muitas das reações realizadas sofreram variações de tempo e temperatura de acordo com o par de primers utilizados, uma vez que as Tms (Temperatura média de fusão) dos mesmos devem ser levados em consideração para que a reação ocorra satisfatoriamente.

Após a amplificação dos fragmentos e do plasmídeo, os mesmos foram purificados por kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) conforme instruções do fabricante. E seguida, foram quantificados em Nanodrop e submetidos a reação do SLIC. Para esta reação foi utilizada a enzima T4 DNA Polimerase (BioLabs – New England) devido à sua atividade de exonuclease 3'→5'. A reação teve um volume final de 10 µL, sendo: 1 µL do Tampão 2.1 (BioLabs – New England); ; 1 µL de BSA 10X (Life Technologies) 0,03 pmol do vetor linearizado; 0,09 pmol de cada inserto; 0,2 µL de T4 DNA Polymerase (BioLabs – New England) e água Milli-Q® estéril para completar o volume.

Imediatamente após acrescentar a enzima a reação foi incubada, a temperatura ambiente, por exatos 2 minutos e 30 segundos. Dado o tempo, a reação foi incubada em gelo por 10 minutos. Em seguida, 100 µL de *E. coli* DH5α quimiocompetente foram acrescentados aos 10 µL da reação de SLIC e transformada conforme descrito na seção 3.6.

### **3.8 Conjugação de *Escherichia coli* S-17 com PA14**

O plasmídeo pEX18Ap<sup>R</sup> é replicativo em *E. coli* mas não em *Pseudomonas sp*, integrando-se no cromossomo por recombinação homóloga, tornando a célula resistente à carbenicilina. Além disso, apresenta o gene *sacB*, cujo produto metaboliza a sacarose a um produto tóxico para a célula, permitindo a seleção das colônias que integraram o plasmídeo (1º recombinação, resistência a carbenicilina) e depois o perdem (2º recombinação, resistência a sacarose e sensibilidade a carbenicilina).



Portanto, os plasmídeos pEX18Ap<sup>R</sup> com os insertos de interesse foram inseridos na cepa conjugativa de *E. coli* S17-1, e transferidos por conjugação para a linhagem parental *P. aeruginosa* PA14, sendo os transconjugantes selecionados em meio LB com carbenicilina. A inserção do plasmídeo pEX18Ap<sup>R</sup> no cromossomo de *P. aeruginosa* permitiu a seleção de colônias resistentes a carbenicilina e sensíveis a sacarose, indicando duas cópias do gene de interesse, uma completa e outra deletada/mutante.

As colônias resistentes à carbenicilina e sensíveis à sacarose foram crescidas a 37 °C por 16 horas em meio LB. Nesta etapa, não foi adicionada carbenicilina ao meio, permitindo o segundo evento de recombinação, que consiste na saída do vetor pEX18Ap<sup>R</sup> do cromossomo de *P. aeruginosa* carregando uma das cópias do gene de interesse. Após o crescimento das bactérias, as células foram diluídas e plaqueadas em meio LB ágar suplementado com 10% sacarose.

As colônias resistentes à sacarose foram repicadas e selecionadas em duas condições diferentes: (A) LB-ágar + 10% sacarose e (B) LB-ágar + carbenicilina + 10% sacarose

As colônias que cresceram somente no meio A e não no meio B indicam o segundo evento de recombinação, com a perda do vetor pEX18Ap<sup>R</sup>. Essas colônias foram analisadas por PCR a fim de confirmar a presença da cópia selvagem ou deletada/mutante no cromossomo. Para esta PCR de confirmação, foram utilizados os oligonucleotídeos ImuA\_1-2\_fwd e ImuA\_3-4\_rev para confirmar o mutante PA14  $\Delta$ imuA, e imuOp\_1-2\_fwd e imuOp\_3-4\_rev para confirmar o mutante PA14  $\Delta$ imuAB/dnaE2.

### 3.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi estimada para todas as linhagens de *P. aeruginosa*, pelo método de microdiluição com os antibióticos descritos na Tabela 2, de acordo com as recomendações do Clinical Laboratory Standards International (CLSI) (M100-S24). Para tanto, foi utilizado o meio de cultivo mais apropriado para antibiograma, Mueller-Hinton (Difco Laboratories, Sparks, Md, USA).

Os inóculos bacterianos foram preparados utilizando o mesmo procedimento em todos os casos. De uma cultura overnight foi feita uma suspensão bacteriana em salina 0,9% atingindo 0,5 McFarland ou DO<sub>600</sub>- 0,08-0,1 (1x10<sup>8</sup> UFC/mL). Esta suspensão foi diluída a fim de se obter 5 × 10<sup>6</sup> UFC/mL. Desta última suspensão foi dispensada 10 µl diretamente em placa contendo 100 µl de volume da solução do antibiótico desejado. As microplacas foram incubadas a 37°C por 16-20 horas. A CIM define a menor concentração do antibiótico onde

não há crescimento bacteriano visível. Os resultados foram interpretados de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2016).

### 3.10 Determinação da frequência de mutantes

A frequência de mutantes foi determinada pelo método de seleção baseado no aparecimento de mutantes resistentes à Fosfomicina (FOS) e Estreptomicina (ESTP), na cepa parental de PA14 e cepas mutantes. Na mutagênese Fos<sup>R</sup>, podem ser compreendidas mutações por inserções, deleções e substituições de bases nitrogenadas que levam a perda de função do gene *glpT*. Este gene codifica uma permease de Glicerol-3-Fosfato, a qual é a única proteína responsável pela entrada da FOS em *P. aeruginosa*. Logo, qualquer tipo de mutação em *glpT* conduz a resistência a FOS (CASTAÑEDA-GARCIA et al, 2009).

Por outro lado, a ESTP seleciona mutantes com alterações na proteína 30S ribossomal. Esta alteração no sítio-alvo da ESTP é decorrente de substituições de nitrogenadas no gene *rpsL*. Esta transversão codifica uma proteína ribossômica resistente à ESTP e de baixo fitness, levando a uma síntese proteica e crescimento lentos (COUCE et al, 2013).

Para isso, uma colônia de cada linhagem foi inoculada em 5 mL de meio LB caldo, em erlenmayer de 50 mL, sendo incubados a 37 °C, overnight a 200 rpm. Desta cultura, foi retirada uma alíquota para ser diluída a 1:1.000 com volume final de 50 mL de meio LB caldo, em erlenmayer de 500 mL, que foi incubada a 37 °C, 200 rpm, até DO<sub>600</sub>= 0,25. Em seguida, essa cultura foi dividida em 10 alíquotas de 5 mL em erlenmayer de 50 mL, sendo cinco para o controle não tratado e cinco tratados. Neste estágio, foi colocado o antibiótico (CIP ou CAZ) em cinco culturas para avaliar a frequência de mutação induzida, e as outras cinco foram mantidas sem antibiótico, para estimar a frequência de mutantes espontâneos. A quantidade de antibiótico utilizada corresponde a 0.5 X CIM de CIP e 2 X CIM de CAZ. Esses frascos foram incubados a 37 °C por 4 horas a 200 rpm. Depois desse tempo de incubação, as amostras foram colocadas em tubos de 50 mL, centrifugadas, e foi retirado o meio LB. O sedimento bacteriano foi ressuscitado em meio LB em mesmo volume final, 5 mL, e as culturas incubadas overnight a 37 °C com agitação de 200 rpm. As amostras foram então submetidas a diluições seriadas e plaqueadas em LB sólido sem antibióticos para estimar o número de células viáveis, e em LB contendo FOS (128 µg/mL) e ESTP (400 µg/mL) e incubadas a 37 °C. Posteriormente, as unidades formadoras de colônias foram contadas para determinação das frequências de mutantes (mutantes/células viáveis). As

frequências de cada linhagem foram comparadas com culturas sem nenhum tratamento e com a cepa selvagem (BLÁZQUEZ et al., 2006).

### 3.11 Análise da indução da resposta SOS pela exposição aos antimicrobianos

Para avaliar a indução dos promotores *PlexA* e *PrecA* de PA14 e PAO1, nós utilizamos as linhagens, previamente construídas em nosso laboratório, que contém o repórter *luxCDABE* fusionado em cada um dos promotores. Nesse sentido, a atividade de luciferase serviu como repórter para a expressão do SOS.

#### 3.11.1 Medida de luminescência

O ensaio quantitativo de medida de luminescência foi realizado para avaliar se as construções com o gene repórter *luxCDABE* estavam funcionais. Para isto, em uma placa contendo meio LB sólido, semeamos 100  $\mu$ L de um inóculo bacteriano ajustado à  $DO_{600} = 0,08$  que foi espalhado com o auxílio de hastes de algodão estéril. Então, à esta placa contendo a suspensão bacteriana semeada, foi colocado um disco de Ciprofloxacina (5  $\mu$ g) e Ceftazidima (30  $\mu$ g). Neste teste, foram submetidos as linhagens PAO1 *PlexA::luxCDABE*, PAO1 *PrecA::luxCDABE*, PA14 *PlexA::luxCDABE* e PA14 *PrecA::luxCDABE*.

O ensaio de medida de luminescência foi realizado em meio BHI e LB. Para fim de melhorar as condições de aeração, os ensaios foram realizados todos em erlenmeyers. Para todas as linhagens, o procedimento experimental foi o mesmo, e cada condição foi avaliada com 3 réplicas técnicas. Uma cultura saturada com volume final de 5 mL, foi diluída 1:200 em volume final de 100 mL. Esta suspensão foi incubada a 37°C, 250 rpm, até  $DO_{600} = 0,1$ . Neste estágio, 5 mL da suspensão foi colocada em erlenmayer de 50 mL e as quantidades adequadas de antibióticos foram introduzidas. As culturas foram incubadas a 37°C, a 200 rpm. Nos tempos determinados, 200  $\mu$ L eram retirados para uma placa preta de 96 poços com fundo transparente, para medida da atividade da luciferase e  $DO_{600}$ , utilizando Tecan's Infinite® F200 multimode microplate reader. A razão luminescência/  $DO_{600}$  foi utilizada como medida da atividade dos diferentes promotores.

### 3.12 Mutagênese induzida ROS em *P. aeruginosa*

Com a finalidade de caracterizar o papel das polimerases TLS em *P. aeruginosa*, a linhagem parental de PA14 e os mutantes em *dnaE2*, *imuAB/dnaE2* e *polB* foram avaliados quanto a mutagênese induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Todos os ensaios foram realizados em triplicata biológica com cinco réplicas técnicas para cada condição, controle e tratado.

De um inóculo ON, foi diluído a DO<sub>600</sub> = 0,1 em volume final de 10 mL de meio LB líquido. Este inóculo foi então incubado a 37 °C, 200 rpm até DO<sub>600</sub> = 0,5. Em seguida, 1 mL desta cultura foi coletado por centrifugação, e o sedimento ressuspenso em salina estéril 0,9% e imediatamente tratadas com 25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich). As culturas foram incubadas a 37 °C, 200 rpm por 15 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5.000 rpm para retirar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e o sedimento bacteriano foi ressuspenso em meio LB. Os inóculos foram incubados ON, a 37 °C, 200 rpm para recuperação.

No dia seguinte, os inóculos foram submetidos a diluições seriadas e plaqueados em meio LB, para estimar os viáveis, e em meio LB contendo FOS [128 µg/mL] para contagem do número de mutantes FOS<sup>R</sup>. Posteriormente, as unidades formadoras de colônias foram contadas para determinação das frequências de mutantes (mutantes/células viáveis). As frequências de cada linhagem foram comparadas com culturas sem nenhum tratamento, e com a cepa selvagem.

### 3.13 Análise do espectro de mutações provocadas por CIP

Para avaliar que tipos de mutações FOS<sup>R</sup> são provocadas pelas polimerases quando induzidas por CIP, sequenciamos o gene *glpT* das linhagens PA14 selvagem e dos mutantes PA14 *dinB*:: MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>, PA14 *dnaE2*:: MAR2xT7 Gm<sup>R</sup> e PA14 *polB*:: MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>. Foi realizado o ensaio semelhante como descrito anteriormente para determinação da frequência de mutantes, sendo ambas as condições (espontânea e induzidas) plaqueadas em FOS. Uma colônia FOS<sup>R</sup> proveniente de cada réplica foi colocada em eppendorfs contendo 50 µL de água Milli-Q® estéril e o material genético extraído por fervura, a 95 °C durante 10 minutos.

As amplificações do *glpT* foram feitas com os primers *glpT*-P14-F1 (5'-AGCGGAGCTCGCGATGTTC-3') e *glpT*-P14-R1 (5'-TCAGCCGGCTTGCTGCGG-3') sendo os primers forward e reverse, respectivamente. A enzima Q5® High-Fidelity DNA

Polymerase (BioLabs – New England) foi utilizada para amplificar as sequências. As reações foram feitas para um volume final de 50  $\mu\text{L}$ , sendo: 10  $\mu\text{L}$  de 5 X Q5 Tampão de Reação; 10  $\mu\text{L}$  de 5 X Q5 High GC Enhancer; 1  $\mu\text{L}$  de uma mistura de dNTPs (0,2 mM) (Life Technologies Ltda, São Paulo, SP., Brasil); 2,5  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo utilizado (10 pmol); 0,5  $\mu\text{L}$  da enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase; 1  $\mu\text{L}$  de DNA e água Milli-Q® estéril para completar o volume. A condição padrão da PCR foi realizada em 98 °C por 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Após 35 ciclos a reação permaneceu a 72 °C por 2 minutos e foi mantida a 12°C.

Alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  da PCR foram, então, submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão de corrida TBE 0,5 X e utilizando-se 1 kb Plus DNA ladder (Life Technologies) como marcador de peso molecular. A condição padrão da eletroforese foi de 100 V por 30 minutos. O gel, após eletroforese, foi submetido a uma solução contendo Brometo de Etídeo para identificação das bandas de DNA sob luz UV.

Após a amplificação dos fragmentos e do plasmídeo, os mesmos foram purificados por kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) conforme instruções do fabricante. E seguida, foram quantificados em Nanodrop e separados em eppendorfs com seus respectivos primers e enviados para o serviço de sequenciamento realizado pela empresa STAB VIDA - Inv. e Serv. Ciências Biológicas, LTDA – Portugal.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Papel dos mecanismos de reparo na resistência de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos

A resistência intrínseca aos antimicrobianos é derivada de fatores variados e típicos de cada espécie, podendo estar envolvidos modificações na permeabilidade e em alvos da droga, entre outros fatores (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017). Dadas as evidências de que espécies reativas de oxigênio poderiam mediar a toxicidade de diferentes classes de antimicrobianos, decidimos testar se as principais vias de reparo de DNA envolvidas na proteção contra lesões oxidativas poderiam constituir fatores de resistência intrínseca às principais drogas anti-pseudomonas. Desta forma, determinamos a concentração inibitória mínima de diversos antimicrobianos para a linhagem parental PA14 e linhagens deficientes em genes de reparo de DNA (Tabela 4). Espera-se que, caso os mecanismos de reparo sejam fatores de resistência intrínseca, as linhagens mutantes se mostrem mais sensíveis aos antimicrobianos.

**Tabela 6** - Concentração Inibitória Mínima para todas as linhagens

Cepa	CIP	CAZ	AMI	COL	MER
CIM µg/mL					
UCBPP-PA14	0,125 (S)	4 (S)	0,75 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
PA14 <i>dinB</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	0,125 (S)	4 (S)	0,75 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
PA14 <i>dnaE2</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	0,25 (S)	4 (S)	0,75 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
PA14 <i>ΔimuABdnaE2</i>	0,25 (S)	4(S)	0,75 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
PA14 <i>polB</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	0,25 (S)	4 (S)	0,75 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
PA14 <i>mutM</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	0,125 (S)	4 (S)	0,75 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
PA14 <i>mutT</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	0,125 (S)	8 (S)	1 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)

PA14 <i>mutY</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	0,125 (S)	8 (S)	1 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
PA14 <i>uvrA</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	0,125 (S)	4 (S)	0,75 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
PA14 <i>xthA</i> :: MAR2xT7 Gm <sup>R</sup>	0,125 (S)	4 (S)	0,75 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
PA14 <i>PrecA</i> :: <i>luxCDABE</i>	0,125 (S)	4 (S)	NR	NR	NR
PA14 <i>PlexA</i> :: <i>luxCDABE</i>	0,125 (S)	4 (S)	NR	NR	NR
PAO1 <i>PrecA</i> :: <i>luxCDABE</i>	0,125 (S)	4 (S)	NR	NR	NR
PAO1 <i>PlexA</i> :: <i>luxCDABE</i>	0,125 (S)	4 (S)	NR	NR	NR

S (sensível); I (intermediário); R (resistente) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2016)

NR : CIM não realizada para estes antimicrobianos para estas cepas

Com o estresse oxidativo supostamente provocado pelos antibióticos, aliado à falta de genes que reparam danos relacionados a este tipo de estresse, esperava-se que as linhagens fossem mais sensíveis por sofrerem mais com a ação bactericida das drogas. Contudo, nossos resultados demonstram que nenhuma das linhagens deficientes em genes de reparo de DNA é mais sensível aos antimicrobianos testados. Estes dados apontam que as vias investigadas (NER, BER, sistema GO e síntese translesão) não constituem em fatores de resistência intrínseca. Indiretamente, sugerem que os danos oxidativos não constituem um mecanismo primordial da atividade bactericida das drogas testadas em *P. aeruginosa*.

Curiosamente, um aumento no perfil de resistência ocorre em alguns casos. Para CAZ e AMI, os mutantes em *mutT* e *mutY* demonstraram um aumento da CIM de 4 µg/mL para 8 µg/mL e 0,75 µg/mL para 1 µg/mL, respectivamente, comparados à cepa selvagem. Estes resultados podem estar relacionados ao fenótipo hipermutador dessas duas cepas, o qual que confere à bactéria vantagens adaptativas, e conseqüentemente, maior resistência à condição de estresse, como os antibióticos (FOWLER et al., 2003). Nestes casos, mutantes espontâneos com pequenos aumentos de CIM podem estar presentes no inóculo inicial, acarretando em valores de CIM ligeiramente elevados.

Páez e colaboradores reportaram que em alguns isolados clínicos a tolerância aos antibióticos estava relacionada à inativação da resposta a estresse oxidativo e nos genes de reparo. Entretanto, nossos dados indicam que os genes de reparo de DNA não atuam como mecanismo de resistência intrínseco em *P. aeruginosa*, pelo contrário, o fenótipo hipermutador, derivado da falta de alguns destes genes, podem levar esta bactéria a ser mais

tolerante aos antibióticos. (KANAFANI; MARTIN, 1985; PÁEZ; BECERRA; ALBESA, 2010). Também, tem sido descrito que linhagens com fenótipos hipermutadores possuem outros mecanismos de resistência expressos, como  $\beta$ -lactamases e bombas de efluxo, além das mutações no sítio-alvo (HENRICHFREISE et al., 2007; OLIVER et al., 2004; PLASENCIA et al., 2007). Entretanto, as ligeiras alterações entre as CIM não alteram a interpretação do antibiograma, sendo todas as linhagens mutantes consideradas sensíveis.

Com base nos resultados obtidos com a linhagem selvagem, e com as linhagens portadoras dos repórteres baseados em luciferase descritos na Tabela 4, também conseguimos determinar a concentração de antibiótico a ser utilizada nos experimentos de mutagênese com CIP (1/2 CIM) e de indução da resposta SOS com CIP e CAZ, descritos nas seções posteriores 4.3.

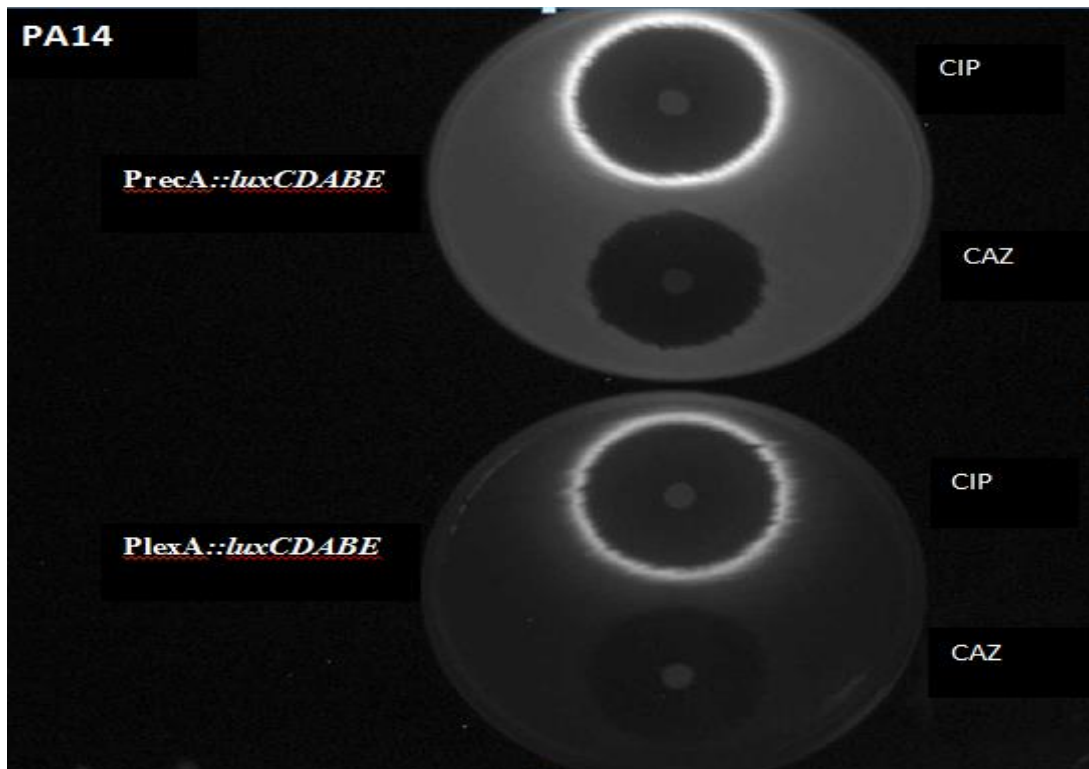
#### **4.2 Indução da Resposta SOS e mutagênese por $\beta$ -lactâmicos em *P. aeruginosa***

A ideia inicial para avaliar os  $\beta$ -lactâmicos como indutores da Resposta SOS em *P. aeruginosa*, surgiu após a observação de dados de microarray publicados por Blázquez e colaboradores, onde foi observado a expressão de diversos genes regulados pela resposta SOS em PAO1 após tratamento com CIP e CAZ (BLÁZQUEZ et al., 2006). Em *E. coli*, é descrito a indução desses genes por  $\beta$ -lactâmicos (MILLER et al., 2004) e a mutagênese relacionada com a formação de ROS por esses antibióticos (KOHANSKI; DEPRISTO; COLLINS, 2010). A formação de ROS contribui para a letalidade bacteriana, contudo por ser um agente altamente genotóxico, também pode contribuir para a indução da resposta SOS que é uma resposta mutagênica, ou ainda pela simples consequência mutagênica de lesões oxidativas no DNA, como a 8-oxoguanina (DWYER et al., 2007; KOHANSKI et al., 2007, 2008). Nesse sentido, seria interessante avaliar a indução de mutagênese em *P. aeruginosa*, uma vez que os  $\beta$ -lactâmicos, principalmente CAZ, são muito empregados no tratamento de infecções provocadas por esta bactéria, e que até então não havia sido descrito na literatura.

Primeiramente, buscamos confirmar as observações anteriores de que a exposição à CAZ poderia acarretar na indução da resposta SOS em *P. aeruginosa*. Previamente, construímos repórteres com os promotores de *recA* e *lexA* controlando os genes *luxCDABE*, inseridos em sítio único no cromossomo de *P. aeruginosa* (VALENCIA et al., 2017).

Utilizando a linhagem PA14, realizamos o ensaio qualitativo para avaliar a indução da resposta SOS por CIP (controle positivo) e CAZ. (Figura 5).

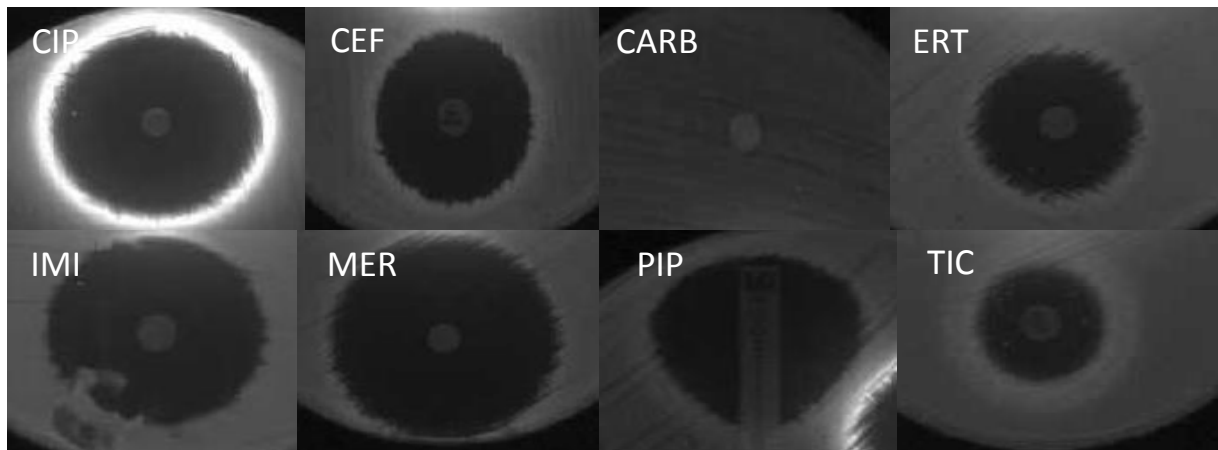




**Figura 5** - Análise qualitativa da indução da resposta SOS por Ciprofloxacina (CIP) e Ceftazidima (CAZ) em PA14. A indução da Resposta SOS é reportada aqui pela expressão de luminescência de um gene repórter (*luxCDABE*) na linhagem de PA14 carregando as fusões transcricionais *PlexA::luxCDABE* ou *PrecA::luxCDABE*. A luminescência pode ser observada como um halo claro em torno da zona de inibição de crescimento por CIP.

A luminescência na borda da zona de inibição indica que o *luxCDABE* está sendo expresso. Neste caso, houve a indução de ambas as fusões transcricionais, *PlexA::luxCDABE* e *PrecA::luxCDABE*, com CIP. Pode-se observar que a indução de *PrecA* é ainda mais elevada, portanto este repórter foi utilizado ao longo do restante de nosso trabalho. Todavia, não foi observada indução de luminescência com CAZ, em nenhum dos promotores.

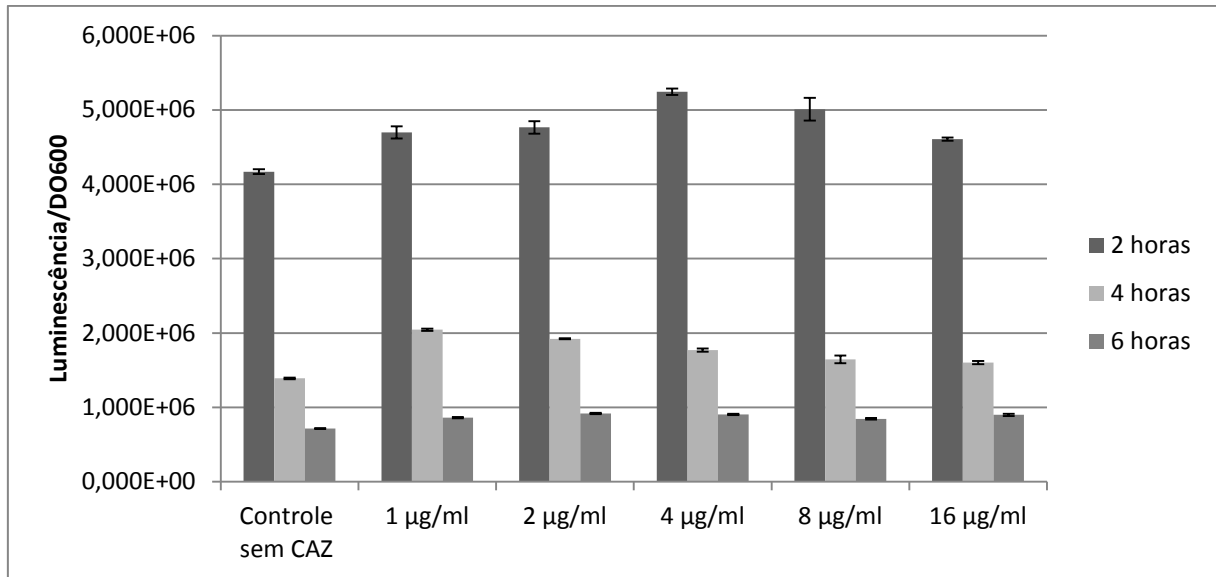
Então, passamos a avaliar a indução da resposta SOS em PA14 *PrecA::luxCDABE* com outros  $\beta$ -lactâmicos, dentre eles: Cefepime (CEF), Carbenicilina (CARB), Ertapenem (ERT), Imipenem (IMI), Meropenem (MER), Piperacilina (PIP) e Ticarcilina (TIC) (Figura 6). Assim como observado com CAZ, não houve indução significativa da resposta SOS por nenhum destes agentes.



**Figura 6** - Indução da Resposta SOS com diferentes  $\beta$ -lactâmicos na linhagem de PA14 carregando a fusão transcricional *PrecA::luxCDABE*.

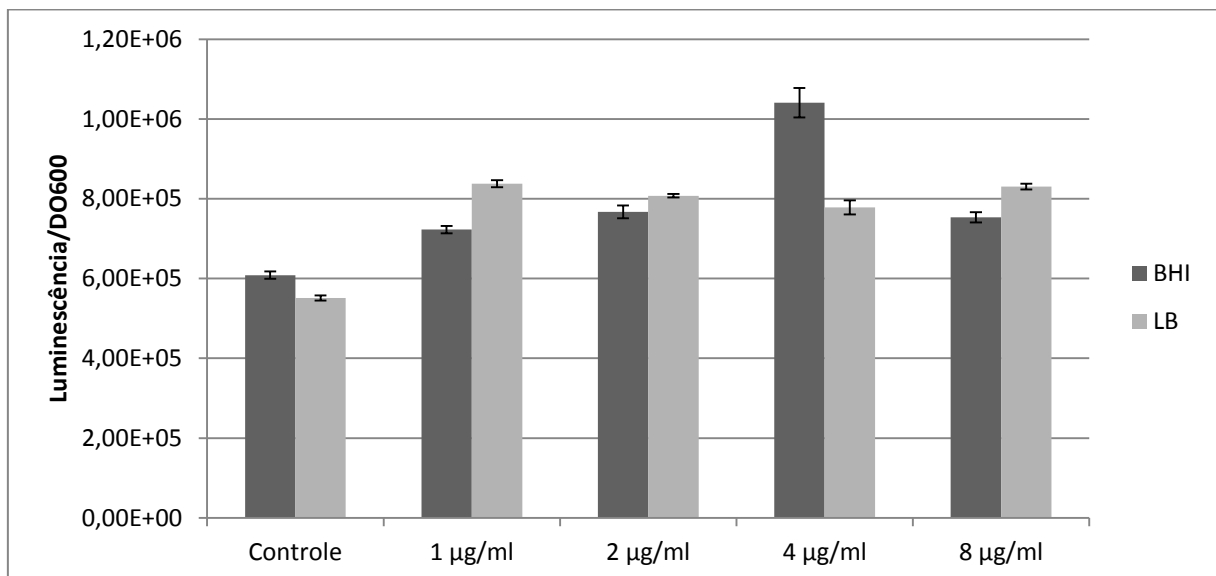
Com CIP, observa-se a luminescência na borda da zona de inibição indicando que *luxCDABE* está sendo expresso em PA14. Este resultado confirma que CIP é um forte indutor da resposta SOS, conforme já publicado, inclusive para *P. aeruginosa*. Contrariamente ao que esperávamos e ao reportado na literatura, CAZ e os outros  $\beta$ -lactâmicos não induziram a resposta SOS, apesar de ser bem descrito que os  $\beta$ -lactâmicos estão relacionados à formação de ROS e indução de respostas mutagênicas, como a SOS, em *E. coli* e *P. aeruginosa* PAO1 (BLÁZQUEZ et al., 2006, 2012; GUTIERREZ et al., 2013b; KOHANSKI et al., 2007; MMLLER; LIU; VAN REMMEN, 2004). Nossos experimentos qualitativos de medida de luminescência das fusões transcricionais com o gene repórter *luxCDABE* nos promotores *recA* e *lexA*, não demonstraram a indução da resposta SOS por CAZ e nem por outros  $\beta$ -lactâmicos em *P. aeruginosa* PA14.

Com o objetivo de confirmar estes resultados de ausência de indução da resposta SOS por CAZ, realizamos o ensaio de medida de luminescência, por ser um método mais sensível e quantitativo. Neste ensaio, a linhagem em estudo PA14 *PrecA::luxCDABE* foi exposta a diferentes concentrações de CIP e CAZ (Figura 7) e a luminescência foi medida após 2,4 e 6 horas de exposição aos antibióticos. Os resultados demonstram que não há indução de luminescência nas cepas tratadas com CAZ, uma vez que não há diferença entre as linhagens tratadas e não tratada.



**Figura 7** - Medida da luminescência em PA14 *PrecA::luxCDABE* sob diferentes concentrações de CAZ e tempos de exposição. As concentrações do antibiótico variam de  $\frac{1}{4}$  X MIC de CAZ a 8 X MIC de CAZ para PA14. Nesta figura, estão representadas as médias de cinco réplicas de cada condição em três ensaios independentes.

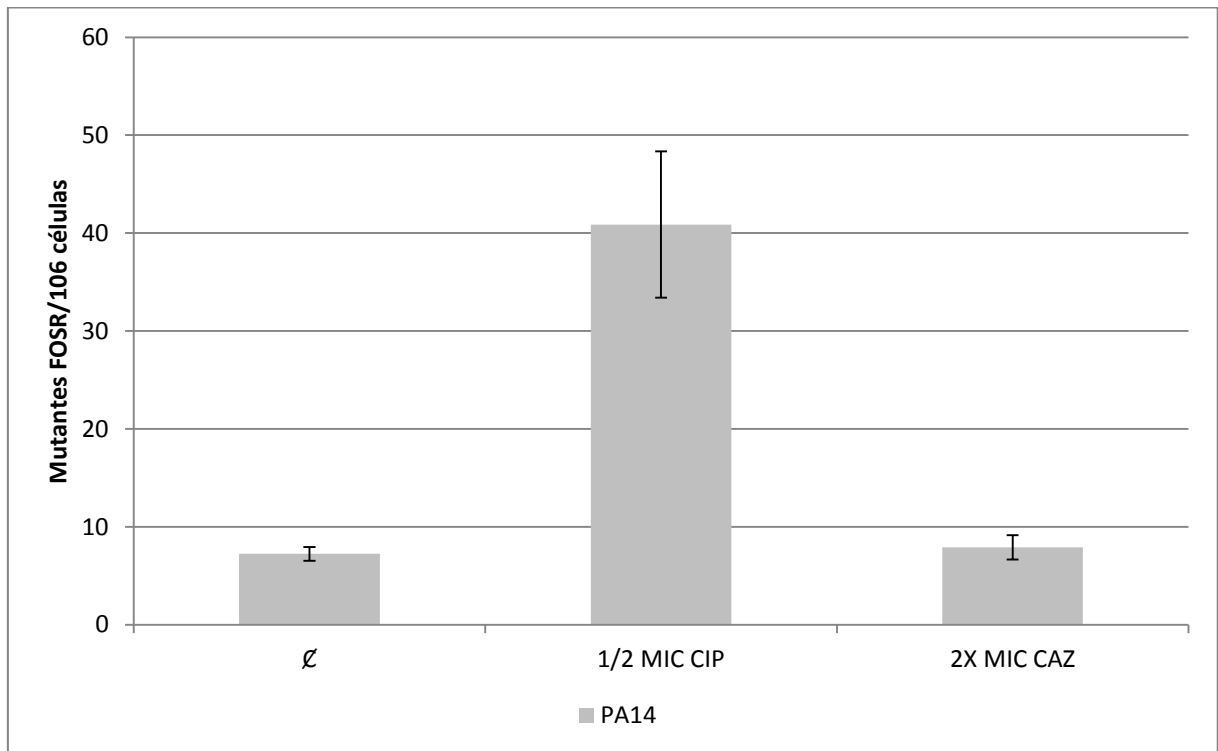
Para descartar a hipótese de interferência do meio de cultivo nos resultados obtidos, analisamos a indução da resposta SOS com a mesma linhagem, porém em meios LB e BHI (Figura 8). Novamente, não foi observada indução significativa (de 2 ou mais vezes) do promotor *PrecA* em PA14 por CAZ.



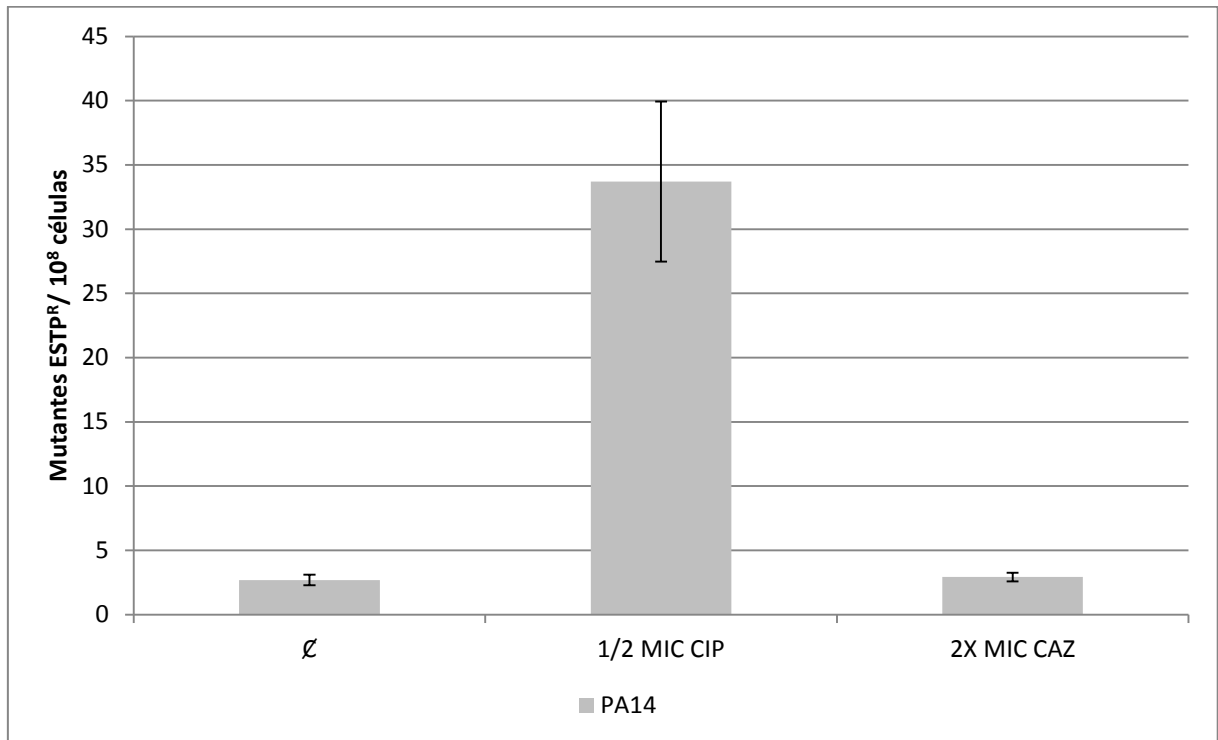
**Figura 8** - Medida da luminescência em PA14 *PrecA::luxCDABE*, sob diferentes concentrações de CAZ e meios de cultura. As concentrações do antibiótico variam de  $\frac{1}{4}$  X MIC de CAZ a 2 X MIC de CAZ para PA14, e a medida de luminescência foi realizada após 2 horas de exposição à CAZ em meios de cultura BHI e LB. Nesta figura, estão representadas as médias de cinco réplicas de cada condição.

Como uma forma alternativa de avaliar a indução da resposta SOS e de danos oxidativos no DNA por CAZ, realizamos uma análise da indução de mutagenese pela

exposição a estes dois agentes (Figuras 9 e 10). Para este fim, analisamos a frequência de mutantes usando dois marcadores distintos: resistência à FOS, resultante de mutações que inativam o gene *glpT* (CASTANEDA-GARCIA et al., 2009); e resistência à ESTP, resultantes de diferentes mutações de ponto em genes que codificam proteínas ribossomais (COUCE et al., 2013). Em concordância com os nossos resultados de indução da resposta SOS, nos ensaios de mutagênese realizados com 0,03 µg/mL CIP (1/2 X MIC) e 8 µg/mL de CAZ (2 X MIC) para PA14, não foi observado nenhum aumento de mutagênese para CAZ nos dois marcadores de mutagênese utilizados, Fosfomicina e Estreptomicina, sendo os valores de mutagênese induzida por CAZ semelhantes aos de mutagênese espontânea. Por outro lado, pode-se observar que CIP induz significativamente um aumento da frequência de mutantes, nos dois marcadores.



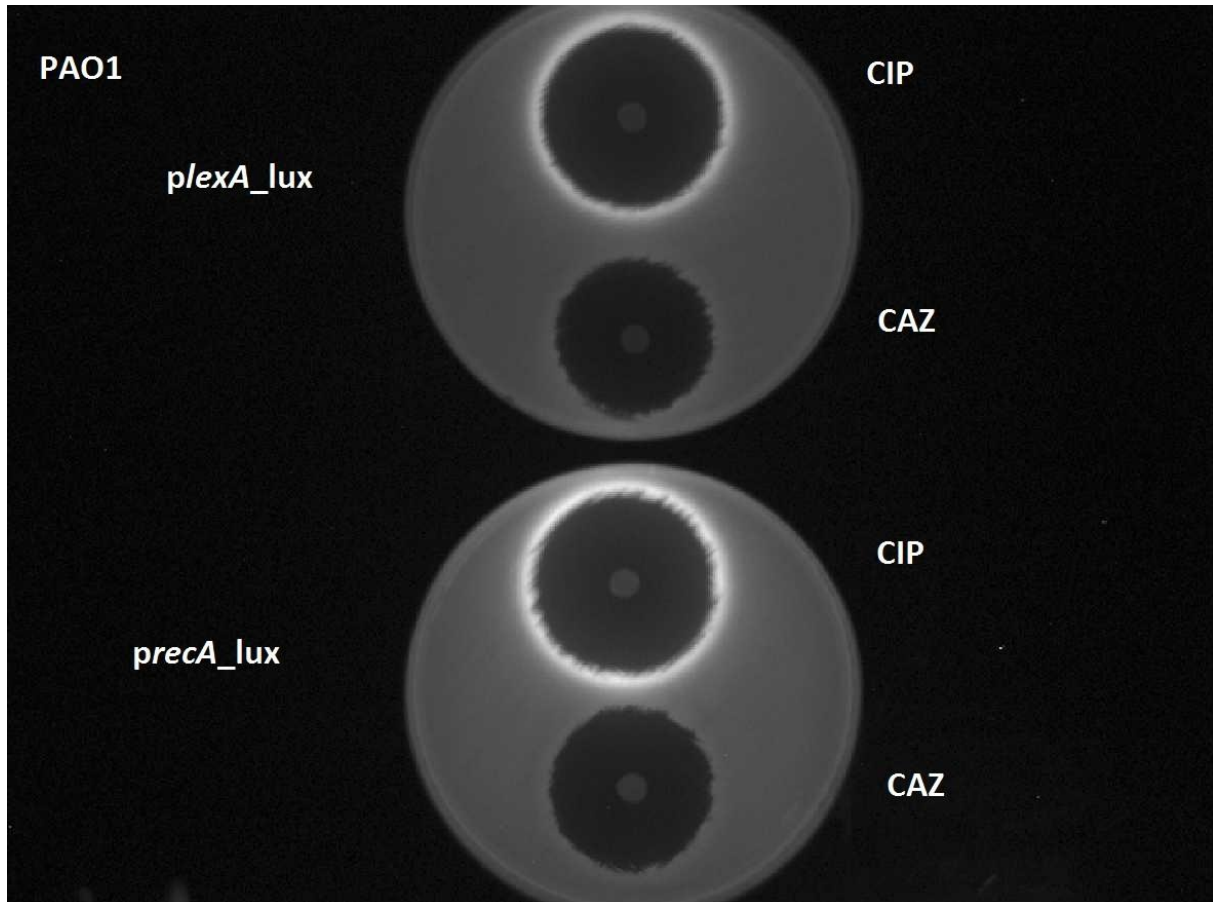
**Figura 9** - Frequências de mutantes FOS<sup>R</sup> induzidos por CAZ em PA14. A linhagem PA14 foi submetida ao tratamento com 0,5 X MIC de CIP (0,03 µg/mL), 2 X MIC de CAZ (8 µg/mL) e sem tratamento (℄) como controle. Nesta figura, estão representadas as médias de cinco réplicas de cada condição em seis ensaios independentes.



**Figura 10** - Frequências de mutantes ESTP<sup>R</sup> induzidos por CAZ em PA14. A linhagem PA14 foi submetida ao tratamento com 0,5 X MIC de CIP (0,03 µg/mL), 2 X MIC de CAZ (8 µ/mL) e sem tratamento (℄) para controle. Nesta figura, estão representadas as médias de cinco réplicas de cada condição em seis ensaios independentes.

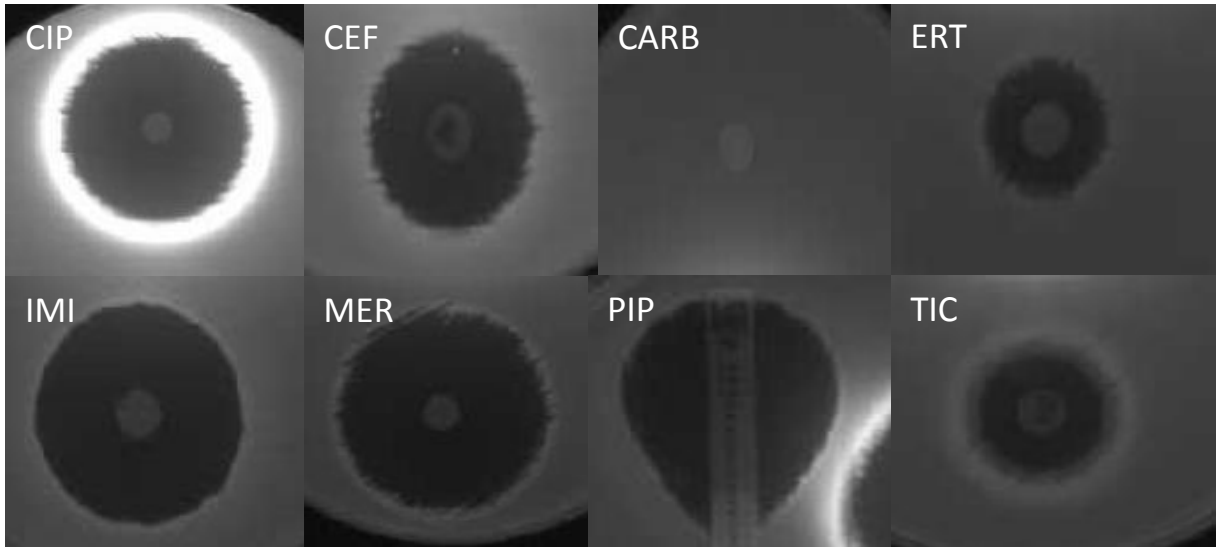
Diante desses resultados, e com o objetivo de esclarecer tal discrepância entre os nossos resultados e os reportados na literatura por Blazquéz e colaboradores, propusemos investigar estes dados no laboratório do Dr. Jesús Blazquéz com a linhagem que foi utilizada para a publicação, PAO1 com a fusão *PrecA::luxCDABE*, e utilizando CAZ de uso hospitalar para tentar aproximar ao máximo das condições originais que renderam os resultados anteriores.

Realizamos o ensaio qualitativo para avaliar se a indução da resposta SOS em PAO1 com os repórteres *PrecA::luxCDABE* e *PlexA::luxCDABE*, expondo as respectivas linhagens aos discos de CIP (controle positivo) e CAZ, como apresentado na Figura 11. Novamente, observamos que as construções estavam funcionais, pois induziram com CIP. Supreendentemente, não foi observado indução de nenhum dos repórteres por CAZ nesta linhagem.



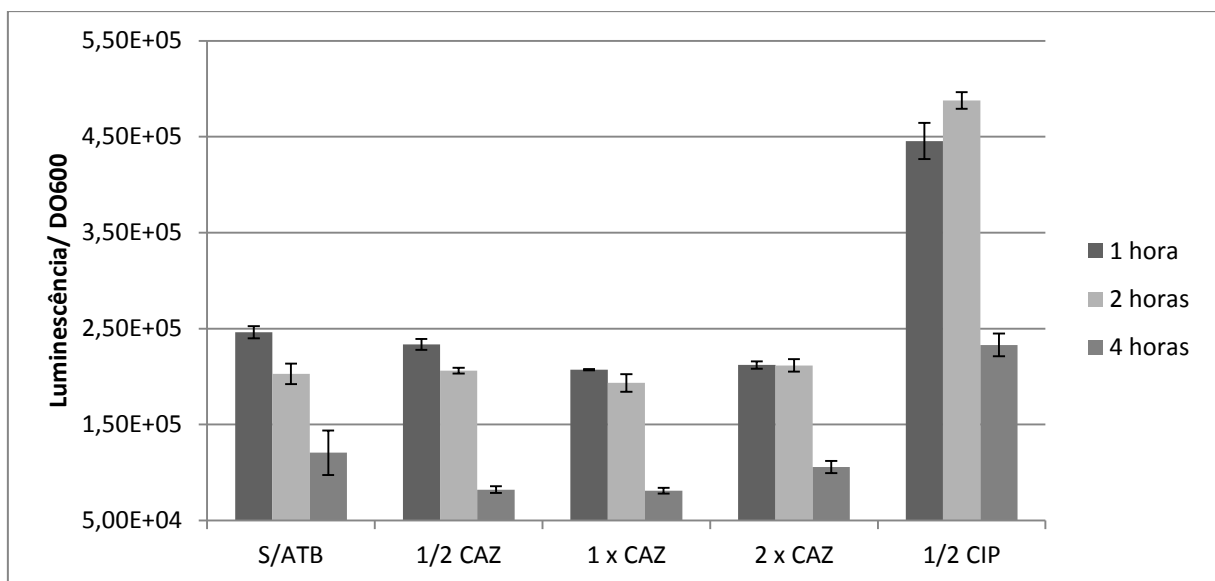
**Figura 11** - Análise qualitativa da indução da resposta SOS por Ciprofloxacina (CIP) e Ceftazidima (CAZ) em PAO1. A indução da Resposta SOS é reportada aqui pela expressão de luminescência de um gene repórter (*luxCDABE*) na linhagem de PAO1 carregando as fusões transcricionais *PlexA::luxCDABE* ou *PrecA::luxCDABE*. A luminescência pode ser observada como um halo claro em torno da zona de inibição de crescimento por CIP.

Também avaliamos a indução da resposta SOS em PAO1 *PrecA::luxCDABE* com outros  $\beta$ -lactâmicos dentre eles: Cefepime (CEF), Carbenicilina (CARB), Ertapenem (ERT), Imipenem (IMI), Meropenem (MER), Piperacilina (PIP) e Ticarcilina (TIC) (Figura 12). Como mostrado para a linhagem PA14, não foi observada indução da resposta SOS pelo método qualitativo por nenhum dos  $\beta$ -lactâmicos testados, incluindo CAZ.



**Figura 12** - Indução da Resposta SOS por diferentes  $\beta$ -lactâmicos na linhagem PAO1 carregando a fusão transcional *PrecA::luxCDABE*.

Ao repetimos os experimentos quantitativos de medida de luminescência com a linhagem PAO1 *PrecA::luxCDABE*, não observamos indução da luciferase. Passamos a alterar algumas condições como  $DO_{600}$  de indução, condições de cultivo para melhorar a aeração (tubos de vidro e erlemayers), e a incubação passou a ser feita em estufa 37 °C com agitação constante, uma vez que a aeração é uma condição muito importante quando se trata de avaliar estresse oxidativo. Em nenhuma das condições testadas foi observada indução da resposta SOS por exposição à CAZ.



**Figura 13** - Medida da indução de luminescência em PAO1 *PrecA::luxCDABE* por CAZ. A medida sem antibiótico (S/ATB) e com  $\frac{1}{2}$  X MIC de Ciprofloxacina (1/2 CIP) representam os controles negativos (nível de expressão basal) e positivo (bem caracterizado como agente indutor da resposta SOS), respectivamente. Três diferentes concentrações de Ceftazidima (CAZ) foram analisadas, correspondendo a 2  $\mu$ g/mL ( $\frac{1}{2}$  X MIC), 4

$\mu\text{g/mL}$  (1 X MIC) e 8  $\mu\text{g/mL}$  (2 X MIC). Nesta figura, estão representadas as médias de cinco réplicas de cada condição em três ensaios independentes.

Um ensaio representativo está mostrado na Figura 13. Neste ensaio, podemos observar que a construção é funcional uma vez que reporta indução com CIP, adotada como controle positivo. Já nas condições com CAZ, não foi observada indução de luminescência, sendo o nível de expressão semelhante ao basal (Sem antimicrobianos).

Com isso, descartamos a hipótese de que a ausência da indução da resposta SOS por CAZ se dê por diferenças entre as linhagens PA14 e PAO1. Desta forma, em nossas condições experimentais, não há ativação da resposta SOS e mutagênese induzidos por CAZ em *P. aeruginosa*, contrariando dados anteriormente publicados (BLÁZQUEZ et al., 2006). Portanto, apesar de ser descrito que os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ativam respostas que podem levar ao aumento de mutagênese em outras bactérias, em *P. aeruginosa*, esta classe de antibióticos parece não exercer semelhante efeito, tanto na indução da resposta SOS, quanto na mutagênese. Não sabemos quais as razões que levam aos resultados conflitantes com aqueles publicados anteriormente pelo grupo do Dr. Jesus Blazquez.

### **4.3 Mutagênese induzida por CIP em *P. aeruginosa***

#### *4.3.1 Papel das polimerases propensas a erros*

Os efeitos bactericidas dos antibióticos podem se dar de diversas maneiras. A interação com o sítio-alvo é a mais conhecida, porém um mecanismo envolvido e que tem sido muito estudado é a produção de ROS (DWYER et al., 2007b; KOHANSKI et al., 2007). A ação direta ou indireta dos antibióticos, principalmente pela produção de ROS, geram os danos celulares, dentre eles quebras na fita de DNA que é um estímulo, também para a ativação da resposta SOS (DRLICA et al., 2008; PHILLIPS et al., 1987). Frente a danos no DNA, os quais as polimerases replicativas não conseguem ultrapassar, as polimerases TLS podem ser recrutadas para dar sequência à replicação (CIRZ et al., 2006b; SANDERS et al., 2006a). Este mecanismo de reparo normalmente é feito por polimerases de baixa fidelidade que inserem nucleotídeos de em frente à lesão, não necessariamente complementares ao da fita molde, podendo resultar na inserção mutações no DNA bacteriano (OHMORI et al., 2001). Além disso, essas polimerases também exibem altas taxas de erro quando usando moldes sem lesões no DNA. Por este motivo, a TLS é considerada a principal via de



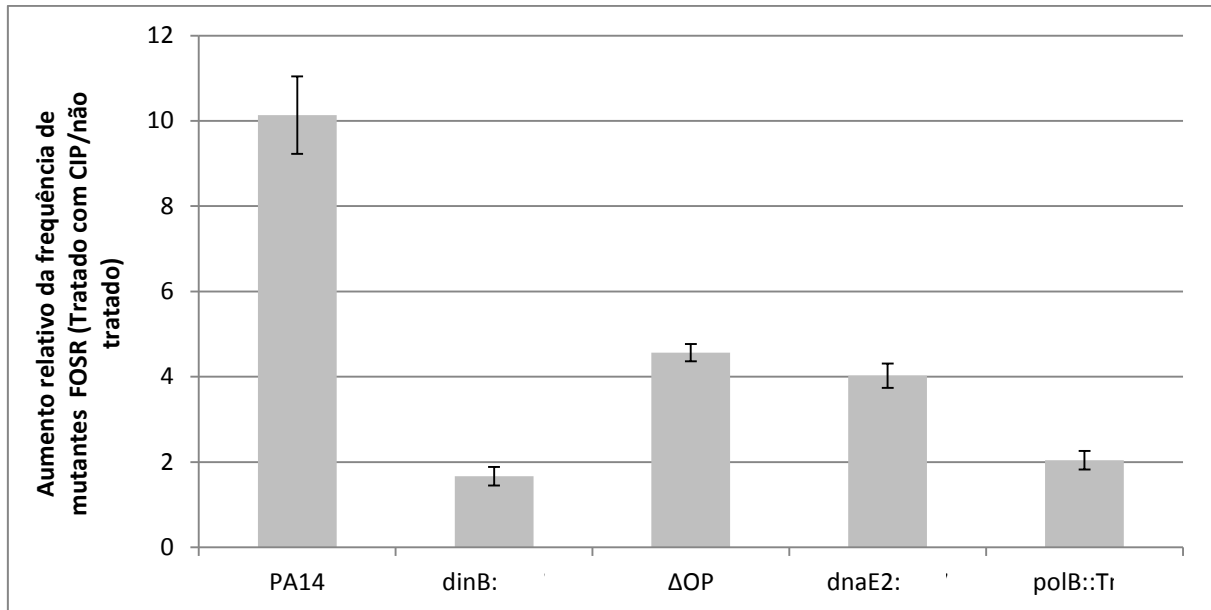
mutagênese em células com o sistema SOS induzido (FRIEDBERG; FEAVAR; GERLACH, 2000; FRIEDBERG; WAGNER; RADMAN, 2002).

Como demonstrado na seção 4.2, CIP é um forte indutor da resposta SOS e mutagênese em *P. aeruginosa*, inclusive em concentrações sub-inibitórias. Desta forma, é interessante avaliar os mecanismos moleculares envolvidos neste processo. Para isso, analisamos o envolvimento das polimerases de baixa fidelidade na mutagênese induzida por concentrações subinibitórias de CIP em *P. aeruginosa*, avaliando a linhagem PA14 e seus derivados mutantes nos genes *dinB*, *dnaE2*, *polB* por inserção de transposon, bem como um mutante construído neste trabalho com a deleção completa do operon *imuABdnaE2*. Também construímos mutante com a deleção completa do gene *imuA*, porém optamos por não utilizá-lo, uma vez que foi demonstrado que para o apropriado funcionamento deste operon é essencial a integridade dos três genes. Logo, ambos os mutantes apresentaram fenótipos iguais em ensaios de mutagênese (JATSENKO et al., 2017).

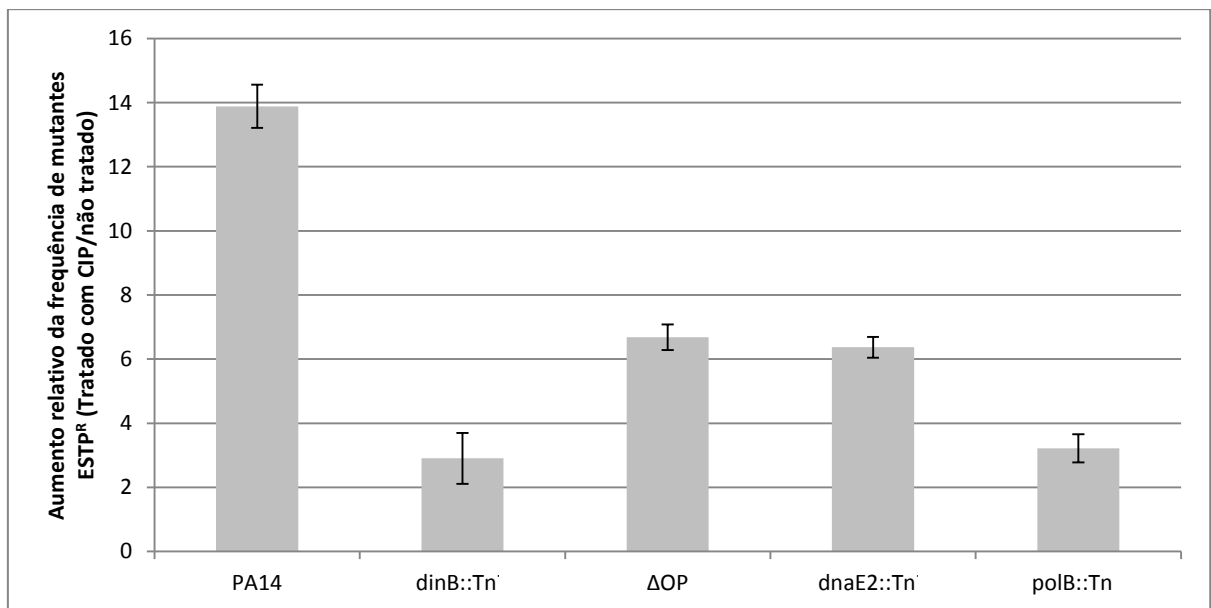
Nossos resultados demonstram que a CIP aumenta a frequência de mutantes aproximadamente 10 e 14 vezes na linhagem selvagem em FOS e ESTP, respectivamente (Figuras 14 e 15). Esses resultados estão de acordo com os estudos que demonstram que exposições a concentrações subinibitórias de fluoroquinolonas aumentam a taxa de mutação em *E. coli*, *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e *P. aeruginosa* (DRLICA; ZHAO, 1997; FUNG-TOMC; KOLEK; BONNER, 1993; PHILLIPS et al., 1987).

Interessantemente, quando avaliados os mutantes nas polimerases propensas a erros, notamos uma redução geral na mutagênese. Nos mutantes PA14 *dinB*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup> e PA14 *polB*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup> houve uma redução de aproximadamente 5 vezes na mutagênese induzida comparada a cepa selvagem, nos dois marcadores (Figuras 14 e 15).

Nos mutantes PA14 *dnaE2*:: MAR2xT7 Gm<sup>R</sup> e PA14 $\Delta$ *imuABdnaE2*, foi observado uma menor indução de mutagênese comparada na cepa selvagem, com redução da mutagênese para apenas ~40% daquela observada na linhagem selvagem, para os dois marcadores. Além disso, não houve diferenças entre o mutante de transposon e o de deleção em fase, mostrando assim que o transposon não interferiu no fenótipo apresentado (Figuras 14 e 15).



**Figura 14** - Perfis de mutagênese induzida por  $\frac{1}{2}$  X CIM de CIP em PA14 e nas cepas mutantes nas polimerases de TLS, PA14 *dinB*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>, PA14 $\Delta$ *imuAB/dnaE2 ( $\Delta$ OP), PA14 *dnaE2*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup> e PA14 *polB*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>, em FOS. Nesta figura, estão representadas as médias de cinco réplicas de cada condição em três ensaios independentes.*



**Figura 15** - Perfis de mutagênese induzida por  $\frac{1}{2}$  X CIM de CIP em PA14 e nas cepas mutantes nas polimerases de TLS, PA14 *dinB*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>, PA14 $\Delta$ *imuAB/dnaE2 ( $\Delta$ OP), PA14 *dnaE2*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup> e PA14 *polB*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>, em ESTP. Nesta figura, estão representadas as médias de cinco réplicas de cada condição em três ensaios independentes.*

Em *E. coli*, os genes *dinB* e *polB* são controlados pelos regulons SOS e RpoS (CIRZ et al., 2005a; DAPA et al., 2017; STORVIK; FOSTER, 2010). Esta coregulação de *dinB* permite com que PolIV esteja presente na célula mesmo na ausência de danos no DNA, contribuindo para a mutagênese espontânea (KIM et al., 2001). Todavia, frente a condições de estresse, onde há quebras da dupla fita e indução da resposta SOS, os níveis de PolIV

aumentam para mais 10 vezes e podem participar do reparo propenso a erros, contribuindo para a mutagênese induzida em *E. coli*. Nossos resultados com a linhagem *dinB* com CIP estão em concordância com o observado na literatura para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. putida*, os quais confirmam o papel mutagênico de *dinB* com diversos agentes: ROS, MMS e mitomicina C (CIRZ et al., 2006b; JATSENKO et al., 2017; PEREZ-CAPILLA et al., 2005; SANDERS et al., 2006).

A PolIII é um membro da família B das DNA polimerases que promove a TLS de maneira mais precisa que as demais polimerases TLS, em *E. coli* (NAPOLITANO et al., 2000). Juntamente com a via de Reparo por Excisão de Nucleotídeo (NER), atua no reparo de danos oxidativos e ligações cruzadas intercadeias de DNA provocadas por agentes alquilantes (BERARDINI; FOSTER; LOECHLER, 1999; ESCARCELLER et al., 1994). Além disso, também é requerida para retomar a replicação quando a forquilha de replicação é paralisada devido às lesões provocadas por UV (RANGARAJAN; WOODGATE; GOODMAN, 1999). Nesta bactéria, PolB tem sido associada com a manutenção da estabilidade do genoma, otimizando a sobrevivência e o desenvolvimento bacteriano (DAPA et al., 2017). Apesar de poucos dados na literatura sobre *polB* em *P. aeruginosa*, sabe-se que este não é regulado pela resposta SOS (CIRZ et al., 2006) e seu papel só está descrito na formação de biofilme (ALSHALCHI; ANDERSON, 2014). Nossos dados com *polB* sugerem o envolvimento desta polimerase no processo mutagênico de PA14 com CIP.

Em *P. aeruginosa*, o gene *umuDC* não é encontrado, em contrapartida, esta bactéria possui o operon *imuAB dnaE2*, que codifica uma maquinaria de TLS com função semelhante a PolV (*umuDC*) de *E. coli*. A PolV tem sua atividade e nível de expressão rigorosamente regulada pela resposta SOS e pode replicar o DNA frente à uma grande variedade de lesões, dentre elas sítios abásicos, dímeros de timina e bases oxidadas, provocadas por agentes químicos e radiação. Está associada à mutagênese induzida por danos no DNA, e na ausência de destes é quase indetectável dentro da célula (GOODMAN; WOODGATE, 2013). A replicação feita por Pol V é propensa a erros devido a falta da atividade de exonuclease 3'-5', conferindo uma baixa fidelidade à replicação, estando bem reportado seu papel na mutagênese em *E. coli*. (FUCHS; FUJII, 2013; GOODMAN; WOODGATE, 2013).

*C. crescentus* e *M. tuberculosis* possuem o operon *imuAB dnaE2* e a maquinaria de TLS codificada por este está envolvida na mutagênese induzida por UV e mitomicina C (BOSHOFF et al., 2003; GALHARDO et al., 2005; WARNER et al., 2010). Em *P. aeruginosa* e *P. putida*, foi recentemente descrito seu envolvimento na mutagênese induzida por UV e MMS, um agente alquilante de DNA (JATSENKO et al., 2017). Segundo dados de

microarray, em *P. aeruginosa* PAO1 e *M. tuberculosis*, o gene *dnaE2* foi regulado positivamente após a exposição a ½ X CIM de CIP. (CIRZ et al., 2006b; O'SMILLIVAN et al., 2008), porém seu papel na mutagênese com CIP não havia sido estudado até então. Consistente com esses resultados de expressão de *dnaE2*, nossos dados de mutagênese demonstram o envolvimento de *dnaE2* na mutagênese induzida por CIP em PA14.

Desta forma, sugerimos que a três polimerases propensas a erros presentes em PA14 estão envolvidas na mutagênese mediada por concentrações subinibitórias de CIP, demonstrando fenótipos relevantes na redução da mutagênese quando estas polimerases estão ausentes. Estes dados são semelhantes aos observados por Cirz e colaboradores em *E. coli*, onde a deleção nos genes *dinB*, *polB* e *umuDC* reduzem drasticamente a mutagênese induzida por CIP (CIRZ et al., 2005). Isto se torna interessante, uma vez que, já foi demonstrada a estreita relação entre aumento de mutagênese associada à persistência da infecção por *P. aeruginosa* e resistência bacteriana (OLIVER et al., 2000). É interessante notar também que, não houve redução completa na mutagênese, provavelmente porque as outras duas polimerases presentes podem suprir parcialmente a falta da terceira. Isso indica funções parcialmente redundantes na mutagênese.

#### 4.4 Espectro de mutação provocado por CIP em *P. aeruginosa*

Para avaliar que tipos de mutações são provocados pela exposição a CIP em PA14 selvagem, e caracterizar o papel das diferentes polimerases propensas a erros neste processo, foi selecionado o gene *glpT* para análise. Este gene codifica uma permease de Glicerol-3-Fosfato, a qual é a única proteína responsável pela entrada da FOS em *P. aeruginosa*. Logo, qualquer tipo de mutação em *glpT* conduz a resistência a FOS. Na mutagênese *Fos<sup>R</sup>*, podem estar compreendidas mutações por inserções, deleções e substituições de bases nitrogenadas que levam à perda de função do gene *glpT* (CASTANEDA-GARCIA et al., 2009).

As mutações espontâneas encontradas em PA14 foram 100% substituições de bases, sendo 70% transições G→A (Tabelas 7 e 8). Já as mutações induzidas por CIP, 100% destas consistem de deleções de mais de 10 pb e inserções. Em concordância com os dados reportados por Song e colaboradores para a cepa selvagem de *E. coli*, e por Didier e colaboradores para *S. aureus*, as mutações de deleções são resultados da ação da CIP, sendo estas mais raras dentre as mutações espontâneas (DIDIER et al., 2011; SONG et al., 2016).

Os tipos de mutações espontâneas prevalentes em PA14 *dinB*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup> foram 70% substituição de bases. Quando induzidas por CIP, foram encontrados 50% de deleções e 50% substituição de bases. Comparativamente com a cepa selvagem exposta à CIP, as mutações de deleções diminuíram em 50%. Nesse sentido, *dinB* pode estar implicado no surgimento de deleções em PA14 (Tabelas 7 e 9).

No mutante PA14 *dnaE2*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup> as substituições de bases representaram 90% das mutações espontâneas, enquanto que em células expostas à CIP as mutações por deleções prevaleceram em 70% das sequencias analisadas (Tabelas 7 e 10).

E para o mutante PA14 *polB*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>, as mutações espontâneas variaram entre deleções (50%) e troca de bases (50%). Já nas mutações induzidas por CIP, 100% das mutações foram de deleção de fragmentos curtos e, interessantemente, concentraram-se na região G<sub>224</sub>CCATC<sub>229</sub> do *glpT* (Tabelas 7 e 11).

**Tabela 7** - Frequência dos tipos de mutações encontradas no *glpT*.

Cepa	Meio	Número de inserções/deleções (%)	Número de substituições de bases (%)
PA14	LB	-	10/10 (100%)
PA14	LB + CIP	10/10 (100%)	-
PA14 <i>dinB</i> ::Tn	LB	3/10 (30%)	7/10 (70%)
PA14 <i>dinB</i> ::Tn	LB + CIP	5/10 (50%)	5/10 (50%)
PA14 <i>dnaE2</i> ::Tn	LB	1/10 (10%)	9/10 (90%)
PA14 <i>dnaE2</i> ::Tn	LB + CIP	7/10 (70%)	3/10 (30%)
PA14 <i>polB</i> ::Tn	LB	5/10 (50%)	5/10(50%)
PA14 <i>polB</i> ::Tn	LB + CIP	10/10 (100%)	-

CIP é um antibiótico que atua sobre o metabolismo DNA bacteriano, induzindo a formação de quebras duplas no DNA (DRLICA et al., 2008). Neste caso, ocorre a indução da resposta SOS, e conseqüentemente, das polimerases de baixa fidelidade. As mutações induzidas por CIP foram basicamente compostas por deleções, assim como o observado em *E. coli* (SONG et al., 2016). Nossos dados indicam que *dinB* pode estar envolvido na formação

desta classe de mutações, uma vez que há redução de 50% das deleções induzidas por CIP no mutante desse gene. No mutante em *dnaE2*, a redução nas deleções é menos pronunciada, mas ainda assim pode ser observada. Essa observação é compatível com uma menor participação de *imuAB dnaE2* neste processo, conforme observado nas Figuras 14 e 15. DinB e PolB ainda ativos neste mutante devem introduzir a maior parte das deleções induzidas pela exposição à CIP, de maneira parcialmente redundante, já que nenhum dos dois mutantes mostra uma completa ausência de mutagenese. Já no mutante em *polB*, nota-se que as mutações tendem a se concentrar em torno de uma mesma região, o que indica que uma das outras polimerases (DinB ou DnaE2) possui preferência por introduzir mutações nesta região, mas que esta atividade é suprimida na presença de *polB*, provavelmente por competição entre as diferentes polimerases.

É interessante notar que a deficiência em qualquer uma das três DNA polimerases propensas a erro altera significativamente o tipo de mutações espontâneas, mudando a proporção e os tipos de substituições de bases observadas. Em particular, as mutações G→A, o tipo de mutação mais comum em genomas bacterianos (HERSHBERG et al., 2010; HILDEBRAND et al., 2010), predominam na linhagem selvagem, mas são significativamente reduzidas nas três linhagens mutantes.

As mutações induzidas por CIP podem ocorrer em qualquer parte do genoma bacteriano, incluindo em genes que codificam sítio-alvos de outros antibióticos (López, 2007), levando a alteração dos mesmos, ou até inativando-os, como em *glpT*. Isso pode ser um problema por conduzir à resistência cruzada, acelerando a evolução da resistência bacteriana (KOHANSKI; DEPRISTO; COLLINS, 2010; SONG et al., 2016).

**Tabela 8** - Tipos de mutações e suas posições no gene *glpT* de mutantes FOS<sup>R</sup> de PA14

Mutações FOS <sup>R</sup> espontâneas	Mutações FOS <sup>R</sup> induzidas por CIP
G to A (CCG <sub>926</sub> )	G <sub>404</sub> GCATGGGCT <sub>413</sub> deleção, 10 bp
G to A (CGG <sub>405</sub> )	G <sub>188</sub> CCAGCTGGGC <sub>198</sub> deleção, 11 bp
T to A (CCT <sub>141</sub> )	A <sub>1006</sub> CCCTGATCTACTGGC <sub>1021</sub> deleção, 16 bp
G to A (CTG <sub>426</sub> )	A <sub>850</sub> AGCACTTCAAC <sub>861</sub> deleção, 12 bp
G to A (CTG <sub>403</sub> )	C <sub>632</sub> inserção, 1pb; T to C (TGT <sub>1288</sub> )
C to A (AAC <sub>874</sub> )	G <sub>199</sub> TCGCGATGT <sub>208</sub> deleção, 10 bp

G to A (CAG <sub>466</sub> )	T <sub>839</sub> CAAGGAGGCCA <sub>850</sub> deleção, 12 bp
G to A (CTG <sub>945</sub> )	T <sub>773</sub> TC inserção, 3pb
A to C (GCA <sub>929</sub> )	G <sub>600</sub> CCTGCCGCCGATCGAG <sub>676</sub> deleção, 17 bp
G to A (CCG <sub>926</sub> )	G <sub>404</sub> GCATGGGCT <sub>413</sub> deleção, 10 bp

**Tabela 9** - Tipos de mutações e suas posições no gene *glpT* de mutantes FOS<sup>R</sup> de PA14 *dinB::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>*.

Mutações FOS <sup>R</sup> espontâneas	Mutações FOS <sup>R</sup> induzidas por CIP
C to G (CAC <sub>1233</sub> )	T <sub>852</sub> CAAGGAGGCC <sub>862</sub> deleção, 11 bp
G to A (CAG <sub>100</sub> )	T <sub>1302</sub> deleção, 1 bp
T <sub>1202</sub> CGGTGGC <sub>1209</sub> deletion, 8 bp	C <sub>736</sub> deleção, 1 bp
G <sub>224</sub> CCATC <sub>229</sub> deletion, 6 bp	G to T (TCG <sub>374</sub> )
C to G (AGC <sub>370</sub> )	G <sub>212</sub> TCGCGATGT <sub>221</sub> deleção, 10 bp
A to T (GGA <sub>858</sub> )	G <sub>212</sub> TCGCGATGT <sub>221</sub> deleção, 10 bp
A to G (TCA <sub>260</sub> )	C to G (GGC <sub>579</sub> )
G <sub>224</sub> CCATC <sub>229</sub> deletion, 6 bp	A to C (GCA <sub>929</sub> )
C to T (GCC <sub>203</sub> )	C to G (ACC <sub>1012</sub> )
A to T (CCA <sub>233</sub> )	C to G (GAC <sub>568</sub> )

**Tabela 10** - Tipos de mutações e suas posições no gene *glpT* de mutantes FOS<sup>R</sup> de PA14 *dnaE2::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>*.

Mutações FOS <sup>R</sup> espontâneas	Mutações FOS <sup>R</sup> induzidas por CIP
A to T (GGA <sub>858</sub> )	G <sub>211</sub> CCATC <sub>216</sub> deleção, 6 bp
C to A (GGC <sub>894</sub> )	C <sub>1032</sub> GGCAACCCGGC <sub>1043</sub> deleção, 12 bp
G <sub>225</sub> CCATC <sub>230</sub> deletion, 6 bp	G <sub>1144</sub> GCACCGCCGC <sub>1154</sub> deleção, 11 bp
C to T (CAC <sub>290</sub> )	A <sub>385</sub> TTAACGGCTG <sub>395</sub> deleção, 11 bp
C to A (GAC <sub>643</sub> )	G to A (ACG <sub>1087</sub> )
G to C (GGG <sub>423</sub> )	C <sub>588</sub> GCCGTGGG <sub>596</sub> deleção, 9 bp

A to C (GGA <sub>471</sub> )	CCG <sub>973</sub> deleção, 1 bp
A to T (TCA <sub>872</sub> )	C inserção, 1 pb (CTC <sub>563</sub> )
A to G (ACA <sub>770</sub> )	A to C (GCA <sub>916</sub> )
A to G (GGA <sub>850</sub> )	G <sub>211</sub> CCATC <sub>216</sub> deleção, 6 bp

**Tabela 11** - Tipos de mutações e suas posições no gene *glpT* de mutantes FOS<sup>R</sup> de PA14 *polB::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>*.

Mutações FOS <sup>R</sup> espontâneas	Mutações FOS <sup>R</sup> induzidas por CIP
G <sub>224</sub> CCA <sub>227</sub> deletion, 4 bp	G <sub>224</sub> CCATC <sub>229</sub> deleção, 6 bp
T to A (GCT <sub>407</sub> )	C <sub>462</sub> GCAGAAGGAGC <sub>473</sub> deleção, 12 bp
C to A (TGG <sub>458</sub> ), C to T (ACC <sub>812</sub> ), C to A (CGC <sub>1168</sub> )	G <sub>224</sub> CCATC <sub>229</sub> deleção, 6 bp
C <sub>478</sub> deletion, 1 bp	G <sub>472</sub> C <sub>473</sub> deleção, 2 bp
C <sub>224</sub> CA <sub>226</sub> deletion, 3 bp	G <sub>224</sub> CCATC <sub>229</sub> deleção, 6 bp
C to G (TTC <sub>805</sub> )	A <sub>1175</sub> CCGGT <sub>1180</sub> deleção, 6 bp
T <sub>1258</sub> deletion, 1 bp	G <sub>224</sub> CCATC <sub>229</sub> deleção, 6 bp
C <sub>478</sub> deletion, 1 bp, T to C (ATT <sub>629</sub> ), T to C (CCT <sub>1131</sub> )	G <sub>1267</sub> deleção, 1 bp
C to A (CCA <sub>453</sub> )	G <sub>657</sub> G <sub>667</sub> deleção, 2 bp
A to C (ACC <sub>1019</sub> )	T <sub>558</sub> GTTCGGCGACTG <sub>570</sub> deleção, 13pb

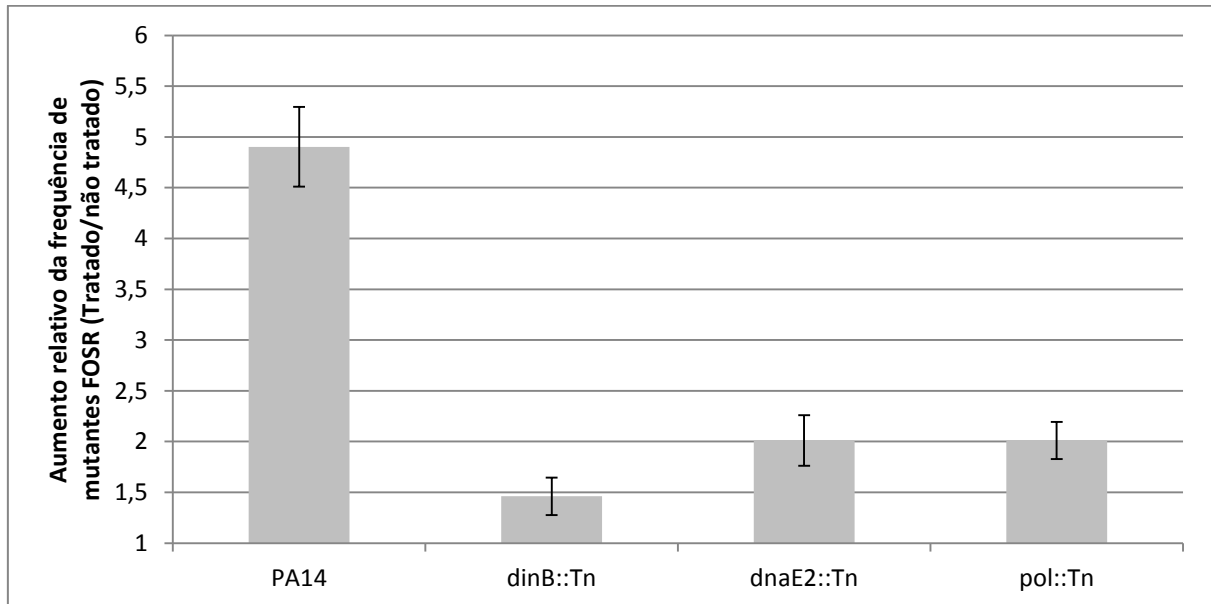
#### 4.5 Envolvimento das polimerases propensas a erros na mutagênese induzida ROS em *P. aeruginosa*

No sentido de analisar se a mutagênese provocada por CIP possui os mesmos requerimentos genéticos do que a induzida por agentes oxidantes, avaliamos o envolvimento das polimerases propensas a erros na mutagênese causada por estresse oxidativo e correlacionamos ao efeito indireto provocado por antibióticos. Para isso testamos as mesmas linhagens mutantes nos genes das polimerases, com peróxido de hidrogênio, no ensaio de determinação da frequência de mutantes. A concentração e condição de tratamento foram padronizadas neste trabalho, sendo 25 mM aquela onde a máxima mutagênese induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi observada (dados não mostrados).



Os tipos de estresse provocados por ROS incluem danos nas bases nitrogenadas, levando à formação de adutos oxidados, dentre eles 7,8-dihydro-8-oxoguanina (8-oxoG ou GO), danos na ligação açúcar-fosfato, ou até mesmo quebras nas fitas de DNA. Durante a replicação, os adutos de 8-oxoG podem ser facilmente pareados com adenina ao invés da sua base correspondente (FREIEDBERG et al., 2006). A PolIV tem sido descrita como a principal responsável por este tipo de incorporação errônea em, *E. coli* (NEELEY et al., 2007).

Nossos resultados de mutagênese induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstram fenótipos semelhantes aos apresentados na mutagênese induzida por CIP, onde as três linhagens mutantes apresentam menos mutagênese induzida pelo agente genotóxico. Neste caso, nota-se que *dinB* é a polimerase com maior envolvimento, e que *dnaE2* e *polB* têm a mesma importância para este fenômeno. É curioso observar que há uma drástica redução de mutagênese nas linhagens deficientes nas polimerases, indicando que a maior parte da mutagênese induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *P. aeruginosa* requer TLS, e não é consequência direta do efeito de lesões que induzem erros de pareamento de bases pela polimerase replicativa, como a 8-oxoG (Figura16).



**Figura 16** - Perfis de mutagênese induzida por 25 mM de Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em PA14 e nas cepas mutantes nas polimerases de TLS, PA14 *dinB*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>, PA14 *dnaE2*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup> e PA14 *polB*::MAR2xT7 Gm<sup>R</sup>. Nesta figura, estão representadas as médias de cinco réplicas de cada condição em três ensaios independentes.

Segundo dados reportados por Dwyer e colaboradores, foi observado que os antibióticos bactericidas aumentam a expressão de *soxS*, enquanto que, com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a

expressão foi diminuída significativamente. Este gene responde à estresses provocados por superóxidos, logo, foi sugerido que *soxS* é ativado por superóxidos produzidos por antibióticos, mas não por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta observação é importante para compreender que as respostas a estresse induzidas intrinsecamente, como as decorrentes de tratamentos antibióticos, podem ser semelhantes, mas não necessariamente igual às induzidas experimentalmente por agentes oxidantes exógenos. Esses dados demonstram que os antibióticos bactericidas desencadeiam respostas ao estresse oxidativo semelhantes a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém as proporções podem ser diferentes devido à natureza dos agentes e à resposta bacteriana frente a cada um deles (DWYER et al., 2014).

Diante disso, pode-se sugerir que há uma relação entre estresse oxidativo e antibióticos, e que as polimerases de baixa fidelidade podem atuar no processo de TLS e mutagênese provocado por ROS.

## 6 CONCLUSÕES

Atualmente, com o aumento resistência bacteriana aliada à falta de opções terapêuticas, torna-se necessário expandir nossos conhecimentos de como os antibióticos atuam nas bactérias, e utilizar estes conhecimentos adquiridos para otimizar o uso dos antibióticos já existentes e/ou auxiliar nas escolhas terapêuticas. *P. aeruginosa*, é um importante patógeno oportunista de difícil tratamento devido a sua alta virulência e capacidade de tornar-se resistente à terapêutica. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ocorre após a exposição das bactérias aos antibióticos, é um mecanismo muito bem estudado em outras bactérias, como *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*. Este efeito secundário dos antibióticos tem sido descrito como um dos ativadores de repostas mutagênicas e adaptativas que podem contribuir para a resistência bacteriana. Em *P. aeruginosa*, foi descrito que Ceftazidima e Ciprofloxacina, ambos muito empregados na terapêutica, induzem a resposta SOS. Uma vez que esta resposta está relacionada com a ativação de genes que codificam para polimerases propensas a erros, buscamos avaliar a resposta de *P. aeruginosa* frente às principais drogas utilizadas para a terapêutica.

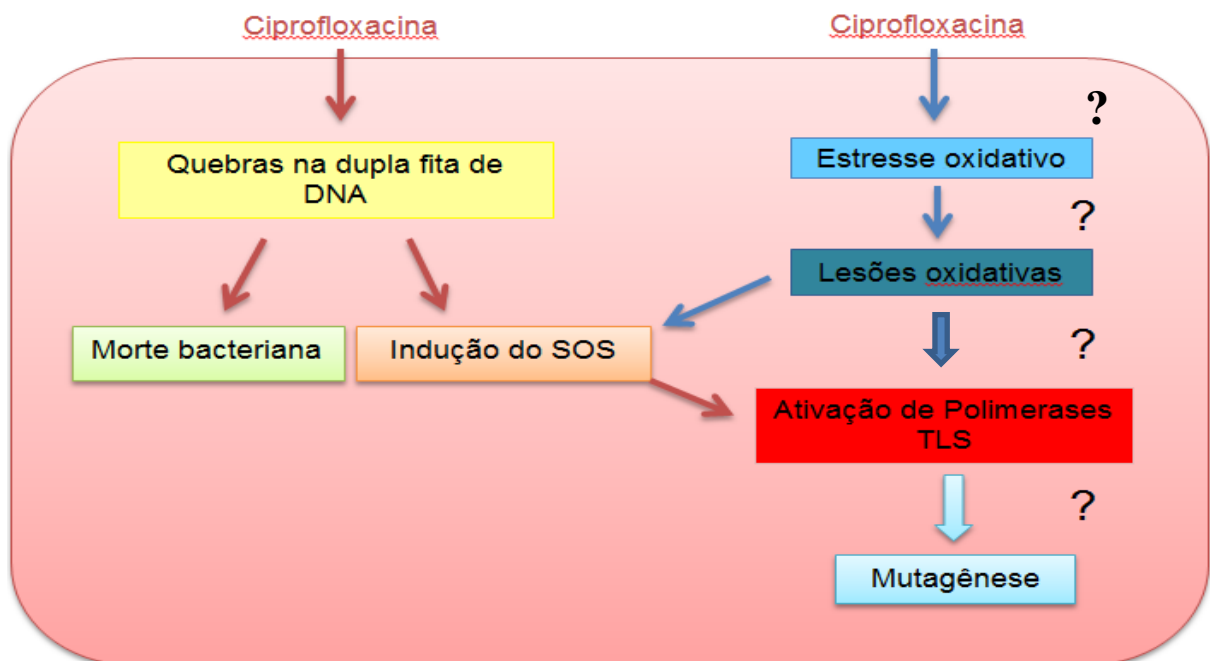
Frente a diferentes drogas testadas, os mutantes de reparo de lesões oxidativas não apresentam maior sensibilidade. Por outro lado, alguns apresentaram um perfil de resistência ligeiramente aumentado, sugerindo que a falta destes mecanismos está mais implicada na formação de um fenótipo hipermutador, tornando-os mais tolerantes aos antibióticos, do que a um mecanismo de resistência intrínseco que diminui o efeito bactericida das drogas devido à eliminação do dano oxidativo induzido pelos mesmos.

Nossos resultados com Ceftazidima e outros  $\beta$ -lactâmicos, avaliando a medida de luminescência do gene repórter *luxCDABE* com os promotores *recA* e *lexA*, mostraram que não há indução da resposta SOS, bem como de mutagênese na bactéria em estudo. Contrariamente ao observado em outras bactérias e análises de microarray reportados para *P. aeruginosa*.

No entanto, nos resultados com Ciprofloxacina, observamos que há uma forte indução da resposta SOS e mutagênese em PA14 e PAO1. Quando avaliamos o envolvimento das polimerases propensas a erros na mutagênese induzida por CIP em PA14, nos mutantes nos genes *dinB*, *dnaE2*, *polB*, chegamos à conclusão que todas participam deste processo, sendo que as codificadas pelos genes *dinB* e *polB* parecem serem as mais ativamente envolvidas.

Na avaliação do espectro de mutações que cada uma dessas polimerases provoca, observamos que 100% destas consistem em deleções em células expostas à CIP, sendo que *dinB* é a principal polimerase responsável por este tipo de mutação. Segundo nossos dados, *polB*, pode estar relacionado às mutações de troca de base, já que no mutante deste gene, 100% das mutações foram de deleções/inserções. E em *dnaE2*, foram ocorreram mutações de todos os tipos, o que pode ser explicado pela presença das outras polimerases codificadas por *dinB* e *polB* neste mutante, bem como a redundância de função entre todas elas.

Quanto a avaliação da mutagênese provocada pelo agente oxidante externo  $H_2O_2$ , foi observado um perfil semelhante ao de CIP. Embora essa correlação entre a mutagênese induzida por CIP e  $H_2O_2$  não nos permita afirmar com segurança, porém, pode-se sugerir que o estresse oxidativo causado pela exposição à CIP pode mediar, pelo menos uma parte da mutagênese induzida por este antibiótico. Por outro lado, como exposto acima, claramente este estresse oxidativo não contribui significativamente para a morte de *P. aeruginosa* exposta à CIP e outros antibióticos.



**Figura 17** - Hipótese sobre os mecanismos moleculares que levam à mutagênese induzida por CIP. O antimicrobiano CIP atua diretamente no DNA causando quebras na dupla-fita, que pode ocasionar em morte celular ou indução da resposta SOS, principalmente em concentrações subinibitórias. A resposta SOS por si é mutagênica, já que induz a expressão de polimerases de baixa fidelidade. Embora não diretamente demonstrado por nossos dados, o estresse oxidativo resultante do desbalanço metabólico também poderia causar lesões no DNA, que podem contribuir para mutagênese tanto por ativar resposta SOS, como por servir de substrato para polimerases propensas a erro.

## REFERÊNCIAS\*

- ALIPOUR, M.; SUNTRES, Z. E.; HALWANI, M.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Activity and interactions of liposomal antibiotics in presence of polyanions and sputum of patients with cystic fibrosis. **PloS one**, v. 4, n. 5, p. E5724, 28 maio 2009.
- ALSHALCHI, S. A.; ANDERSON, G. G. Involvement of Stress-Related Genes *polB* and *PA14\_46880* in Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 11, p. 4746–4757, 1 nov. 2014.
- ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49–59, 3 mar. 2017.
- ASAKURA, Y.; KOBAYASHI, I. From damaged genome to cell surface: transcriptome changes during bacterial cell death triggered by loss of a restriction-modification gene complex. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 9, p. 3021–3031, maio 2009.
- AU, N.; KUESTER-SCHOECK, E.; MANDAVA, V.; BOTHWELL, L. E.; CANNY, S. P.; CHACHU, K. Genetic Composition of the *Bacillus subtilis* SOS System. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 22, p. 7655–7666, 15 nov. 2005.
- AURÉ LIE MATHIEU, A.; BASTIEN FLEURIER, S.; FRÉ, N. A.; SANCHEZ-VIZUETE, P.; SONG, X. Discovery and Function of a General Core Hormetic Stress Response in *E. coli* Induced by Sublethal Concentrations of Antibiotics. **CellReports**, v. 17, p. 46–57, 2016.
- BAHAROGLU, Z.; MAZEL, D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 6, p. 1126–1145, 1 nov. 2014.
- BAQUERO, F.; TEDIM, A. P.; COQUE, T. M. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 15, 2013.
- BATTESTI, A.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 189–213, 13 out. 2011.
- BECEIRO, A.; TOMAS, M.; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185–230, 1 abr. 2013.
- BERARDINI, M.; FOSTER, P. L.; LOECHLER, E. L. DNA polymerase II (*polB*) is involved in a new DNA repair pathway for DNA interstrand cross-links in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 9, p. 2878–2882, 1 maio 1999.

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BHAGIRATH, A.Y.; LI, Y.; SOMAYAJULA, D.; DADASHI, M.; BADR, S.; DUAN, K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 16, n. 1, p. 174, 5 dez. 2016.

BLÁZQUEZ, J.; GÓMEZ-GÓMEZ, J. M.; OLIVER, A.; JUAN, C.; KAPUR, V.; MARTÍN, S. PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 84–99, 2006.

BLÁZQUEZ, J.; COUCE, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; RODRÍGUEZ-ROJAS, A. Antimicrobials as promoters of genetic variation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 561–569, out. 2012.

BOSHOFF, H.; REED, M. B.; BARRY, C. E.; MIZRAHI, V. DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell**, v. 113, n. 2, p. 183–193, 18 abr. 2003.

BROOKS, P. C.; MOVAHEDZADEH, F.; DAVIS, E. O. Identification of Some DNA Damage-Inducible Genes of *Mycobacterium tuberculosis*: Apparent Lack of Correlation with LexA Binding. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 15, p. 4459–4467, 1 ago. 2001.

CASTANEDA-GARCIA, A.; RODRIGUEZ-ROJAS, A.; GUELFO, J. R.; BLAZQUEZ, J. The Glycerol-3-Phosphate Permease GlpT Is the Only Fosfomycin Transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 22, p. 6968–6974, 15 nov. 2009a.

CIOFU, O.; RIIS, B.; PRESSLER, T.; POULSEN, H. E.; HOIBY, N. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2276–2282, jun. 2005.

CIRZ, R. T.; CHIN, J. K.; ANDES, D. R.; DE CRÉCY-LAGARD, V.; CRAIG, W.A.; ROMESBERG, F. E. Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance. **PLoS Biology**, v. 3, n. 6, p. E176, 10 maio 2005a.

CIRZ, R.T.; O'NEILL, B. M.; HAMMOND, J. A.; HEAD, S. R.; ROMESBERG, F. E. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS Response and Its Role in the Global Response to the Antibiotic Ciprofloxacin. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 20, p. 7101–7110, 15 out. 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Ninth six ed. Wayne, PA, USA. 2014: Approved Standard M100-S24. CLSI, 2016.

COUCE, A.; GUELFO, J. R.; BLÁZQUEZ, J.; BLANCHARD, J.; LENSKI, R. Mutational Spectrum Drives the Rise of Mutator Bacteria. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 1, p. E1003167, 10 jan. 2013.

COURCELLE, J.; KHODURSKY, A.; PETER, B.; BROWN, P. O.; HANAWALT, P. C. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. **Genetics**, v. 158, n. 1, p. 41–64, maio 2001.

- DAPA, T.; FLEURIER, S.; BREDECHE, M. F.; MATIC, I. The SOS and RpoS Regulons Contribute to Bacterial Cell Robustness to Genotoxic Stress by Synergistically Regulating DNA Polymerase Pol II. **Genetics**, v. 206, n. 3, 2017.
- DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941–950, 21 jun. 2007.
- DAVIES, J.; SPIEGELMAN, G. B.; YIM, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 445–453, out. 2006.
- DIDIER, J. P.; VILLET, R.; HUGGLER, E.; LEW, D. P.; HOOPER, D.; KELLEY, W. L. Impact of ciprofloxacin exposure on Staphylococcus aureus genomic alterations linked with emergence of rifampin resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 1946–1952, 1 maio 2011.
- DÖRING, G.; CONWAY, S. P.; HEIJERMAN, H. G.; HODSON, M. E.; HOIBY, N.; SMYTH, A. Antibiotic therapy against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: a European consensus. **The European respiratory journal**, v. 16, n. 4, p. 749–767, out. 2000.
- DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 160–201, 1 jan. 2010.
- DRLICA, K.; MALIK, M.; KERNS, R. J.; ZHAO, X. Quinolone-mediated bacterial death. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 385–392, 1 fev. 2008.
- DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 3, p. 377–392, set. 1997.
- DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; HAYETE, B.; COLLINS, J. J. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in Escherichia coli. **Molecular systems biology**, v. 3, p. 91, 13 mar. 2007a.
- DWYER, D. J.; BELENKY, P. A.; YANG, J. H.; MACDONALD, I. C.; MARTELL, J. D.; TAKAHASHI, N. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 20, p. E2100-109, 20 maio 2014.
- DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; COLLINS, J. J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. **Current opinion in microbiology**, v. 12, n. 5, p. 482–489, out. 2009.
- EL-KHOLY, A.; SAIED, T.; GABER, M.; YOUNAN, M. A.; HALEIM, M.; EL-SAYED, H. Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units at Cairo University hospitals: First step toward initiating surveillance programs in a resource-limited country. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 6, p. E216–E220, ago. 2012.
- ERILL, I.; ESCRIBANO, M.; CAMPOY, S.; BARBÉ, J. In silico analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 19, n. 17, p. 2225–2236, 22 nov. 2003.
- ESCARCELLER, M.; HICKS, J.; GUDMUNDSSON, G.; TRUMP, G.; TOUATI, D.; LOVETT, S. Involvement of Escherichia coli DNA polymerase II in response to oxidative damage and adaptive mutation. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 20, p. 6221–6228, 1 out. 1994.

- FIJALKOWSKA, I. J.; SCHAAPER, R. M.; JONCZYK, P. DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 6, p. 1105–1121, nov. 2012.
- FOWLER, R. G.; WHITE, S. J.; KOYAMA, C.; MOORE, S. C.; DUNN, R. L.; SCHAAPER, R. M. Interactions among the *Escherichia coli* mutT, mutM, and mutY damage prevention pathways. **DNA repair**, v. 2, n. 2, p. 159–173, 3 fev. 2003.
- FOWLER, R. G.; SCHAAPER, R. M. The role of the *mutT* gene of *Escherichia coli* in maintaining replication fidelity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 43–54, 1 ago. 1997.
- FRIEDBERG, E. C.; FEAVER, W. J.; GERLACH, V. L. The many faces of DNA polymerases: Strategies for mutagenesis and for mutational avoidance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 11, p. 5681–5683, 23 maio 2000.
- FRIEDBERG, E. C.; WAGNER, R.; RADMAN, M. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. **Science (New York, N.Y.)**, v. 296, n. 5573, p. 1627–1630, 31 maio 2002.
- FRIEDBERG EC, WALKER GC, SIEDE W, WOOD RD, SCHULTZ RA, ELLENBERGER T. **DNA repair and mutagenesis**. Washington, D.C. ASM press, 2006. 1000 p.
- FUCHS, R. P.; FUJII, S. Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis in Prokaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 12, p. A012682–A012682, 1 dez. 2013.
- FUJII, S.; ISOGAWA, A.; FUCHS, R. P. RecFOR proteins are essential for Pol V-mediated translesion synthesis and mutagenesis. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 24, p. 5754–5763, 13 dez. 2006.
- FUNG-TOMC, J.; KOLEK, B.; BONNER, D. P. Ciprofloxacin-induced, low-level resistance to structurally unrelated antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 6, p. 1289–1296, jun. 1993.
- GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354–360, ago. 2012.
- GALHARDO, R. S.; ROCHA, R. P.; MARQUES, M. V.; MENCK, C.F. M. An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 8, p. 2603–2614, 28 abr. 2005.
- GALHARDO, R. S.; DO, R.; YAMADA, M.; FRIEDBERG, E. C.; HASTINGS, P. J.; NOHMI, T. DinB upregulation is the sole role of the SOS response in stress-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. **Genetics**, v. 182, n. 1, p. 55–68, maio 2009.
- GIBSON, R. L.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B. W. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 168, n. 8, p. 918–951, 15 out. 2003.
- GOH, E. B.; YIM, G.; TSUI, W.; MCCLURE, J.; SURETTE, M. G.; DAVIES, J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of



- antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 26, p. 17025–17030, 24 dez. 2002.
- GOLDBERG, J. Why is *Pseudomonas aeruginosa* a pathogen? **F1000 Biology Reports**, v. 2, 27 abr. 2010.
- GOODMAN, A. L.; KULASEKARA, B.; RIETSCH, A.; BOYD, D.; SMITH, R. S.; LORY, S. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Developmental cell**, v. 7, n. 5, p. 745–754, nov. 2004.
- GOODMAN, M. F.; WOODGATE, R. Translesion DNA polymerases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 10, p. A010363, 1 out. 2013.
- GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guide to antimicrobial use in animals**. [s.l.] Blackwell Pub, 2008.
- GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, O. G.; ILBÄCK, C.; SANDEGREN, L.; HUGHES, D. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. E1002158, 21 jul. 2011.
- GUTIERREZ, A.; LAURETI, L.; CRUSSARD, S.; ABIDA, H.; RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; BLÁZQUEZ, J.  $\beta$ -Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. **Nature communications**, v. 4, p. 1610, 19 mar. 2013.
- HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation research**, v. 443, n. 1–2, p. 37–52, 15 jul. 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 1–85, 1990.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557–80, 5 jun. 1983.
- HÄRING, M.; RÜDIGER, H.; DEMPPE, B.; BOITEUX, S.; EPE, B. Recognition of oxidized abasic sites by repair endonucleases. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 11, p. 2010–2015, 11 jun. 1994.
- HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 90001, p. 29–35, 1 maio 2003.
- HENRICHFREISE, B.; WIEGAND, I.; LUHMER-BECKER, I.; WIEDEMANN, B. Development of resistance in wild-type and hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains exposed to clinical pharmacokinetic profiles of meropenem and ceftazidime simulated in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3642–3649, 1 out. 2007.
- HERSHBERG, R.; PETROV, DA.; LEFKOWITZ, E.; ROOS, D.; SCHEUERMANN, R. Evidence That Mutation Is Universally Biased towards AT in Bacteria. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 9, p. E1001115, 9 set. 2010.
- HILDEBRAND, F.; MEYER, A.; EYRE-WALKER, A.; BARBE, V.; BAERISWYL, S. Evidence of Selection upon Genomic GC-Content in Bacteria. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 9, p. E1001107, 9 set. 2010.

- HORNBACK, M. L.; ROOP, R. M.; II. The *Brucella abortus* xthA-1 gene product participates in base excision repair and resistance to oxidative killing but is not required for wild-type virulence in the mouse model. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 4, p. 1295–1300, fev. 2006.
- HUANG, C. Z.; FENG, P.; LI, Y. F.; TAN, K. J. Pharmacokinetic detection of penicillin excreted in urine using a totally internally reflected resonance light scattering technique with cetyltrimethylammonium bromide. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 1, p. 85–90, 13 maio 2005.
- HULL, J.; SOUTH, M.; PHELAN, P.; GRIMWOOD, K. Surfactant Composition in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 1, p. 161–165, jul. 1997.
- IMLAY, J. A.; CHIN, S. M.; LINN, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. **Science (New York, N.Y.)**, v. 240, n. 4852, p. 640–642, 29 abr. 1988.
- JACOBY, G. A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 5, out. 2014.
- JATSENKO, T.; SIDORENKO, J.; SAUMAA, S.; KIVISAAR, M. DNA Polymerases ImuC and DinB Are Involved in DNA Alkylation Damage Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. E0170719, 24 jan. 2017.
- JENA, N. R. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. **Journal of biosciences**, v. 37, n. 3, p. 503–517, jul. 2012.
- JEONG, J. Y.; YIM, H. S.; RYU, J. Y.; LEE, H.S.; LEE, J. H.; SEEN, D. S. One-Step Sequence- and Ligation-Independent Cloning as a Rapid and Versatile Cloning Method for Functional Genomics Studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5440–5443, 1 ago. 2012.
- JOZEF CZUK, S.; KLIE, S.; CATCHPOLE, G.; SZYMANSKI, J.; CUADROS-INOSTROZA, A.; STEINHAUSER, D.; SELBIG, J.; WILLMITZER, L. Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. **Molecular Systems Biology**, v. 6, p. 364, 11 maio 2010.
- KALDALU, N.; MEI, R.; LEWIS, K. Killing by ampicillin and ofloxacin induces overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 890–896, mar. 2004.
- KANAFANI, H.; MARTIN, S. E. Catalase and superoxide dismutase activities in virulent and nonvirulent *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 21, n. 4, p. 607–610, abr. 1985.
- KELLEY, W. L. Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. **Molecular microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1228–1238, dez. 2006.
- KEREN, I.; WU, Y.; INOCENCIO, J.; MULCAHY, L. R.; LEWIS, K. Killing by Bactericidal Antibiotics Does Not Depend on Reactive Oxygen Species. **Science**, v. 339, n. 6124, p. 1213–1216, 8 mar. 2013.
- KIFFER, C. R. V.; CAMARGO, E. C.G.; SHIMAKURA, S. E.; RIBEIRO, P. J.; BAILEY, T. C.; PIGNATARI, A. C. C. A spatial approach for the epidemiology of antibiotic use and

resistance in community-based studies: the emergence of urban clusters of *Escherichia coli* quinolone resistance in Sao Paulo, Brasil. **International journal of health geographics**, v. 10, n. 1, p. 17, 28 fev. 2011.

KIM, S. R.; MATSUI, K.; YAMADA, M.; GRUZ, P.; NOHMI, T. Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 266, n. 2, p. 207–215, out. 2001.

KISKER, C.; KUPER, J.; VAN HOUTEN, B. Prokaryotic Nucleotide Excision Repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 3, p. A012591–A012591, 1 mar. 2013.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C. A.; COLLINS, J. J. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797–810, 7 set. 2007.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; WIERZBOWSKI, J.; COTTAREL, G.; COLLINS, J. J. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. **Cell**, v. 135, n. 4, p. 679–690, 14 nov. 2008.

KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 311–320, 12 fev. 2010.

KROKAN, H. E.; BJØRÅS, M. Base excision repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. A012583, 1 abr. 2013.

LIU, Y. C.; HUANG, W. K.; HUANG, T. S.; KUNIN, C, M. Detection of antimicrobial activity in urine for epidemiologic studies of antibiotic use. **Journal of clinical epidemiology**, v. 52, n. 6, p. 539–545, jun. 1999.

LIU, Y.; IMLAY, J. A. Cell Death from Antibiotics Without the Involvement of Reactive Oxygen Species. **Science**, v. 339, n. 6124, 2013.

LORIAN, V. Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 51, n. 9, p. 1046–1055, out. 1975.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Lung infections associated with cystic fibrosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 194–222, abr. 2002.

MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. **Nature**, v. 355, n. 6357, p. 273–275, 16 jan. 1992.

MANDSBERG, L. F.; CIOFU, O.; KIRKBY, N.; CHRISTIANSEN, L. E.; POULSEN, H. E.; HOIBY, N. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2483–2491, 1 jun. 2009.

MICHAELS, M. L.; CRUZ, C.; GROLLMAN, A. P.; MILLER, J. H. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 15, p. 7022–7025, 1 ago. 1992.

MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H. The GO system protects organisms from the mutagenic

effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 20, p. 6321–6325, out. 1992.

MICHEL, B. After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us. **PLoS Biology**, v. 3, n. 7, p. E255, 12 jul. 2005.

MILLER, C.; THOMSEN, L. E.; GAGGERO, C.; MOSSERI, R.; INGMER, H.; COHEN, S. N. SOS Response Induction by  $\beta$ -Lactams and Bacterial Defense Against Antibiotic Lethality. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1629–1631, 10 set. 2004.

MILLER, J. H.; MICHAELS, M. Finding new mutator strains of *Escherichia coli*--a review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 129–132, 7 nov. 1996.

MULLER, F. L.; LIU, Y.; VAN REMMEN, H. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p. 49064–49073, 19 nov. 2004.

NAPOLITANO, R.; JANEL-BINTZ, R.; WAGNER, J.; FUCHS, R. P. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. **The EMBO journal**, v. 19, n. 22, p. 6259–6265, 15 nov. 2000.

NEELEY, W. L.; DELANEY, S.; ALEKSEYEV, Y. O.; JAROSZ, D. F.; DELANEY, J. C.; WALKER, G. C. DNA Polymerase V Allows Bypass of Toxic Guanine Oxidation Products *in Vivo*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 17, p. 12741–12748, 27 abr. 2007.

NOHMI, T.; BATTISTA, J. R.; DODSON, L. A.; WALKER, G. C. RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 6, p. 1816–1820, mar. 1988.

O'SULLIVAN, D. M.; HINDS, J.; BUTCHER, P. D.; GILLESPIE, S. H.; MCHUGH, T. D. Mycobacterium tuberculosis DNA repair in response to subinhibitory concentrations of ciprofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 1199–1202, dez. 2008.

OHMORI, H.; FRIEDBERG, E. C.; FUCHS, R. P.; GOODMAN, M. F.; HANAOKA, F.; HINKLE, D. The Y-family of DNA polymerases. **Molecular cell**, v. 8, n. 1, p. 7–8, jul. 2001.

OLIVER, A.; CANTÓN, R.; CAMPO, P.; BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. **Science**, v. 288, n. 5469, 2000.

OLIVER, A.; LEVIN, B. R.; JUAN, C.; BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4226–4233, 1 nov. 2004.

OLIVER, A.; SÁNCHEZ, J. M.; BLÁZQUEZ, J. Characterization of the GO system of *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 1, p. 31–35, 1 nov. 2002.

OLSON, M. V.; STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959–964, 21 ago. 2000.

- OSMAN, K. M.; ALABADY, M. S.; ATA, N.; EZZELDIN, N. A.; ALY, M. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human and animal sources in Egypt. **Zoonoses and public health**, v. 57, n. 5, p. 329–338, ago. 2010.
- PÁEZ, P. L.; BECERRA, M. C.; ALBESA, I. Antioxidative mechanisms protect resistant strains of *Staphylococcus aureus* against ciprofloxacin oxidative damage. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 6, p. 771–776, 1 dez. 2010.
- PAGÈS, V.; FUCHS, R. P. Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5623, p. 1300–1303, 23 maio 2003.
- PEREZ-CAPILLA, T.; BAQUERO, M. R.; GOMEZ-GOMEZ, J. M.; IONEL, A.; MARTIN, S.; BLAZQUEZ, J. SOS-Independent Induction of *dinB* Transcription by  $\beta$ -Lactam-Mediated Inhibition of Cell Wall Synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 4, p. 1515–1518, 15 fev. 2005.
- PHILLIPS, I.; CULEBRAS, E.; MORENO, F.; BAQUERO, F. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 20, n. 5, p. 631–638, nov. 1987.
- PLASENCIA, V.; BORRELL, N.; MACIÁ, M. D.; MOYA, B.; PÉREZ, J. L.; OLIVER, A. Influence of high mutation rates on the mechanisms and dynamics of in vitro and in vivo resistance development to single or combined antipseudomonal agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2574–2581, 1 jul. 2007.
- PLETZ, M. W. R.; RAU, M. B. J.; DE ROUX, A.; BURKHARDT, O.; KRUSE, G. Ertapenem Pharmacokinetics and Impact on Intestinal Microflora, in Comparison to Those of Ceftriaxone, after Multiple Dosing in Male and Female Volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3765–3772, 1 out. 2004.
- POHLHAUS, J. R.; KREUZER, K. N. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks, causing double-stranded breaks *in vivo*. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1416–1429, jun. 2005.
- POOLE, K. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *Microbe*. **Microbe**, v. 3, p. 179–185, 2008.
- POWER, E. G. M.; PHILLIPS, I. Induction of the SOS gene (*umuC*) by 4-quinolone antibacterial drugs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 78–82, 1 fev. 1992.
- RANGARAJAN, S.; WOODGATE, R.; GOODMAN, M. F. A phenotype for enigmatic DNA polymerase II: a pivotal role for pol II in replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 16, p. 9224–9229, 3 ago. 1999.
- SADER, H. S.; FARRELL, D. J.; FLAMM, R. K.; JONES, R. N.; ANZUETO, A.; MARTIN, C. D. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 78, n. 4, p. 443–448, 1 abr. 2014.
- SANDERS, L.H.; ROCKEL, A.; LU, H.; WOZNIAK, D. J.; SUTTON, M. D. Role of *Pseudomonas aeruginosa* *dinB*-encoded DNA polymerase IV in mutagenesis. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8573–8585, 15 dez. 2006a.

SANDERS, L. H.; SUDHAKARAN, J.; SUTTON, M. D. The GO system prevents ROS-induced mutagenesis and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS microbiology letters**, v. 294, n. 1, p. 89–96, maio 2009.

SCHAAPER, R.; BOND, B.; FOWLER, R. AT → CG transversions and their prevention by the *Escherichia coli* mutT and mutHLS pathways. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 219, n. 1–2, p. 256–262, out. 1989.

SHAFIROVICH, V.; KROPACHEV, K.; ANDERSON, T.; LIU, Z.; KOLBANOVSKIY, M.; MARTIN, B. D. Base and Nucleotide Excision Repair of Oxidatively Generated Guanine Lesions in DNA. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 10, p. 5309–5319, 4 mar. 2016.

SONG, L. Y.; GOFF, M.; DAVIDIAN, C.; MAO, Z.; LONDON, M.; LAM, K. Mutational Consequences of Ciprofloxacin in *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6165–6172, out. 2016.

STORVIK, K. A. M.; FOSTER, P. L. RpoS, the stress response sigma factor, plays a dual role in the regulation of *Escherichia coli*'s error-prone DNA polymerase IV. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 14, p. 3639–3644, 15 jul. 2010.

SUAREZ, C.; PEÑA, C.; ARCH, O.; DOMINGUEZ, M. A.; TUBAU, F.; JUAN, C. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 272, 13 out. 2011.

TEGOVA, R.; TOVER, A.; TARASSOVA, K.; TARK, M.; KIVISAAR, M. Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2735–2744, maio 2004.

THI, T. D.; LOPEZ, E.; RODRIGUEZ-ROJAS, A.; RODRIGUEZ-BELTRAN, J.; COUCE, A.; GUELFO, J. R. Effect of recA inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 531–538, 1 mar. 2011.

VALENCIA, E. Y.; ESPOSITO, F.; SPIRA, B.; BLÁZQUEZ, J.; GALHARDO, R. S. Ciprofloxacin-mediated mutagenesis is suppressed by subinhibitory concentrations of amikacin in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, 2017.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. M. Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 4, p. 256–280, abr. 2005.

VINCENT, J. L. Nosocomial infections in adult intensive-care units. **The Lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2068–2077, 14 jun. 2003.

WADE, J. T.; REPPAS, N. B.; CHURCH, G. M.; STRUHL, K. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. **Genes & Development**, v. 19, n. 21, p. 2619–2630, 1 nov. 2005.

WADHAWAN, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. A component of gamma-radiation-induced cell death in *E. coli* is programmed and interlinked with activation of caspase-3 and SOS response. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 8, p. 545–557, 27 ago. 2013.

WARNER, D. F.; NDWANDWE, D. E.; ABRAHAMS, G. L.; KANA, B. D.; MACHOWSKI, E. E.; VENCLOVAS, C. Essential roles for imuA'- and imuB-encoded accessory factors in DnaE2-dependent mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 29, p. 13093–13098, 20 jul. 2010.

WOLTER, D. J.; KHALAF, N.; ROBLEDO, I. E.; VAZQUEZ, G. J.; SANTE, M. I.; AQUINO, E. E. Surveillance of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: Dissemination of KPC and IMP-18 $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1660–1664, 1 abr. 2009.

YORDANOV, D.; STRATEVA, T. *Pseudomonas aeruginosa*? a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1133–1148, 1 set. 2009.

YSERN, P.; CLERCH, B.; CASTAÑO, M.; GIBERT, I; BARBÉ, J.; LLAGOSTERA, M. Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. **Mutagenesis**, v. 5, n. 1, p. 63–66, jan. 1990.