

**LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA**

**“Caracterização do mutante *phoU* de *Pseudomonas aeruginosa*”**

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

São Paulo  
2019



**LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA**

**“Caracterização do mutante *phoU* de *Pseudomonas aeruginosa*”**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o Programa de Pós-Graduação”.

São Paulo  
2019

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)

de Almeida, Luiz Gustavo  
Caracterização do mutante *phoU* de *Pseudomonas*  
*aeruginosa* / Luiz Gustavo de Almeida; orientador  
Beny Spira. -- São Paulo, 2018.  
112 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. MICROBIOLOGIA. 2. BACTERIOLOGIA. 3. BACTÉRIAS.  
4. BACTÉRIAS AERÓBICAS GRAM-NEGATIVAS. 5.  
PSEUDOMONAS. I. Spira, Beny, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Luiz Gustavo de Almeida  
Título da Dissertação: Caracterização do mutante *phoU* de *Pseudomonas aeruginosa*  
Orientador(a): Beny Spira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese do Doutorado, em sessão pública realizado a ...../...../..... considerou

**( ) Aprovado(a)**

**( ) Reprovado(a)**

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

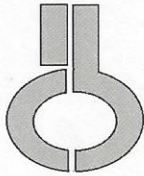
Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

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° **637/14** referente ao projeto intitulado: “*O gene PhoU e sua relação com ppGpp e o acúmulo de polifosfato em Pseudomonas aeruginosa*” sob a responsabilidade de **Luiz Gustavo de Almeida**, 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, 26 de fevereiro de 2014.

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

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





*Dedico esse trabalho à minha esposa, Sheila Zago e aos meus pais. Esse trabalho seria impossível sem vocês.*



## AGRADECIMENTOS

Especial agradecimento ao meu orientador Beny Spira, por todo o conhecimento passado e fundamental participação em toda minha pós-graduação durante os 10 anos que estive no laboratório.

Aos meus pais, Jadir Aparecido Almeida e Maria Lúcia Almeida, por serem a minha inspiração de como ser uma pessoa melhor, pelo apoio nas minhas escolhas e por tornarem possível a realização dos meus sonhos. Vocês sempre terão meu maior respeito e suporte.

À Sheila Zago, que continua sendo minha namorada desde o meu mestrado, agora como esposa e companheira para todas as horas.

Aos meus amigos e familiares que durante estes anos me apoiaram e ajudaram a superar mais este desafio com muita paciência, estímulo e carinho.

À Prof. Dr. Regina Lúcia Baldini e toda a equipe de seu laboratório que desde o início do meu mestrado me ajudou muito com todos os experimentos, discussões e dúvidas.

À Prof. Marílis do Valle Marques, por sua colaboração intelectual, apoio e utilização de recursos de seu laboratório.

Ao Prof. Carlos Tabora por me receber em seu laboratório. Especial agradecimento à pos-doc do laboratório, Luciana Thomaz, que se tornou uma grande amiga de bancada e me ensinou muito e teve participação crucial na reta final do meu doutorado.

Aos técnicos do laboratório que auxiliaram na preparação do material para que todos os experimentos fossem realizados.

À secretária da pós-graduação, Gisele, que sempre me ajudou em todas as etapas de documentação tanto do mestrado quanto do doutorado.

Aos meus amigos de laboratório que sempre me ajudaram em todos os momentos. Aos que estão atualmente no laboratório, Vinícius, Nicole, Gabriela, Taissa, Kátia, Ynes, Auri. Aos que já passaram no laboratório durante o doutorado, Gardênia, Nicolás, Gabriela, Ariel. Especial agradecimento ao Henrique Neves pela amizade durante os 10 anos de laboratório, certamente aprendemos muito um com o outro e a amizade não se restringiu apenas ao laboratório.

À Natalia Pasternak Taschner, amiga de divulgação científica e depois da vida, dentro e fora do laboratório. Nossas valiosas conversas sobre ciência contribuíram muito para a formação do meu pensamento crítico e científico.

Ao financiamento concedido pela CAPES e FAPESP, indispensáveis para que eu pudesse realizar todas as etapas deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.



## RESUMO

Uma das características mais notáveis de microrganismos é a capacidade de adaptação às mudanças do ambiente. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é encontrada em diversos habitats, alguns com condições bastante desfavoráveis à sobrevivência e ao crescimento. Para adaptar-se à diferentes condições ambientais, *P. aeruginosa* possui um arsenal sofisticado de genes e regulons que controlam a expressão gênica. A baixa disponibilidade de fosfato solúvel no meio gera a expressão coordenada dos genes do regulon PHO, entre eles, o operon *pst*, que codifica um sistema de transporte de fosfato inorgânico (Pi) de alta afinidade. O último gene do operon *pst* codifica a proteína PhoU, que não participa do transporte de Pi, mas que, em conjunto com o sistema Pst, atua como repressora da expressão do regulon PHO quando há excesso desse nutriente no meio. *P. aeruginosa* também é um patógeno oportunista, que tem a capacidade de infectar uma ampla gama de organismos hospedeiros, de plantas a humanos. A promiscuidade patogênica dessa bactéria é devida a um repertório variado de genes de virulência em seu genoma. Nessa tese são descritos diversos aspectos relacionados aos efeitos fenotípicos do nocaute de *phoU* na cepa PA14 de *P. aeruginosa*. Entre eles, foi analisado o efeito da mutação *phoU* sobre a virulência em larvas de *Galleria mellonella* e a capacidade antibacteriana de nanopartículas de prata. Foram também estudados os efeitos da suplementação de ferro e magnésio no meio sobre o crescimento bacteriano e a atividade enzimática da fosfatase alcalina. O metaboloma do mutante *phoU* e da cepa selvagem cultivados em carência e suficiência de fosfato foi comparado. Além disso, isolados de um experimento de evolução em cultura contínua foram sequenciados e os fenótipos de virulência e sensibilidade à antibióticos foram avaliados. Os resultados mostram que a concentração de ferro interfere na taxa de crescimento e no rendimento do mutante *phoU* além de aumentar fortemente a atividade da fosfatase alcalina. Por outro lado, a suplementação de magnésio interfere no rendimento e na motilidade do tipo *swarming*. Além disso foi mostrado que o mutante *phoU* é muito menos virulento quando comparado com a cepa selvagem. Por último, foram identificados SNPs em alguns genes dos isolados do experimento de evolução no quimiostato. A virulência foi parcialmente restaurada nos isolados em comparação à cepa ancestral. Foram feitas tentativas no sentido de complementar as mutações com os genes selvagens correspondentes.

**Palavras chaves:** Polifosfato, fosfato, *Pseudomonas aeruginosa*, *phoU*, operon *pst*, regulon PHO, ppGpp.



## ABSTRACT

One of the most notable characteristics of microorganisms is their ability to adapt to environmental changes. *Pseudomonas aeruginosa* is found in several habitats, some with conditions quite unfavorable to survival and growth. To adapt to different environmental conditions, *P. aeruginosa* has a sophisticated arsenal of genes and regulons that control gene expression. Low availability of soluble phosphate in the media triggers the coordinate expression of the PHO regulon genes, among them, the *pst* operon, which encodes a high-affinity inorganic phosphate (Pi) transport system. The last *pst* operon gene encodes the PhoU protein, which does not participate in the Pi transport, but which, together with the Pst system, acts as a repressor of PHO regulon expression when there is an excess of that nutrient in the media. *P. aeruginosa* is also an opportunistic pathogen, which has the ability to infect a wide range of host organisms, from plants to humans. The pathogenic promiscuity of this bacteria is due to a varied repertoire of virulence genes in its genome. In this thesis several aspects related to the phenotypic effects of the *phoU* knockout in the PA14 strain of *P. aeruginosa* are described. Among them, the effect of *phoU* mutation on virulence in *Galleria mellonella* larvae and the antibacterial capacity of silver nanoparticles was analyzed. The effects of iron and magnesium supplementation in the media on bacterial growth and the enzymatic activity of alkaline phosphatase have also been studied. The *phoU* mutant and the wild-type strain metabolome cultivated in phosphate deficiency and sufficiency was compared. In addition, isolates from a continuous culture evolution experiment were sequenced and virulence and antibiotic susceptibility phenotypes were evaluated. The results show that the iron concentration affects the growth rate and yield of the *phoU* mutant in addition to strongly increasing alkaline phosphatase activity. On the other hand, magnesium supplementation interferes with swarming performance and motility. In addition, it has been shown that the *phoU* mutant is much less virulent when compared to the wild-type strain. Finally, SNPs were identified in some genes from the isolates from the chemostat evolution experiment. Virulence was partially restored in the isolates compared to the ancestral strain. Attempts have been made to complement the mutations with the corresponding wild-type genes.

**Key words:** Polyphosphate, phosphate, *Pseudomonas aeruginosa*, operon *pst*, PHO regulon, ppGpp.





## SUMÁRIO

Sumário . . . . .	5	
Lista de ilustrações . . . . .	8	
Lista de tabelas . . . . .	10	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO . . . . .</b>	<b>21</b>
1.1	O Regulon PHO . . . . .	21
1.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	23
1.3	O gene <i>phoU</i> . . . . .	25
1.4	Fosfatase alcalina . . . . .	26
1.5	Resistência a antibióticos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	27
1.5.1	Permeabilidade da membrana celular . . . . .	28
1.5.2	O sistema de bombas de efluxo . . . . .	29
1.5.3	Inativação e modificação de antibióticos . . . . .	31
1.5.4	Mutações nos alvos dos antibióticos . . . . .	32
1.6	Nanopartículas de prata (AgNPs) . . . . .	33
1.6.1	Mecanismos antibacterianos por contato direto com microrganismos . . . . .	34
1.6.2	Mecanismos antibacterianos mediados pela liberação de íons de prata . . . . .	35
1.7	<i>Galleria mellonella</i> . . . . .	37
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS . . . . .</b>	<b>39</b>
2.1	Bactérias e plasmídios utilizados . . . . .	39
2.2	Meios de cultura . . . . .	39
2.3	Construção de cepas e plasmídios . . . . .	41
2.3.1	PCR . . . . .	41
2.3.2	Construção do mutante <i>phoU</i> . . . . .	42
2.3.3	Construção do duplo mutante $\Delta phoU \Delta ppk$ . . . . .	43
2.3.4	Clonagem dos genes mutantes e selvagens dos isolados do quimiostato . . . . .	44
2.4	Técnicas de Biologia Molecular . . . . .	45
2.4.1	Gel de poliacrilamida para polifosfato . . . . .	45
2.4.2	Metaboloma . . . . .	45
2.4.3	Sequenciamento genômico da cepa selvagem, do mutante <i>phoU</i> e dos isolados I4, I5 e I6 . . . . .	46
2.5	Técnicas bioquímicas . . . . .	46
2.5.1	Microdeterminação de fosfato . . . . .	46
2.5.2	Extração de polifosfato . . . . .	47
2.5.3	Quantificação do polifosfato pela microdeterminação de Pi . . . . .	47

2.5.4	Extração de piocianina . . . . .	48
2.5.5	Síntese das nanopartículas de prata (AgNP) . . . . .	48
2.6	Ensaio enzimáticos . . . . .	48
2.6.1	Fosfatase alcalina . . . . .	48
2.7	Outros . . . . .	49
2.7.1	Curva de crescimento e rendimento da cultura . . . . .	49
2.7.2	Ensaio de resistência a antibióticos . . . . .	49
2.7.3	Ensaio de motilidade: <i>Swarming</i> . . . . .	50
2.7.4	Insetos . . . . .	50
2.7.4.1	<i>Galleria mellonella</i> como modelo de infecção de <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	50
2.7.4.2	Ensaio de atividade da fenoxidase . . . . .	51
2.7.4.3	Contagem dos hemócitos totais . . . . .	51
2.8	Teste de sensibilidade a nanopartículas de prata . . . . .	52
3	RESULTADOS . . . . .	53
3.1	Deleção do gene <i>phoU</i> . . . . .	53
3.2	Cinética de crescimento e consumo de fosfato do mutante $\Delta phoU$ . . . . .	54
3.3	Acúmulo de poliP no mutante <i>phoU</i> . . . . .	55
3.4	Efeito da suplementação de íons de magnésio sobre o mutante <i>phoU</i> . . . . .	56
3.4.1	Efeito de íons de magnésio sobre o rendimento do mutante <i>phoU</i> . . . . .	57
3.4.2	Efeito de íons de magnésio sobre a taxa de crescimento do mutante <i>phoU</i> . . . . .	58
3.4.3	Efeito de íons de magnésio sobre o consumo de Pi do mutante <i>phoU</i> . . . . .	59
3.4.4	Efeito de íons de magnésio sobre o acúmulo de poliP no mutante <i>phoU</i> . . . . .	60
3.4.5	Efeito de íons de magnésio sobre a motilidade do tipo <i>swarming</i> . . . . .	61
3.4.6	Efeito de íons de magnésio sobre a resistência a antibióticos do mutante <i>phoU</i> . . . . .	62
3.4.7	Efeito de íons de magnésio sobre a produção de piocianina . . . . .	62
3.5	Deteção da atividade de fosfatase alcalina em <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	64
3.6	Efeitos da adição de altas concentrações de ferro ao meio de cultura . . . . .	66
3.6.1	Concentrações crescentes de íon férrico aumentam a atividade da FA na cepa PA14 . . . . .	67
3.6.1.1	A FA de PA14 é parcialmente secretada . . . . .	70
3.6.2	Efeito da suplementação de íons de ferro sobre a taxa de crescimento de PA14WT e do mutante <i>phoU</i> . . . . .	70
3.6.3	Efeito da suplementação de íons de ferro sobre o consumo de Pi em PA14WT e no mutante <i>phoU</i> . . . . .	71
3.7	Inviabilidade do duplo mutante PA14 <i>phoU ppk</i> . . . . .	73
3.8	Análise metabolômica da cepa selvagem PA14 e do mutante <i>phoU</i> . . . . .	74
3.8.1	Efeito da carência de fosfato sobre o metaboloma de PA14 . . . . .	74

3.8.2	Efeito da mutação <i>phoU</i> sobre o metaboloma de PA14 . . . . .	74
3.9	Efeito da mutação <i>phoU</i> sobre a virulência de <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	76
3.9.1	Efeito da mutação <i>phoU</i> sobre a sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i> . .	77
3.9.2	Atividade da fenoloxidase na hemolinfa de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>P. aeruginosa</i> selvagem e com o mutante <i>phoU</i> . . . . .	78
3.9.3	Contagem de UFC na hemolinfa de <i>G. mellonella</i> . . . . .	79
4	<b>NANOPARTÍCULAS DE PRATA</b> . . . . .	81
4.1	Produção das AgNPs . . . . .	81
4.2	Uso de <i>Galleria mellonella</i> para avaliar a eficácia antibacteriana de na- nopartículas de prata . . . . .	81
4.3	Sobrevivência . . . . .	82
4.4	UFC . . . . .	83
4.5	Atividade de fenoloxidase . . . . .	84
5	<b>ANÁLISE DOS ISOLADOS DE UM EXPERIMENTO DE EVOLUÇÃO NO QUIMIOSTATO COM O MUTANTE <i>PHOU</i></b> . . . . .	87
5.1	Sequenciamento genômico do mutante <i>phoU</i> e dos isolados do quimiostato	87
5.2	Complementação das mutações dos isolados do quimiostato . . . . .	89
5.3	Antibiograma dos isolados do quimiostato e de seus transformantes . . .	91
5.4	Virulência dos isolados do quimiostato . . . . .	94
6	<b>DISCUSSÃO</b> . . . . .	97
6.1	Magnésio e o crescimento bacteriano . . . . .	97
6.2	Efeito de íons de magnésio sobre o consumo de fosfato e o acúmulo de poliP do mutante <i>phoU</i> . . . . .	97
6.3	Efeito dos íons de magnésio sobre a motilidade do tipo <i>swarming</i> e a produção de piocianina . . . . .	98
6.4	Consequências da adição de ferro sobre a taxa de crescimento, rendi- mento e atividade de FA . . . . .	99
6.5	Metaboloma de PA14 e do mutante <i>phoU</i> . . . . .	100
6.6	Virulência do mutante <i>phoU</i> . . . . .	102
6.7	AgNPs . . . . .	105
6.8	Complementação dos SNPs encontrados nos isolados do quimiostato . .	106
7	<b>CONCLUSÕES</b> . . . . .	109
	<b>ANEXO A – ANTIBIOGRAMAS DOS ISOLADOS DO QUIMIOSTATO</b>	111
	<b>REFERÊNCIAS</b> . . . . .	121

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo de regulação do Regulon PHO . . . . .	22
Figura 2 – Operon <i>pst</i> de <i>E. coli</i> e de <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	24
Figura 3 – Alinhamento dos genomas das cepas PA14 e PAO1 . . . . .	25
Figura 4 – Sítios de inserção de transposons no operon <i>pst</i> de <i>Sinorhizobium meliloti</i> . . . . .	26
Figura 5 – Hidrólise de pNPP . . . . .	27
Figura 6 – Sistemas de Efluxo . . . . .	30
Figura 7 – MexAB-OprM . . . . .	31
Figura 8 – Estratégias de resistência a antibióticos . . . . .	33
Figura 9 – Interação entre as AgNPs e o peptidoglicano . . . . .	34
Figura 10 – Mecanismos antibacterianos de AgNPs . . . . .	37
Figura 11 – Deleção do mutante <i>phoU</i> . . . . .	53
Figura 12 – Cinética do consumo de Pi . . . . .	54
Figura 13 – Acúmulo de Polifosfato . . . . .	56
Figura 14 – Rendimento do mutante <i>phoU</i> . . . . .	57
Figura 15 – Curva de crescimento do mutante <i>phoU</i> . . . . .	59
Figura 16 – Consumo de Pi do mutante <i>phoU</i> . . . . .	60
Figura 17 – Acúmulo de poliP do mutante <i>phoU</i> . . . . .	61
Figura 18 – Efeito do Mg <sup>2+</sup> sobre a <i>swarm</i> em PA14 . . . . .	62
Figura 19 – Antibiograma do mutante <i>phoU</i> . . . . .	63
Figura 20 – Produção de piocianina . . . . .	64
Figura 21 – Fluxograma de ensaios de FA . . . . .	66
Figura 22 – Concentração de ferro afeta a FA . . . . .	67
Figura 23 – Atividade de FA em meio HGP . . . . .	68
Figura 24 – Atividade de FA em meio A . . . . .	69
Figura 25 – FA no sobrenadante da cultura . . . . .	71
Figura 26 – Curva de crescimento com suplementação de FeCl <sub>3</sub> . . . . .	72
Figura 27 – Consumo de Pi ao adicionar FeCl <sub>3</sub> . . . . .	73
Figura 28 – Metaboloma de PA14 . . . . .	75
Figura 29 – Metaboloma do mutante <i>phoU</i> . . . . .	76
Figura 30 – Sobrevivência de <i>G. mellonella</i> . . . . .	77
Figura 31 – Atividade de fenoloxidase . . . . .	78
Figura 32 – Contagem de UFC na hemolinfa de <i>G. mellonella</i> . . . . .	79
Figura 33 – Nanopartículas de prata . . . . .	82
Figura 34 – Sobrevivência de <i>G. mellonella</i> . . . . .	83
Figura 35 – Contagem de UFC na hemolinfa de <i>G. mellonella</i> . . . . .	84
Figura 36 – Atividade de fenoloxidase . . . . .	85
Figura 37 – Clonagem dos genes do mutante <i>phoU</i> . . . . .	90
Figura 38 – Antibiograma: <i>nppC</i> I4 . . . . .	92

Figura 39 – Antibiograma: <i>nppC</i> I5 . . . . .	93
Figura 40 – Antibiograma: <i>nppC</i> I6 . . . . .	94
Figura 41 – Sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectada com os isolados do quimiostato . . . . .	95
Figura 42 – Antibiograma: PA14_57610 I4 . . . . .	111
Figura 43 – Antibiograma: PA14_57610 I5 . . . . .	112
Figura 44 – Antibiograma: PA14_57610 I6 . . . . .	113
Figura 45 – Antibiograma: <i>dnpA</i> I4 . . . . .	114
Figura 46 – Antibiograma: <i>dnpA</i> I5 . . . . .	115
Figura 47 – Antibiograma: <i>dnpA</i> I6 . . . . .	116
Figura 48 – Antibiograma: <i>impA</i> I4 . . . . .	117
Figura 49 – Antibiograma: <i>impA</i> I5 . . . . .	118
Figura 50 – Antibiograma: <i>impA</i> I6 . . . . .	119

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <b>Lista de bactérias e plasmídios</b> . . . . .	40
Tabela 2 – <b>Tabela de Iniciadores</b> . . . . .	41
Tabela 3 – <b>Comparação entre o método de Neznansky et al. (1) e o método padrão utilizado no laboratório para medir a atividade da FA.</b> . . . . .	65
Tabela 4 – <b>SNP-table</b> . . . . .	88

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O Regulon PHO

Bactérias são organismos capazes de adaptar-se rapidamente à mudanças no ambiente, por meio da modulação de seu metabolismo e fisiologia às novas condições do meio. Estas características são relevantes para que bactérias consigam colonizar os mais diversos ambientes, aquáticos, terrestres e hospedeiros. A cascata de sinalização de resposta à mudanças no ambiente envolve uma série de proteínas, cujo objetivo final é induzir a expressão de genes que coletivamente são chamados de regulon. O regulon é, portanto, um dos principais sistemas de resposta e adaptação às condições ambientais (2).

Uma situação comumente encontradas no ciclo de vida de bactérias é a carência de nutrientes, como o fósforo. A principal fonte de fósforo para bactérias como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* é o ortofosfato ou fosfato inorgânico ( $\text{PO}_4^{3-}$  ou Pi) (3, 4, 5). O regulon PHO é composto por uma rede de genes e operons relacionados à captação e assimilação de Pi para promover a sobrevivência e o crescimento bacteriano em condições limitantes deste nutriente (6). Em *P. aeruginosa*, o regulon PHO consiste de mais de 40 genes e operons (7). Os genes pertencentes a este regulon carregam em seus promotores, uma ou mais sequências consenso conhecidas como **PHO-box** no lugar da região -35 convencional (8). O PHO-box é uma sequência de 18 pb que encontra-se 10 pb acima da sequência -10 (9). A transcrição dos genes de PHO é regulada por um sistema de dois componentes formado por PhoB e PhoR. Em condições de carência de Pi, ou seja, quando a concentração de Pi no ambiente cai abaixo de 4  $\mu\text{M}$ , PhoR, que está localizada na membrana interna, se autofosforila e transfere o grupo Pi para a proteína PhoB. Uma vez fosforilada, PhoB, que é o ativador transcricional dos genes de PHO, liga-se aos PHO-boxes presentes nas regiões promotoras e interage com  $E\sigma^D$  iniciando a transcrição dos genes deste regulon (10).

O operon *pst*, pertencente ao regulon PHO codifica um sistema do tipo ABC (*ATP-binding*

*cassete*) de transporte de Pi, formado por 4 proteínas: PstS, uma proteína periplasmática, cuja função é ligar moléculas de ortofosfato e conduzi-las ao canal formado pelas proteínas integrais de membrana PstC e PstA ; e PstB, que é uma ATPase que fornece energia ao transporte (11, 12). Além do transporte de Pi, as proteínas Pst, juntamente com PhoU atuam como repressoras do regulon PHO quando a bactéria se encontra em um ambiente com excesso de Pi. A Figura 1 mostra um modelo do funcionamento da regulação de PHO.

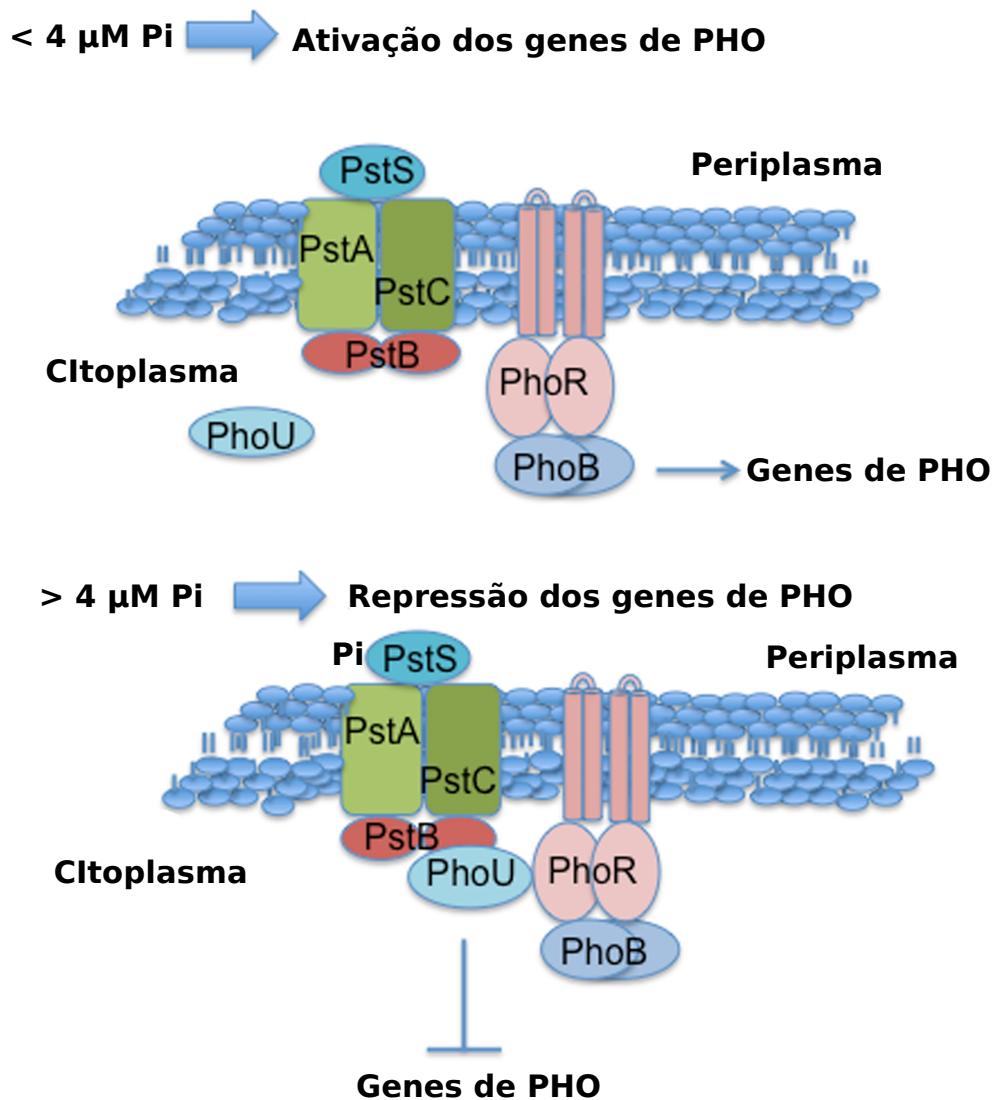


Figura 1 – **Modelo de regulação do Regulon PHO.** Os processos de inibição, ativação e desativação de PhoR estão representados. A proteína periplasmática PstS, encontra-se saturada quando Pi está em excesso. Nestas condições, um sinal é propagado para PhoR levando à formação Repressora de PhoR, que desfosforila PhoB. Em condições de limitação de Pi (ou na ausência de alguma proteína do operon *pst*), ocorre sinalização para que PhoR se autofosforile, e transfira o grupo Pi para PhoB. Adaptado de (13)



## 1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é uma proteobactéria  $\gamma$  encontrada em reservatórios naturais de água, no solo, em plantas e em animais. Em humanos, causa infecções associadas à queimaduras severas e é um patógeno oportunista de pacientes imunodeprimidos e portadores de fibrose cística (14). O gênero *Pseudomonas* é conhecido também pela produção de piocianina, que é um pigmento verde-azulado solúvel em água que tem ação contra bactérias, fungos e protozoários (15).

Aproximadamente 10% do genoma de *P. aeruginosa* é dedicado à regulação gênica. Uma característica marcante dessa bactéria é a presença de 129 genes que codificam sistemas de dois componentes, responsáveis pela resposta imediata à mudanças nas condições ambientais (16).

o regulon PHO de *P. aeruginosa* não foi tão bem caracterizado como em *E. coli*, porém uma análise *in silico* previu a presença de 73 PHO-boxes no genoma da cepa PA01 (17). O operon *pst* de *P. aeruginosa* também é composto por 5 genes, assim como o de *E. coli* 2. A principal diferença é que em *E. coli*, o operon *pst* é governado por um promotor principal contendo dois PHO-boxes antecedentes ao gene proximal, *pstS* (18), enquanto que em *P. aeruginosa*, existe um único PHO-box que antecede *pstS* e outro entre *pstS* e *pstC* (7). Assim como em *E. coli*, o último gene do operon, *phoU*, codifica uma proteína que não participa do transporte de Pi, mas atua como repressor de PHO (19).

A cepa UCBPP-PA14 (ou simplesmente PA14), escolhida como cepa padrão deste estudo, é um isolado clínico que pode infectar diferentes tipos de hospedeiros de categorias filogenéticas distintas (20). Apesar de não ser a cepa padrão de *P. aeruginosa* mais utilizada, o genoma de PA14 foi totalmente sequenciado e anotado (21). Além disso, a cepa PA01, mais comumente utilizada, sofreu microevolução com o passar dos anos, comprometendo a reprodutibilidade dos resultados em diferentes laboratórios (22).

Os genomas de PA14 e de PA01 são semelhantes quanto ao tamanho (PA14 = 6,537,648

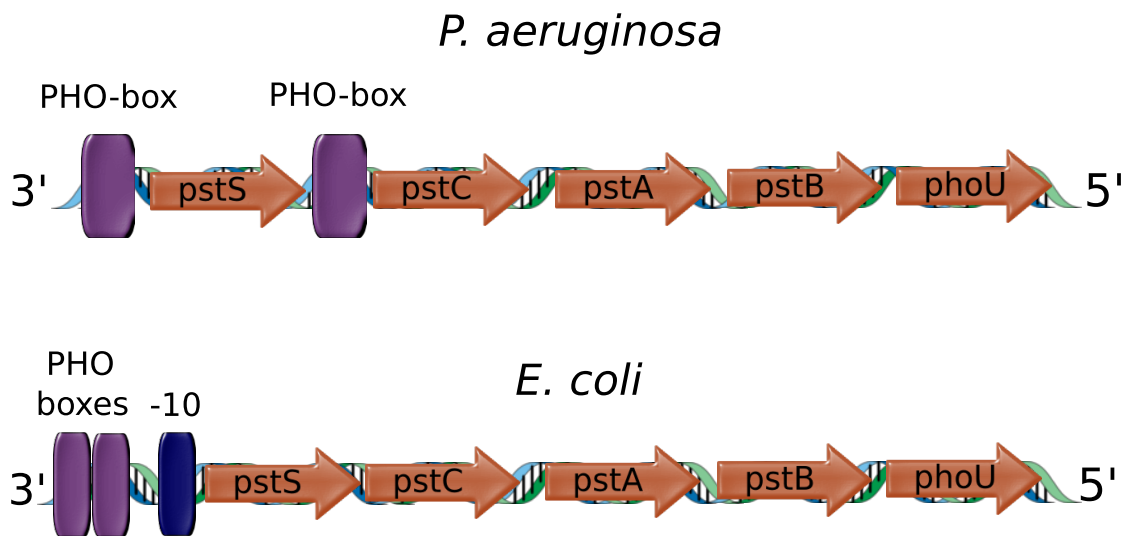


Figura 2 – Esquema representativo do operon *pst* de *P. aeruginosa* e de *E. coli*

pares de base e PAO1 = 6,264,403 pares de base), conteúdo de GC (PA14 = 66.3% 4.3; PAO1 = 66.6%) e número total de genes (PA14 = 5973; PAO1 = 5651). A principal diferença entre as duas cepas é a presença de uma inversão de um grande cluster de RNA ribossômico (16, 21). Foi mostrado também que 18 isolados distintos de *P. aeruginosa* eram mais semelhantes, do ponto de vista genômico (isto é, em relação à grande inversão), à cepa PA14 do que à cepa PAO1. Além disso clones adicionais de PAO1 (distintos do isolado que foi sequenciado) também continham a mesma inversão encontrada em PA14 (23). Portanto a inversão no genoma de PA14 parece ser mais representativa do genoma canônico, ou ancestral, de *P. aeruginosa* do que do isolado de PAO1. No entanto, as consequências fisiológicas de tal inversão e ciclo de replicação assimétrica não são claras (23). A Figura 3 mostra o local exato dessa grande inversão no genoma de PA14 quando comparado com o genoma de PAO1.

PA14 também contém duas ilhas de patogenicidade (PAPI-1 e PAPI-2) que estão ausentes em PAO1, e estas possuem vários genes relacionados à virulência. Como exemplo, podemos citar o gene *exoU*, que codifica um efetor do sistema de secreção tipo III (T3SS), e os sistemas de dois componentes Rcs/Pvr que controlam o cluster fimbrial *cupD* (21, 24). Um estudo recente mostrou ainda que a deleção de uma ou ambas as ilhas de patogenicidade afeta a virulência da

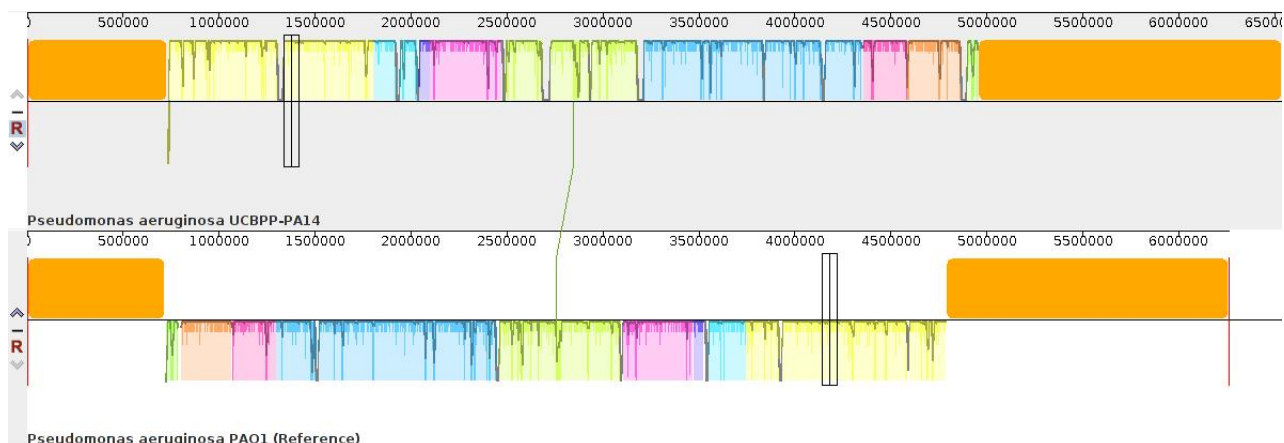


Figura 3 – Alinhamento dos genomas das cepas PA14 e PAO1 de *P. aeruginosa*. A sequência PAO1 contém uma inversão em relação a PA14 resultante de um evento de recombinação presumida entre dois dos clusters de rRNA. O alinhamento foi feito utilizando o software Mauve, versão 2.4.0

PA14 em modelos murinos de pneumonia aguda e bacteremia (25).

### 1.3 O gene *phoU*

Em *P. aeruginosa* PhoU é uma proteína de 250 aminoácidos e 27,5 kDa, codificada pelo gene de mesmo nome, localizado na porção distal do operon *pst* (26). A similaridade entre as sequências de PhoU de *E. coli* e de *P. aeruginosa* é de 50%

Além do seu papel repressor sobre a transcrição do regulon PHO em condições de excesso de Pi no meio, foi sugerido que a proteína PhoU de *E. coli* agiria diretamente sobre o sistema Pst, inibindo o transporte de Pi quando sua concentração intracelular fosse elevada (27, 28).

Altos níveis de Pi intracelular deslocam a atividade bioquímica de PhoR de quinase para fosfatase de PhoB. Foi proposto que PhoU estaria interagindo com PhoR, modulando a sua atividade. Ao se ligar em PhoR, o domínio catalítico dessa proteína seria reprimido, inibindo a atividade de quinase da mesma (28).

A mutação do gene *phoU* de *P. aeruginosa* causa a expressão constitutiva de PHO, aumenta o consumo de Pi e o acúmulo de polifosfato além de diminuir a resistência a estresses ambientais e a antibióticos (19).

PhoU aparenta ser um regulador global negativo além de seu papel no metabolismo de Pi,

conforme sugerido por Li e Zhang. Nesse estudo o mutante *phoU* de *E. coli* apresentou também um defeito dramático em relação à persistência aos antibióticos ampicilina e gentamicina (29).

Em *Sinorhizobium meliloti*, uma  $\alpha$ -Proteobacteria, o operon *pst* é precedido por *phoR* e seguido por *phoB* 4. Foi demonstrado que nessa bactéria, a mutação não-polar de *phoU* é letal, quando a mesma é cultivada em altas concentrações de Pi. A mutação *phoU* ocasionou um alto consumo de Pi que ao acumular-se, era tóxico para a bactéria (30). Em um outro estudo, diCenzo e colaboradores (31) analisaram os sítios de inserção de transposons em *S. meliloti* e mostraram que a frequência de inserções em *phoU* era extremamente baixa, como mostra a figura 4.

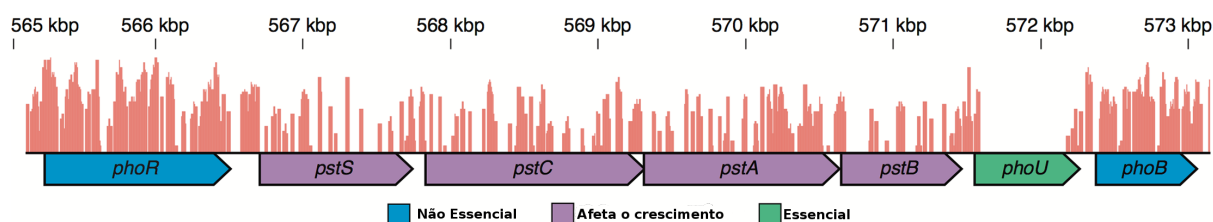


Figura 4 – **Sítios de inserções de transposons no operon *pst* de *Sinorhizobium meliloti*.** As posições dos nucleotídeos cromossômicos são indicadas ao longo do topo da imagem, e a localização e a abundância relativa das inserções do transposon são indicadas pelas barras vermelhas. Genes não essenciais contêm uma alta densidade de inserções de transposons, enquanto genes essenciais têm poucas ou nenhuma inserção de transposon. Os genes são codificados por cores com base em sua classificação de fitness. Os genes *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU* e *phoB* são co-transcritos como um único operon. Mutações não-polares de *phoU* são letais em *S. meliloti*, enquanto que mutações polares não são letais. Adaptado de (31)

## 1.4 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (FA) é uma fosfomonoesterase capaz de hidrolisar diferentes ésteres de monofosfato, liberando Pi após a reação. Como o nome sugere, a sua atividade ótima ocorre em pH alcalino (32). Até o presente momento foram identificadas 3 famílias de genes que codificam fosfatases alcalinas em procariotos, que foram denominadas PhoA, PhoX e PhoD (33). Essas enzimas são amplamente distribuídas na natureza, de bactérias a humanos e plantas (34, 35).

O gene *phoA* de *P. aeruginosa*, assim como o de *E. coli*, pertence ao regulon PHO (4). Portanto, essas bactérias induzem a produção de FA somente quando há baixa disponibilidade de

Pi no meio(4, 36).

Zimmerman e colaboradores calcularam que 31.0% de 3058 procariotos sequenciados apresentam o potencial genético para produzir pelo menos uma das 3 famílias de FA (37). A FA é geralmente um homodímero dependente de  $Mg^{2+}$  e  $Zn_2^+$ . Diferentemente desta enzima, os monómeros PhoD e PhoX tem como co-fator  $Ca_2^+$  (38, 39). A Figura 5 mostra a reação de hidrólise do substrato p-nitrofenilfosfato, que resulta em p-nitrofenol e Pi pela ação da FA.

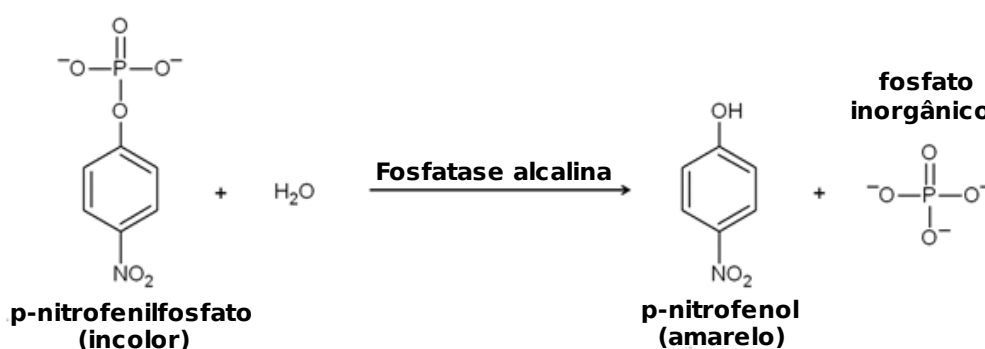


Figura 5 – Hidrólise do p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol e Pi por ação da FA.

Cheng e colaboradores mostraram que ao lavar as células de *P. aeruginosa* com 0.2 M de  $MgCl_2$  em pH alcalino, a FA era liberada para o sobrenadante. Os autores sugeriram que a FA de *P. aeruginosa* estaria ligada a outros componentes do periplasma através de pontes de íons metálicos divalentes, possivelmente íons  $Mg^{2+}$ . Essa hipótese seria corroborada pelo fato de que enzimas citoplasmáticas, ou ancoradas no citoplasma, não foram liberadas durante os experimentos (40). Isso não acontecia com a FA de *E. coli*.

## 1.5 Resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa*

Existem quatro mecanismos básicos pelos quais os microrganismos resistem a ação de agentes antimicrobianos: hidrólise enzimática do antibiótico, restrição da captação, aumento do efluxo e alteração nos alvos antimicrobianos (41).

### 1.5.1 Permeabilidade da membrana celular

Todas as principais classes de antibióticos usados para tratar infecções causadas por *P. aeruginosa* têm que atravessar a parede celular para atingir seus alvos. Os aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, ampicacina) inibem a síntese proteica se ligando à subunidade 30S do ribossomo. Quinolonas (ciprofloxacina) se ligam à subunidade A da DNA girase, que mantém a estrutura ordenada do cromossomo dentro das células.  $\beta$ -lactâmicos (ceftazidima, imipenem, meropenem e aztreonam) inibem as transpeptidases que realizam a montagem de peptidoglicano localizadas na face externa da membrana citoplasmática. Por fim, polimixinas (colomicina, colistina) ligam-se a fosfolipídios da membrana citoplasmática, destruindo a mesma. A resistência intrínseca de *P. aeruginosa* à todas as classes de antibióticos tem sido geralmente atribuída à baixa permeabilidade da sua parede celular (42).

Uma característica de *P. aeruginosa* é a produção de alginato, que envolve as células e as unem em agregados. Embora tenha sido mostrado que o alginato possa ligar-se a antibióticos catiônicos, como aminoglicosídeos, e restringir a sua difusão, o seu efeito sobre resistência de *P. aeruginosa* é provavelmente mínimo. De fato, alguns isolados são totalmente sensíveis a aminoglicosídeos (43). Com isso em vista, voltamos os olhos para a membrana externa de *P. aeruginosa*, que é uma barreira significativa à penetração de antibióticos, restringindo a taxa de penetração de pequenas moléculas hidrofílicas e excluindo moléculas maiores. Antibióticos hidrofílicos pequenos tais como  $\beta$ -lactâmicos e quinolonas só podem atravessar a membrana externa através das porinas, que são moléculas em forma de barril que atravessam a membrana externa, geralmente associados como trímeros (44).

*P. aeruginosa* produz mais de um tipo de porinas, sendo OprF a principal espécie presente em todas as cepas analisadas (44). Embora mutantes *oprF* tenham sido relatados, a perda de *oprF* não foi considerada a principal causa de resistência a antibióticos. OprD é uma porina especializada que atua na absorção de aminoácidos carregados positivamente, como lisina. A perda de *oprD* é frequentemente associada à resistência ao antibiótico imipenem, que requer esta

porina para atravessar a membrana externa. A ausência de OprD aumenta o MIC de imipenem de 1-2 para 8-32 µg/ml (45).

Curiosamente, a sensibilidade a meropenem não é afetada pela perda de oprD, indicando que os carbapenêmicos cruzaram a membrana externa por diferentes canais. Os aminoglicosídeos e a colistina não atravessam a membrana via porinas. Em vez disso, eles promovem a própria absorção por ligação ao lipopolissacarídeo da face externa da membrana. Isso destrói a barreira de permeabilidade da membrana externa e permite aos antibióticos penetrarem através da parede para o interior da célula. As colistinas exercem ação bactericida através do rompimento da membrana citoplasmática. A resistência aos aminoglicosídeos e à colistina, observada em cepas de laboratório de *P. aeruginosa*, é devida a super-expressão de uma proteína de membrana externa, OprH, que protege o LPS da ligação aos antibióticos (46).

### 1.5.2 O sistema de bombas de efluxo

O efluxo se caracteriza pelo bombeamento de moléculas e solutos para fora das células. As proteínas que compõem essas bombas de efluxo podem ser específicas para um tipo de substrato ou podem transportar uma variedade de compostos diferentes, incluindo antibióticos de múltiplas classes (47).

Até o momento foram descritas 5 famílias de proteínas que participam de sistemas de efluxo: RND (*resistance nodulation division*); MFS (*major facilitator superfamily*); MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*); SRM (*staphylococcal multiresistance*); ABC *superfamily*. A Figura 6 mostra o esquema desses sistemas de bombas de efluxo. Esta última é a única que utiliza ATP como fonte de energia para realizar o transporte, todas as outras utilizam a energia gerada pelo gradiente eletroquímico (48).

O arranjo tripartido do sistema RND forma um sistema de extrusão eficiente para moléculas tóxicas presentes no citoplasma, na membrana citoplasmática ou no periplasma. Há quatro sistemas de efluxo de antibióticos do tipo RND descritos em *P. aeruginosa*: *mexAB-oprM*,

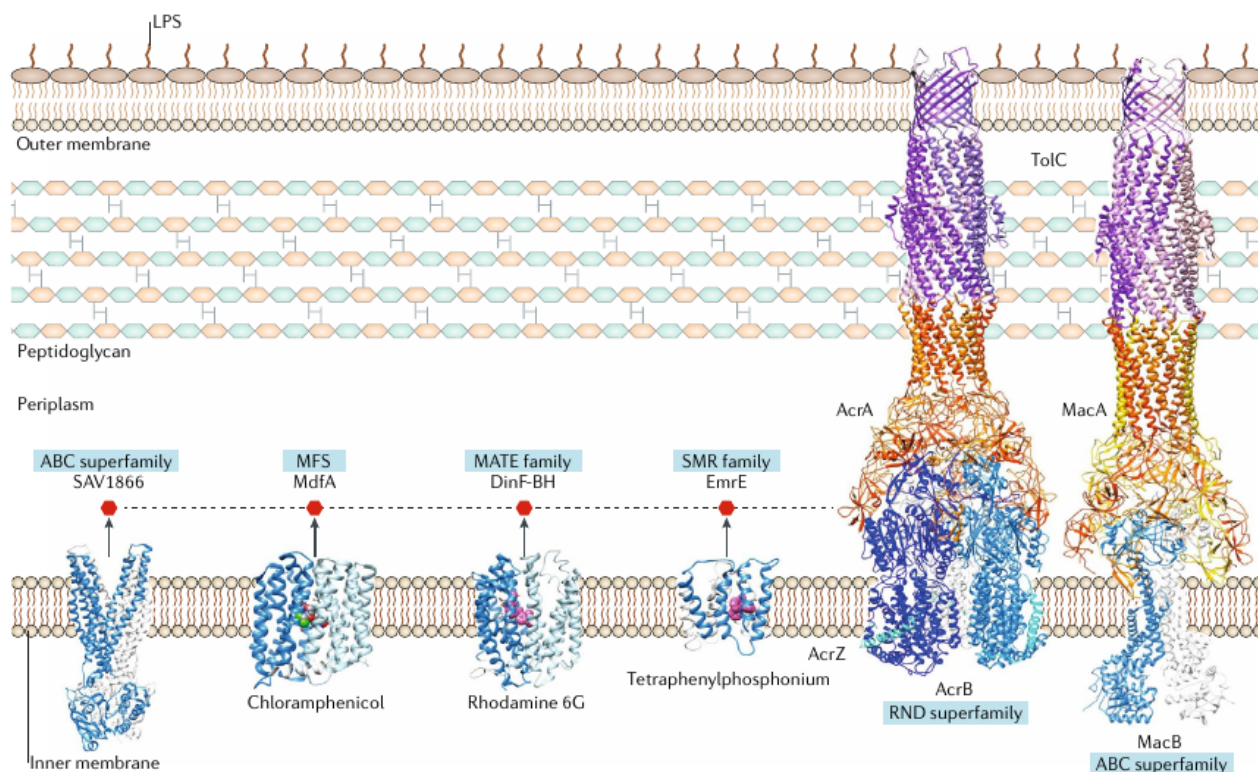


Figura 6 – Esquema de estruturas dos diferentes sistemas de efluxos. Adaptado de (48)

*mexXY-oprM*, *mexCD-oprJ* e *mexEF-oprN* (49). Todas as classes de antibióticos, exceto as polimixinas, são susceptíveis à extrusão por um ou mais sistemas de efluxo. MexAB-*oprM* é o principal sistema de efluxo, sendo responsável pela extrusão de  $\beta$ -lactâmicos (exceto imipenem), quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina, novobiocina, trimetoprim e uma variedade de desinfetantes. MexXY-*oprM* realizam a extrusão de aminoglicosídeos e *mexEF-oprN* são responsáveis pelo efluxo de carbapenems e quinolonas. Os genes desses sistemas estão presentes em todas as cepas, mas normalmente não são altamente expressos. No entanto, o aumento da expressão pode resultar de mutação em genes reguladores, como *mexR*, que controla a expressão dos genes *mexAB-oprM* (50).

*OprM* pode interagir com outros sistemas de efluxo presente em *P. aeruginosa*. A Figura 7 mostra o esquema da bomba de efluxo formada por MexAB-*OprM*.



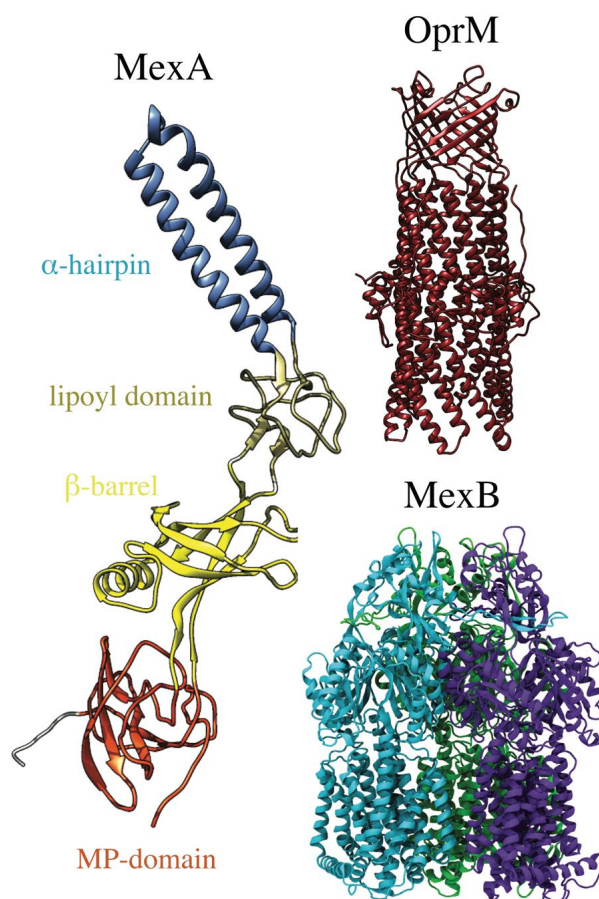


Figura 7 – Esquema do sistema de efluxo MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. Adaptado de (51)

### 1.5.3 Inativação e modificação de antibióticos

A grande maioria das cepas de *P. aeruginosa* possui o gene *ampC*, que codifica uma  $\beta$ -lactamase. Em diversas cepas isoladas de pacientes com fibrose cística observou-se a super-expressão de *ampC*, ocasionada pela mutação espontânea do gene *ampR*, que regula a expressão deste gene. Esse tipo de mutação se mostrou mais frequente em cepas isoladas de pacientes que foram tratados com ceftazidima por um longo período. Além disso a super-expressão da  $\beta$ -lactamase AmpC representa uma ameaça particular às cefalosporinas (52).

Outras  $\beta$ -lactamases produzidas por *P. aeruginosa* incluem as enzimas mediadas por plasmídios de espectro estendido (ESBLs), ativas contra penicilinas e cefalosporinas (53). O uso de inibidores de  $\beta$ -lactamase, como o ácido clavulânico, fornece proteção apenas contra enzimas mediadas por esses plasmídios, mas não contra AmpC (54).

Por outro lado, a inativação de aminoglicosídeos ocorre por meio de enzimas que transferem radicais acetil, fosforil ou adenilil à hidroxilas presentes nas estruturas de antibióticos. Antes do reconhecimento de que os aminoglicosídeos podem ser eliminados por bombas de efluxo, a inativação foi considerada como o principal mecanismo de resistência a este grupo de antibióticos. As enzimas modificadoras utilizam cofatores citoplasmáticos (acetil co-enzima A ou ATP) como doadores das moléculas que serão adicionadas aos aminoglicosídeos no processo de modificação dos antibióticos no citoplasma.

#### 1.5.4 Mutações nos alvos dos antibióticos

Este mecanismo de resistência resulta de mutações nas moléculas-alvo, sem afetar demasiadamente o papel vital que essas moléculas possam ter no metabolismo celular. Em *P. aeruginosa* isto ocorre frequentemente com as quinolonas através de mutações no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da enzima alvo, a DNA girase (55). Juntamente com o sistema de efluxo, mutações representam um dos principais mecanismos de resistência em cepas de *P. aeruginosa*, principalmente em isolados clínicos de fibrose cística. Por fim, mudanças na estrutura da subunidade 30S do ribossomo (alvo de aminoglicosídeos), influenciam a sensibilidade à estreptomicina. Alterações nas proteínas de ligação à penicilina de *P. aeruginosa* resultam na resistência a  $\beta$ -lactamases (56).

A figura 8 mostra uma representação resumida dos mecanismos de resistência encontrados em *Pseudomonas aeruginosa*.

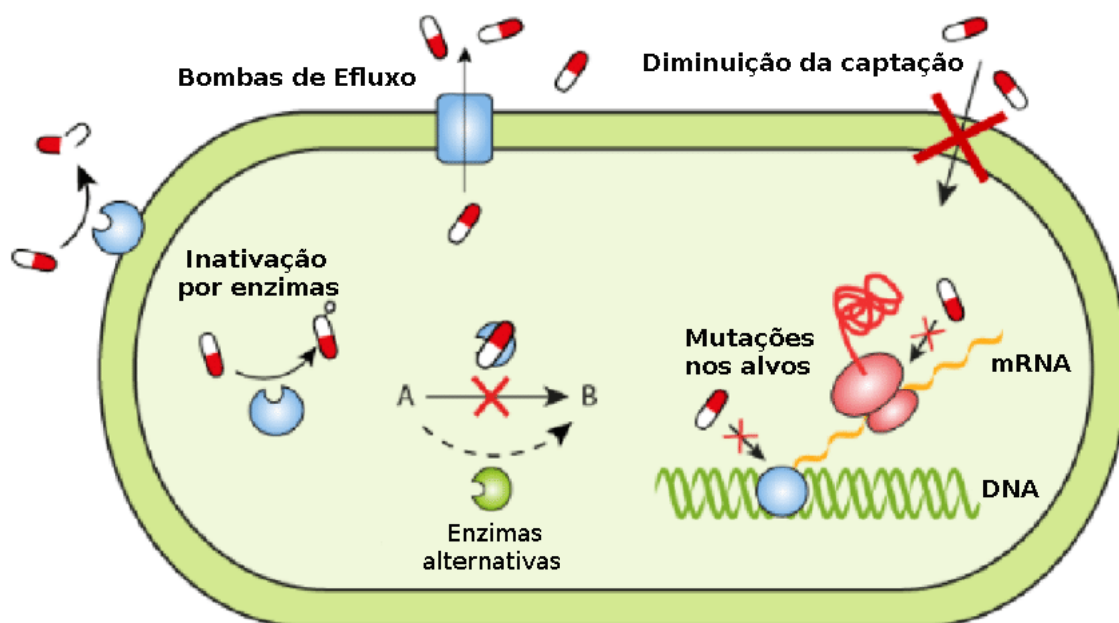


Figura 8 – Estratégias de resistência a antibióticos em bactérias. Adaptado de (57).

## 1.6 Nanopartículas de prata (AgNPs)

É sabido que a prata (Ag) possui efeito antibacteriano eficaz e tem sido amplamente usada durante a história para combater diversas infecções. Mais recentemente, o advento de nanopartículas de prata (AgNPs), veio melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas deste elemento (58).

AgNPs atuam sobre várias bactérias resistentes a antibióticos e previne a formação de biofilme, indicando um potencial aplicativo no combate a bactérias patogênicas e outros microrganismos. Embora as propriedades bacterianas de AgNPs tenham sido amplamente discutidas (59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66), o efeito exato de AgNPs em bactérias ainda não está claro. Até o momento, dois mecanismos antibacterianos foram propostos: morte por contato e morte mediada por íons de  $\text{Ag}^+$  (67).

### 1.6.1 Mecanismos antibacterianos por contato direto com microrganismos

As AgNPs têm propriedades físico-químicas e biológicas mais marcantes do que sais de prata, tal como o  $\text{AgNO}_3$ . Foi mostrado que as AgNPs podem ancorar à parede celular bacteriana e, conseqüentemente, infiltrá-la. Por consequência dessa adesão, ocorrem alterações físicas na membrana, que podem levar ao extravasamento do conteúdo celular e à morte bacteriana (68).

Foi demonstrado também que o efeito das AgNPs em bactérias Gram-negativas é, aparentemente, mais forte do que em bactérias Gram-positivas. Esse fenômeno pode ser explicado pela diferença existente na espessura da parede celular, composta principalmente de peptidoglicano, entre bactérias Gram-positivas (30 nm) e Gram-negativas (3-4 nm).

As AgNPs interagem com a parede celular bacteriana diretamente ou via liberação de  $\text{Ag}^+$  (Figura 9a). Essa conexão com a parede celular resulta na geração de aberturas. Posteriormente, as AgNPs se acumulam e ligam-se mais fortemente com as camadas subjacentes, liberando  $\text{Ag}^+$  (Figura 9b). As aberturas geradas se tornam maiores e, finalmente, a parede celular é destruída e o conteúdo intracelular das bactérias é expelido para fora (69).

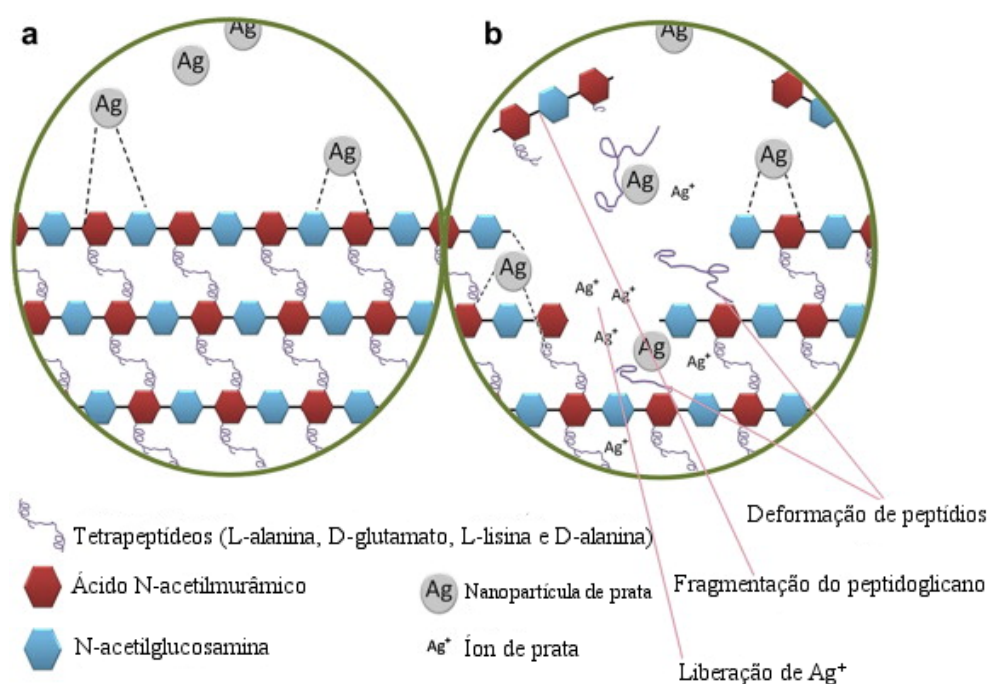


Figura 9 – Esquema da interação entre as AgNPs e o peptidoglicano. Adaptado de (69).

A membrana celular tem carga negativa devido à presença de grupos carboxila, fosfato e amino (70). A carga das AgNPs confere atração eletrostática entre as AgNPs e a membrana celular dos microrganismos, facilitando a fixação das AgNPs nas membranas (59, 71). Assim, o efeito antibacteriano pode ser aumentado, alterando a carga superficial das AgNPs (72, 71).

Após a adesão à parede bacteriana, as AgNPs também podem penetrar a membrana interna das bactérias. Há um efeito antibacteriano dependente do tamanho, ou seja, nanopartículas menores têm uma grande área de superfície em contato com as células bacterianas e podem atingir o citoplasma com mais frequência do que nanopartículas maiores (73).

Quando as AgNPs penetram a célula microbiana, elas interagem com estruturas celulares e biomoléculas, tais como proteínas, lipídios e DNA. A interação dessas macromoléculas com as AgNPs levará à disfunção bacteriana e finalmente à morte. Em particular, a interação AgNP com ribossomos leva à sua desnaturação causando inibição da síntese de proteínas (74).

O mecanismo antibacteriano das AgNPs é também devido à sua capacidade de produzir altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, radical hidroxila, ácido hipocloroso e oxigênio singlete (75, 76).

### 1.6.2 Mecanismos antibacterianos mediados pela liberação de íons de prata

Íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) podem se ligar à proteína presentes na membrana celular, tais como as ATPases, que estão envolvidas na geração de ATP transmembrana e fazem a mediação do transporte de íons através das membranas celulares, resultando na desativação das mesmas (77).

Além disso, foi descrito que  $\text{Ag}^+$  pode desacoplar o transporte de elétrons da cadeia respiratória da fosforilação oxidativa e obstruir a membrana para o transporte de prótons e Pi (78, 79).

$\text{Ag}^+$  pode ainda formar complexos com ácidos nucleicos, intercalando-se entre os pares de base e rompendo as ligações de hidrogênio. Isso resulta da inibição da replicação do DNA e da divisão celular (80).

Sendo um íon de metal pesado,  $\text{Ag}^+$  pode causar o aumento do estresse oxidativo celular em micróbios, que é outro mecanismo antibacteriano. Foi sugerido que o  $\text{Ag}^+$  de AgNPs liberado interage com proteínas da cadeia respiratória na membrana, interrompe a redução intracelular de  $\text{O}_2$  e induz a produção de ROS (81).

Com o aumento da utilização de AgNPs, começam a surgir relatos de desenvolvimento de resistência bacteriana a esses compostos. Em um relatório recente, verificou-se que as AgNPs aumentaram a resistência bacteriana aos antibióticos promovendo a tolerância ao estresse por meio da indução de ROS intracelular (82). Além disso, as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* 013, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 e *E. coli* CCM 3954 desenvolveram resistência a AgNPs após exposição repetida. Esse fenômeno foi atribuído à produção de flagelina, uma proteína adesiva do flagelo bacteriano, que causou a agregação de AgNPs e, assim, eliminou seu efeito antibacteriano (83). A Figura 10 mostra um esquema dos mecanismos de ação das AgNPs.

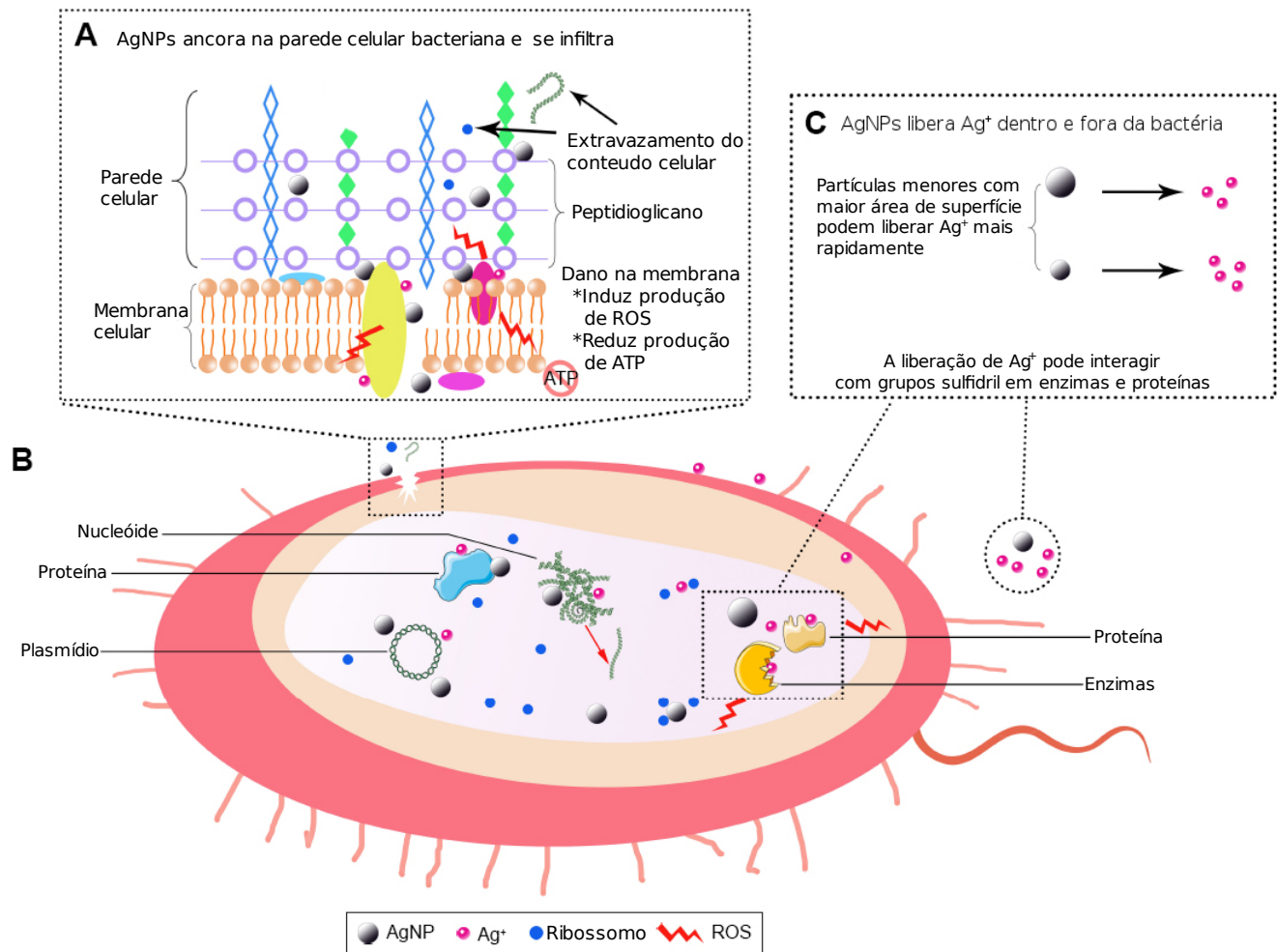


Figura 10 – **Mecanismos antibacterianos de AgNPs.**(A) A imagem ampliada local mostra que as AgNPs podem ancorar à parede celular bacteriana e, conseqüentemente, infiltrá-la. Essa ação pode levar a danos na membrana e vazamento de conteúdo celular. Além disso, AgNPs ou Ag<sup>+</sup> podem se ligar à proteína presente na membrana celular, que está envolvida na geração de ATP. (B) As AgNPs podem penetrar no interior da célula microbiana, e então as AgNPs e o Ag<sup>+</sup> liberado podem interagir com estruturas celulares e biomoléculas, como proteínas, enzimas, lipídios e o DNA. O aumento de ROS leva a uma resposta semelhante à apoptose, peroxidação lipídica e dano ao DNA. (C) As AgNPs podem liberar de forma sustentável o Ag<sup>+</sup> dentro e fora das bactérias, e o Ag<sup>+</sup> pode interagir com proteínas e enzimas. **Abreviações:** AgNP, nanopartículas de prata; ROS, espécies reativas de oxigênio.

## 1.7 *Galleria mellonella*

Invertebrados têm sido cada vez mais vistos como modelos válidos para estudar a virulência de patógenos humanos, principalmente devido as semelhanças entre os sistemas imunes inatos de invertebrados e mamíferos (84). Além disso, mecanismos de virulência de patógenos ambientais, especialmente de patógenos oportunistas, são provavelmente conservados entre os diferentes

modelos avaliados. Alguns hospedeiros invertebrados utilizados para estudos de virulência de bactérias e fungos patogênicos humanos incluem os nemátodos *Caenorhabditis elegans* (85) e a traça do favo de mel *Galleria mellonella* (86).

A fagocitose, o encapsulamento e a nodulação são mecanismos imunocelulares de insetos praticados pelos hemócitos. Os hemócitos também desempenham um papel importante no reconhecimento de corpos estranhos, na síntese de espécies reativas de oxigênio, de peptídeos e de proteínas envolvidas na imunidade. Os granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos e oenocitóides são os principais hemócitos presente na hemolinfa dos insetos pertencentes à ordem *Lepidoptera* (87).

As larvas de *G. mellonella* são de baixo custo, fácil manutenção e manipulação. A sua utilização pode reduzir a necessidade de testes de patogenicidade em mamíferos, com uma redução concomitante no sofrimento desses animais (84). A resposta imune de insetos, assim como de mamíferos, consiste de barreiras estruturais e passivas, com geração de respostas celulares e humorais, mediadas por hemócitos no interior da hemolinfa (88).

A patogenicidade de *P. aeruginosa* está associada à produção de muitas proteínas, incluindo as exotoxinas S, T, U, A e as enzimas lipase, fosfolipase C, e várias proteases extracelulares: protease IV, protease alcalina, as elastases LasA (stafilolisina) e LasB (pseudolisina). A utilização de *G. mellonella* para o estudo da patogenicidade de *P. aeruginosa* já foi demonstrada (89, 90).

O principal objetivo deste trabalho foi o de caracterizar o efeito da mutação no gene *phoU* de *Pseudomonas aeruginosa* no acúmulo de poliP, metaboloma e virulência. O efeito da adição de íons de magnésio e ferro sobre o rendimento, taxa de crescimento, consumo de Pi, acúmulo de poliP, *swarming*, detecção da atividade de FA e resistência a antibióticos também foi avaliado.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Bactérias e plasmídios utilizados

As bactérias e os plasmídios utilizados estão listados na Tabela 1

### 2.2 Meios de cultura

- Meio LB (95): Bacto-Triptona (10 g/l); Extrato de levedura (5 g/l); NaCl (10 g/l).
- H-salts (96): 0,2% glicose; NaCl (4,68 g/l); KCl (1,5 g/l); NH<sub>4</sub>Cl (1,08 g/l); HEPES (285,96 g/l); MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (0,2 g/l); Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,35 g/l); CaCl<sub>2</sub> (0,01 M); FeCl<sub>3</sub> (0,01 M); ZnCl<sub>2</sub> (0,01 M); em pH 7,5 (ajustado com HCl concentrado).
- Meio HGP1: Meio H-salts acrescido de 1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Meio HGP0,1: Meio H-salts acrescido de 0,1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Meio HGP0,1.50: Meio H-salts acrescido de 0,1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 50 μM de FeCl<sub>3</sub>.
- Meio HGP1.50: Meio H-salts acrescido de 1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 50 μM de FeCl<sub>3</sub>.
- Meio HGP4: Meio H-salts acrescido de 4 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Meio HGP10: Meio H-salts acrescido de 10 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Meio HGP10.50Fe: Meio H-salts acrescido de 10 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 50 μM de FeCl<sub>3</sub>.
- Meio HGP10.6Mg: Meio H-salts acrescido de 10 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 6 mM de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Meio Swarming-1: 20 mM NH<sub>4</sub>Cl; 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,6 mM NaCl; 11 mM glicose; 0,5 % ácido casamino; 0,5 % ágar bacteriológico; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O em pH 6,5 (ajustado com HCl)

Cepas bacterianas	Genótipo relevante	Referência ou fonte
PA14	<i>P. aeruginosa</i> selvagem	(20)
PA14 <i>phoU</i>	<i>phoU</i> ::pKNOCK-Gm	(19)
PA14 $\Delta$ <i>phoU</i>	$\Delta$ <i>phoU</i>	Coleção do laboratório
I4	Isolado do quimiostato	Coleção do laboratório
I5	Isolado do quimiostato	Coleção do laboratório
I6	Isolado do quimiostato	Coleção do laboratório
DH10B	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 endA1 recA1 deoR</i> ( <i>ara; leu</i> ) 7697 <i>araD39 galU galK nupG rpsL</i>	(91)
S-17	<i>Escherichia coli</i> $\lambda$ -pir	(92)
MG1655	<i>E. coli</i> K12 selvagem	Coleção do laboratório
MG1655 <i>pstS</i>	MG1655 <i>pstS</i> :: Km	Coleção do laboratório
MG1655 <i>phoA</i>	MG1655 $\Delta$ <i>phoA</i> :: Km	Coleção do laboratório
Plasmídios	Utilização do plasmídio	
pKNOCK-Gm	Vetor suicida para mutagenização de bactérias Gram negativas	(92)
pEX18	Vetor suicida para mutagenização de bactérias Gram negativas	(93)
pTZ57R/T	Vetor de clonagem Amp <sup>r</sup>	Fermentas
pLG24	Fragmento que flanqueia o gene <i>phoU</i> clonado em pTZ57R/T	Coleção do laboratório
pLG25	Fragmento que flanqueia o gene <i>phoU</i> clonado em pEX18	Coleção do laboratório
pLG26	Fragmento que flanqueia o gene <i>ppk</i> clonado em pEX18	Coleção do laboratório
pUCp18	Vetor de clonagem Cb <sup>r</sup>	(94)
pLG27	Gene <i>nppC</i> de PA14 <i>phoU</i> clonado em pUCp18	Este estudo
pLG28	Gene <i>nppC</i> de I4 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG29	Gene <i>nppC</i> de I5 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG30	Gene <i>nppC</i> de I6 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG31	Gene <i>dnpA</i> de PA14 <i>phoU</i> clonado em pUCp18	Este estudo
pLG32	Gene <i>dnpA</i> de I4 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG33	Gene <i>dnpA</i> de I5 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG34	Gene <i>dnpA</i> de I6 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG35	Gene <i>impA</i> de PA14 <i>phoU</i> clonado em pUCp18	Este estudo
pLG36	Gene <i>impA</i> de I4 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG37	Gene <i>impA</i> de I5 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG38	Gene <i>impA</i> de I6 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG39	Gene 57610 de PA14 <i>phoU</i> clonado em pUCp18	Este estudo
pLG40	Gene 57610 de I4 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG41	Gene 57610 de I5 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG42	Gene 57610 de I6 clonado em pUCp18	Este estudo
pLG43	Fragmento interno do gene <i>ppK</i> clonado em pEX18	Este estudo

Tabela 1 – Lista de bactérias e plasmídios

- Meio Swarming-6: 20 mM NH<sub>4</sub>Cl; 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,6 mM NaCl; 11 mM glicose; 0,5 % ácido casamino; 0,5 % ágar bacteriológico; 6 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O em pH 6,5 (ajustado com HCl)
- Meio A (97): 0,12M Tris, 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM NH<sub>4</sub>Cl, 3 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 μM ZnCl<sub>2</sub>, 0,5% Glicose, 0,5% Bacto-peptona, pH 7,5. O Meio A é um meio de cultura semi-rico contendo concentração limitante de Pi (aproximadamente 0,2 mM) (98). Quando acrescido de 1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> é denominado meio A +Pi. Na ausência de qualquer acréscimo de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, é denominado meio A -Pi
- Mueller Hinton BD Difco™
- Mueller Hinton Agar BD Difco™

## 2.3 Construção de cepas e plasmídios

### 2.3.1 PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando o Kit GoTaq (Promega) conforme instruções do fabricante. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 2.

Iniciadores - PCR	Sequencia 5' - 3'
ppKUP-F	TAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTAATCGCCGCGATGACTTCTCC
ppKUP-R	GCGCTGGAGACTTCAGCCGCTCCAGGAGCG
ppKDOWN-F	GCGGCTGAAGTCTCCAGCGCCGACTGGATG
ppKDOWN-R	AGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGGTTGCGTCAGCTACACC
dnpA-F	ATCCCCGGGTACCGAGCTCGGAATTCGCTACTGCGGATCCCACATATC
dnpA-R	CAGCTATGACCATGATTACGGAATTCAGTACTGGAACGAGAAGACC
nppC-F	ATCCCCGGGTACCGAGCTCGGAATTCGCGGCAAGGTACTCGACTATTTTC
nppC-R	CAGCTATGACCATGATTACGGAATTCCTTCTCGATGGTATGCAGC
impA-F	ATCCCCGGGTACCGAGCTCGGAATTCACGTTTCGTGAATATCTC
impA-R	CAGCTATGACCATGATTACGGAATTCCTCATCTATCCATCCTTCC
57610-F	ATCCCCGGGTACCGAGCTCGGAATTCGCGCGCATGGATTTTATC
57610-R	CAGCTATGACCATGATTACGGAATTCATCGATCCAGAACCCCTAC
phouUP-F	TCCACGCTGAAGATCGAAGAG
phouUP-R	GCGCAAGCTTGTTGAACTGCTGGGAGATGTG
phouDOWN-F	GCGCAAGCTTAAGCTGGTGATCTACCTGGTTTCG
phouDOWN-R	GCCTTCTTGATCTTGGCCAC

Tabela 2 – Tabela de Iniciadores

### 2.3.2 Construção do mutante *phoU*

Para deletar o gene *phoU* de PA14 foi utilizado o vetor suicida pEX18. Este vetor é capaz de se transferir por conjugação em várias espécies de bactérias, possui múltiplos sítios de clonagem, marcador de resistência a ampicilina e o gene da levanosucrase *sacB*, usado para a seleção da deleção no segundo evento de recombinação (99).

Para a construção dos mutantes, primeiramente foram realizadas amplificações de 2 fragmentos de DNA contendo regiões de aproximadamente 500 pb antecedentes e subsequentes ao gene *phoU* utilizando os iniciadores descritos na tabela 2. Os fragmentos amplificados foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI, cujo sítio de clivagem foi inserido no iniciador Montante 3' e no iniciador Jusante 5'. Os dois fragmentos foram ligados por 12 horas a 16°C utilizando a enzima T4 DNA ligase conforme instruções do fabricante (Fermentas), gerando um fragmento único de aproximadamente 1000 pb, onde se conservou 100 pb da região codificadora de *phoU*. O fragmento de 1000 pb gerado foi reamplificado por PCR com os iniciadores Montante 5' e Jusante 3'. Esse fragmento foi clonado no vetor pTZ57R/T conforme instruções do fabricante (Fermentas) e confirmados por clivagem com as endonucleases XbaI e BamHI. Posteriormente o clone correto foi digerido com estas mesmas enzimas e o fragmento de 1000 pb foi transferido para o vetor suicida pEX18-Amp gerando o plasmídio pLG25. Essa última transferência foi também confirmada por digestão. Células de PA14 WT competentes foram transformadas com o plasmídio pLG24 e selecionadas no meio LB ágar contendo 100 µg/mL de carbenicilina. A inserção de pLG25 no genoma de PA14 WT, na primeira recombinação, permitiu a seleção de colônias resistentes à carbenicilina e sensíveis à sacarose que possuem uma cópia do gene *phoU* intacta e outra cópia deletada. Essas colônias resistentes a carbenicilina e sensíveis a sacarose foram crescidas a 28 °C, 180 rpm durante 12 horas no meio LB sem nenhum antibiótico para permitir o segundo evento de recombinação, que consiste na excisão do vetor pEX18-Amp do genoma de PA14 WT carregando a versão inteira ou deletada do gene *phoU*. Após as 12 horas de crescimento, as células foram plaqueadas no meio LB ágar suplementado com 10%

sacarose e 100 µg/mL de carbenicilina. As colônias que cresceram neste meio foram transferidas e selecionadas em três diferentes condições de meio LB ágar:

Meio 1: LB ágar + 10% de sacarose

Meio 2: LB ágar + carbenicilina + 10% de sacarose

Meio 3 LB ágar + carbenicilina

As bactérias que cresceram apenas no meio 1 foram selecionadas e analisadas por PCR com os iniciadores phouUP-F e phouDOWN-R para confirmar a deleção de *phoU*.

### 2.3.3 Construção do duplo mutante $\Delta phoU \Delta ppk$

Para criar o duplo mutante *phoUppk*, fragmentos de 1.200 pb antecedentes e subsequentes ao gene *ppk* foram amplificados por PCR utilizando os iniciadores ppKUP-F, ppKUP-R e ppKDOWN-F, ppKDOWN-R, respectivamente. Os iniciadores ppKUP-F e ppKDOWN-R possuem 15 pb de homologia a cada ponta do plasmídio pEX18, que foi linearizado com a enzima de restrição HindIII. Já os iniciadores ppKUP-R e ppKDOWN-F possuem homologia de 15 pb com os fragmentos de 1200 pb clonados a montante e a jusante do gene *ppK* na extremidade 3' e 5', respectivamente. Tanto os fragmentos amplificados quanto o vetor linearizado foram purificados com o kit comercial *Promega Wizard PCR and Gel Clean Up system*.

Para clonar os fragmentos de PCR no vetor foi utilizada a técnica SLIC, conforme descrito na seção 2.3.4. O vetor linearizado e os insertos foram misturados e incubados a temperatura ambiente por 2,5 minutos com a enzima T4 DNA polimerase (NEB) para gerar *overhangs* na extremidade 5'. Em seguida, a reação foi mantida no gelo por 10 minutos para anelar as regiões de fita única de DNA e terminar a reação. Cinco microlitros dessa reação foram transformados em DH10B competentes por choque térmico. A recombinação homóloga entre os fragmentos e o vetor é realizada *in vivo* e as bactérias são selecionadas em LB-ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina. Após a confirmação da construção do plasmídio pLG26, células de PA14 WT competentes foram transformadas com este plasmídio e selecionadas no meio LB

ágar contendo 300 µg/mL de carbenicilina. A inserção do pLG26 no genoma de PA14 WT e do mutante *phoU*, durante a primeira recombinação, permitiu a seleção de colônias resistentes a carbenicilina e sensíveis a sacarose que possuem uma cópia do gene *ppk* intacta e outra cópia deletada. Essas colônias resistentes à carbenicilina e sensíveis à sacarose foram cultivadas a 37°C com agitação durante 12 horas em meio LB sem nenhum antibiótico para permitir o segundo evento de recombinação, que consiste na excisão do vetor pEX18-Amp do genoma de PA14 WT carregando a versão inteira ou deletada do gene *ppk*. Após as 12 horas de crescimento, as células foram plaqueadas no meio LB ágar (sem adição de NaCl) suplementado com 10% sacarose. Em seguida pelo menos 30 colônias foram selecionadas e repicadas em placas de LB ágar contendo 100 µg/mL de carbenicilina. As colônias que cresceram na presença de sacarose e não cresceram nas placas contendo carbenicilina, foram selecionadas para a confirmação da deleção por PCR.

#### **2.3.4 Clonagem dos genes mutantes e selvagens dos isolados do quimiostato**

A clonagem dos genes que continham SNPs nos isolados do quimiostato foi feita pelo método de *sequencing-and ligation-independent cloning* (SLIC) (100). Os genes *nppC*, *dnpA*, *impA* e *57610* de PA14 *phoU*, e dos isolados I4, I5 e I6 foram amplificados por PCR utilizando os iniciadores listados na Tabela 1, cada um deles contendo 15 nt de homologia com o vetor pUCp18. Em paralelo, pUCp18 foi clivado com a enzima de restrição EcoRI. Tanto o plasmídeo digerido quanto os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit comercial Promega Wizard PCR and Gel Clean Up system seguindo as instruções do fabricante e ressuspensos em 10 mM de Tris-HCl pH 8.5. Em seguida, 100 ng do vetor e 40 ng de cada inserto foram misturados com 1X Buffer (NEB), 1X Albumina do soro bovino e 0.5 U de T4 DNA polimerase (NEB) em um volume final de 10 µl. As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 2,5 minutos e transferidas para o gelo por 10 minutos, para permitir o anelamento das regiões de fita única de

DNA e promover o término da reação. Cinco microlitros dessa reação foram transformados em *E. coli* DH10B competentes por choque térmico. A recombinação homóloga entre os fragmentos e o vetor é realizada in vivo. As bactérias foram selecionadas em L-ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina. Após a confirmação da construção dos plasmídeo (por digestão dos mesmos), células de PA14 *phoU*, I4, I5 e I6 competentes foram transformadas com os plasmídios e selecionadas no meio LB ágar contendo 300 µg/mL de carbenicilina.

## 2.4 Técnicas de Biologia Molecular

### 2.4.1 Gel de poliacrilamida para polifosfato

O polifosfato extraído conforme descrito na seção 2.5.2 foi separado em gel de poliacrilamida 20% dissolvida em tampão 1x TBE (0.1 M Tris, 0.1 M ácido bórico, 2 mM EDTA). Após a eletroforese o gel foi corado durante 30 minutos utilizando uma solução contendo 20% de metanol, 2% de glicerol, 3g de tris e 2 µg/ml de DAPI. O gel foi então exposto à luz ultravioleta e visualizado em um fotodocumentador.

### 2.4.2 Metaboloma

Bactérias foram cultivadas em meio HPG0,1 e HGP4 durante 16 horas a 37 °C com agitação e em seguida centrifugadas a 7.000 rpm por 10 minutos. 0,51 g do pellet foi transferido para tubos *Falcon* e o pellet foi novamente centrifugado, o excesso de água remanescente foi retirado e a massa de bactérias foi pesada novamente. Este passo foi repetido mais uma vez e as bactérias foram então armazenadas a -80 °C. No momento da extração foram adicionados 1.666 µl de metanol e 833 µl de clorofórmio (ambos a -20 °C) ao pellet congelado e em seguida as células foram rompidas utilizando um sonicador. Foi adicionado ao lisado 1250 µl de clorofórmio e 1250 µl de água deionizada (ambos a -20 °C). As amostras foram agitadas vigorosamente e depois centrifugadas a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C O sobrenadante da fase polar foi coletado e o metanol remanescente foi removido em um evaporador centrífugo durante 4 horas. À cada

amostra foram adicionados 540 µl de água deuterada, 60 µl de 1 M tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 6,06 µl de 50 mM Trimethylsilyl propanoic acid (TSP). As amostras seguiram para a análise de ressonância magnética (RMN) e os espectros foram faseados manualmente. A correção de linha de base de primeira ordem automatizada foi aplicada. Os metabólitos foram identificados usando o Chenomx NMR Suite 5.1 (Chenomx, Inc., Edmonton, Alberta, Canadá) em relação ao ácido trimetilsilil-2,2,3,3-tetradeutopropiônico (TSP).

### **2.4.3 Sequenciamento genômico da cepa selvagem, do mutante *phoU* e dos isolados I4, I5 e I6**

O DNA cromossomal da cepa PA14WT do laboratório, do mutante PA14 *phoU* e dos isolados do quimiostato (I4, I5 e I6) foi extraído utilizando o DNeasy® Blood & Tissue Kit conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA foram sequenciadas utilizando a plataforma Illumina Hi-Seq pela empresa MicrobesNG (<http://www.microbesng.uk>). Os dados gerados foram alinhados com a sequência de referência de *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14, a identificação de SNPs (single-nucleotide polymorphisms) e Indels (inserções/deleções) foi realizada utilizando o software Geneious V 10.3 (<http://www.geneious.com>). Os parâmetros utilizados para validar um SNP foram de uma cobertura mínima de 30x e com uma frequência de variantes de 80 %.

## **2.5 Técnicas bioquímicas**

### **2.5.1 Microdeterminação de fosfato**

A concentração de Pi residual no sobrenadante das culturas foi medida segundo uma adaptação do método de (101). Foram preparadas as seguintes soluções: 167 mM de ácido sulfúrico; 2,5% de molibdato de amônia; 10% de ácido ascórbico. Uma curva de calibração foi feita utilizando as seguintes concentrações de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 0,16 mM; 0,08 mM; 0,04 mM; 0,02 mM; 0,01 mM. O reagente de trabalho consiste na mistura de 1 volume de 167 mM de ácido sulfúrico,



1 volume de 2,5% de molibdato de amônia, 1 volume de 10% de ácido ascórbico e 2 volumes de água deionizada. As bactérias foram cultivadas em meio HGP10 e HGP10.50 durante 16 horas e no dia seguinte foram centrifugadas por 10 minutos a 6.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e diluído 10 vezes para então ser misturado a 1 volume do reagente de trabalho e incubado a 37 °C por duas horas. A leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro na absorvância de 820 nm.

Os valores absolutos da  $DO_{820}$  foram convertidos em mM de Pi utilizando a equação da curva de calibração.

### 2.5.2 Extração de polifosfato

Polifosfato foi extraído de bactérias cultivadas durante 16 horas em 2 ml dos diferentes meio HG. O pellet de bactérias foi lavado duas vezes com 0,9% de NaCl e então ressuspenso em 100 µl de tampão LETS (100 mM LiCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 7.4; 0,2% SDS). Em seguida 100 µl de fenol ácido (pH 4.3) foi adicionado e agitado vigorosamente durante 5 minutos à 4 °C. A mistura foi centrifugada à 14.000 rpm por 5 minutos à 4 °C e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 200 µl de clorofórmio. A mistura foi agitada vigorosamente durante 5 minutos à 4 °C e então centrifugada durante 5 minutos também à 4 °C. Novamente a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, dessa vez contendo 250 µl de etanol absoluto gelado (4 °C). As amostras foram mantidas à -80°C por 24 horas e no dia seguinte foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi aspirado e o pellet foi lavado com 1 ml de etanol 70%. As amostras foram secas à 37 °C durante 30 minutos para eliminar todo o etanol remanescente. O pellet de polifosfato foi ressuspenso em 50 µl do tampão RB (0,1% SDS; 0,5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 7.0) e as amostras foram resolvidas por eletroforese de gel de poliacrilamida (PAGE).

### 2.5.3 Quantificação do polifosfato pela microdeterminação de Pi

Para quantificar o polifosfato extraído das amostras, este foi primeiro hidrolisado em ácido perclórico 2 M a 100 °C durante 30 minutos. O Pi liberado foi medido conforme descrito em

### 2.5.1.

## 2.5.4 Extração de piocianina

As bactérias foram cultivadas por 16 horas com agitação a 37 °C em meio LB. Em seguida, foram centrifugadas a 6.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi filtrado por um filtro de 0,2 µm (Sartorius). Uma alíquota de 5 ml dos sobrenadantes das bactérias foi misturada a 3 ml de clorofórmio e agitada vigorosamente por 30 segundos. Após centrifugação durante 3 minutos a 1.200 × g a temperatura ambiente, 2,5 ml da fase orgânica da solução foram coletados e misturados com 1 ml de 0,2 M HCl. A porção pink foi coletada e medida em espectrofotômetro a 530 nm (102).

## 2.5.5 Síntese das nanopartículas de prata (AgNP)

As AgNPs de prata foram sintetizadas no laboratório de Biomateriais do Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais (CCTM) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Para tal, foi preparada uma solução de ácido láctico, ácido acético, manitol e dióxido de carbono. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente até a sua utilização. A 10 mL desta solução, misturou-se 0,01 g de AgNO<sub>3</sub> em agitação constante por 5 minutos, para a formação das nanopartículas de prata, as quais foram armazenadas a 4°C protegidas da luz. As AgNPs foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão,

## 2.6 Ensaio enzimáticos

### 2.6.1 Fosfatase alcalina

Em um ensaio padrão, 100 µl de uma cultura de bactérias foram adicionados a 900 µl de p-NPP (p-nitrofenilfosfato) dissolvido em 1 M Tris pH 9, na concentração de 1 mg/ml. As reações permaneceram incubadas a 37 °C até a obtenção de coloração amarela, sendo estas interrompidas pelo acréscimo de 250 µl de 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. As amostras foram centrifugadas por

2 minutos em velocidade máxima e a absorvância foi então medida no comprimento de onda 410 nm. A atividade enzimática da amostra é obtida pela equação  $E.U. = \frac{A_{410} \times FD}{min \times DO_{600}}$ , onde  $A_{410}$  é a absorvância do produto da reação a 410 nm; FD é o fator de diluição das bactérias; min é o tempo de reação; e  $DO_{600}$  é a concentração de bactérias medida pelo nível de turbidez da cultura a 600 nm.

## 2.7 Outros

### 2.7.1 Curva de crescimento e rendimento da cultura

Bactérias foram cultivadas durante 16 horas, diluídas para uma  $DO_{600} = 0,1$  e cultivadas a 37 °C com agitação nos meios HGP10, HGP10.50Fe. A medição da  $DO_{600}$  foi feita em um espectrofotômetro. A taxa de crescimento durante a fase exponencial foi calculada utilizando a fórmula  $\mu = \frac{\ln(\frac{N}{N_0})}{T}$ , onde  $N_0$  e  $N$  são, respectivamente, a concentração inicial e final de bactérias e  $T$  é o intervalo de tempo utilizado para o cálculo. O rendimento das bactérias foi medido após 22 horas de cultivo.

### 2.7.2 Ensaios de resistência a antibióticos

A resistência das bactérias a antibióticos foi testada em antibiogramas com discos comerciais (Sensifar) contendo concentrações conhecidas de antibióticos. As bactérias foram cultivadas durante 16 horas em meio Mueller-Hinton e em seguida diluídas em 0,9% NaCl para uma  $DO_{600} = 0,1$ . 300 µl de cada cultura foram plaqueados em meio Mueller-Hinton ágar e os discos com os antibióticos foram aplicados sobre a camada de bactérias. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e os halos formados em volta dos discos foram medidos utilizando o software ImageJ. Foram utilizados os seguintes antibióticos: 10 µg imipenem (IMP), 5 µg ciprofloxacina (CIP), 30 µg amicacina (AMI), 30 µg aztreonam (ATM), 10 µg meropenem (MER), 30 µg ácido nalidíxico (NAL), 30 µg cefotaxima (CTX), 30 µg ácido clavulânico + amoxicilina (AMC), 30 µg cefepime (CPM), 30 µg ceftriaxona (CRO) e 10 µg ertapenem (ETP).

### 2.7.3 Ensaio de motilidade: *Swarming*

A motilidade do tipo *swarming* foi avaliada em Meio Swarming (vide seção 2.2) . As bactérias foram cultivadas em meio HGP10 e HGP10.6 durante 16 horas com agitação a 37 °C. Em seguida a DO<sub>600</sub> das culturas foi medida e a concentração de bactérias foi ajustada para uma DO<sub>600</sub> = 1,0. Uma alíquota de 10 µl foi aplicada no centro de cada placa contendo o Meio Swarming-1 e Meio Swarming-6. As placas foram incubadas dentro de sacos plásticos para evitar evaporação excessiva de água do meio a 30 °C durante 48 horas. O registro fotográfico foi feito a cada 24 horas

### 2.7.4 Insetos

Para avaliar o virulência de *Pseudomonas aeruginosa* e do mutante *phoU*, larvas da grande traça da cera *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyrali-dae) foram utilizadas. Os insetos foram criados no escuro em restos de ninhos de abelhas a 28 °C com umidade entre 70-80%. Foram selecionadas larvas, com o corpo larval íntegro sem nenhuma marca de mielinização ou picaduras, de 2,0-2,5 cm e massa entre 150 mg a 230 mg para realizar os experimentos a seguir. Os experimentos envolvendo larvas de *Galleria mellonella* foram realizados em colaboração com a Pós Doutoranda Luciana Thomaz, do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

#### 2.7.4.1 *Galleria mellonella* como modelo de infecção de *P. aeruginosa*

Bactérias foram cultivadas durante 16 horas em meio HGP4. No dia seguinte as culturas foram centrifugadas a 7.000 rpm por 5 minutos e lavadas 3 vezes com 0,9% NaCl e por fim ressuspensas nessa mesma solução. Em seguida foram feitas diluições seriadas 1:10 para obter inóculos de 10<sup>2</sup> bactérias. O número de bactérias inoculadas nos insetos foi estimado com base na densidade óptica da cultura e confirmado por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de LB-ágar. As injeções foram feitas utilizando Seringa de

Hamilton por perfuração do último par da proleg larval. Como controle foram utilizadas larvas inoculadas com a solução de 0,9% NaCl e larvas sem nenhuma infecção. Um único tratamento com nanopartículas de prata foi administrado 2 horas antes da infecção com bactérias. Foram utilizados grupos de 10 larvas e os experimentos foram repetidos em triplicata utilizando larvas de diferentes lotes. Dados a partir desses experimentos replicados foram agrupados para obter um  $n = 30$ . Após a infecção, as larvas foram mantidas no escuro a 37 °C por 24 horas e a sobrevivência das larvas foi avaliada em 3, 6 e 24 horas. Em todas as comparações com o controle negativo, foi utilizado o controle não infectado. Testes de *t Student* com  $p \leq 0,05$  foram considerados significantes.

#### 2.7.4.2 Ensaio de atividade da fenoloxidase

A atividade da fenoloxidase foi determinada na hemolinfa das larvas de *G. mellonella* infectadas e com o mutante *phoU* pelo método descrito por Mak e colaboradores (103). 2 µl da hemolinfa, dez vezes diluído em TBS (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, NaCl 1 mM), foram combinados com 18 µl de TBS contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub> nos poços de uma placa de 96 poços (volume final da amostra 20 µl) e mantidos por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida 180 µl de dopamina diluída em fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 foram adicionados aos poços contendo as amostras. A atividade da fenoloxidase foi determinada com base na formação de melanina medida pela absorbância a 490 nm durante 90 minutos com um intervalo de 15 minutos a cada leitura utilizando um leitor de placas de microtitulação (Bio-Rad).

#### 2.7.4.3 Contagem dos hemócitos totais

As larvas foram anestesiadas pelo contato com o gelo (5 min), esterilizadas na superfície com etanol (70%) e feridas com uma tesoura estéril. A hemolinfa foi recolhida em tubos de 1,5 ml contendo solução salina fisiológica de inseto estéril (IPS: cloreto de sódio 150 mM, cloreto de potássio 5 mM, cloridrato TRIS 100 mM pH 6,9, EDTA 10 mM e citrato de sódio 30 mM). As contagens de hemócitos foram realizadas de acordo com (104). A densidade de hemócitos foi

determinada com um hemocitômetro de Neubauer padrão (capacidade de 10  $\mu$ l). Para determinar as contagens totais de hemócitos (THC) as células foram contadas em quatro quadrados de um hemocitômetro utilizando um microscópio de luz (Olympus CX41, objetiva de 40  $\times$ ). Três medidas independentes foram obtidas 3, 6, 9 e 24 horas após a injeção das larvas inoculadas com as bactérias.

## 2.8 Teste de sensibilidade a nanopartículas de prata

As concentrações inibitórias mínimas (MIC) das nanopartículas de prata em *P. aeruginosa* foram determinadas em microplacas de 96 poços contendo concentrações dobradas (1, 2, 4, 8, 16 e 32  $\mu$ g/ml) de AgNP em meio Mueller Hinton. Cada poço foi inoculado com  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL de PA14 WT. As placas foram incubadas a 37 °C e a MIC foi definida como a concentração presente no primeiro poço opticamente límpido após 24 h. Cada experimento foi realizado em triplicata.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Deleção do gene *phoU*

Com o intuito de utilizar o mutante *phoU* de *P. aeruginosa* como ferramenta para a remoção de fosfato de águas residuárias foi construído um novo mutante limpo, isto é, sem adição de uma marca de resistência a antibióticos. A metodologia de construção desse novo mutante está descrita na seção 2.3.2. A Figura 11 mostra a confirmação da deleção da ORF de *phoU*. O gel mostra o produto da amplificação da região do gene *phoU* utilizando os iniciadores PA-*phoU*-5171F e PA-pstCAB*phoU*-6086R, externos ao gene. O mutante  $\Delta$ *phoU* foi testado em relação aos fenótipos pertinentes (atividade de FA, captação de Pi, acúmulo de poliP e resistência a estresses ambientais).

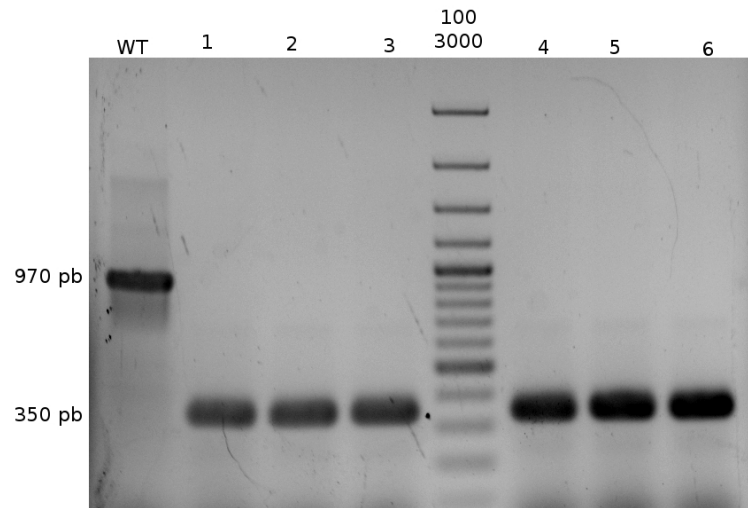


Figura 11 – **Confirmação da deleção do gene *phoU* de PA14.** Amplificação do gene *phoU* da cepa selvagem PA14 e dos candidatos  $\Delta$ *phoU* utilizando os iniciadores PA-*phoU*-5171F e PA-pstCAB*phoU*-6086R. A primeira coluna denominada WT é a amplificação do gene selvagem, de aproximadamente 970 pb. As colunas de 1-6 são candidatos isolados depois do segundo evento de recombinação, detalhado na seção 2.3.2. O fragmento resultante após a deleção é de aproximadamente 350 pares de base. O padrão de peso molecular 100-3000 está indicado na coluna do meio.

### 3.2 Cinética de crescimento e consumo de fosfato do mutante $\Delta phoU$

Foi mostrado que após 16 horas de crescimento, o mutante  $phoU::pKNOCK-Gm$  de *P. aeruginosa* apresenta menor rendimento e maior consumo de fosfato quando comparado com a cepa selvagem (19). Para determinar em que momento o mutante  $\Delta phoU$  passa a consumir mais fosfato do que a cepa selvagem, foi realizada uma curva de crescimento acompanhada da medição do Pi remanescente no meio por 24 horas. A Figura 12 mostra o resultado de consumo de fosfato normalizado pela concentração bacteriana ( $DO_{600}$ ) a cada hora. É possível observar que a partir da 2ª hora, o mutante  $phoU$  passa a consumir mais fosfato quando comparado com a cepa selvagem. Enquanto que a cepa selvagem estabiliza a concentração de Pi captado em 0,4-0,5 mM, em torno da 4ª hora, o mutante  $phoU$  segue removendo Pi do meio, atingindo 2,5 mM de Pi captado/ $DO_{600}$  após 22 horas. O plasmídio pLG13 ( $pphoU^+$ ) complementou o fenótipo de crescimento, mas consumiu mais Pi do que a cepa selvagem, ainda que muito menos do que o mutante  $phoU$ .

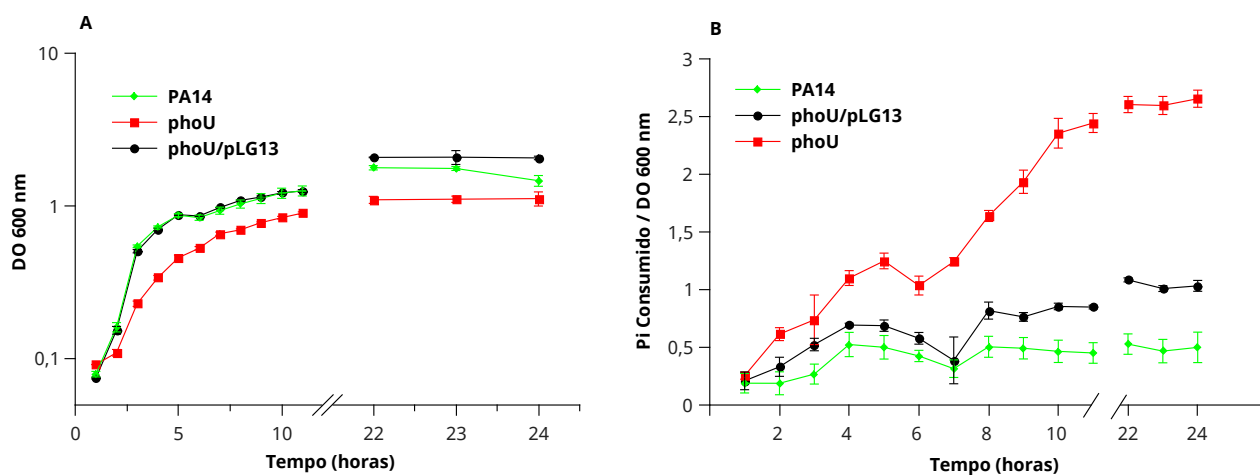


Figura 12 – Cinética do consumo de Pi. Bactérias foram cultivadas em meio HGP4 durante 16 horas a 37 °C. Em seguida, as culturas foram diluídas para a  $DO_{600} = 0.05$  em meio HGP4 fresco e cultivadas durante 24 horas a 37 °C com agitação. **A:** Amostras foram coletadas a cada hora e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 600 nm. **B:** O consumo de Pi foi avaliado a cada hora conforme descrito na seção 2.5.1 e o resultado foi normalizado pela  $DO_{600}$  de cada cepa. Os resultados apresentados representam a média de 3 experimentos independentes  $\pm$ DPM (desvio padrão da média).



### 3.3 Acúmulo de poliP no mutante *phoU*

Em trabalho anterior, para quantificar o montante de poliP acumulado nas bactérias, foi utilizado o corante DAPI, que ao entrar em contato com o poliP intracelular, causa um desvio no espectro de emissão da molécula (19). Porém, um estudo recente mostrou que DAPI, apesar de amplamente utilizado para visualizar e quantificar poliP, interage também com outras moléculas fosfatadas presentes na célula, podendo interferir com a medição de poliP (105). Com o objetivo de evitar esse problema, o poliP foi primeiro extraído, separado em gel de poliacrilamida e somente depois foi corado com DAPI. A Figura 13 mostra o poliP extraído da cepa selvagem, do mutante *phoU* e do mutante complementado (pLG13) separados por PAGE conforme descrito nas seções 2.5.2 e 2.4.1. É possível notar que a quantidade de polifosfato do mutante *phoU* em relação às demais cepas é consideravelmente maior. O mutante *phoU* complementado com pLG13 apresentou um padrão similar ao da cepa selvagem.

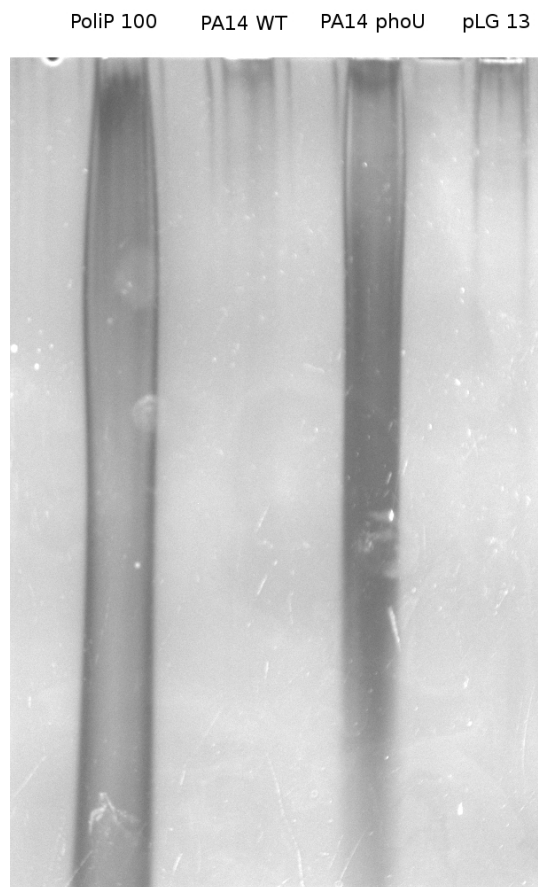


Figura 13 – **Acúmulo de polifosfato em bactérias cultivadas em HGP4.** As bactérias foram cultivadas em meio HGP4 durante 16 horas a 37 °C com agitação. Uma alíquota das bactérias foi utilizada para a extração de poliP e separada por PAGE. O gel foi corado com DAPI e exposto à luz UV em um fotodocumentador. poliP 100 é o marcador de peso molecular de poliP, PA14 WT é a cepa selvagem, PA14 phoU é o mutante *phoU* e pLG13 é o mutante *phoU* complementado. Essa imagem é representativa de pelo menos 4 ensaios independentes

### 3.4 Efeito da suplementação de íons de magnésio sobre o mutante *phoU*

Kim e colaboradores mostraram que a síntese proteica in vitro sofre inibição devido ao acúmulo de fosfato oriundo da degradação de fosfoenolpiruvato. Esse mesmo estudo demonstrou que ao adicionar magnésio à reação, a síntese proteica é restaurada (106). Uma vez que o mutante *phoU* de *P. aeruginosa* acumula mais polifosfato quando comparado com a cepa selvagem, foi levantada a hipótese de que o polifosfato do mutante *phoU* estaria quelando o magnésio no interior da bactéria e inibindo reações anabólicas importantes, tais como a síntese proteica e a replicação de DNA, afetando o crescimento da bactéria. Os experimentos a seguir foram

realizados para verificar se a sensibilidade a antibióticos, crescimento, consumo de Pi, acúmulo de poliP, motilidade e produção de pirocianina da cepa selvagem e do mutante *phoU* seriam afetados pela adição de concentrações crescentes de magnésio ao meio.

### 3.4.1 Efeito de íons de magnésio sobre o rendimento do mutante *phoU*

A mutação no gene *phoU* de *E. coli* e de *P. aeruginosa* afetou a taxa de crescimento e o rendimento pois ambos diminuíram quando comparados com a cepa selvagem (107, 19). Para verificar se a adição de magnésio poderia afetar o rendimento de PA14 e do mutante *phoU*, bactérias foram cultivadas em meio definido HGP4, suplementado com concentrações crescentes de  $MgSO_4$ . A Figura 14 mostra que o rendimento do mutante *phoU* aumentou significativamente conforme concentrações maiores do que 1 mM (2, 4 ou 6 mM) foram adicionadas ao meio de cultura. Pode-se observar também que o rendimento máximo foi atingido com 4 mM de  $MgSO_4$ . A cepa selvagem não teve seu rendimento afetado pelo aumento da concentração de magnésio.

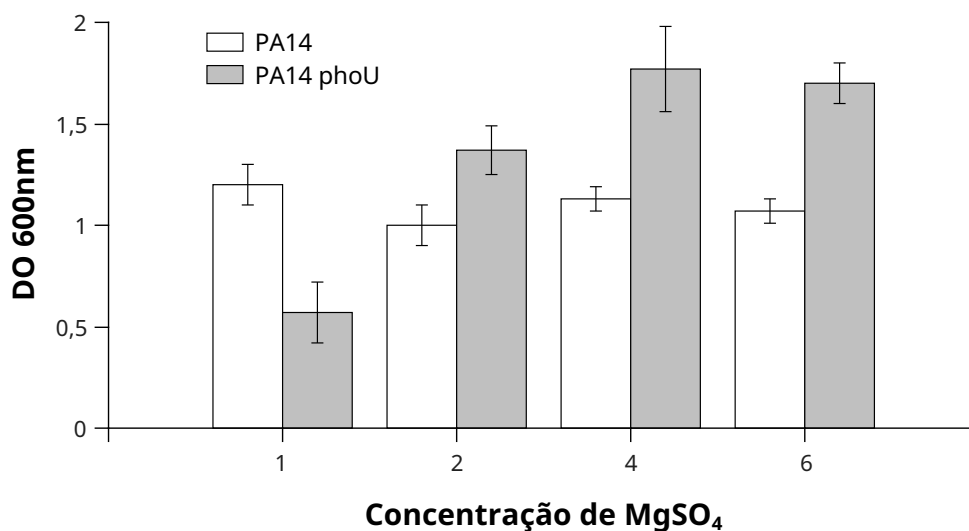


Figura 14 – **Rendimento das culturas em concentrações crescentes de  $MgSO_4$ .** As bactérias foram cultivadas durante 16 horas em meio HGP4 contendo 1, 2, 4 e 6 mM de  $MgSO_4$  e a turbidez das culturas foi medida em um espectrofotômetro a 600 nm. O resultado apresentado é a média de três ensaios independentes. As barras de erro mostram o erro padrão da média.

Como padrão, os experimentos seguintes foram realizados em meio definido contendo 1 mM (baixa concentração) ou 6 mM (alta concentração) de  $MgSO_4$ . Observamos que o mutante *phoU*

cultivado em meio HPG4 (4 mM de Pi) acrescido de 6 mM de  $\text{MgSO}_4$  consumia quase todo o Pi disponível no meio. A partir desse experimento, a curva de crescimento, os ensaios de consumo de Pi e de acúmulo de poliP foram realizados em meio HGP10, contendo 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , e em meio HGP10.6, contendo 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 6 mM de  $\text{MgSO}_4$ , para evitar que a baixa concentração de Pi se tornasse um fator limitante para o crescimento das bactérias.

### 3.4.2 Efeito de íons de magnésio sobre a taxa de crescimento do mutante *phoU*

A figura 15 mostra a curva de crescimento da cepa selvagem e do mutante *phoU* em meio HGP10 contendo duas concentrações de magnésio distintas, 1 mM e 6 mM de  $\text{MgSO}_4$ . A taxa de crescimento da cepa selvagem e do mutante *phoU* não foi afetada pela suplementação de  $\text{MgSO}_4$  durante a fase exponencial e até as 13 horas de cultivo. Por outro lado, após 24 horas, o rendimento da cultura do mutante *phoU* cultivado em HGP10.6 foi aproximadamente 3 vezes maior do que quando comparado com o mesmo mutante cultivado em meio HGP10, confirmando o resultado apresentado na Fig. 14. As taxas de crescimento de PA14 e do mutante *phoU* cultivados em HGP10 na fase exponencial (de 1 a 3 h, no caso da cepa selvagem e de 1 a 5 h, no caso do mutante *phoU*) foram de  $0,68 \text{ h}^{-1}$  e  $0,34 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Já no meio HGP10.6, as  $\mu$  de PA14 e *phoU* foram  $0,70 \text{ h}^{-1}$  e  $0,36 \text{ h}^{-1}$ .

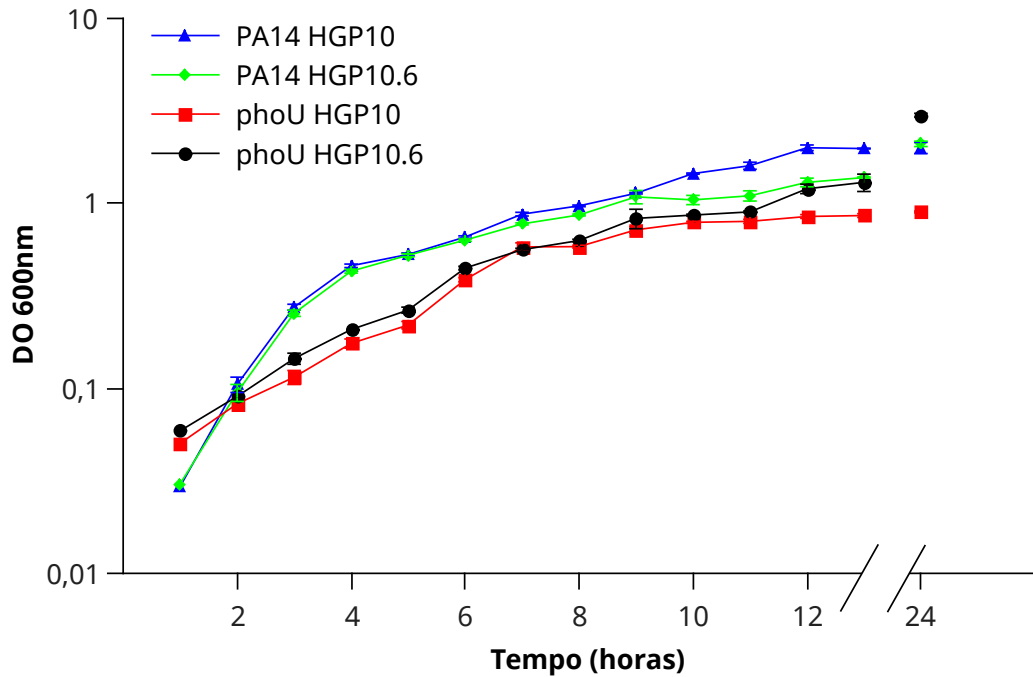


Figura 15 – Curva de crescimento das culturas em meio contendo 1 ou 6 mM de  $MgSO_4$ . As bactérias foram cultivadas durante 24 horas em meio HGP10 contendo 1 ou 6 mM de  $MgSO_4$ . Amostras foram coletadas a cada hora e a turbidez foi medida em um espectrofotômetro a 600 nm. O resultado apresentado é a média de três ensaios independentes. As barras de erro mostram o erro padrão da média.

### 3.4.3 Efeito de íons de magnésio sobre o consumo de Pi do mutante *phoU*

Foi demonstrado que o mutante *phoU* de *P. aeruginosa* remove 3-5 vezes mais fosfato do meio quando comparado com a cepa selvagem (Fig. 12 e (19)). Para verificar se a concentração de magnésio disponível no meio afeta o consumo de Pi do mutante *phoU*, bactérias foram cultivadas em meio HGP10 e HGP10.6 e o consumo de Pi foi determinado pela medição do fosfato residual no meio. A figura 16A mostra a concentração de Pi consumido nos meios HGP10 e HGP10.6 após 16 horas de cultivo.

Estes resultados confirmam que o mutante *phoU* consome altas quantidades de Pi, independentemente da concentração de  $Mg^{2+}$  no meio. Ao adicionar mais magnésio ao meio de cultura, o rendimento do mutante *phoU* aumentou e, conseqüentemente o consumo de Pi também aumentou. Por outro lado, a relação Pi consumido por  $DO_{600}$  diminuiu, como pode ser visto na Figura 16B. Em relação à cepa selvagem, a adição de mais magnésio ao meio não afetou

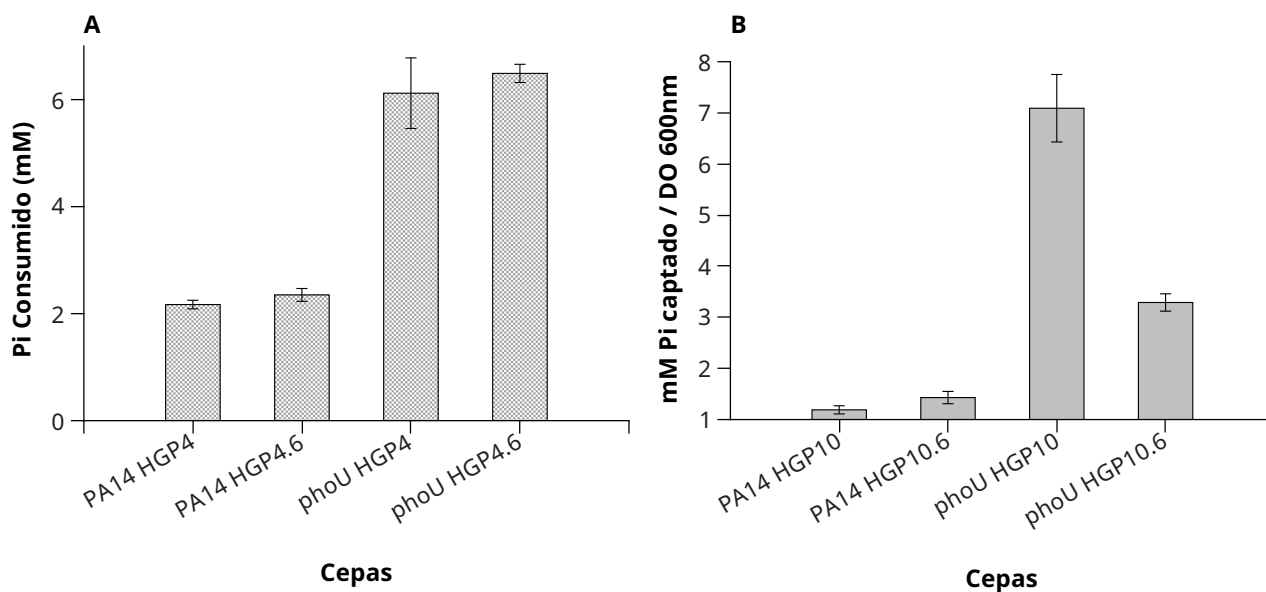


Figura 16 – **Consumo de fosfato no meio HGP4 e HGP4.6.** **A)** Bactérias foram cultivadas durante 16 horas com agitação a 37°C em meio HGP10 e HGP10.6 e o fosfato consumido foi medido. **B)** Consumo de Pi normalizado pela DO<sub>600</sub> das respectivas culturas. O resultado apresentado é a média de três ensaios independentes. As barras de erro mostram o erro padrão da média.

significativamente a captação de Pi.

### 3.4.4 Efeito de íons de magnésio sobre o acúmulo de poliP no mutante *phoU*

Foi demonstrado que o mutante *phoU* de *P. aeruginosa* acumula 5 vezes mais poliP quando comparado com a cepa selvagem (19). Para verificar se o acúmulo de poliP é afetado pelo aumento de magnésio disponível no meio, bactérias foram cultivadas em meio HGP10 e HGP10.6. Após 16 horas de crescimento as culturas foram coradas com DAPI. Na Figura 17 é possível observar que o mutante *phoU* cultivado em meio HGP10 acumulou 5 vezes mais poliP por DO<sub>600</sub> do que a cepa selvagem cultivada neste mesmo meio. Por outro lado, em HGP10.6, a diferença de acúmulo de poliP por unidade de DO<sub>600</sub> entre o mutante *phoU* e a cepa selvagem foi de apenas 2 vezes. Esse resultado corrobora o observado em relação ao consumo de Pi/DO<sub>600</sub> (Figura 16) e mostra que a adição de mais magnésio ao meio de cultura afeta negativamente o acúmulo de poliP no mutante *phoU*. A cepa selvagem acumulou quantidades semelhantes de poliP independentemente da concentração de Mg<sup>2+</sup>.

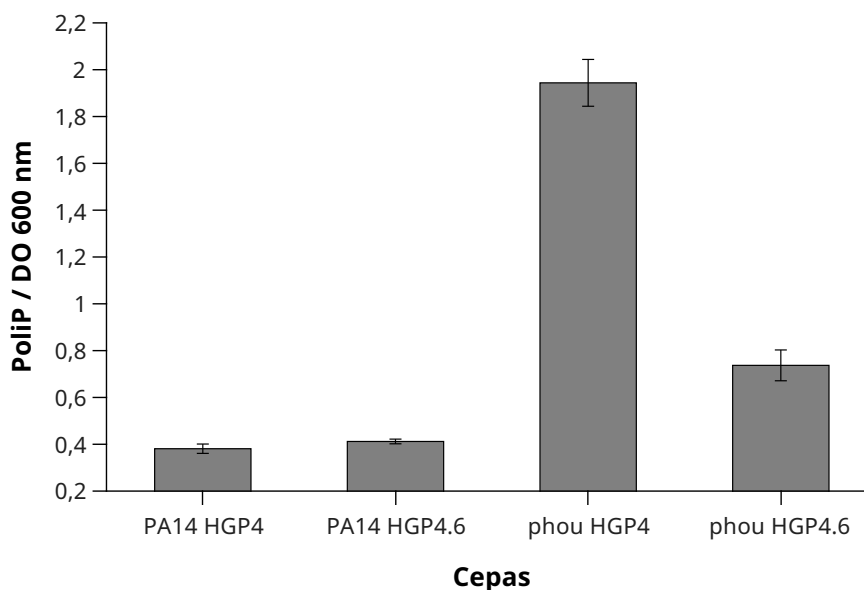


Figura 17 – Acúmulo de polifosfato no meio HGP4 e HGP4.6. Bactérias foram cultivadas durante 16 horas com agitação a 37°C em meio HGP10 e HGP10.6 e o polifosfato acumulado foi medido pelo ensaio de microdeterminação de Pi após hidrólise do polímero. O resultado da medição foi normalizado pela DO<sub>600</sub> das respectivas bactérias. O resultado apresentado é a média de três ensaios independentes. As barras de erro mostram o erro padrão da média.

### 3.4.5 Efeito de íons de magnésio sobre a motilidade do tipo *swarming*

A Figura 18 mostra o efeito do Mg<sup>2+</sup> sobre a motilidade do tipo *swarming* na cepa selvagem e no mutante *phoU*, respectivamente.

É possível observar que a adição de 6 mM de MgSO<sub>4</sub> causou um aumento significativo no *swarming* de PA14. No caso do mutante *phoU*, a adição de Mg<sup>2+</sup> excedente teve um efeito ainda mais fantástico. Enquanto que no Meio *Swarming*-1, o mutante *phoU* não apresentou motilidade, no meio *Swarming*-6, a formação dos tentáculos é nítida, mostrando que a concentração de magnésio tem um papel fundamental na capacidade de *swarming* do mutante *phoU*.

O fato da motilidade do tipo *swarming* ser drasticamente aumentada no meio HGP10.6, sugere que íons de Mg<sup>2+</sup> afetam positivamente essa modalidade de locomoção. Isso também sugere que a ausência de *swarming* no mutante *phoU* é, pelo menos em parte, devida à carência de Mg<sup>2+</sup>, provavelmente provocada pela quelação do cátion divalente pelo poliP.

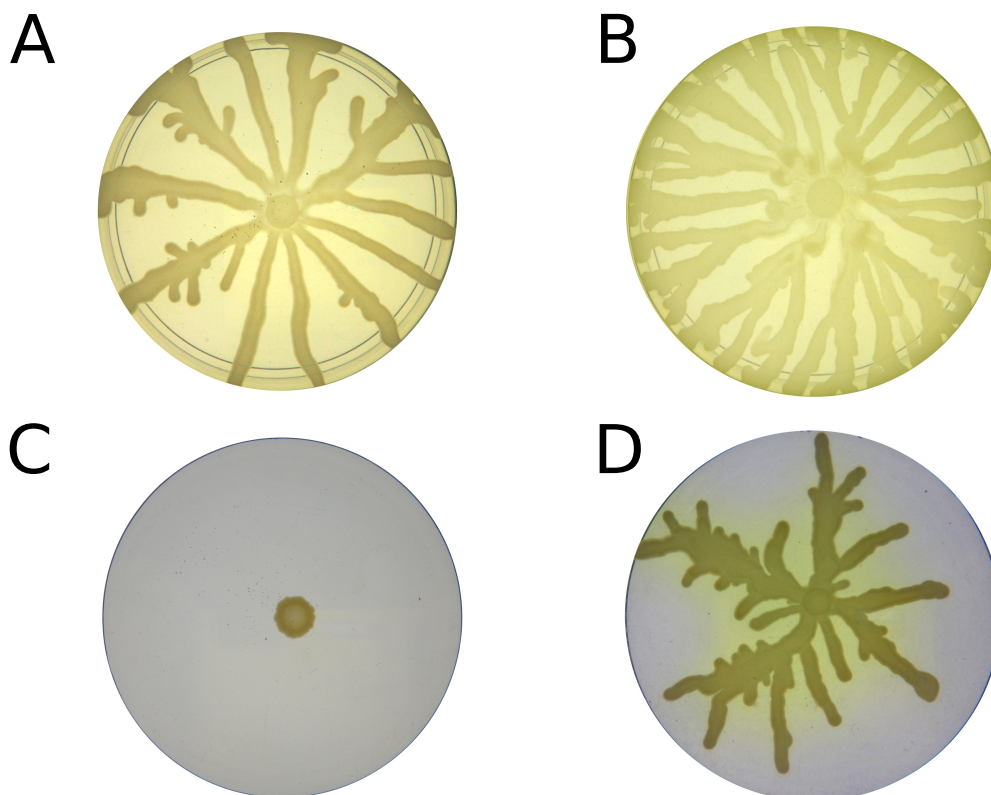


Figura 18 – Efeito do  $Mg^{2+}$  sobre a motilidade do tipo *swarming* em PA14. PA14 selvagem e o mutante *phoU* foram cultivadas em meio HGP10 e HGP10.6 durante 16 horas, no dia seguinte 10  $\mu$ l de cada cultura de foram aplicados ao centro da placa de Meio Swarming-1 (A e C) e Meio Swarming-6 (B e D), respectivamente. As placas foram mantidas a 30 °C durante 48 horas. As imagens são representativas de 3 ensaios.

### 3.4.6 Efeito de íons de magnésio sobre a resistência a antibióticos do mutante *phoU*

Para verificar se a resistência a antibióticos também seria afetada pela suplementação de íons de magnésio, bactérias foram cultivadas em meio HGP10.6 e HGP10. A Figura 19 mostra que, com a exceção da sensibilidade à sulfonamida, que aumentou em bactérias cultivadas com mais  $MgSO_4$ , não houve diferença significativa na sensibilidade do mutante *phoU* aos antibióticos testados quando cultivado em meio contendo 1 ou 6 mM de  $MgSO_4$ .

### 3.4.7 Efeito de íons de magnésio sobre a produção de piocianina

A motilidade do tipo *swarming* está relacionada com a densidade populacional de bactérias, através do fenômeno de *quorum sensing* (108). Outro fenótipo afetado por *quorum sensing* é a



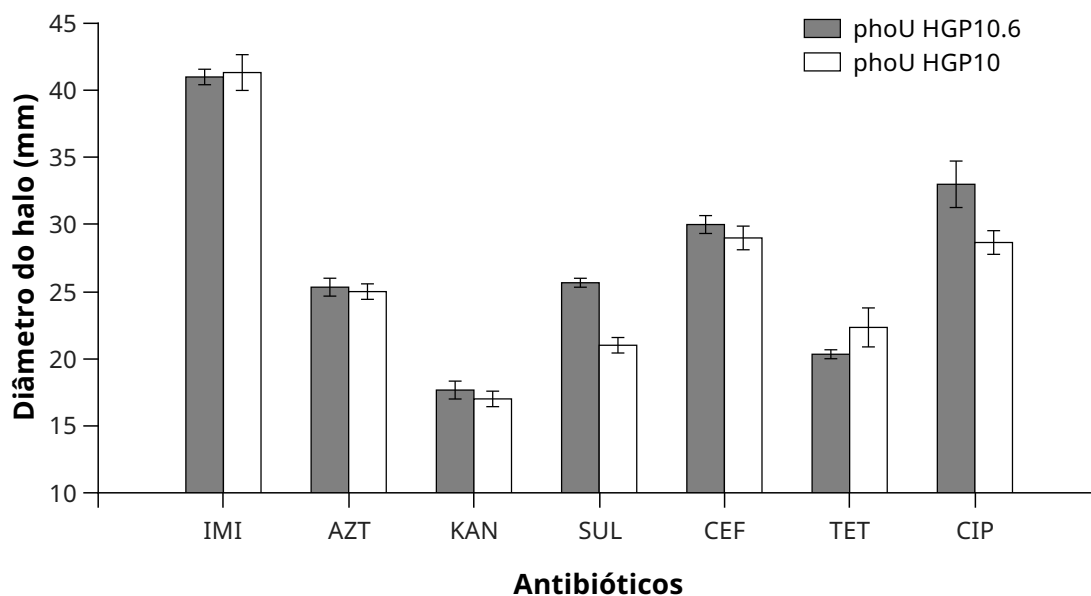


Figura 19 – **Antibiograma realizado em meio suplementado com  $MgSO_4$ .** As bactérias foram cultivadas em meio HGP10.6 e HGP10 durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibiótico utilizados foram: imipenem 10  $\mu g$  (IMI), aztreonam 30  $\mu g$  (AZT), canamicina 30  $\mu g$  (KAN), sulfonamida 250  $\mu g$  (SUL), ceftazidima 30  $\mu g$  (CEF), tetraciclina 30  $\mu g$  (TET) e ciprofloxacina 5  $\mu g$  (CIP). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos com o Software ImageJ2. O resultado apresentado é a média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

produção de piocianina (109). Para verificar se a produção de piocianina também seria afetada pela concentração de magnésio, as bactérias foram cultivadas em meio HGP10 e HGP10.6 e a piocianina foi extraída conforme descrito na seção 2.5.4. A Figura 20 mostra a porcentagem de piocianina produzida pelas bactérias. À cepa selvagem cultivada em meio HGP10 foi atribuído o valor de 100%.

Pode-se observar que o mutante *phoU* produz mais piocianina do que a cepa selvagem, independentemente da condição de cultivo, mas a adição de  $Mg^{2+}$  não afetou a produção desse metabólito secundário em nenhuma das cepas. Além disso, o fato do mutante *phoU* produzir mais piocianina do que a cepa selvagem, sugere que o *quorum sensing* não foi negativamente afetado pela mutação.

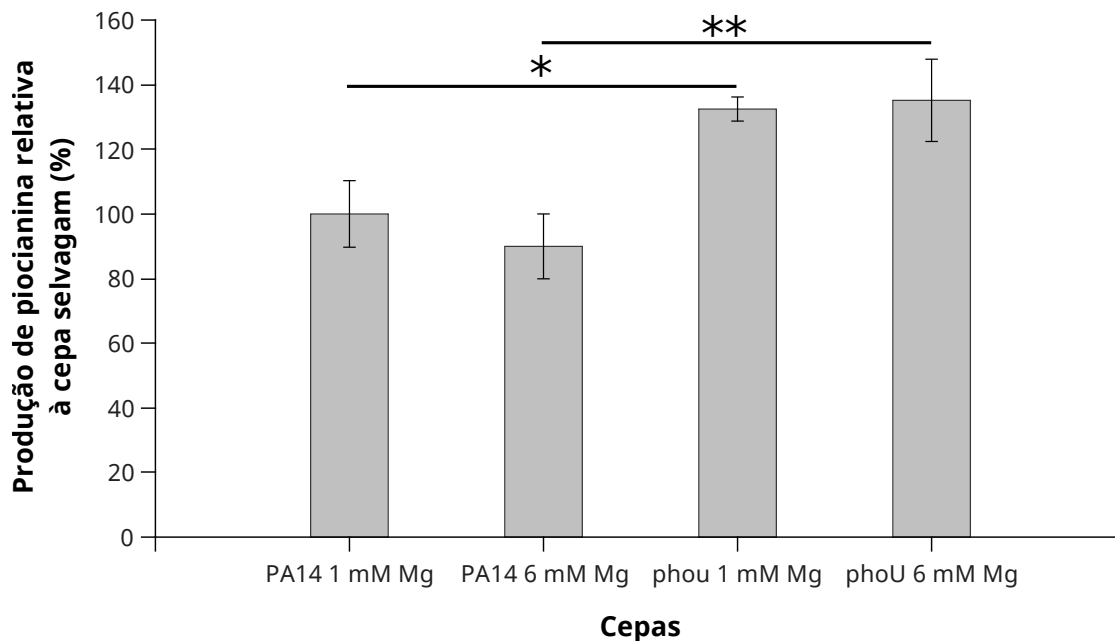


Figura 20 – **Produção de piocianina de PA14 e do mutante *phoU* em meio HGP10 e HGP10.6.** As bactérias foram cultivadas em meio HGP10 e HGP10.6 durante 16 horas com agitação a 37 °C. A piocianina presente no sobrenadante foi extraída e quantificada conforme descrito na seção 2.5.4 e normalizados pela  $DO_{600}$ . O resultado apresentado é a média de 3 ensaios independentes e a barra de erro mostra o erro padrão da média. \*:  $p = 0.003381$ . \*\*:  $p = 0.00349$ .

### 3.5 Detecção da atividade de fosfatase alcalina em *P. aeruginosa*

Ao entrar na fase de carência de Pi, os genes do regulon PHO são induzidos e a atividade da FA aumenta dezenas de vezes. Esse quadro vale para todas as bactérias que já foram testadas no laboratório, com a exceção de *P. aeruginosa*. Neste caso, mesmo quando todo o Pi era consumido e o crescimento bacteriano era interrompido, não era possível detectar a atividade da FA em PA14 ou em seus derivados não PHO-constitutivos. No caso do mutante *phoU*, que supostamente expressa a FA de forma constitutiva, era possível detectar uma baixa atividade da enzima.

Para testar a possibilidade de que a atividade da FA não estaria sendo detectada devido a algum problema com o meio de cultura HGP, avaliamos diferentes meios. Foi possível detectar alguma atividade de FA, ainda que baixa, utilizando o meio MMH, descrito em (110). Porém, neste meio de cultura, o rendimento das culturas bacterianas era sempre muito baixo, tanto para a cepa selvagem quanto para o mutante *phoU*. Ao meio HGP foi acrescentado, quando

Referência	pNPP	CHCl <sub>3</sub>	FeCl <sub>3</sub>	Centrifugação
Este trabalho	0,9 mg/ml	-	2 µM	Não
Neznansky	13,1 mg/ml	+	50 µM	2.200 RPM

Tabela 3 – Comparação entre o método de Neznansky et al. (1) e o método padrão utilizado no laboratório para medir a atividade da FA.

necessário, os micro e macronutrientes encontrados no meio MMH e mesmo assim a atividade de FA continuava praticamente indetectável.

Neznansky e colaboradores (1), utilizando um meio de cultura definido um pouco distinto do HGP e algumas diferenças na técnica de medição da atividade da FA, detectaram uma alta atividade de FA na cepa PA01 de *Pseudomonas aeruginosa*. As diferenças entre o método de (1) e a nossa técnica tradicional estão descritas na Tabela 3.

Para determinar qual o componente responsável pela grande diferença nos níveis de FA observados em cada um dos métodos, avaliamos separadamente cada uma das diferenças metodológicas. A Figura 21 mostra um esquema das condições de cultivo e do ensaio de detecção da atividade da FA avaliadas.

A atividade de FA foi observada apenas quando as bactérias foram cultivadas com 50 µM FeCl<sub>3</sub>, e foram utilizados 13,1 mg/ml de pNPP.

O meio HGP que utilizamos corriqueiramente em nosso laboratório possui apenas 2 µM de FeCl<sub>3</sub>. Com base nesses resultados passamos a avaliar o efeito do ferro sobre outros fenótipos de PA14WT e do mutante *phoU*.

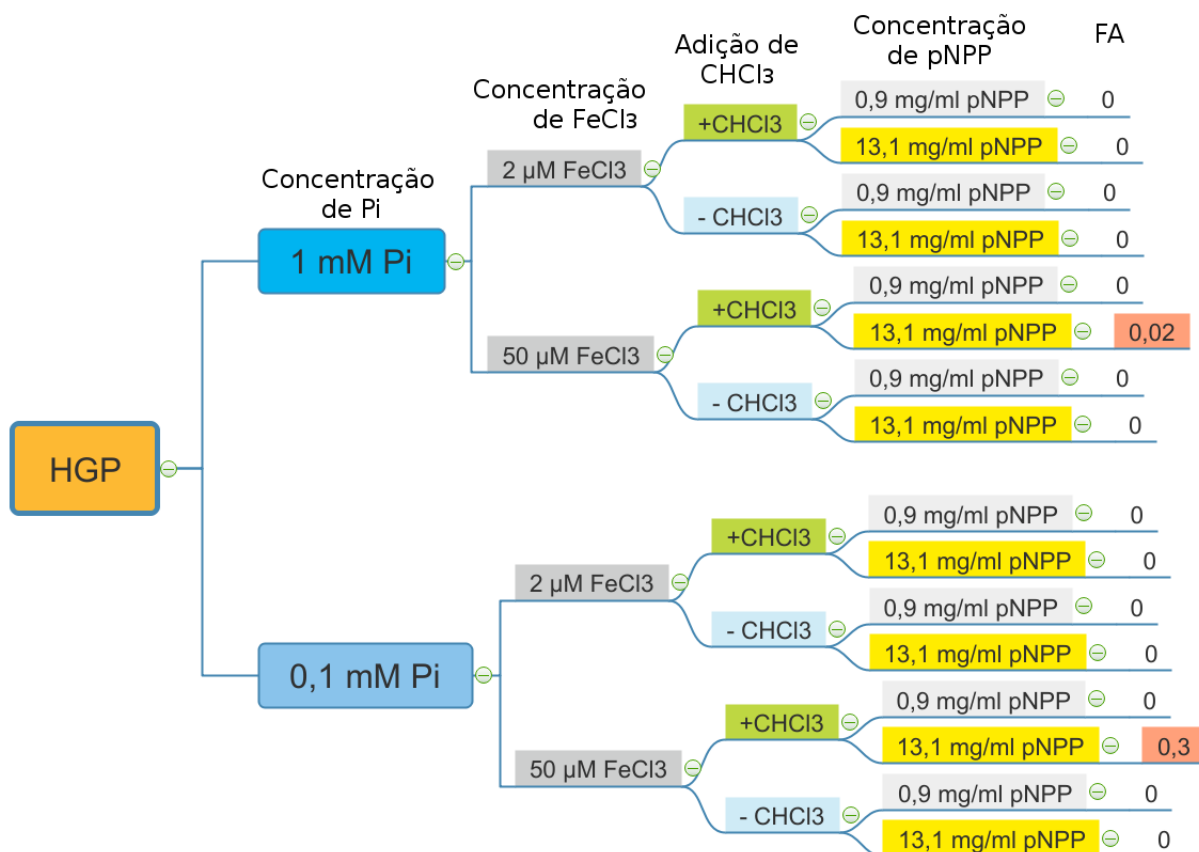


Figura 21 – **Variações do método de detecção da atividade da FA.** Bactérias da cepa PA14WT foram cultivadas em meio HGP/HGP50 contendo 1/0,1 mM de Pi durante 24 horas com agitação a 37 °C. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 2.200 rpm por 5 minutos e permeabilizadas ou não com CHCl<sub>3</sub>. O ensaio de FA foi realizado com 13,1 mg/ml ou 0,9 mg/ml de pNPP. No lado direito, em caixas coloridas, foram anotadas os níveis enzimáticos da FA observados

### 3.6 Efeitos da adição de altas concentrações de ferro ao meio de cultura

Na seção 3.4 foi mostrado o efeito da adição de íons de magnésio sobre a taxa de crescimento, rendimento e resistência a estresses ambientais na cepa selvagem e no mutante *phoU*. O efeito do Mg<sup>2+</sup> sobre a atividade da FA do mutante *phoU* e da cepa selvagem foi também avaliado, mas as atividades reportadas eram sempre muito baixas, mesmo no mutante *phoU*, que produz FA de forma constitutiva. Embora fosse possível observar em placas de LB suplementadas com o substrato cromogênico X-P a constitutividade do mutante *phoU*.

No meio HGP utilizado rotineiramente em nosso laboratório, a concentração padrão de FeCl<sub>3</sub> é de 2 μM. Os resultados a seguir mostram o efeito da adição de ferro sobre a atividade de FA

em *P. aeruginosa* PA14.

### 3.6.1 Concentrações crescentes de íon férrico aumentam a atividade da FA na cepa PA14

Para avaliar o efeito de íons férricos sobre a atividade da FA na cepa selvagem PA14, esta foi cultivada em meio HGP contendo 0,1 mM de Pi e concentrações crescentes (2, 5, 10, 30, 50, 70 e 100  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{FeCl}_3$ . A Figura 22 mostra que a suplementação de concentrações crescentes de  $\text{FeCl}_3$  ao meio de cultura aumentou gradativamente a atividade da FA, chegando ao máximo em bactérias cultivadas com 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ . Concentrações maiores de  $\text{FeCl}_3$ , como 50, 70 e 100  $\mu\text{M}$ , não alteraram significativamente a atividade da FA.

Vale ressaltar que não foi preciso utilizar altas concentrações de pNPP (13,1 mg/ml) neste ensaio. Observamos que 0,9 mg/ml pNPP já era o suficiente para observar a atividade da FA.

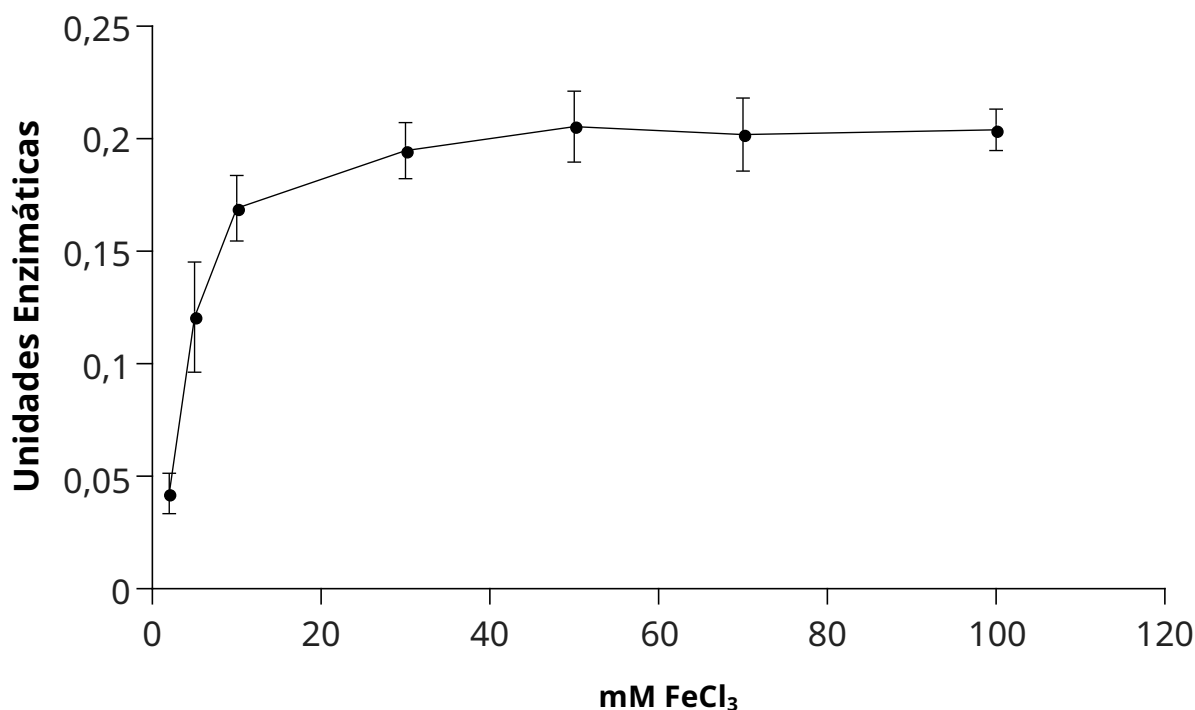


Figura 22 – Concentrações crescentes de  $\text{FeCl}_3$  aumentam a atividade da FA. PA14WT foi cultivada em meio HGP0,1 suplementado com concentrações crescentes (2, 5, 10, 30, 50, 70, 100  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{FeCl}_3$  com agitação a 37 °C por 24 horas. As culturas foram então ensaiadas para a atividade de FA. Cada ponto representa a média e o erro padrão da média de três experimentos independentes.

Para melhor avaliar o efeito da adição de  $\text{FeCl}_3$  sobre a atividade da FA, foram testadas as cepas selvagem PA14WT, o mutante *pstC*, que é PHO-constitutivo e o mutante *phoA*, como controle. *P. aeruginosa* produz outras fosfatases, que poderiam estar sendo ativadas pela adição de  $\text{FeCl}_3$ . Os resultados apresentados na Figura 23A (meio suplementado com  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ ) mostram que a FA da cepa selvagem foi induzida 10 vezes pela carência de Pi, ao passo que a atividade da FA na cepa *pstC* foi máxima, independentemente da concentração de Pi no meio. Já o mutante *phoA* mostrou apenas um nível basal de expressão de FA, que pode ser atribuído à atividade de outras fosfatases presentes na célula. No meio contendo apenas  $2 \mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ , a atividade da FA na cepa selvagem e no mutante *pstC* foi praticamente igual a do mutante *phoA*. Isso confirma que a suplementação de  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  é imprescindível para a detecção da atividade da FA, mas não é necessária para a indução da expressão da enzima, pois o mutante *pstC*, que é PHO-constitutivo, também não apresentou atividade de FA.

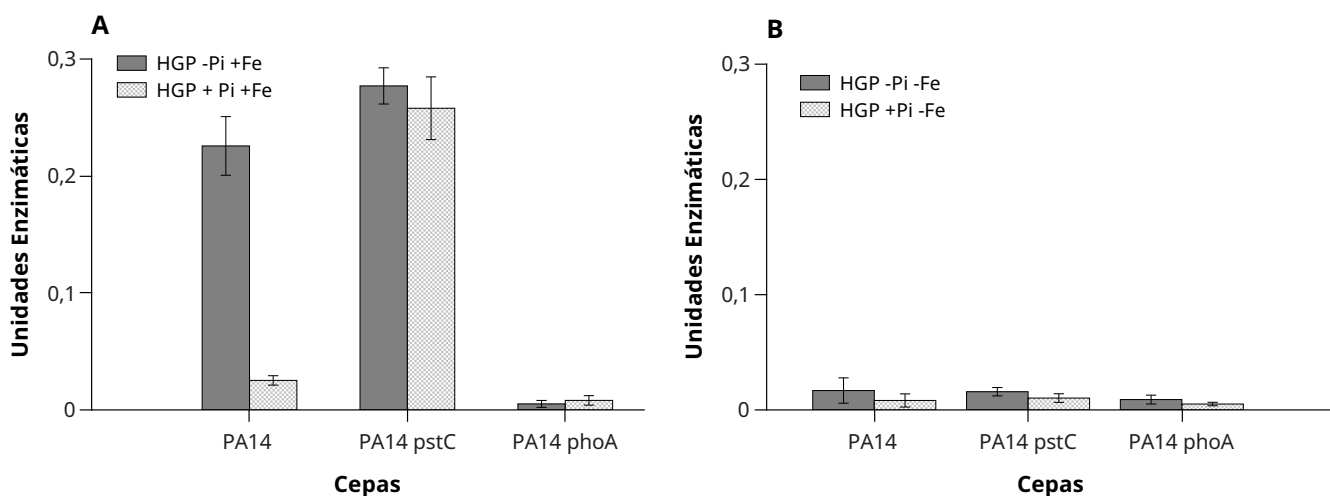


Figura 23 – Efeito da adição de  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  ao meio sobre a atividade da FA. Bactérias foram cultivadas em meio HGP com agitação a  $37^\circ\text{C}$  durante 16 horas e ensaiadas para a atividade da FA. A, meio contendo  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ ; B, meio contendo  $2 \mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ . As barras de cor cinza representam meio contendo  $0.1 \text{ mM}$  de Pi, as barras verdes representam culturas em meio com  $1 \text{ mM}$  de Pi. Cada barra representa a média de 3 ensaios independentes. As barras de erro mostram o erro padrão da média.

Para verificar se o efeito da adição de  $\text{FeCl}_3$  sobre a atividade da FA é dependente do tipo de meio de cultura utilizado, as bactérias foram cultivadas em um segundo meio de cultura, meio A. Este é um meio semi-rico, que possui 0,5% de peptona e ao qual não são normalmente adicionados sais de ferro. A Figura 24 mostra a atividade da FA em bactérias cultivadas em meio A normal e em meio A suplementado com 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ .

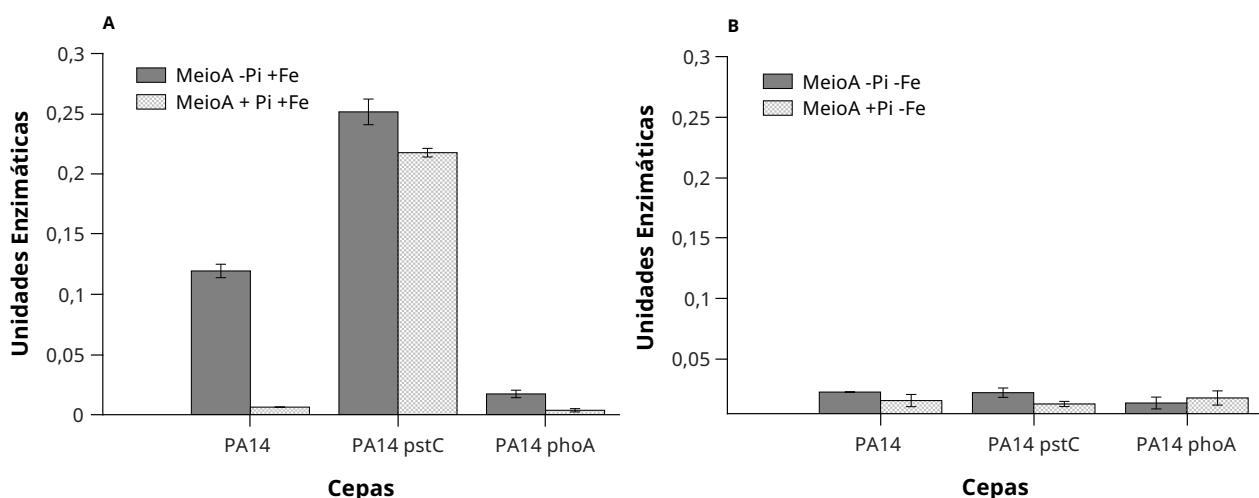


Figura 24 – **Atividade da FA em meio A suplementado com  $\text{FeCl}_3$ .** Bactérias (PA14, PA14 *pstC*, PA14 *phoA*) foram cultivadas em (A) meioA50 e (B) meioA suplementados ou não com 1 mM Pi a 37 °C com agitação durante 24 horas. As barras de cor cinza representam meio A não suplementado com Pi, as barras azuis representam culturas em meio A suplementado com 1 mM Pi. A atividade de FA foi medida. Cada coluna representa a média de 3 experimentos diferentes e a barra de erros indica o erro padrão da média.

Somente foi possível observar atividade de FA quando as bactérias foram cultivadas em meio contendo 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ . A carência de Pi, observada nas bactérias cultivadas em meio A + Fe resultou em uma indução de aproximadamente 20 vezes na atividade da FA, quando comparada às bactérias cultivadas em suficiência de Pi (meio A + Pi + Fe).

O mecanismo por trás do efeito do Fe sobre a atividade de FA ainda não está claro e está sendo estudado intensamente em nosso laboratório. Levantamos duas hipóteses até o momento. A primeira é a de que os íons de ferro afetariam a tradução de *phoA*. A segunda seria a de que o Fe estaria atuando sobre o dobramento ou secreção da FA para o periplasma.

### 3.6.1.1 A FA de PA14 é parcialmente secretada

Resultados preliminares em nosso laboratório sugeriram que parte da FA produzida por *P. aeruginosa* é secretada pela bactéria. Para investigar essa possibilidade e testar o efeito da adição de  $\text{FeCl}_3$  sobre a secreção da FA, bactérias foram cultivadas durante 20 horas nos meios HGP50 contendo 1 e 0.1 mM de Pi. Após a centrifugação, o pellet foi separado do sobrenadante e ambas as frações foram avaliadas quanto à atividade de FA. A Figura 25 mostra apenas os resultados obtidos em meio HGP50 contendo 0.1 mM de Pi. É possível observar que 70% da atividade da FA de PA14 está concentrada no sobrenadante. Por outro lado, 98% da atividade de FA de *E. coli* se encontra no pellet de células. Aparentemente, a maior parte da FA produzida por PA14 é secretada pela bactéria nessas condições de cultivo.

Estes resultados ajudam a explicar os resultados apresentados na Seção 3.5. No método utilizado por Neznansky et al. (1), a cultura de *P. aeruginosa* é centrifugada e o sobrenadante é descartado antes de medir a FA. Desta forma grande parte da FA estaria sendo eliminada e por isso, para esses autores é necessária a utilização de altas concentrações de pNPP (13,1 mg/ml).

### 3.6.2 Efeito da suplementação de íons de ferro sobre a taxa de crescimento de PA14WT e do mutante *phoU*

A Figura 26 mostra uma curva de crescimento da cepa selvagem e do mutante *phoU* cultivados em meios de cultura contendo duas concentrações de ferro distintas: HGP10 (2  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ ) e HGP10.50 (50  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ ). As taxas de crescimento na fase exponencial não foram alteradas na cepa selvagem, se mantendo em 0,4  $\text{h}^{-1}$  nas duas condições de cultivo. Já no mutante *phoU*, a taxa de crescimento foi de 0,38  $\text{h}^{-1}$  e de 0,54  $\text{h}^{-1}$  nos meios HGP10 e HGP10.50, respectivamente. Ou seja, a taxa de crescimento do mutante *phoU* aumentou 42% quando a bactéria foi cultivada no meio contendo 50  $\mu\text{M}$  de ferro. Após 22 horas de crescimento, o rendimento do mutante *phoU* cultivado em HGP10.50 é 3 vezes maior quando comparado com a cultura em meio HGP10.



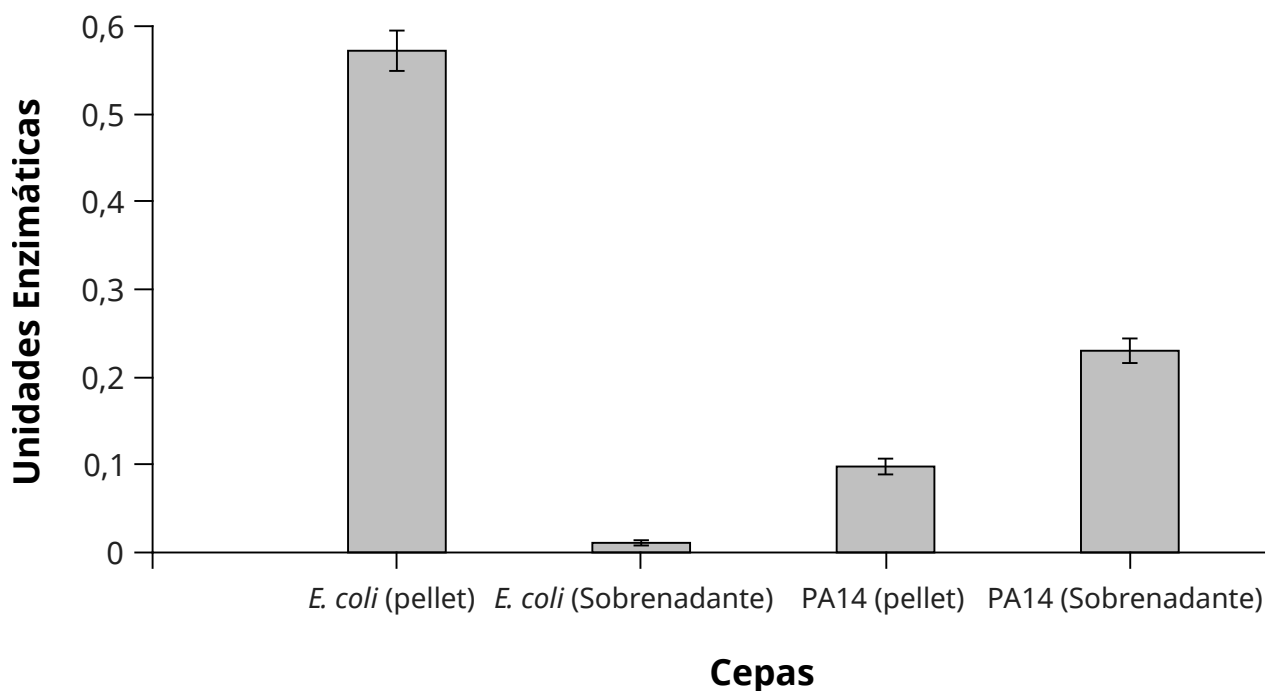


Figura 25 – **Atividade da FA no sobrenadante das culturas.** PA14WT e *E. coli* MG1655 foram cultivadas em meio HGP50 suplementado com 0,1 mM de Pi com agitação durante 24 horas. A atividade de FA foi medida no pellet de células e no sobrenadante da cultura. Cada coluna representa a média de 3 ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média.

### 3.6.3 Efeito da suplementação de íons de ferro sobre o consumo de Pi em PA14WT e no mutante *phoU*

Para verificar se a concentração de ferro disponível no meio afeta o consumo de Pi do mutante *phoU* de PA14, bactérias foram cultivadas em meio HGP10 e HGP10.50 e o Pi residual no meio de cultura foi determinado. A Figura 27 mostra a concentração de Pi consumido nos meios HGP10 e HGP10.50 após 22 horas de cultivo.

Estes resultados mostram que o mutante *phoU* seguiu consumindo altas quantidades de Pi. Ao adicionar 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  ao meio de cultura, o rendimento do mutante *phoU* aumentou, e conseqüentemente, o consumo de Pi também aumentou. Na cepa selvagem, a relação Pi consumido por  $\text{DO}_{600}$  aumentou 75% na presença de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  em comparação à cultura em meio contendo apenas 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ . Por outro lado, a suplementação de ferro diminuiu em 16,4% a relação de consumo de Pi por  $\text{DO}_{600}$  no mutante *phoU*. Podemos concluir que a adição

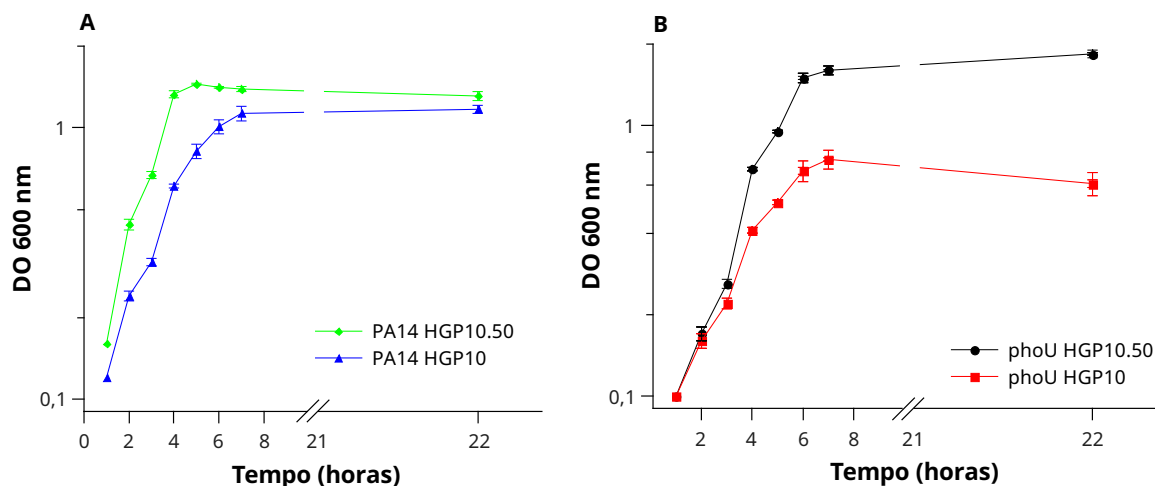


Figura 26 – Curva de crescimento das culturas em meio contendo 2 ou 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ . As bactérias foram cultivadas durante 22 horas em meio HGP10 e HGP10.5. Amostras foram coletadas a cada hora durante as 7 primeiras horas e a turbidez foi medida em um espectrofotômetro a 600 nm. O rendimento foi medido após 22 horas de crescimento. **A)** As taxas de crescimento exponencial de PA14 cultivada em HGP10, HGP10.50 foram de  $0.42 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.43 \text{ h}^{-1}$  respectivamente. **B)** As taxas de crescimento exponencial do mutante *phoU* cultivado em HGP10 e HGP10.50 foram  $0.38 \text{ h}^{-1}$  e  $0.54 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. O resultado apresentado é a média de três ensaios independentes. As barras de erro mostram o erro padrão da média.

de  $\text{FeCl}_3$  afeta o consumo de Pi da cepa selvagem e do mutante *phoU* de forma antagonista.

Uma possível explicação para os efeitos deletérios da mutação *phoU* seria a de que o excesso de poliP estaria quelando os íons de ferro, resultando na carência deste nutriente. A presença de altas concentrações de  $\text{FeCl}_3$ , reverteria esse problema. Para testar essa hipótese, o polifosfato extraído a partir do mutante *phoU* foi submetido a uma microanálise de raios-X em um microscópio eletrônico de transmissão (TEM). Nessa análise, conseguimos detectar baixas concentrações de magnésio associadas aos grânulos de poliP extraídos do mutante *phoU*, porém a presença do ferro não foi detectada.

A espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) apresenta maior sensibilidade quando comparada à técnica de microanálise de raios-X no TEM. Estão sendo realizados ensaios de análise elementar utilizando essa técnica para detectar íons de ferro nas amostras de poliP.

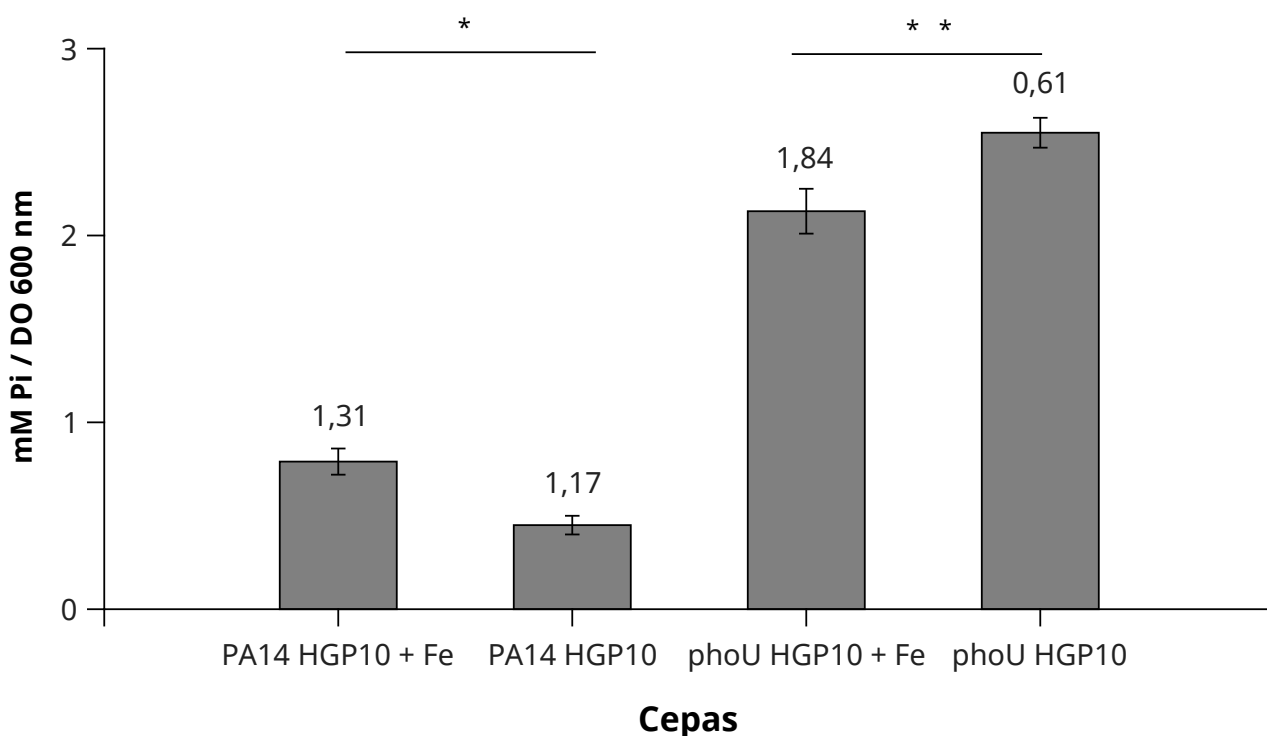


Figura 27 – **Consumo de Pi nos meios HGP10 e HGP10.50.** Bactérias foram cultivadas em meio HGP10 e HGP10.50 com agitação a 37 °C durante 22 horas e o Pi residual foi medido. O resultado foi normalizado pela DO<sub>600</sub> das respectivas bactérias. O número acima das barras é a média dos rendimentos das culturas. O resultado apresentado é a média de três ensaios independentes. As barras de erro mostram o erro padrão da média. \* p = 0.0168. \*\* p = 0.0436

### 3.7 Inviabilidade do duplo mutante PA14 *phoU ppk*

Para testar se os efeitos fisiológicos deletérios do nocaute de *phoU* (maior sensibilidade a estresses ambientais e antibióticos e defeito no crescimento) estão relacionados ao acúmulo de poliP, o gene *ppk* —que codifica a principal polifosfato quinase— de *P. aeruginosa* foi deletado utilizando a metodologia descrita em 2.3.2. Porém, apesar de diversas tentativas, não foi possível obter o duplo nocaute de *phoU* e *ppk* na mesma cepa. Isso sugere que a ocorrência concomitante das duas deleções é letal para a bactéria.

De fato, não há relatos na literatura da existência do duplo mutante *phoU ppk* em *E. coli* ou em *P. aeruginosa*, o que reforça a hipótese de que essa construção seja altamente deletéria para a bactéria. O motivo dessa inviabilidade seria o acúmulo de concentrações tóxicas de Pi no citoplasma, uma vez que o excesso de Pi não seria polimerizado e armazenado em grânulos de

volutina (111).

### 3.8 Análise metabolômica da cepa selvagem PA14 e do mutante *phoU*

Com o intuito de identificar diferenças metabólicas entre o mutante *phoU* e a cepa selvagem de *P. aeruginosa*, e também analisar o efeito da carência de Pi sobre o metaboloma da cepa selvagem e do mutante *phoU*, foi realizada uma análise por ressonância magnética nuclear (RMN) dos principais metabólitos dessas bactérias. Duas condições de cultivo foram utilizadas para extrair os metabólitos: carência de Pi (meio HGP0.1) e suficiência de Pi (meio HGP4).

#### 3.8.1 Efeito da carência de fosfato sobre o metaboloma de PA14

O metaboloma de PA14 cultivada em suficiência (4 mM) e carência (0,1 mM) de Pi foi analisado por RMN para comparar a diferença entre as moléculas produzidas nessas duas condições.

A Figura 28 mostra os metabólitos extraídos de PA14 cultivada em carência de fosfato, que tiveram a produção aumentada ou diminuída em pelo menos duas vezes em relação à mesma cepa cultivada em suficiência de Pi. Apenas os metabólitos com valores significativos ( $p < 0.05$ ) estão nomeados.

Nove metabólitos com  $p < 0,05$  tiveram as suas concentrações alteradas pelo menos duas vezes na cepa selvagem cultivada em carência de fosfato em comparação com a mesma cepa cultivada em suficiência de Pi. A concentração de etileno glicol foi 3.500 vezes maior em bactérias carentes em comparação à bactérias cultivadas com excesso de Pi.

#### 3.8.2 Efeito da mutação *phoU* sobre o metaboloma de PA14

O mutante *phoU* expressa constitutivamente os genes do regulon PHO, mimetizando, assim, o estado de carência de Pi. Porém, conforme relatado em seções anteriores, a mutação *phoU* afeta diversos outros fenótipos, não relacionados diretamente com a carência de Pi. Para avaliar

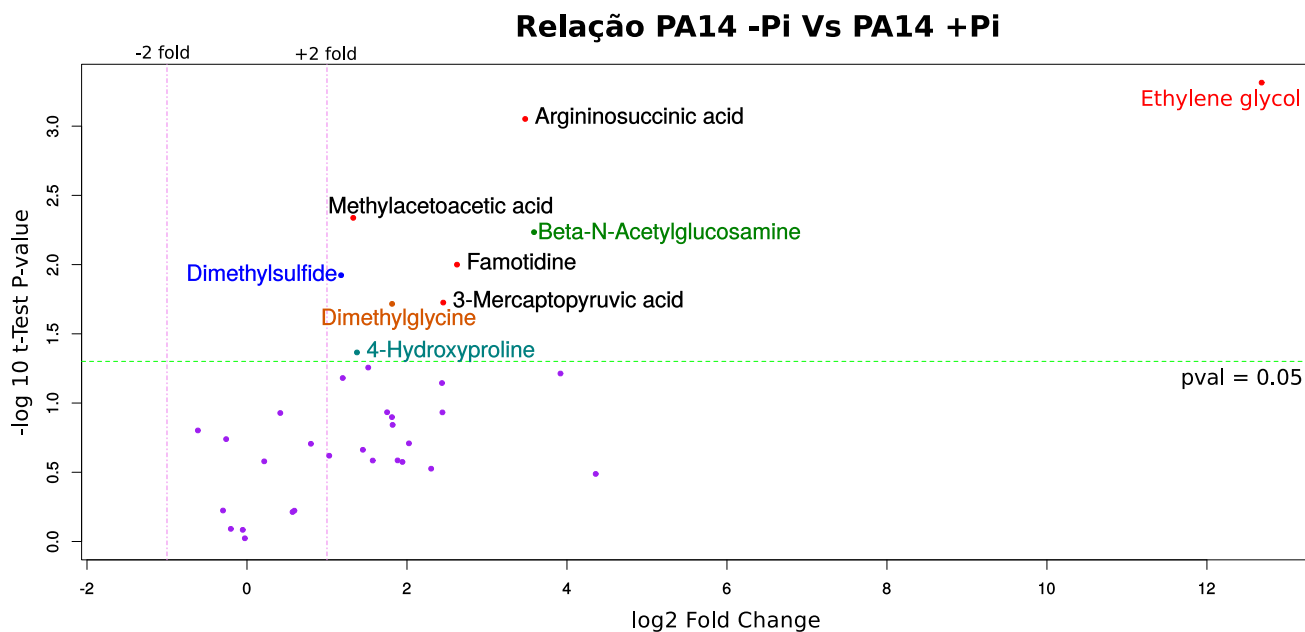


Figura 28 – **Metaboloma de PA14 cultivada em carência e suficiência de Pi.** Bactérias foram cultivadas em meio HGP0,1 e HGP4 com agitação a 37 °C durante 16 horas. O metaboloma foi analisado por RMN após a extração dos metabólitos com metanol-clorofórmio. Cada ponto representa a razão entre um metabólito extraído de bactérias carentes em Pi e a concentração do mesmo extraído de bactérias cultivadas em suficiência de Pi. O resultado apresentado corresponde à média de cinco extrações independentes de cada condição de cultivo.

o efeito da mutação *phoU* sobre o metaboloma de *P. aeruginosa*, a cepa selvagem PA14 e o seu mutante *phoU* foram cultivados em suficiência (4 mM) de Pi. O metaboloma de ambas as cepas foi analisado por RMN após 16 horas de cultivo e o resultado apresentado na Figura 29 mostra a diferença entre os metabólitos produzidos pelo mutante *phoU* em relação à cepa selvagem.

Foram identificados e quantificados 39 metabólitos no mutante *phoU* e na cepa selvagem cultivados na mesma condição. Onze metabólitos apresentaram uma diferença de pelo menos 2 vezes em uma cepa ou outra, com um valor de  $p < 0,05$  (Figura 29). Assim como observado em culturas de PA14WT crescidas em meio limitado em Pi, havia uma alta concentração de etileno glicol no mutante *phoU* em relação à cepa selvagem, quando a concentração de Pi no meio não era limitante.

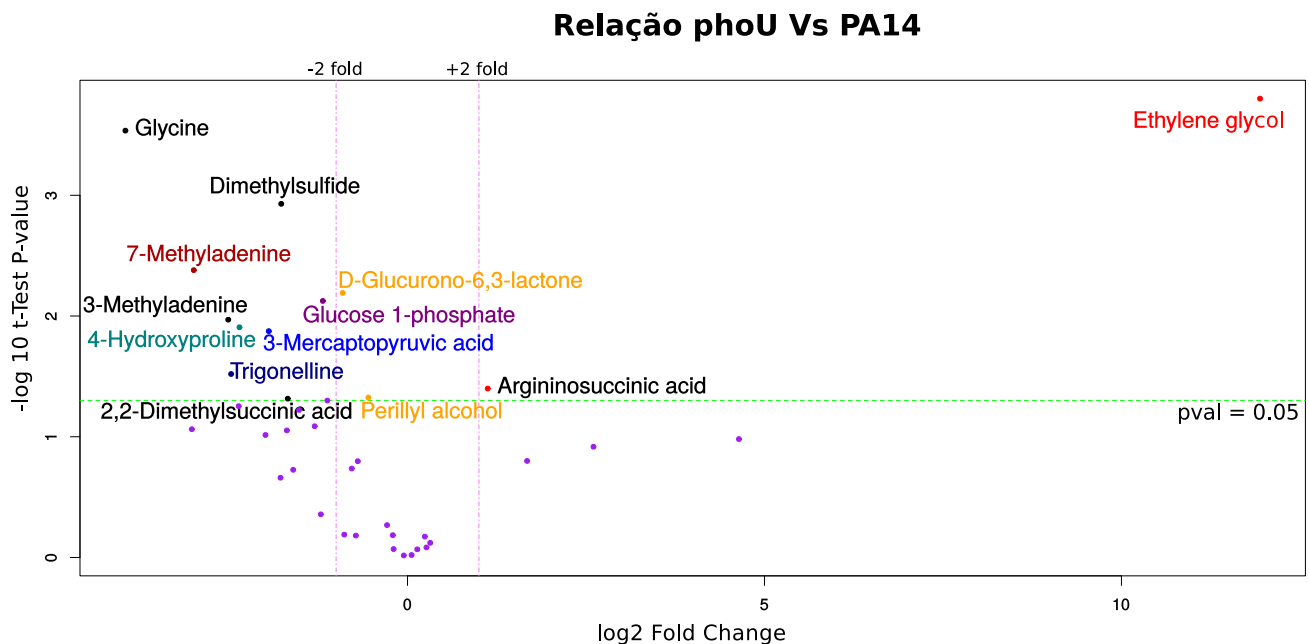


Figura 29 – **Comparação entre o metaboloma do mutante *phoU* e da cepa selvagem.** Bactérias foram cultivadas em meio HGP4 com agitação a 37°C durante 16 horas. O metaboloma foi analisado por RMN após a extração dos metabolitos com metanol-clorofórmio. Cada ponto representa a razão entre a concentração de um metabolito extraído do mutante *phoU* e a concentração do mesmo extraído da cepa selvagem. O resultado apresentado corresponde à média de cinco extrações independentes de cada cepa.

### 3.9 Efeito da mutação *phoU* sobre a virulência de *P. aeruginosa*

Diversos estudos associaram o operon *pst* à virulência em várias espécies de patógenos. A deleção parcial ou total dos genes de *pst* afetou negativamente a virulência de uma *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) (112), *E. coli* aviária (APEC) (113), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (114) e *Mycobacterium tuberculosis* (115). Em *P. aeruginosa*, há dados que relacionam a carência de Pi com a virulência (116).

Para avaliar o efeito da mutação *phoU* sobre a virulência de PA14, testamos a sobrevivência de *Galleria mellonella* e demais fenótipos relacionados à imunoproteção em larvas do inseto.

### 3.9.1 Efeito da mutação *phoU* sobre a sobrevivência de *Galleria mellonella*

Para testar o efeito da mutação *phoU* sobre a capacidade de virulência de *P. aeruginosa*, foi utilizado, como modelo, o invertebrado *Galleria mellonella*. Inicialmente, 3 grupos de 10 larvas de *G. mellonella* foram infectados com  $10^2$  UFCs da cepa selvagem, do mutante *phoU* e do mutante *phoU* complementado com o plasmídeo pLG13 (*phoU*<sup>+</sup>), separadamente. As larvas foram mantidas a 37 °C durante 24 horas e o número de sobreviventes foi contado 3, 6, 9 e 24 horas após a infecção. A Figura 30 mostra a média dos resultados.

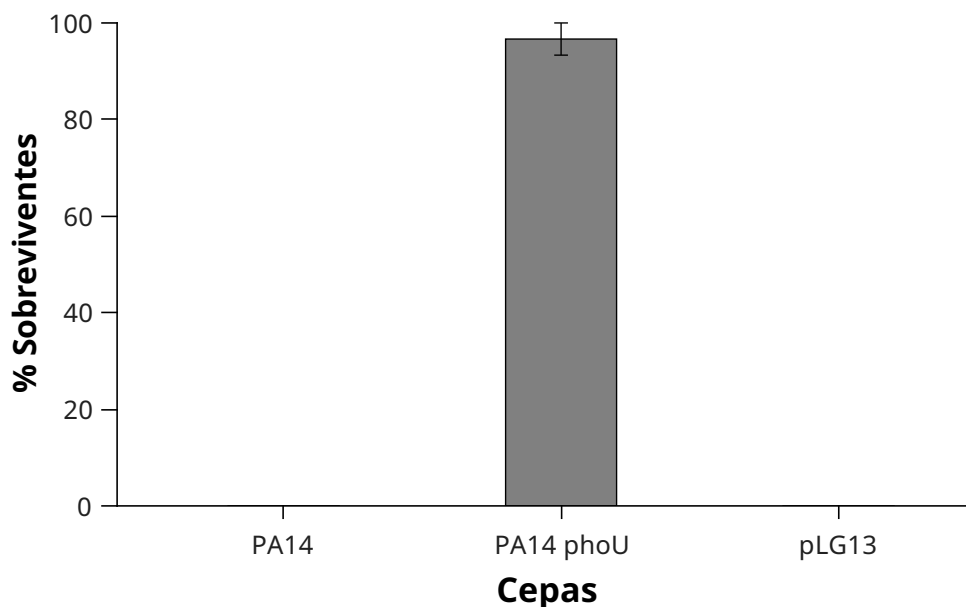


Figura 30 – Sobrevivência de *G. mellonella* desafiadas com PA14 e seus derivados. As cepas PA14WT, o mutante *phoU* e o transformante pLG13 (*p<sub>phoU</sub>*<sup>+</sup>) → *phoU* foram cultivados em meio HGP4 com agitação a 37°C durante 16 horas. As bactérias foram lavadas 2 vezes com 0,9 % NaCl, diluídas e 100 UFCs foram, então, inoculadas nas larvas. As larvas foram incubadas a 37 °C e o número de sobreviventes foi contabilizado após 24 horas do inóculo. O resultado representa a média de 3 resultados independentes. Nas larvas controle, foi inoculado 0,9% NaCl.

Nenhuma larva morreu nos grupos controle (0,9 % NaCl) (dados não mostrados).

É possível observar que a cepa selvagem matou 100% das larvas após 24 horas de infecção, enquanto que o mutante *phoU* matou apenas 10 % das larvas no mesmo intervalo de tempo. A complementação da mutação *phoU* (pLG13) restaurou o fenótipo selvagem.

### 3.9.2 Atividade da fenoloxidase na hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *P. aeruginosa* selvagem e com o mutante *phoU*

A ativação da cascata de fenoloxidase (proPO) na hemolinfa de insetos desafiados com bactérias é uma das primeiras reações do sistema imune inato desses invertebrados. Para avaliar se PA14WT e o mutante *phoU* induzem essa resposta,  $10^2$  UFCs de cada cepa foram utilizadas para infectar larvas de *G. mellonella*. 2, 4, 6, 8 e 10 horas após o início do desafio, a hemolinfa das larvas foi coletada e o ensaio de fenoloxidase foi realizado conforme descrito em 2.7.4.2 (Figura 31).

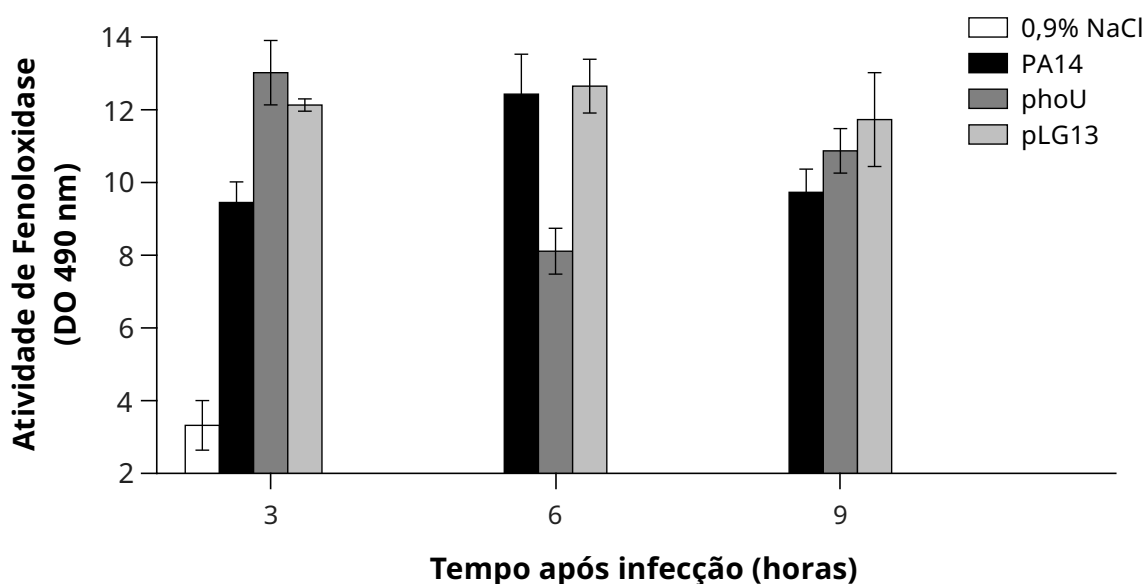


Figura 31 – **Atividade da fenoloxidase na hemolinfa de *G. mellonella*.** Bactérias foram cultivadas em meio LB com agitação a 37 °C durante 16 horas. Em seguida, foram lavadas 2 vezes com 0,9 % NaCl e diluídas até a concentração de 100 bactérias/ 10 µl. Dez µl foram inoculados nas larvas. Após 3, 6, e 9 horas a hemolinfa das larvas foi coletada a atividade da fenoloxidase foi medida após 90 minutos. O resultado apresentado é a média de três experimentos independentes e as barras de erro mostram o erro padrão da média.

Os resultados indicam que nas primeiras três horas, a atividade de fenoloxidase é maior nas larvas desafiadas com o mutante *phoU*. Já na cepa selvagem, a atividade de proPO é alta nas larvas infectadas 6 horas após o início do desafio. Ao final de 9 horas é possível observar que há uma similaridade na atividade de ProPO quando comparamos a cepa selvagem e o mutante *phoU*.



### 3.9.3 Contagem de UFC na hemolinfa de *G. mellonella*

A hemolinfa das larvas infectadas com bactérias foi coletada e plaqueada em LB-ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina e X-P. *Pseudomonas aeruginosa* é resistente à esse antibiótico, que foi utilizado para evitar o crescimento de outras espécies de bactérias presentes no corpo da larva. A Figura 32 mostra a contagem de UFC das bactérias que foram infectados com as bactérias.

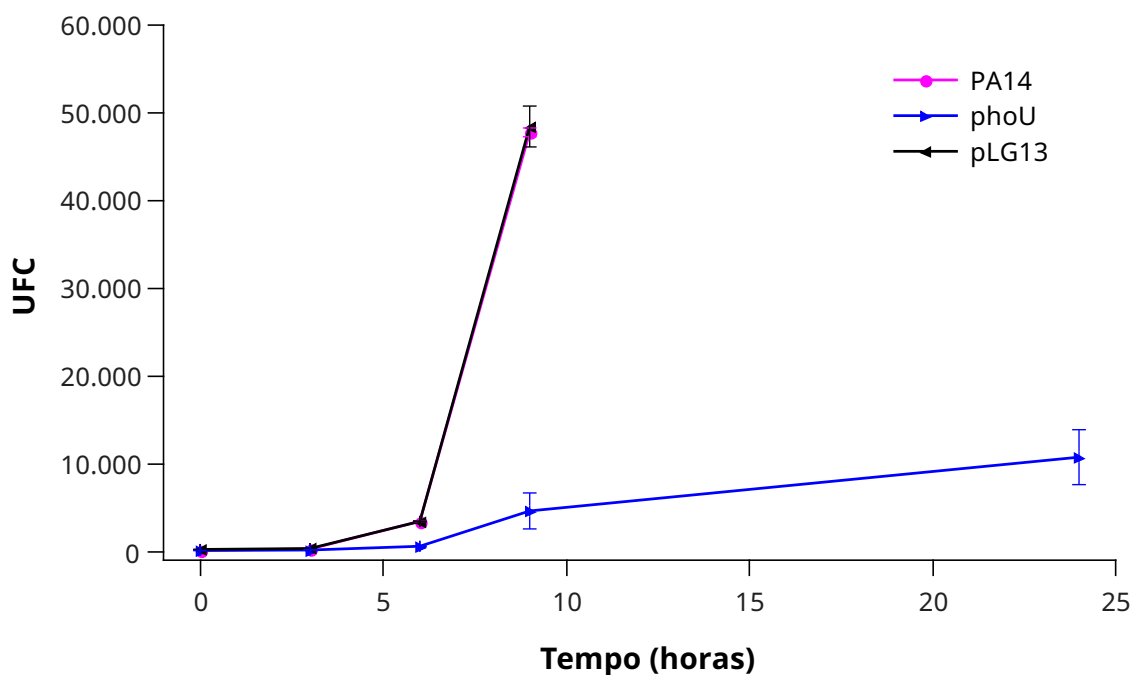


Figura 32 – **Contagem de UFC na hemolinfa de *G. mellonella*.** Bactérias foram cultivadas em meio LB com agitação a 37 °C durante 16 horas. Bactérias foram cultivadas em meio LB com agitação a 37 °C durante 16 horas. Em seguida, foram lavadas 2 vezes com 0,9 % NaCl e diluídas até a concentração de 100 bactérias/ 10 µl e inoculadas nas larvas. Após 3, 6, e 9 horas a hemolinfa das larvas foi coletada e plaqueada em LB-ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina e 40 µg/ml de X-P. O resultado apresentado é a média de três experimentos independentes e as barras de erro mostram o erro padrão da média.

O tempo 0 indica a contagem de UFC das culturas que foram diluídas e inoculadas nas larvas, que foi aproximadamente de 100 bactérias por grupo. Após 9 horas, a hemolinfa foi diluída 100 vezes antes de ser plaqueada. 6 horas após a infecção, o número de bactérias PA14WT já era próximo de 50 mil e o mutante *phoU* apenas 5 mil. A complementação do mutante *phoU* restaurou o fenótipo selvagem. O número de UFCs do mutante *phoU* dobrou entre 9 e 24 h, chegando a 10.000. Não foi possível coletar a hemolinfa das larvas dos grupos infectados com PA14WT e pLG13 as 24 h, pois as larvas já estavam mortas.

## 4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Com o objetivo de chamar a atenção para o problema da resistência a antibióticos e guiar os esforços pela busca de novas drogas, a Organização Mundial de Saúde publicou no dia 27/02/17 uma lista composta por 12 bactérias resistentes a diversos antibióticos que representam a maior ameaça e que devem ser o foco principal das pesquisas por novos agentes microbianos. A lista é dividida em três categorias: situação crítica, alta, e média prioridade (117). *P. aeruginosa* é uma das bactérias na categoria de situação crítica.

Durante o período do meu doutorado surgiu a oportunidade de avaliar o potencial antimicrobiano de nanopartículas de prata em *P. aeruginosa*. Em um ensaio piloto os resultados foram promissores, tendo obtido um MIC na faixa micromolar para as nanopartículas. A partir desse resultado preliminar partimos para avaliar a eficácia das nanopartículas.

Os resultados apresentados nas próximas seções visam desenvolver e caracterizar uma forma alternativa de combate às infecções causadas por *P. aeruginosa* em um modelo de *G. mellonella*.

### 4.1 Produção das AgNPs

Após 5 minutos de agitação, a formação das AgNPs foi indicada pelo surgimento da coloração marrom/amarelada na solução. As AgNPs se mantiveram estáveis, sem nenhuma mudança na coloração da solução como mostrado na Figura 33A. A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi utilizada para identificar o tamanho, forma e morfologia das nanopartículas. É possível observar que as nanopartículas de prata estão bem dispersas e possuem forma predominantemente esférica 33B. O tamanho médio das AgNPs é de aproximadamente 32 nm.

### 4.2 Uso de *Galleria mellonella* para avaliar a eficácia antibacteriana de nanopartículas de prata

A concentração inibitória mínima (MIC) das AgNPs foi determinada conforme descrito em 2.5.5. O MIC das AgNPs foi de 5 µg/ml. Essa concentração foi injetada em larvas de *G.*

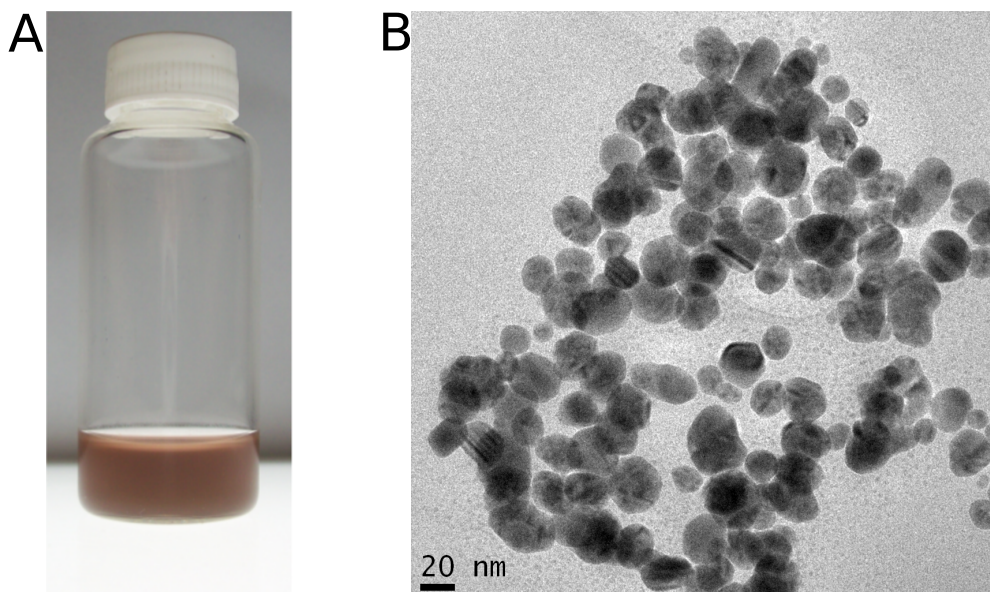


Figura 33 – **Análise das AgNPs.** **A:** Imagem da solução de nanopartículas sintetizadas conforme descrito em 2.5.5. **B:** TEM das AgNPs

*mellonella* 2 horas antes da infecção com bactérias.

### 4.3 Sobrevivência

Miyata e colaboradores mostraram que *P. aeruginosa* PA14 matou metade das larvas de *G. mellonella* infectadas 24 horas após a injeção de apenas 10 bactérias (90). Aqui, foram inoculadas aproximadamente 100 bactérias e avaliamos a sobrevivência das larvas após 24 horas em dois grupos de insetos: um que foi tratado 2 horas antes com 5  $\mu\text{g/ml}$  de AgNP e outro que não recebeu o tratamento. Como controle inoculamos dois grupos distintos com uma solução de 0,9 % NaCl (solução utilizada para lavar as bactérias) e outro com 0,9 % NaCl contendo 5  $\mu\text{g/ml}$  de AgNPs, para demonstrar que as nanopartículas não estavam matando as larvas.

A Figura 34 mostra que 98 % das larvas que foram tratadas previamente com AgNPs sobreviveram após a infecção com PA14. Por outro lado, 100 % das larvas que não foram tratadas com AgNP morreram. É possível observar também que o tratamento com AgNP somente (sem bactérias), não alterou a sobrevivência das larvas.

O resultado apresentado é inédito e nos trás a perspectiva de, por um lado, poder utilizar o

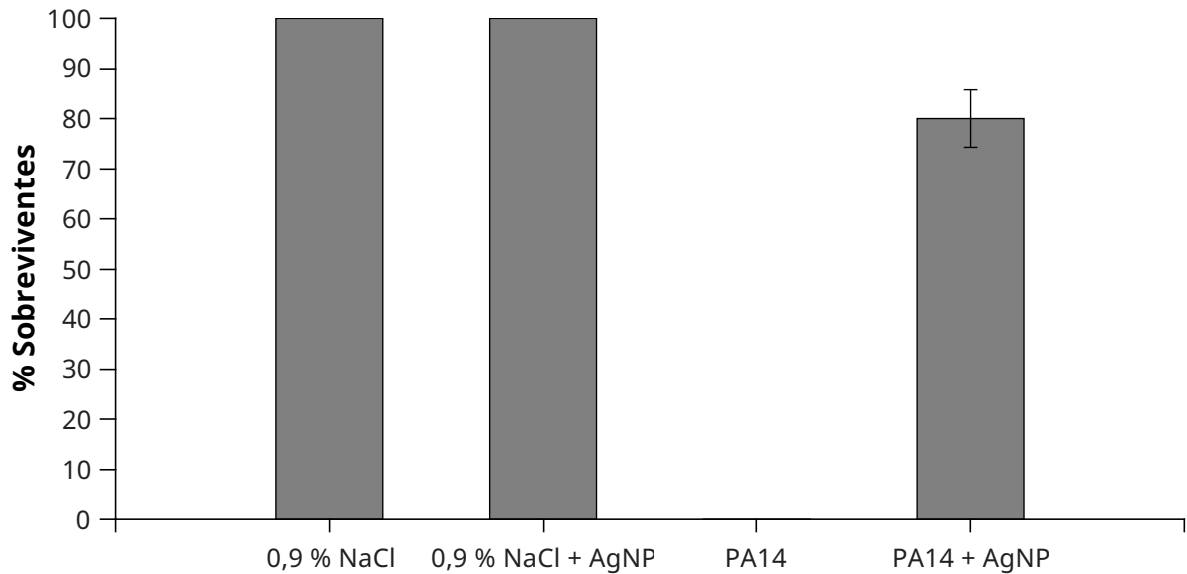


Figura 34 – **Sobrevivência de *G. mellonella* desafiadas com PA14 na presença de AgNPs.** Bactérias foram cultivadas em meio HGP4 com agitação a 37°C durante 16 horas. Em seguida, as bactérias foram lavadas 2 vezes com 0,9 % NaCl, diluídas e então inoculadas nas larvas. As larvas foram mantidas a 37 °C e o número de sobreviventes foi contabilizado após 24 horas do inóculo. O resultado representa a média de 3 ensaios independentes. As soluções de 0,9% NaCl e 0,9% NaCl + AgNP foram utilizadas como controle.

modelo de larvas de *G. mellonella* para avaliar o potencial antimicrobiano de novos compostos e por outro, o de utilizar AgNPs como alternativa ao uso de antibióticos para infecções causadas por *P. aeruginosa*.

#### 4.4 UFC

Para avaliar se as AgNPs estavam matando PA14 no interior das larvas de *G. mellonella*, a hemolinfa das larvas infectadas foi retirada após 3, 6, 9 e 24 horas, plaqueada em LB-ágar e incubada a 37 °C por 24 h. O número de UFCs foi contabilizado (Figura 35).

Podemos observar que 6 horas após o início da infecção, foi possível detectar a presença de PA14 no interior das larvas não tratadas com AgNP. Após 9 h, o número de UFC nessas larvas era de aproximadamente  $5 \times 10^4$ . Já nas larvas tratadas previamente com AgNP, o número de UFC infectante permaneceu nulo. Os resultados das larvas infectadas com 0,9% NaCl e com

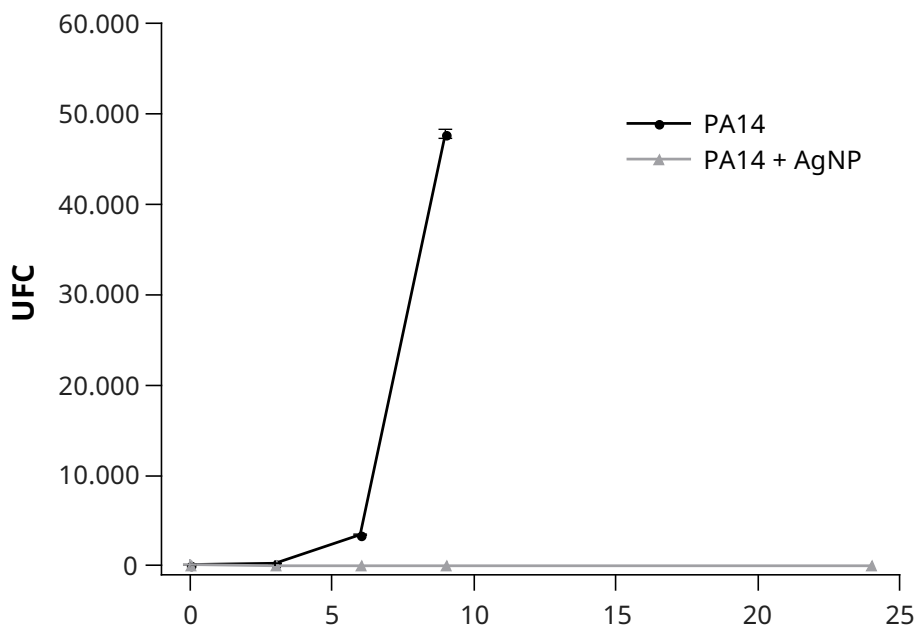


Figura 35 – **Contagem de UFC na hemolinfa de *G. mellonella*.** Bactérias foram cultivadas em meio LB com agitação a 37 °C durante 16 horas. Em seguida, foram lavadas 2 vezes com 0,9 % NaCl e diluídas até a concentração de 100 bactérias/ 10 µl. Dez µl foram inoculados nas larvas previamente separadas em 3 grupos: PA14 + AgNP, que receberam 5 µg/ml de nanopartículas de prata 2 horas antes da infecção com bactérias; PA14, grupo que não recebeu nenhuma forma de tratamento antes da infecção. Após 3, 6, 9 e 24 horas a hemolinfa das larvas vivas foi coletada e plaqueada em LB-ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina e 40 µg/ml de X-P. O resultado apresentado é a média de três experimentos independentes e as barras de erro mostram o erro padrão da média.

0,9% NaCl contendo as AgNPs foram omitidos para facilitar a visualização do gráfico, mas em nenhuma dessas duas condições foram observadas colônias.

#### 4.5 Atividade de fenoxidase

Conforme mostrado na Figura 31, a cascata de proPO é detectada na hemolinfa das larvas de *G. mellonella* poucas horas após a infecção. Podemos observar na Figura 36 que a atividade de proPO nas bactérias que foram tratadas previamente com AgNPs manteve-se inalterada, muito similar aos controles larvas infectadas com 0,9% NaCl e 0,9% NaCl com AgNPs.

Esses resultados corroboram os dados de UFC mostrados anteriormente. Uma vez que não foram detectadas bactérias no grupo tratado com AgNPs, era de se esperar que a atividade de proPO também se mantivesse inalterada. Esses dois resultados se complementam indicando que

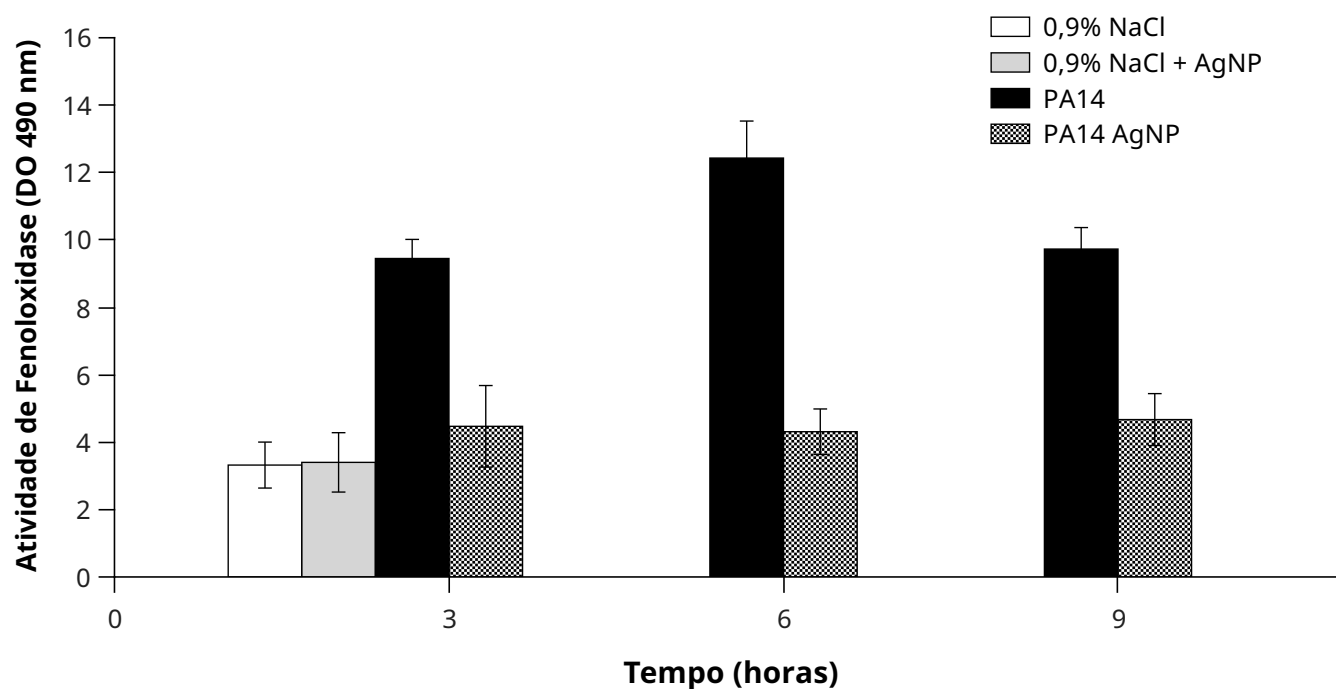


Figura 36 – **Atividade da fenoloxidase na hemolinfa de *G. mellonella*.** Bactérias foram cultivadas em meio LB com agitação a 37 °C durante 16 horas. Em seguida, foram lavadas 2 vezes com 0,9 % NaCl e diluídas até a concentração de 100 bactérias/ 10 µl e então inoculadas nas larvas previamente separadas em 2 grupos: AgNP, que receberam 5 µg/ml de nanopartículas de prata 2 horas antes da infecção com bactérias, e o grupo que não recebeu nenhuma forma de tratamento antes da infecção. Após 3, 6, e 9 horas, a hemolinfa das larvas foi coletada e a atividade da fenoloxidase foi medida após 90 minutos. O resultado apresentado é a média de três experimentos independentes e as barras de erro mostram o erro padrão da média.

as AgNPs eliminaram o crescimento das bactérias infectantes.





## 5 ANÁLISE DOS ISOLADOS DE UM EXPERIMENTO DE EVOLUÇÃO NO QUIMIOSTATO COM O MUTANTE *PHOU*

Durante o mestrado, realizei um experimento de evolução com o mutante *phoU* de *P. aeruginosa* em cultura contínua (quimiostato) limitado em fosfato. Naquela ocasião, o mutante *phoU* utilizado como a cepa ancestral não era  $\Delta phoU$ , mas carregava uma inserção (*phoU*::pKNOCK-Gm), descrita em (19). O objetivo desse experimento era obter isolados que fossem capazes de consumir mais Pi que a cepa ancestral. Três isolados foram parcialmente caracterizados (118). Ensaio de estresses ambientais e de sensibilidade à antibióticos foram realizados e foi possível observar que os isolados reverteram alguns dos fenótipos de sensibilidade do mutante *phoU*, tornando-se quase tão resistentes como a cepa selvagem. As seções a seguir reúnem novos resultados de experimentos realizados durante o doutorado.

### 5.1 Sequenciamento genômico do mutante *phoU* e dos isolados do quimiostato

O sequenciamento genômico dos 3 isolados do quimiostato, do mutante *phoU* e da cepa selvagem PA14 foi realizado para identificar mutações que poderiam explicar os diferentes fenótipos observados.

O DNA genômico das bactérias foi extraído e quantificado em um fluorímetro Qubit (Life Technologies). O sequenciamento do genoma foi realizado pela *facility* MicrobesNG (Birmingham, UK). A biblioteca de DNA genômico foi obtida usando o kit de preparação de biblioteca Nextera XT (Illumina). Bibliotecas foram sequenciadas em uma plataforma Illumina HiSeq e a montagem do genoma *de novo* foi realizada com o *software* SPAdes (versão 3.7). A anotação dos genomas foi realizada utilizando o *software* Geneious 10.3, tendo o genoma de *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (NC\_008463) como referência.

Foram encontrados muitos SNPs em todas as cepas, mas quase todos estavam presentes também na cepa selvagem e na cepa ancestral PA14 *phoU*::pKNOCK-Gm. Esses SNPs são provavelmente devido a erros de sequenciamento do genoma da cepa de referência, cuja sequência,

publicada em 2006 (23), havia sido realizada pelo método de Sanger.

Quatro SNPs não silenciosos nos genes, PA14\_57610, *dnpA*, *impA* e *nppC* foram observados somente nos isolados (Tabela 4).

Genes	Substituições							
	Ancestral		I4		I5		I6	
	Base	AA	Base	AA	Base	AA	Base	AA
<i>nppC</i>			G541A	GE	C538T	P→L	G541A	G→E
<i>impA</i>	CAC1022ACG	T→R	+G1026	Y→STOP	+G1026	Y→STOP	+G1026	Y→STOP
<i>dnpA</i>			A1082C	S→A	A1082C	S→A		
<b>PA14_57610</b>	T15G	D→A	T15G	D→A	T15G	D→A	T15G	D→A

Tabela 4 – SNPs encontrados nos genomas dos isolados. O DNA genômico total das bactérias foi extraído e sequenciado conforme descrito na seção 2.4.3. A detecção dos SNPs foi feita utilizando o programa Geneious®. *Ancestral* refere-se à cepa PA14 *phoU*::pKNOCK-Gm. O sinal "+" indica inserção.

O gene *nppC* codifica a proteína NppC, que está ancorada na membrana citoplasmática da bactéria e faz parte do canal de transporte de antibióticos da família nucleosídeo de peptidil (119). Nos isolados I4, I5 e I6 foram encontrados dois SNPs nesse gene:

- Uma transição G→A na posição 541 da ORF, ocasionando a troca de uma glicina por ácido glutâmico.
- Uma transição C→T na posição 538 da ORF, que acarretou a alteração de uma prolina por uma leucina, uma substituição também não muito conservada.

Pletzer e colaboradores mostraram que a super-expressão do transportador Npp aumentou a suscetibilidade de PA14 aos antibióticos blasticidina em 8 vezes e à pacidamicina em 32 vezes. Além disso, a deleção do operon *npp* causou um aumento de 4 vezes na concentração inibitória mínima (MIC) de pacidamicina (119).

ImpA é uma proteína da membrana interna e está associadas à variações na morfologia das colônias em *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (120). O mutante *phoU* apresentou uma diferença em relação à cepa selvagem: a substituição da trinca CAC por ACG na posição 1022 da ORF, resultando na troca de uma treonina por uma arginina. Nos isolados I4, I5 e I6 houve a inserção de uma guanina na posição 1026 da ORF, ocasionando um *frameshift* e o surgimento de um códon de parada prematuro.

*dnpA* é um gene que codifica uma proteína envolvida na tolerância e persistência a fluoroquilononas (121). Ocorreu a transversão A→C na posição 1082 da ORF dos isolados I4 e I5, ocasionando a troca de uma serina por uma alanina.

PA14\_57610 é uma Acetil-CoA Desidrogenase. Nos isolados I4, I5 e I6 ocorreu a troca T→G na posição 15 da ORF que resultou na substituição de ácido aspártico por uma alanina.

## 5.2 Complementação das mutações dos isolados do quimiostato

Para determinar se os SNPs observados nos isolados do quimiostato I4, I5 e I6 são responsáveis pelo aumento da resistência a antibióticos, as mutações devem ser reintroduzidas na cepa ancestral e esses recombinantes testados em um antibiograma. Tendo em vista a dificuldade de transferir alelos em *P. aeruginosa*, optamos pela técnica de complementação *in trans* com plasmídios. Os alelos selvagens e mutantes foram amplificados, respectivamente, a partir da cepa ancestral PA14 *phoU* e a partir do isolado correspondente. Os amplicons foram clonados individualmente no plasmídio pUCp18 e transformados em PA14 *phoU* ou nos respectivos isolados. A Figura 37 mostra o esquema de clonagem e transformação do gene (*nppC*) selvagem nos isolados e a transformação dos genes dos isolados na cepa-mãe PA14 *phoU*. Os genes (*impA*, *dnpA* e PA14\_57610) foram clonados e transformados da mesma maneira.

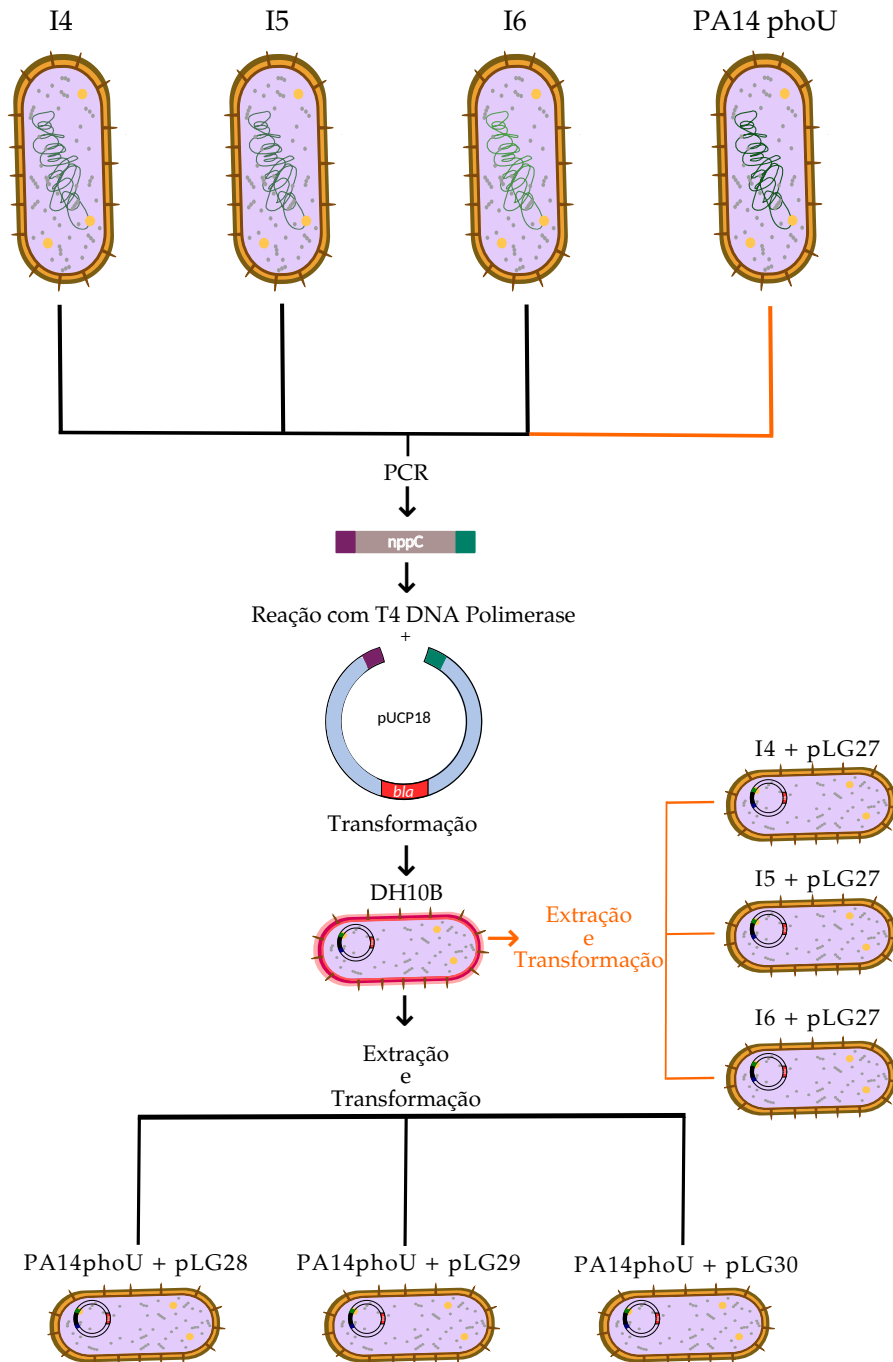


Figura 37 – Visão geral da clonagem do alelo *nppC* selvagem a partir da cepa ancestral PA14 *phoU* por SLIC. A amplificação do gene de interesse foi feita utilizando iniciadores que possuem homologia com a porção 3' e 5' de pUCp18 e o sítio de restrição *EcoRI*. Em paralelo o vetor pUCp18 foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*. Em uma mesma reação o vetor linearizado e o fragmento gerado por PCR foram tratados com a enzima T4 DNA Polimerase, gerando alças de homologia entre as duas moléculas de DNA. Em seguida, a cepa de *E. coli* DH10B foi transformada por eletroporação com o produto da reação. A ligação entre fragmentos é feita *in vivo* pelas próprias bactérias. Confirmada a construção do plasmídio, esses foram transformados nos isolados I4, I5 e I6. Os genes (*impA*, *dnpA* e *PA14\_57610*) foram clonados e transformados da mesma maneira, utilizando os respectivos oligos listados na Tabela 2.

### 5.3 Antibiograma dos isolados do quimiostato e de seus transformantes

Geralmente, ensaios de complementação são realizados na cepa mutante transformada com um plasmídio contendo o alelo selvagem. Parte-se do pressuposto de que o alelo mutante é recessivo em relação ao alelo selvagem. Entretanto, com a exceção da mutação *frameshift* em *impA*, não é possível afirmar nada em relação a dominância/recessividade dos alelos observados. Por esse motivo, tanto o gene selvagem como o gene mutante foram clonados e utilizados para complementar a cepa correspondente.

A sensibilidade a antibióticos das cepas complementadas foi avaliada. A Figura 38 mostra o resultado do antibiograma da cepa selvagem, da cepa ancestral *phoU*, do isolado I4 complementado com o gene *nppC* de *phoU* (I4 + *nppC* de *phoU*) e da cepa ancestral PA14 *phoU* complementado com o gene *nppC* do isolado (PA14 *phoU* + *nppC* de I4).

Tanto o mutante *phoU* quanto o isolado I4 são mais sensíveis aos antibióticos IMP, AMC, NAL e CPM quando comparados com a cepa selvagem. A transformação do isolado I4 com o plasmídio contendo o gene *nppC* da cepa-mãe (*phoU*), bem como a transformação do plasmídio contendo o alelo *nppC* do isolado I4 na cepa-mãe não alteraram significativamente o nível de sensibilidade das cepas.

O mesmo ensaio foi realizado com o isolado I5 (Fig. 39) e I6 (Fig. 40).

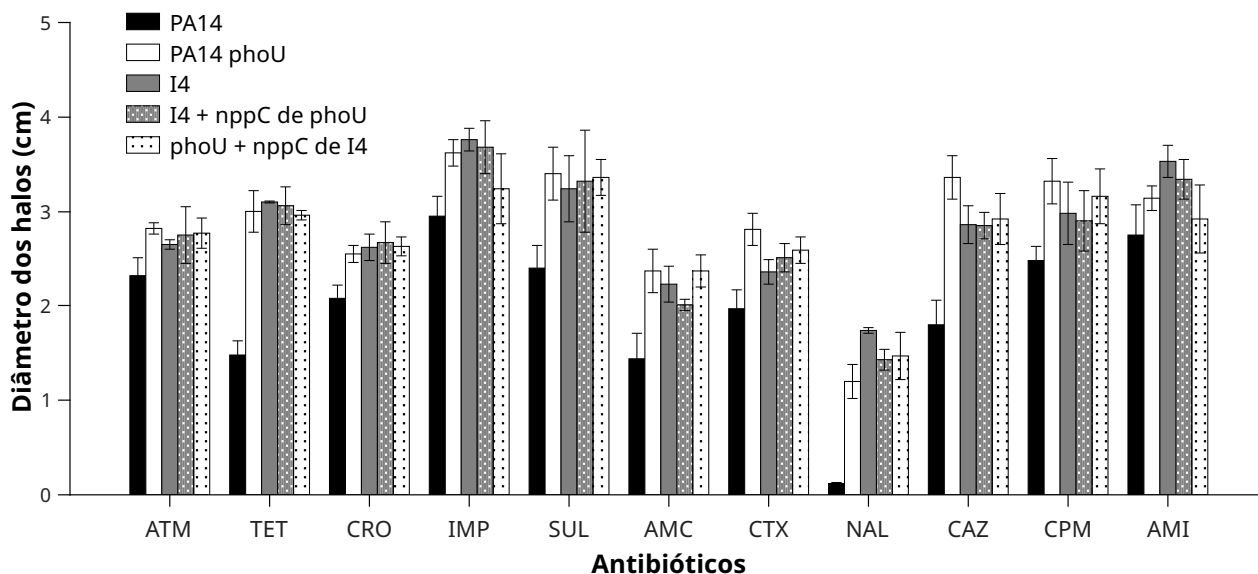


Figura 38 – **Antibiograma do isolado I4 avaliando a complementação do gene *nppC*.** As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibióticos utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e ampicilina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

O isolado I6 se destaca por apresentar uma maior resistência ao antibiótico NAL, como pode ser observado na Figura 40. O fenótipo de resistência do isolado I6 ao ácido nalidíxico é semelhante ao da cepa selvagem. Porém, a complementação do mutante *phoU* com o gene *nppC* do isolado I6 não aumentou a resistência do mesmo frente a esse antibiótico.

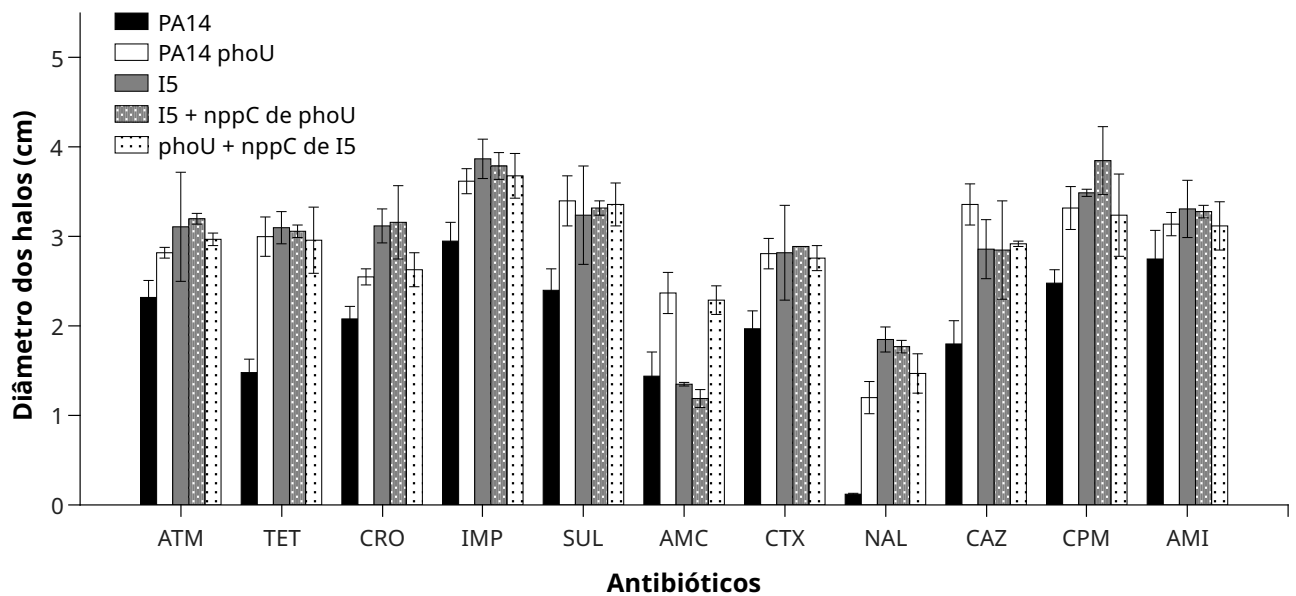


Figura 39 – **Antibiograma do isolado I5 avaliando a complementação do gene *nppC*.** As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibiótico utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e ampicacina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

Os demais resultados dos antibiogramas feitos com os isolados I4, I5 e I6 em conjunto com as complementações se encontram no Anexo I. Os resultados foram semelhantes aos apresentados aqui e nenhuma das complementações alterou a sensibilidade dos isolados ou do mutante *phoU* aos antibióticos testados.

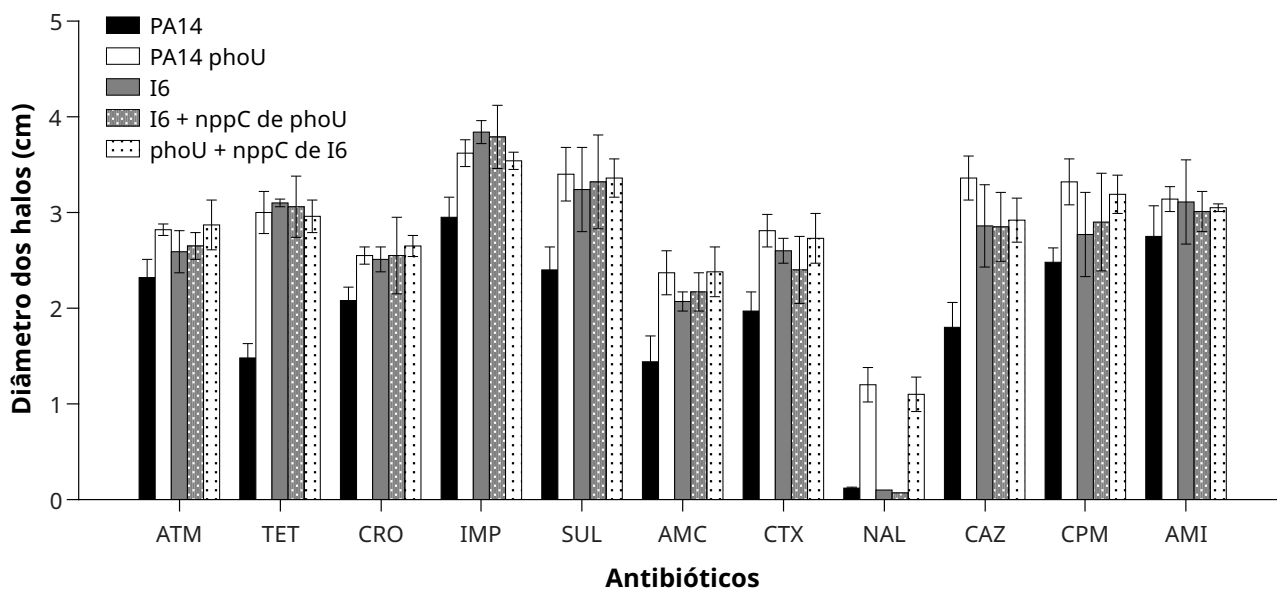


Figura 40 – **Antibiograma do isolado I6 avaliando a complementação do gene *nppC*.** As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibióticos utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e ampicilina (AMI). As placas foram mantidas a 37 °C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

#### 5.4 Virulência dos isolados do quimiostato

Para testar a virulência dos isolados do quimiostato as larvas de *G. mellonella* foram infectadas com  $10^4$  bactérias da cepa selvagem PA14WT, do mutante *phoU*, e dos isolados I4, I5 e I6, separadamente. Após a infecção, as larvas foram mantidas a 37 °C durante 4 dias e o número de sobreviventes foi contado a cada 24 horas. A Figura 41 mostra a média de sobrevivência das larvas.

Após 24 horas de infecção, apenas a cepa selvagem matou 100% das larvas, enquanto que o mutante *phoU*, o isolado I5 e I6 mataram aproximadamente 25, 30 e 50 % das larvas no mesmo intervalo de tempo, respectivamente. O isolado I4 foi o que melhor restaurou o fenótipo selvagem. É possível observar que, já no segundo dia, aproximadamente 75 % das larvas foram



mortas pelas bactérias.

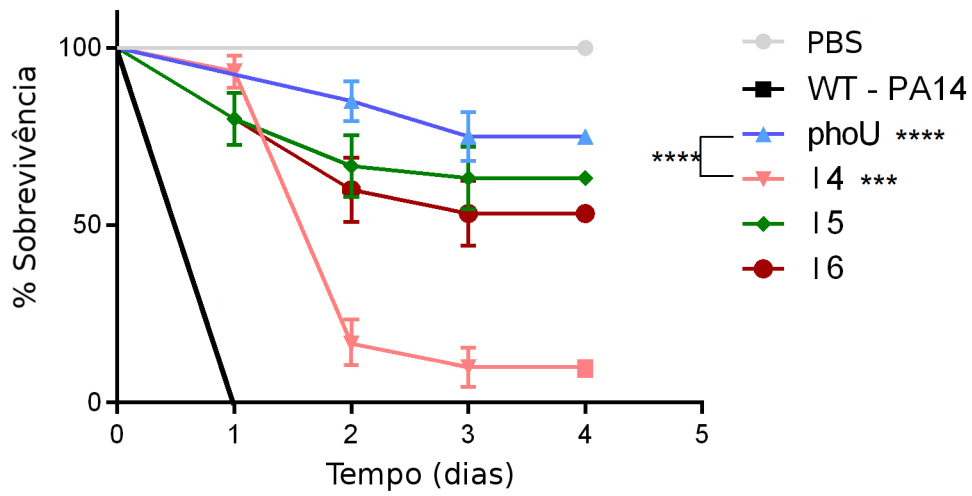


Figura 41 – **Virulência dos isolados do quimiostato.** Bactérias foram cultivadas em meio HGP4 com agitação a 37 °C durante 16 horas. Em seguida as bactérias foram lavadas 2 vezes com 0,9% NaCl, e  $10^4$  bactérias de cada cepa foram inoculadas nas larvas de *G. mellonella* separadamente, em grupos de 10 larvas. O resultado representa a média de 3 resultados independentes. NaCl foi utilizado como controle da solução de diluição das bactérias.



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Magnésio e o crescimento bacteriano

Os resultados apresentados na Seção 3.4 mostram que a adição de 6 mM MgSO<sub>4</sub> ao meio de cultura aumentou consideravelmente o rendimento mas não melhorou a taxa de crescimento do mutante *phoU*. Na cepa selvagem, a adição de mais magnésio não afetou os fenótipos analisados. Polifosfato tem a capacidade de quelar magnésio (122), portanto a hipótese levantada seria a de que o poliP acumulado pelo mutante *phoU* estaria quelando os íons de magnésio, que são necessários para a síntese de proteínas e DNA, prejudicando assim o crescimento da bactéria. O efeito da adição de 6 mM MgSO<sub>4</sub> é observado somente após a fase de crescimento exponencial, isso ocorre porque o acúmulo máximo de poliP no mutante *phoU* ocorre quando as bactérias entram na fase estacionária (19). Ou seja, durante a fase de crescimento exponencial 1 mM de MgSO<sub>4</sub> é suficiente para suprir as necessidades anabólicas das bactérias, pois não há ainda poliP excedente quelando os íons de magnésio. Porém, com o passar do tempo, a concentração de magnésio disponível diminui, de forma que este nutriente torna-se escasso para manter o crescimento da população. É interessante notar que este problema não ocorre com a cepa selvagem, uma vez que ela não acumula grandes quantidades de poliP.

Em uma análise preliminar da composição do polifosfato acumulado pelo mutante *phoU* pela técnica de microscopia eletrônica por transmissão (TEM), conseguimos detectar magnésio no poliP extraído. Esse dado corrobora a hipótese de que os íons de magnésio estariam sendo sequestrados pelo poliP excedente.

### 6.2 Efeito de íons de magnésio sobre o consumo de fosfato e o acúmulo de poliP do mutante *phoU*

Pi é captado principalmente por duas vias distintas em *P. aeruginosa*, o sistema de transporte de baixa afinidade Pit e o sistema de alta afinidade Pst (123). Foi demonstrado que o mutante

*phoU* de *E. coli* e de *Synechocystis* removeram, respectivamente, duas e quatro vezes mais Pi do meio de cultura quando comparados com a cepa selvagem (124). Foi demonstrado em nosso laboratório que o mutante *phoU::pKNOCK-GM* consome 3 vezes mais fosfato quando comparado com a cepa selvagem (19). Os resultados apresentados na Seção 3.4 mostram que o mutante  $\Delta phoU$  de PA14 consumiu mais fosfato quando cultivado em meio HGP10.6, mas isso ocorreu porque o rendimento da cultura também aumentou. Ao normalizar o resultado de consumo de Pi pelo rendimento, é possível observar que a adição de mais magnésio ao meio de cultura diminuiu o consumo de Pi *per capita* do mutante *phoU*.

Por que a adição de mais  $MgSO_4$  ao meio diminuiu o consumo de Pi/ $DO_{600}$  no mutante *phoU*? A síntese de poliP em *E. coli* e em *P. aeruginosa* é realizada principalmente pela enzima PPK, uma polifosfato quinase, cujo substrato é o fosfato  $\gamma$  da molécula de ATP (125, 126) e a hidrólise de poliP é catalisada pela enzima PPX (127).  $Mg^{2+}$  é cofator de PPX. É possível, portanto, que o mutante *phoU* cultivado com 6 mM de  $MgSO_4$  degrade mais poliP pela ação da PPX, e o Pi liberado estaria sendo secretado para fora da célula, dando a impressão de que na presença de excesso de íons de magnésio, menos Pi estaria sendo consumido.

### 6.3 Efeito dos íons de magnésio sobre a motilidade do tipo *swarming* e a produção de piocianina

de Boer e colaboradores reportaram que a omissão de  $Ca^+$  ou  $Mg^{2+}$  do meio de cultura não afetou o *swarming* de *Vibrio alginolyticus* (128). Porém, se ambos os sais fossem omitidos, o crescimento seria fortemente inibido e o *swarm* ocorria apenas após 3 dias de incubação. Já Thampuran e colaboradores mostraram que altas concentrações de  $MgCl_2$  inibem o *swarming* de diversas espécies de *Bacillus* (129). Os resultados apresentados em 3.4 mostram que a presença de 6 mM de  $MgSO_4$  afetou positivamente o *swarming* da cepa selvagem e do mutante *phoU* de *P. aeruginosa*. O efeito no mutante *phoU* é excepcional, tendo em vista que sem a suplementação de  $Mg^{2+}$  a motilidade sequer acontece. Portanto, em *P. aeruginosa*, íons de magnésio são

imprescindíveis para a motilidade do tipo *swarming* e o meio de cultura 'Swarming' (130) deveria ser ajustado para conter 6 mM de MgSO<sub>4</sub>, ao invés do 1 mM atualmente sugerido.

Apesar de tanto a produção de piocianina quanto a motilidade *swarming* serem ambos fenômenos que dependem de *quorum sensing*, a síntese de piocianina não foi afetada pela concentração de MgSO<sub>4</sub>, conforme mostrado na Seção 3.4.7. Isso sugere que o efeito dos íons de magnésio sobre a motilidade *Swarming* é independente de *quorum sensing*. Weiser e colaboradores sugeriram que a remoção de Mg<sup>2+</sup> do meio de cultura inibiu a síntese de flagelos em *Proteus mirabilis* (130). Similarmente, a carência de magnésio poderia estar afetando a síntese/atividade do flagelo e consequentemente a motilidade de *P. aeruginosa*.

#### **6.4 Consequências da adição de ferro sobre a taxa de crescimento, rendimento e atividade de FA**

A adição de FeCl<sub>3</sub> no meio de cultura, aumentou a taxa de crescimento, o rendimento e, mais significativamente, a atividade da FA.

Apesar de Neznansky e colaboradores terem reportado a utilização de altas concentrações de FeCl<sub>3</sub> na descrição do método de ensaio de FA, os autores não discutiram o motivo dessa suplementação (1).

Quando semeadas em meio de cultura sólido suplementado com o substrato cromogênico X-P, é clara a diferença entre a cepa selvagem (branca) e o mutante *phoU* (azul). Por outro lado, nos ensaios de FA, que por padrão utilizam pNPP como substrato da enzima (conforme descrito em 2.6.1), não foi possível sequer detectar a atividade da FA. A diferença entre esses dois métodos é a de que X-P é um substrato aproximadamente 10.000 vezes mais sensível do que pNPP (131, 132).

Na seção 3.6 foi mostrado que a adição de ferro ao meio de cultura afeta drasticamente a detecção da atividade da enzima FA. Interessantemente, os íons de ferro não constam na base de dados UniProt nem na literatura como cofatores da FA de *P. aeruginosa*.

Em nosso laboratório, foi também utilizado o meio de cultura proposto por Hancock *et. al* que contém 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  (133). Quando cultivadas nesse meio de cultura, conseguimos detectar a atividade de FA de PA14, porém a cultura apresenta baixo rendimento (110). De acordo com Ochsner e colaboradores a expressão do gene *phoA* não é alterada pela concentração de  $\text{Fe}^{3+}$  no meio (134), o que sugere que o efeito do Fe não se dá ao nível de transcrição de *phoA*. Por outro lado, a adição de  $\text{FeCl}_3$  à mistura da reação de FA (pNPP+bactérias) tampouco aumenta a atividade da enzima (dados não mostrados). O fantástico aumento da atividade da FA causado pela adição de  $\text{FeCl}_3$  ocorre também no mutante *phoU*, indicando que não se trata apenas do efeito de  $\text{Fe}^{3+}$  sobre a entrada das bactérias na fase de carência de Pi, pois, sendo constitutiva, a expressão da FA no mutante *phoU* independe do estado fisiológico das bactérias. Uma possível hipótese seria a de que os íons de Fe são necessários para o correto dobramento da enzima. Porém, não há nada na literatura que aponte para uma relação direta entre a concentração de ferro disponível no meio e a atividade da FA bacteriana.

Segundo o método de Neznansky e colaboradores, as bactérias são centrifugadas e o sobrenadante é desprezado antes da adição do substrato (1). Como podemos ver na Figura 3.6.1.1, ao centrifugar as bactérias, boa parte da FA permanece no sobrenadante. Isso também justifica a alta concentração de pNPP (13,1 mg/ml) utilizada por esses autores, uma vez que apenas uma porção da FA restaria no pellet e o substrato teria dificuldade em penetrar no periplasma das bactérias (MARTINEZ1992-Kinetic Properties of Enzyme Populations in Vivo: Alkaline Phosphatase of the Escherichia coli Periplasm).

## 6.5 Metaboloma de PA14 e do mutante *phoU*

A mutação no gene *phoU* de *P. aeruginosa* acarreta diversos efeitos pleiotrópicos na bactéria, o que sugere que *phoU* possa ser um regulador global (29, 19). A vasta diversidade de estruturas celulares e metabólitos intra e extracelulares requer a validação de protocolos de extração de metabólitos para diferentes organismos. Tredwell e colaboradores mostraram que a extração com

etanol em ebulição é tão eficiente quanto a metodologia de congelamento e descongelamento com metanol aquoso seguida de sonicação (que foi a metodologia utilizada no presente trabalho), apesar dessa última causar uma perda relativamente baixa de metabólitos quando comparados com a técnica de ebulição em etanol (135).

A concentração de etileno-glicol encontrada no mutante *phoU* e na cepa selvagem cultivada em carência de fosfato é enorme (3.8.2). Até o momento foi descrito apenas uma via sintética de produção desse metabólito por bactérias (136). Tentamos validar o resultado do etileno glicol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), porém não foi possível detectar a presença de etileno glicol utilizando essa técnica. Na revisão publicada por Pang e colaboradores, são mostradas as vias de síntese de EG a partir de etanol, glicerol, sorbitol, açúcares e (hemi) celulose. Nenhum dos processos de produção do EG a partir desses compostos utiliza bactérias, todos os processos são físico-químicos (137). O vislumbamento de uma via de síntese biológica desse metabólito pode vir a ter aplicações industriais.

Dos metabólitos destacados, a 4-Hidroxirolina, o dimetilsulfeto e o etileno-glicol possuem as características destacadas a seguir:

- **4-Hidroxirolina:** A 4-Hidroxirolina é produzida 4 vezes menos pelo mutante *phoU* em relação à cepa selvagem cultivada em condição de suficiência de Pi (4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Já a cepa selvagem cultivada em carência de Pi (0,1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) produz 2 vezes mais quando comparada com a a mesma cepa cultivada em condições de carência de Pi. Esse metabólito é produzido pela hidroxilação de prolina livre por uma enzima chamada hidroxilase e é encontrada em peptídios antimicrobianos (138)
- **Dimetilsulfeto:** Recentemente foi descoberto e caracterizado o primeiro gene envolvido na síntese de dimetilsulfeto (DMS) em bactérias (139). O gene *mddA* codifica a proteína methyltransferase que metila o metanotiol e gera DMS. Esse composto é conhecido por afetar formação de nuvens e é uma molécula sinalizadora para aves marinhas (139).

O mutante *phoU* produz 8 vezes menos desse composto quando comparado com a PA14 selvagem, ambas cultivadas em HGP4. A cepa selvagem cultivada em meio HGP0,1 produz 2 vezes mais DMS do que a mesma cepa cultivada em HGP4.

- **Etileno-glicol:** O etileno-glicol é um anticongelante e também é um composto utilizado na produção de politereftalato de etileno (PET). A produção deste composto por bactérias foi descrita apenas por vias sintéticas até o momento (136).

Tanto o mutante *phoU* cultivado em HGP4 quanto a cepa selvagem cultivada em HGP0,1 produziram 3.500 vezes mais esse composto em relação à cepa selvagem cultivada em HGP4.

## 6.6 Virulência do mutante *phoU*

A cepa PA14 de *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista que pode causar infecções severas em humanos, camundongos, invertebrados e plantas. Isso pode estar relacionado ao fato de que a patogenicidade da PA14 é multifatorial, exigindo a ação cumulativa (e potencialmente coordenada) de múltiplos fatores de virulência, alguns dos quais são componentes do cerne conservado do genoma, enquanto outros estão localizados em ilhas de virulência classicamente definidas nessa cepa (16, 140, 23, 141).

Mostramos que o mutante *phoU* apresenta um defeito na motilidade do tipo *swarming* (Figura 18). Esse tipo de motilidade parece estar envolvida na virulência de PA14, uma vez que a diminuição da disponibilidade de N-acylhomoserina lactona reduziu drasticamente a expressão de genes de virulência e a motilidade do tipo *swarming* em *P. aeruginosa* (142). Além disso, mutantes defeituosos na motilidade mostraram ineficiência na formação de biofilme e baixa adesão à células eucarióticas (143)

Foi demonstrado que mutantes de *P. aeruginosa* deficientes na produção de poliP também apresentavam deficiência de *swarming* (144). Embora o mutante *phoU* acumule altas concentra-



ções de poliP, diversos efeitos pleiotrópicos foram demonstrado ao longo desse trabalho e em (19).

Gallarato e colaboradores demonstraram que o gene *ppx* (uma exopolifosfatase) de *P. aeruginosa* é essencial na produção de fatores de virulência, como a motilidade, a produção de biofilme, ramnolipídios, piocianina e da homoserina lactona (145). Ao inativar esse gene, os autores reportaram diminuição da produção de todos esses fatores de virulência. Em um outro estudo, Kuroda e colaboradores reportaram que o aumento de (p)ppGpp promove o acúmulo de polifosfato em *E. coli*. Eles demonstraram que esse nucleotídeo se liga à proteína PPX e inibe a ação de hidrólise do poliP, que culminaria no acúmulo deste (146). Nosso grupo demonstrou que o mutante *phoU* de PA14 acumula mais (p)ppGpp quando comparado com a cepa selvagem e sugerimos que o mecanismo de ação seria semelhante ao observado por Kuroda e colaboradores (19). É possível que o mutante *phoU* seja menos virulento por acumular ppGpp o que acaba inibindo a ação de PPX e consequentemente afetando os fenótipos de virulência do mutante.

Outra hipótese que poderia explicar a perda de virulência do mutante *phoU* é a de que o excesso de poliP estaria quelando os íons de magnésio e outros micronutrientes importantes para o crescimento da bactéria. Foi mostrado na Seção 3.4 que a adição de altas concentrações de magnésio afeta o rendimento e o *swarming* do mutante *phoU*. Ambos os fatores afetam indiretamente a virulência das bactérias.

Foi observado por Zaborina e colaboradores que a carência de Pi no intestino de camundongos aumentou em 60% a mortalidade dos animais. Logo, o regulon PHO, que é ativado pela carência de Pi, parece estar relacionado direta ou indiretamente com a expressão de genes de virulência (116). Entretanto, o mutante *phoU* é constitutivo para o regulon PHO, uma situação que mimetiza a carência de Pi, e supostamente estaria induzindo a virulência. Mas não é isso que observamos neste estudo. Portanto, o efeito negativo da mutação *phoU* sobre a virulência não deve estar relacionado à super-expressão do regulon PHO.

A variação na atividade de proPO entre as cepas pode ser explicada pelas diferentes estratégias

de virulência de cada bactéria. Nos resultados apresentados em 3.9.2 e 5.4 é possível observar o rápido aumento da atividade da fenoloxidase e a maior sobrevivência das larvas infectadas com o mutante *phoU*. A fenoloxidase faz parte da cascata de resposta imune de insetos frente a patógenos. Essa enzima é capaz de produzir formas reativas de oxigênio nas bactérias, resultando na morte das mesmas. Além disso, a fenoloxidase também está envolvida no recrutamento dos hemócitos para o combate de infecções (147, 148). A oscilação na atividade de proPO também foi observada por Andrejko *et.al* (147).

Desta forma, a maior sensibilidade a antibióticos e a menor virulência, fazem do gene *phoU* um alvo importante para o desenvolvimento de inibidores, que atuariam como drogas antimicrobianas para o tratamento de *Pseudomonas aeruginosa*. Isso poderá ser relevante em eventuais tratamentos clínicos, uma vez que *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista e possui resistência intrínseca a diversos tipos de antibióticos. Vale lembrar que a Organização Mundial de Saúde lançou uma lista de patógenos prioritários para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, onde *Pseudomonas aeruginosa* aparece na prioridade máxima desta lista (149).

Harel e colaboradores mostraram que o mutante Pst de uma cepa ExPEC de *E. coli* extra-intestinal perdeu virulência num modelo de porco recém-nascido privado de colostro. Os autores relatam que a inativação por inserção de *pst* parece ter múltiplos efeitos na virulência, como um aumento da sensibilidade ao efeito bactericida do soro e uma redução significativa na quantidade de antígeno capsular na superfície celular (112).

Em um outro trabalho foi demonstrado que a virulência de *P. aeruginosa* pode ser ativada por opioides, que funcionam como moléculas sinalizadoras bacterianas derivadas do hospedeiro, dado que os opioides endógenos estão amplamente distribuídos dentro da mucosa intestinal ricamente inervada e exercem múltiplos efeitos durante o estresse nas células epiteliais neuronais, imunológicas e intestinais. (150). Mais recentemente o mesmo grupo demonstrou que a abundância de Pi pode se sobrepor à esse efeito dos opioides e não ativar a virulência de PA01

(151).

A deleção dos genes *pst* afetou negativamente a virulência de uma *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (114) e de uma cepa ExPEC pertencente ao grupo APEC de *E. coli* patogênica de aves mostrou reduzir a virulência em um modelo de infecção de galinha. Os autores também relataram que a mutação *pst* afetou múltiplos atributos de virulência, como a redução a resistência ao efeito bactericida do soro, à acidez e aos peptídeos antimicrobianos catiônicos (113).

Foi também relatado que mutantes *pstS1* e *pstS2* de *Mycobacterium tuberculosis* captam menos fosfato e são menos virulentos quando comparados com a cepa selvagem. Os autores sugerem que a baixa concentração de Pi encontrada no vacúolo das células fagocíticas poderia estimular a expressão diferenciada de genes, inclusive genes ligados à replicação e à virulência (115).

## 6.7 AgNPs

A resistência à antibióticos de patógenos humanos importantes, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella sp*, acelerou dramaticamente nos últimos anos (152). A descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos é, portanto, da maior importância. Novos compostos são inicialmente avaliados *in vitro* em relação à sua eficácia e potencial toxicidade para em seguida serem testados em modelos animais, como camundongos. No entanto experimentos com mamíferos são mais demorados, caros e por vezes, considerados eticamente repreensíveis. O modelo de *G. mellonella* é uma alternativa simples e acessível para a rápida avaliação da efetividade de drogas antimicrobianas *in vivo*. No mínimo, o teste de virulência em *G. mellonella* reduz a probabilidade de um agente antimicrobiano que tenha um bom desempenho em estudos *in vitro* de progredir para um comportamento malsucedido em um modelo de mamífero (153).

Na seção 5.4 foi mostrado que as AgNPs reduziram em até 80% a taxa de morte de *G. mellonella* infectada com PA14WT. Além disso, após 3 horas já não era mais possível observar bactérias na hemolinfa das larvas tratadas com AgNPs. Isso mostra o fantástico efeito bactericida

dessas moléculas contra um patógeno altamente virulento, capaz de matar as larvas mesmo com um pequeno inóculo inicial de bactérias ( $\pm 100$  bactérias). O resultado apresentado é bastante promissor.

## 6.8 Complementação dos SNPs encontrados nos isolados do quimiostato

Os genomas de cinco cepas foram sequenciados: a cepa selvagem PA14, o mutante *phoU::pKNOCK-Gm* e os isolados do quimiostato I4, I5 e I6. Em todos os casos, foi usado como referência, o genoma da cepa PA14 NC\_008463.1 (23). Ao comparar a sequência da nossa PA14 com o genoma de referência, detectamos a presença de 228 SNPs. Essa grande quantidade de polimorfismos pode ter duas explicações: erros de sequenciamento ou mutagenização espontânea das bactérias desde que os clones das cepas foram separados e distribuídos nos laboratórios mundo afora. Embora essa última possibilidade seja mais remota, existem casos já relatados sobre mutações que bactérias sofreram ao serem transportadas de um laboratório para outro (154).

Comparando o genoma dos isolados do quimiostato com o genoma da cepa ancestral (PA14 *phoU::pKNOCK-Gm*), foi possível identificar 38, 76 e 26 SNPs nos isolados I4, I5 e I6, respectivamente. Desses, os não-silenciosos foram descritos em 5.1. Os demais SNPs estavam em regiões intergênicas ou resultavam em mutações silenciosas. Um dos SNPs silenciosos encontrado no isolado I6 foi no gene *amrB*, que pertence à família de proteínas RND e que participa de um sistema de efluxo juntamente com MexA e OprM, como mencionado na seção 7. Este é um dos principais sistemas de efluxo envolvidos na resistência a antibióticos em *P. aeruginosa* (155). Mesmo que silenciosa, essa mutação poderia afetar a resistência do isolado I6 ao ácido nalidíxico, observada nos antibiogramas. Por exemplo, a mutação poderia favorecer a tradução do codon por tRNAs mais abundantes. Kohler e colaboradores mostraram que todos os mutantes de *P. aeruginosa* PA01 resistentes ao ácido nalidíxico super-expressavam MexAB-OprM (156).

Conforme mostrado na Seção 5.3 e no Anexo A, não foi possível observar a complementação do fenótipo de resistência a antibióticos nos isolados do quimiostato. O SNP encontrado no gene *nppC* parece não interferir na resistência aos antibióticos testados. Esse gene faz parte do operon *npp*, que é necessário para a captação do antibiótico peptídeo-uridil-pacidamicina, que tem como alvo a enzima translocase I (MraY), que está envolvida na síntese de peptidoglicano (119). ImpA é uma proteína de secreção do tipo VI. DnpA é uma proteína envolvida na tolerância e persistência a fluoroquilononas (121). PA14\_57610 é uma Acetil-CoA Desidrogenase. Aparentemente, esses genes não estão envolvidos no aumento da resistência a antibióticos nos isolados, pois os plasmídios contendo os genes selvagens não alteraram o fenótipo das bactérias, ou vice-versa. O efeito também pode ser sinérgico, ou seja, seriam necessárias duas ou mais mutações para interferir na resistência aos antibióticos testados.

A virulência do mutante *phoU* foi parcialmente restaurada no isolado I4, conforme pode ser visto nos resultados apresentados em 5.4. Não encontramos nenhum SNP relacionado diretamente com genes de virulência nesse isolado. Algumas proteínas hipotéticas foram identificadas com SNPs não silenciosos, porém não se tem conhecimento sobre a função dessas proteínas.



## 7 CONCLUSÕES

- A suplementação de 6 mM Mg<sup>2+</sup> no meio de cultura afeta positivamente o rendimento do mutante *phoU* de *P. aeruginosa*.
- A suplementação de 6 mM Mg<sup>2+</sup> aumenta a motilidade do tipo *swarming* na cepa selvagem e no mutante *phoU*.
- A presença de 50µM FeCl<sub>3</sub> é necessária para a detecção da atividade de FA em *P. aeruginosa*. A FA é parcialmente secretada por *P. aeruginosa* ao meio. Um protocolo para a determinação da atividade da FA em *P. aeruginosa* foi desenvolvido.
- A análise metabolômica revelou altas concentrações de etileno glicol em culturas do mutante *phoU* e na cepa selvagem cultivada em baixas concentrações de Pi. Porém, não foi possível detectar a presença de etileno glicol nessas culturas por HPLC. O pico de ressonância observado ainda poderia ser de outra molécula, uma vez que o software Chenomx é voltado para identificar moléculas metabólicas principalmente de humanos e está em constante atualização.
- O mutante *phoU* é bem menos virulento que a cepa selvagem
- O isolado I4 restaurou, em parte, a virulência do mutante *phoU*.
- As AgNPs apresentaram ação antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa in vitro* e em *G. mellonella*.
- Foram detectados SNPs em 4 genes distintos nos isolados do quimiostato, que poderiam explicar os fenótipos de maior resistência observados. Porém, ensaios de complementação não foram capazes de demonstrar o envolvimento desses genes na resistência a antibióticos.





## ANEXO A – ANTIBIOGRAMAS DOS ISOLADOS DO QUIMIOSTATO

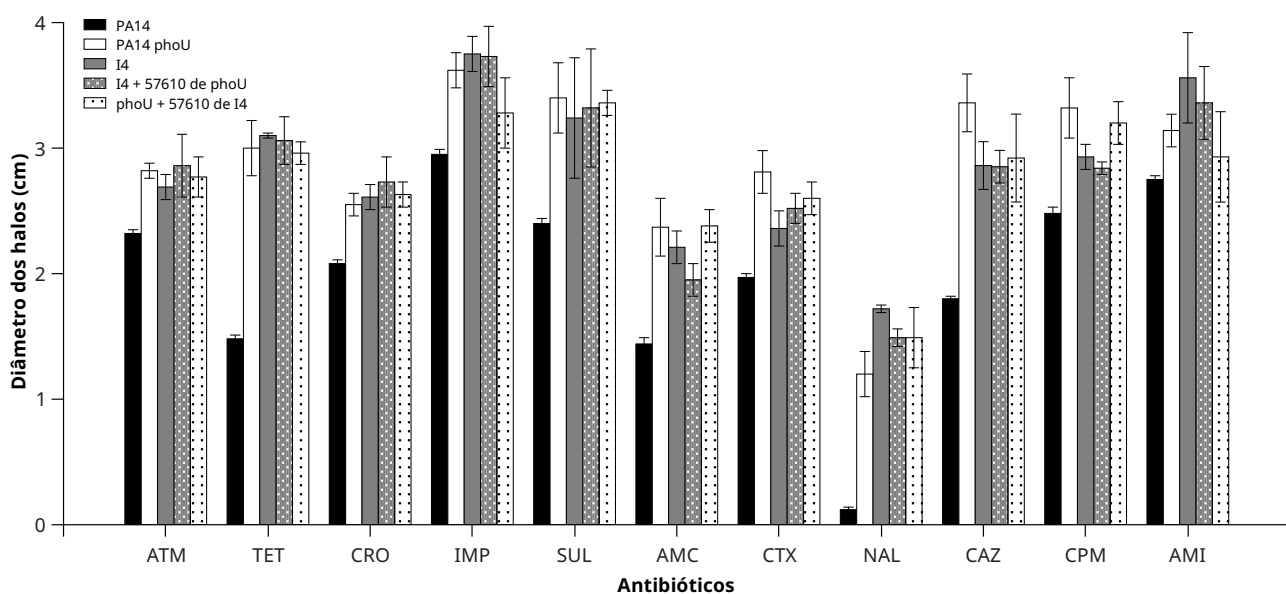


Figura 42 – **Antibiograma do isolado I4 avaliando a complementação do gene 57610.** As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibiótico utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e amicacina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

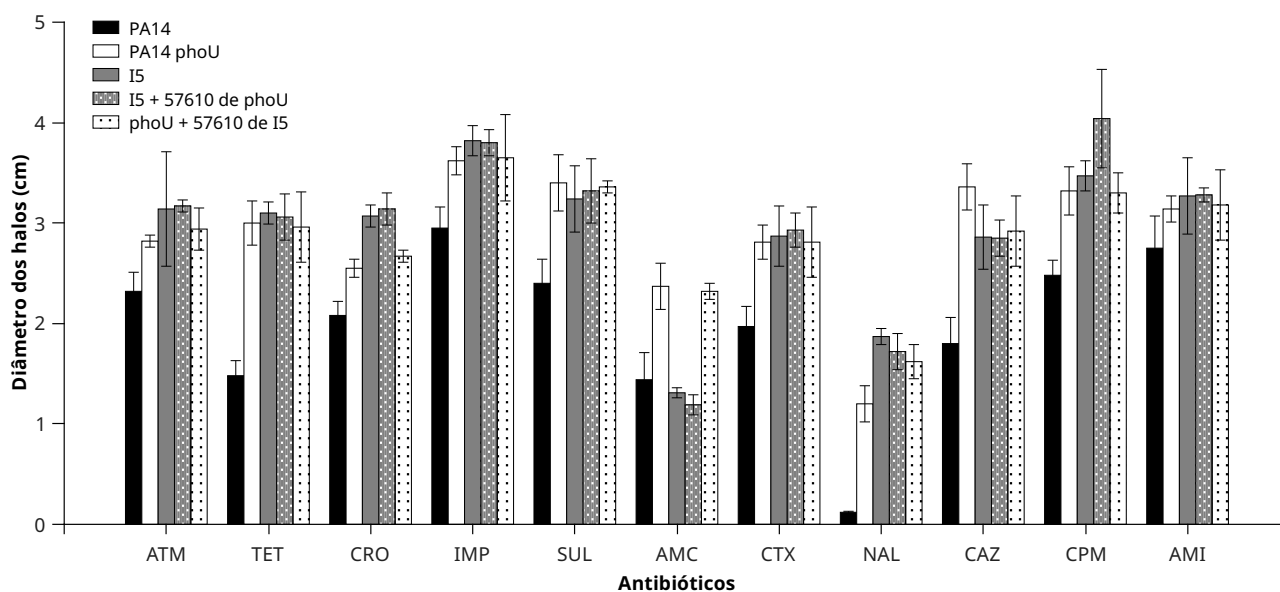


Figura 43 – **Antibiograma do isolado I5 avaliando a complementação do gene 57610.** As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibiótico utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e ampicilina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

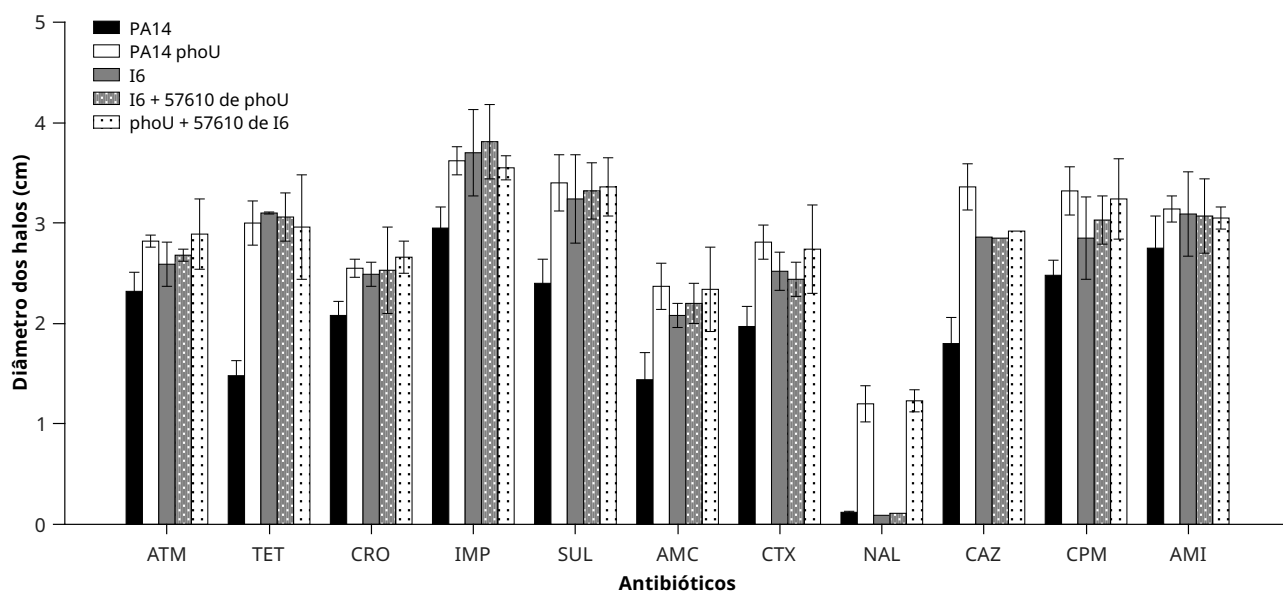


Figura 44 – **Antibiograma do isolado I6 avaliando a complementação do gene 57610.** As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibiótico utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e amicacina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

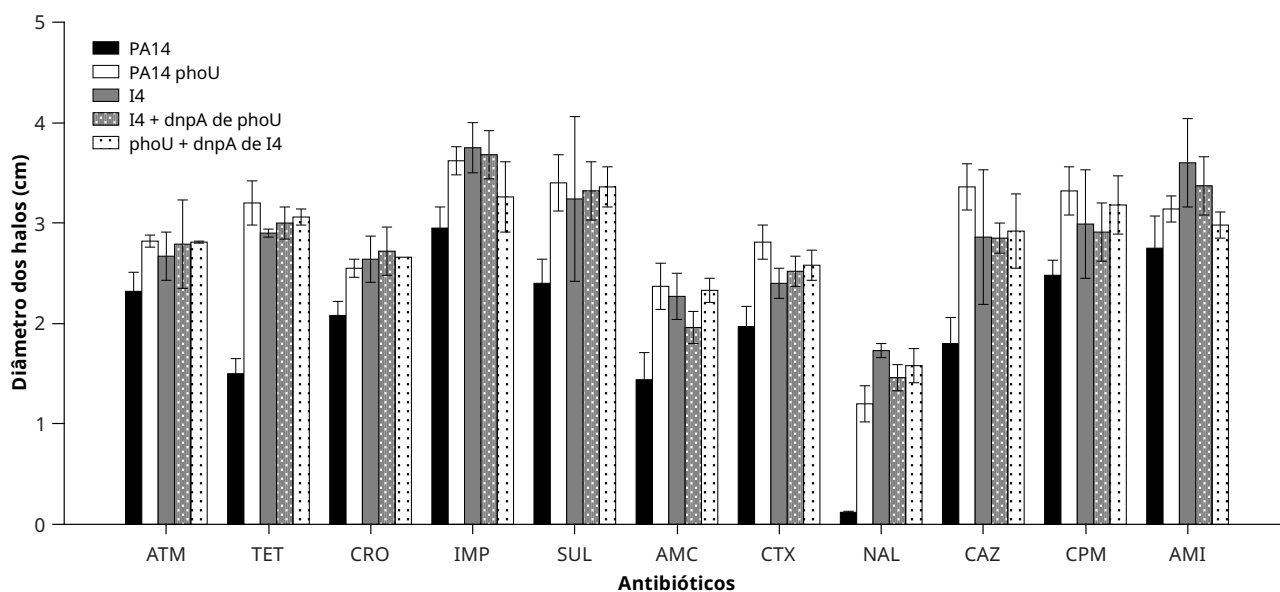


Figura 45 – **Antibiograma do isolado I6 avaliando a complementação do gene *dnpA***. As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibiótico utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e amicacina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

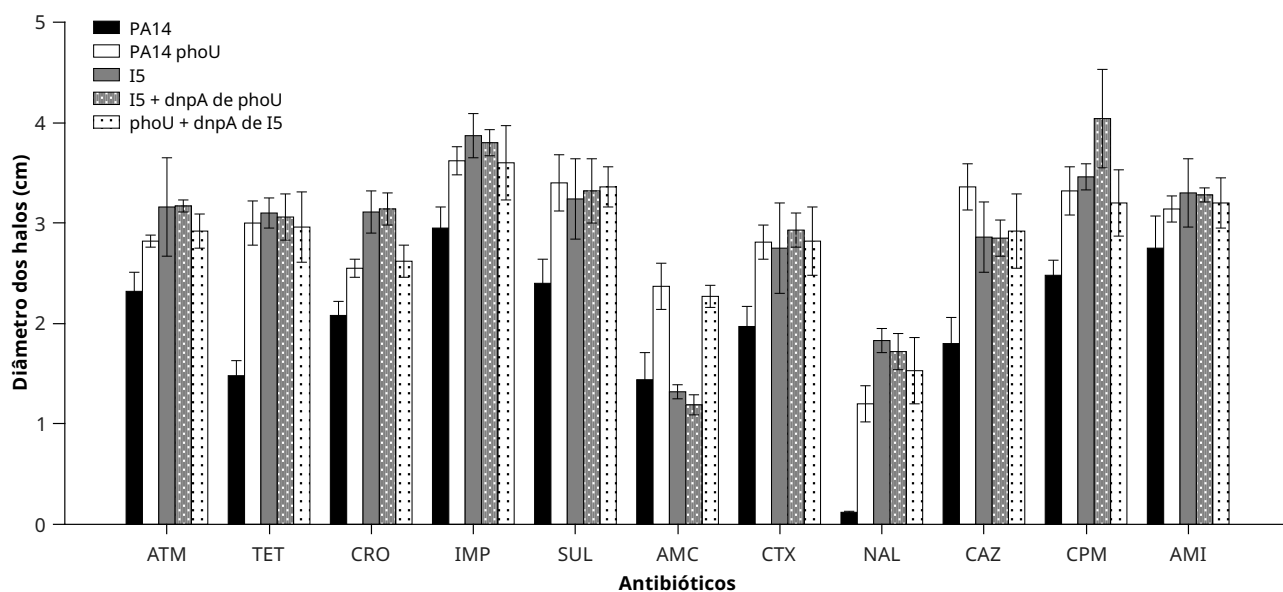


Figura 46 – **Antibiograma do isolado I5 avaliando a complementação do gene *dnpA***. As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibióticos utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e amicacina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

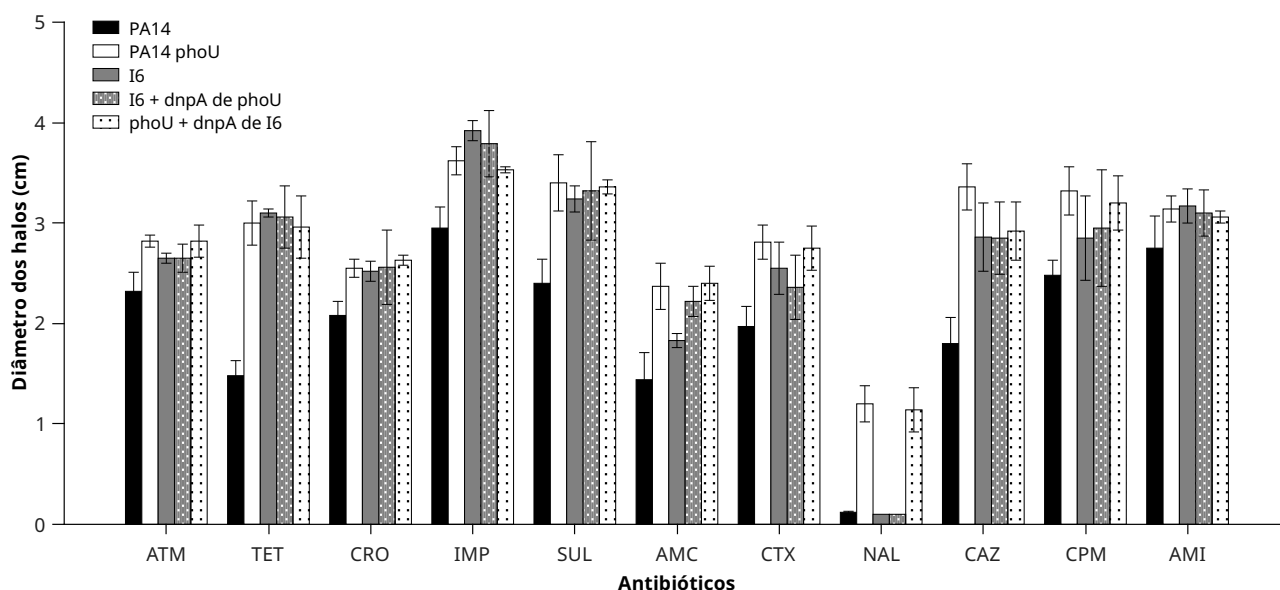


Figura 47 – **Antibiograma do isolado I6 avaliando a complementação do gene *dnpA***. As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibiótico utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e ampicilina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

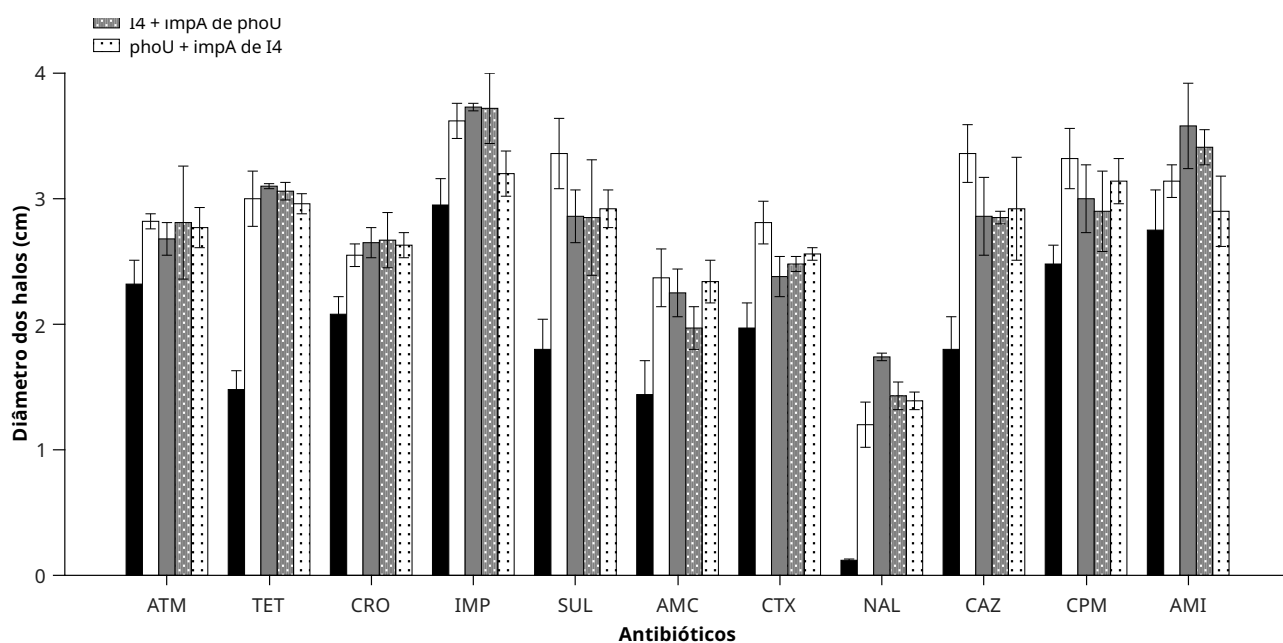


Figura 48 – **Antibiograma do isolado I4 avaliando a complementação do gene *impA***. As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibiótico utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e amicacina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.

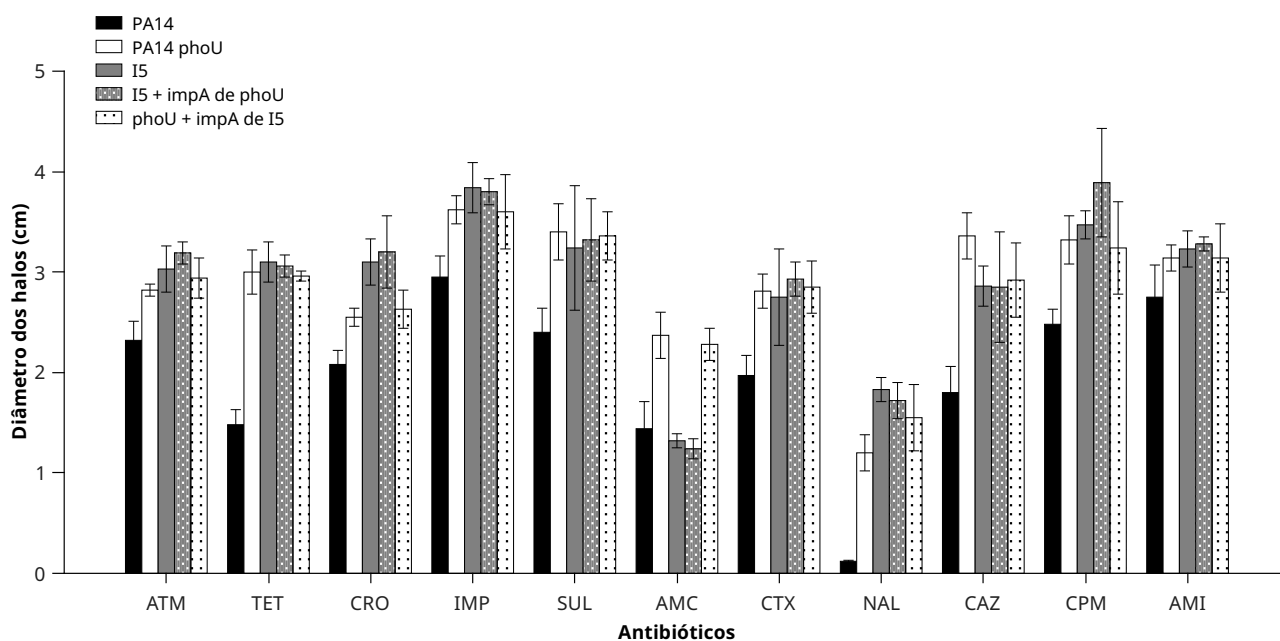


Figura 49 – **Antibiograma do isolado I5 avaliando a complementação do gene *impA***. As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibiótico utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e amicacina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.



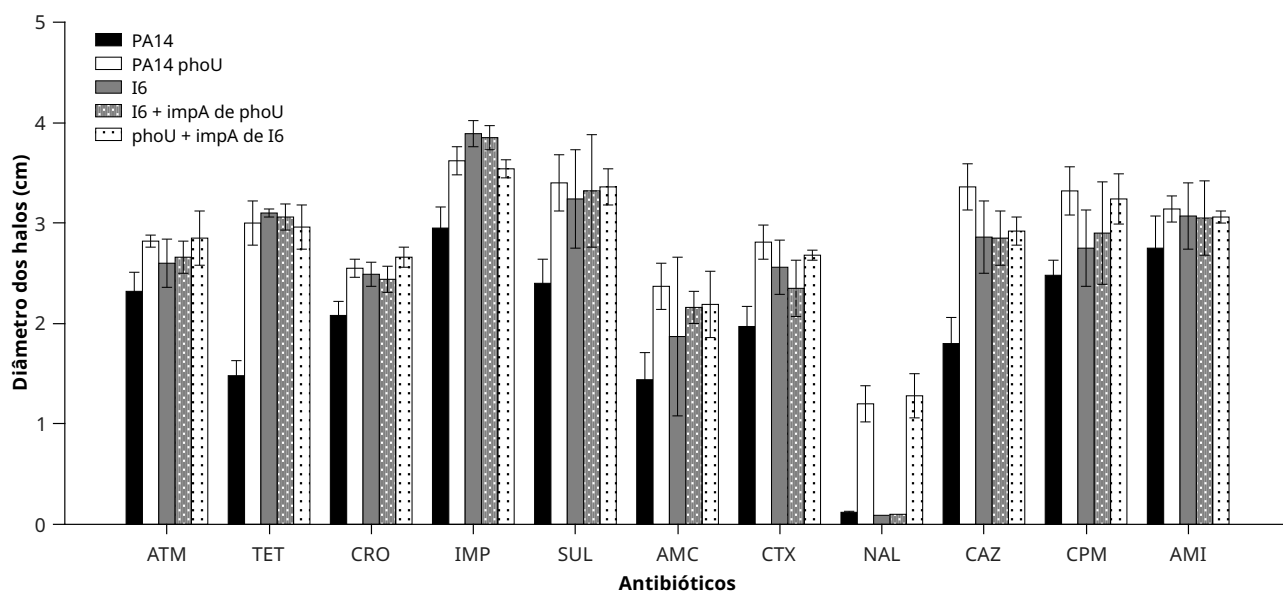


Figura 50 – **Antibiograma do isolado I6 avaliando a complementação do gene *impA***. As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton a 37 °C com agitação durante 16 horas. Em seguida foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton ágar e discos comerciais contendo concentrações conhecidas de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibióticos utilizados foram: aztreonam (ATM), tetraciclina (TET), ceftriaxona, (CRO), imipenem (IMP), sulfonamida (SUL), amoxicilina + clavulanato, (AMC), cefotaxima (CTX), ácido nalidíxico (NAL), e ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM) e amicacina (AMI). As placas foram mantidas a 37°C durante 24 horas e os halos formados foram medidos utilizando o software ImageJ. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão da média.



## REFERÊNCIAS

- 1 NEZNANSKY, A. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* phosphate transport protein PstS plays a phosphate-independent role in biofilm formation. **The FASEB Journal**, FASEB, v. 28, n. 12, p. fj—14, 2014. ISSN 0892-6638.
- 2 CHIANG, S. M.; SCHELLHORN, H. E. Evolution of the rpos regulon: origin of rpos and the conservation of rpos-dependent regulation in bacteria. **Journal of molecular evolution**, Springer, v. 70, n. 6, p. 557–571, 2010.
- 3 WU, H. et al. Identification and characterization of two chemotactic transducers for inorganic phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 182, p. 3400, 2000.
- 4 WANNER, B. L. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. **Escherichia coli and Salmonella**, American Society for Microbiology Press, p. 1357–1381, 1996.
- 5 VEEN, H. W. V. Phosphate transport in prokaryotes: Molecules, mediators and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 299–315, 1997. ISSN 00036072.
- 6 MAKINO, K. et al. Mechanism of transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. **Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology**, p. 5–12, 1994.
- 7 WU, H. et al. Cloning and characterization of *Pseudomonas putida* genes encoding the phosphate-specific transport system. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 87, p. 273–279, 1999. ISSN 1389-1723.
- 8 OHTAKE, H. et al. Regulation of bacterial phosphate taxis and polyphosphate accumulation in response to phosphate starvation stress. **Journal of biosciences**, Springer, v. 23, n. 4, p. 491–499, 1998.
- 9 MAKINO, K. et al. Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. **Genes & development**, Cold Spring Harbor Lab, v. 7, n. 1, p. 149, 1993.
- 10 MAKINO, K. et al. Mechanism of transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. **The Journal of Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 231–238, 1998.
- 11 RAO, N. N.; TORRIANI, A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, Wiley Online Library, v. 4, n. 7, p. 1083–1090, 1990.
- 12 TORRIANI-GORINI, A. Introduction: the Pho regulon of *Escherichia coli*. **Phosphate in Microbiology: Cellular and Molecular Biology**, p. 1–4, 1994.
- 13 GIBSON, J. e. a. L. Model of regulation of the pho regulon. **PLOS ONE**, 2015.
- 14 RASHID, M. H.; RAO, N. N.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. **Journal of bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 182, n. 1, p. 225–227, 2000.
- 15 BARON, S. S.; ROWE, J. J. Antibiotic action of pyocyanin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Am Soc Microbiol, v. 20, n. 6, p. 814–820, 1981.

- 16 STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 406, n. 6799, p. 959–964, 2000.
- 17 YUAN, Z. C. et al. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. **Nucleic acids research**, Oxford Univ Press, v. 34, n. 9, p. 2686, 2006.
- 18 NIKATA, T. et al. Molecular analysis of the phosphate-specific transport (*pst*) operon of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 250, p. 692–698, abr. 1996. ISSN 0026-8925.
- 19 ALMEIDA, L. G. de et al. *phoU* inactivation in *Pseudomonas aeruginosa* enhances ppGpp and polyphosphate accumulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 9, p. AEM.04168–14, 2015.
- 20 RAHME, L. G. et al. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. **Science**, v. 268, n. June, p. 1899–1902, jun. 1995. ISSN 0036-8075.
- 21 HE, J. et al. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. **PNAS**, National Acad Sciences, v. 101, n. 8, p. 2530–2535, 2004.
- 22 KLOCKGETHER, J. et al. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. **Journal of bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 192, n. 4, p. 1113–1121, 2010.
- 23 LEE, D. G. et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. **Genome biology**, BioMed Central Ltd, v. 7, n. 10, p. R90, 2006.
- 24 NICASTRO, G. G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 *cupD* transcription is activated by the *rscB* response regulator, but repressed by its putative cognate sensor *rscC*. **FEMS microbiology letters**, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 301, n. 1, p. 115–123, 2009.
- 25 HARRISON, E. M. et al. Pathogenicity islands *papi-1* and *papi-2* contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 78, n. 4, p. 1437–1446, 2010.
- 26 LEE, S. J. et al. Crystal structure of PhoU from *Pseudomonas aeruginosa*, a negative regulator of the Pho regulon. **Journal of structural biology**, Elsevier, v. 188, n. 1, p. 22–29, 2014.
- 27 MOROHOSHI, T. et al. Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis sp.* strain PCC6803. **Applied and environmental microbiology**, Am Soc Microbiol, v. 68, p. 4107, 2002.
- 28 GARDNER, S. G. et al. The PhoU Protein from *Escherichia coli* Interacts with PhoR, PstB, and Metals To Form a Phosphate-Signaling Complex at the Membrane. **Journal of bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 196, n. 9, p. 1741–1752, 2014.
- 29 LI, Y.; ZHANG, Y. PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Am Soc Microbiol, v. 51, n. 6, p. 2092–2099, 2007.
- 30 SHARTHIYA, H. et al. Phou allows rapid adaptation to high phosphate concentrations by modulating *pstSCAB* transport rate in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, Am Soc Microbiol, p. JB–00143, 2017.

- 31 DICENZO, G. e. a. C. Visualization of the location of transposon insertion sites. **PLOS Genetics**. Disponível em: <[https://figshare.com/articles/Visualization\\_of\\_the\\_location\\_of\\_transposon\\_insertion\\_sites/6163370/1](https://figshare.com/articles/Visualization_of_the_location_of_transposon_insertion_sites/6163370/1)>.
- 32 NANNIPIERI, P. et al. Role of phosphatase enzymes in soil. In: *Phosphorus in action*. [S.l.]: Springer, 2011. p. 215–243.
- 33 LUO, H. et al. Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases. **PNAS**, National Acad Sciences, v. 106, n. 50, p. 21219–21223, 2009.
- 34 CHANG, T.-C. et al. Regulation of the expression of alkaline phosphatase in a human breast-cancer cell line. **Biochemical Journal**, Portland Press Limited, v. 303, n. 1, p. 199–205, 1994.
- 35 SADEGHIRIZI, A.; YAZDANPARAST, R. Plasma membrane homing of tissue nonspecific alkaline phosphatase under the influence of 3-hydrogenkwadaphnin, an antiproliferative agent from *dendrostellera lessertii*. **Acta Biochimica Polonica-English Edition**, Citeseer, v. 54, n. 2, p. 323, 2007.
- 36 APEL, A. K. et al. Phosphate control of *phoA*, *phoC* and *phoD* gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveals significant differences in binding of phop to their promoter regions. **Microbiology**, Microbiology Society, v. 153, n. 10, p. 3527–3537, 2007.
- 37 ZIMMERMAN, A. E.; MARTINY, A. C.; ALLISON, S. D. Microdiversity of extracellular enzyme genes among sequenced prokaryotic genomes. **The ISME journal**, Nature Publishing Group, v. 7, n. 6, p. 1187, 2013.
- 38 YAMANE, K.; MARUO, B. Alkaline phosphatase possessing alkaline phosphodiesterase activity and other phosphodiesterases in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 134, n. 1, p. 108–114, 1978.
- 39 WU, J.-R. et al. Cloning of the gene and characterization of the enzymatic properties of the monomeric alkaline phosphatase (phox) from *Pasteurella multocida* strain x-73. **FEMS microbiology letters**, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 267, n. 1, p. 113–120, 2007.
- 40 CHENG, K. J.; INGRAM, J. M.; COSTERTON, J. W. Release of alkaline phosphatase from cells of *Pseudomonas aeruginosa* by manipulation of cation concentration and of pH. **J Bacteriol**, v. 104, p. 748–753, nov. 1970. ISSN 0021-9193.
- 41 LAMBERT, P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the royal society of medicine**, Royal Society of Medicine Press, v. 95, n. Suppl 41, p. 22, 2002.
- 42 HANCOCK, R. E.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. **Drug resistance updates**, Churchill Livingstone, v. 3, n. 4, p. 247–255, 2000.
- 43 NICHOLS, W. W. et al. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Am Soc Microbiol, v. 32, n. 4, p. 518–523, 1988.
- 44 BRINKMAN, F. S.; BAINS, M.; HANCOCK, R. E. The amino terminus of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein oprf forms channels in lipid bilayer membranes: correlation with a three-dimensional model. **Journal of Bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 182, n. 18, p. 5251–5255, 2000.

- 45 LIVERMORE, D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford University Press, v. 47, n. 3, p. 247–250, 2001.
- 46 GILLELAND, L. B. et al. Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of medical microbiology**, Microbiology Society, v. 29, n. 1, p. 41–50, 1989.
- 47 PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical microbiology reviews**, Am Soc Microbiol, v. 19, n. 2, p. 382–402, 2006.
- 48 DU, D. et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, Nature Publishing Group, p. 1, 2018.
- 49 POOLE, K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 255–264, 2001.
- 50 HANCOCK, R. E. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, The University of Chicago Press, v. 27, n. Supplement\_1, p. S93–S99, 1998.
- 51 LÓPEZ, C. A. et al. Dynamics of intact mexab-oprm efflux pump: focusing on the mexa-oprm interface. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 7, 2017.
- 52 GIWERCMAN, B. et al. High-level beta-lactamase activity in sputum samples from cystic fibrosis patients during antipseudomonal treatment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Am Soc Microbiol, v. 36, n. 1, p. 71–76, 1992.
- 53 VAHABOGLU, H. et al. Clinical importance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (per-1-type)-producing acinetobacter spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Journal of medical microbiology**, Microbiology Society, v. 50, n. 7, p. 642–645, 2001.
- 54 MAITI, S. N. et al. Beta-lactamase inhibitors: agents to overcome bacterial resistance. **Current medicinal chemistry**, v. 5, n. 6, p. 441–456, 1998.
- 55 AKASAKA, T. et al. Type ii topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Am Soc Microbiol, v. 45, n. 8, p. 2263–2268, 2001.
- 56 SRIKUMAR, R.; TSANG, E.; POOLE, K. Contribution of the mexab-oprm multidrug efflux system to the  $\beta$ -lactam resistance of penicillin-binding protein and  $\beta$ -lactamase-derepressed mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford University Press, v. 44, n. 4, p. 537–540, 1999.
- 57 PAL, C. **Effects of biocides and metals on antibiotic resistance: a genomic and metagenomic perspective**. Tese, 2017.
- 58 KELKAWI, A. H. A.; KAJANI, A. A.; BORDBAR, A.-K. Green synthesis of silver nanoparticles using mentha pulegium and investigation of their antibacterial, antifungal and anticancer activity. **IET nanobiotechnology**, IET, v. 11, n. 4, p. 370–376, 2016.

- 59 SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. **Journal of colloid and interface science**, Elsevier, v. 275, n. 1, p. 177–182, 2004.
- 60 MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, IOP Publishing, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005.
- 61 RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology advances**, Elsevier, v. 27, n. 1, p. 76–83, 2009.
- 62 KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, Elsevier, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.
- 63 LARA, H. H. et al. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer, v. 26, n. 4, p. 615–621, 2010.
- 64 PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? a study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, Am Soc Microbiol, v. 73, n. 6, p. 1712–1720, 2007.
- 65 PRABHU, S.; POULOSE, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International nano letters**, Springer, v. 2, n. 1, p. 32, 2012.
- 66 SHAHVERDI, A. R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, Elsevier, v. 3, n. 2, p. 168–171, 2007.
- 67 YUAN, Y.-G.; PENG, Q.-L.; GURUNATHAN, S. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy. **International journal of molecular sciences**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 18, n. 3, p. 569, 2017.
- 68 RAFFI, M. et al. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* atcc-15224. **Journal of materials science and technology**, Shenyang, China: Allerton Press, c1993-, v. 24, n. 2, p. 192–196, 2008.
- 69 MIRZAJANI, F. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **Research in microbiology**, Elsevier, v. 162, n. 5, p. 542–549, 2011.
- 70 WAL, A. van der et al. Determination of the total charge in the cell walls of gram-positive bacteria. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, Elsevier, v. 9, n. 1-2, p. 81–100, 1997.
- 71 ABBASZADEGAN, A. et al. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. **Journal of Nanomaterials**, Hindawi Publishing Corp., v. 16, n. 1, p. 53, 2015.
- 72 MANDAL, D. et al. Bio-fabricated silver nanoparticles preferentially targets gram positive depending on cell surface charge. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Elsevier, v. 83, p. 548–558, 2016.

- 73 KHALANDI, B. et al. A review on potential role of silver nanoparticles and possible mechanisms of their actions on bacteria. **Drug research**, © Georg Thieme Verlag KG, v. 67, n. 02, p. 70–76, 2017.
- 74 YOU, C. et al. The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity. **Molecular biology reports**, Springer, v. 39, n. 9, p. 9193–9201, 2012.
- 75 GOMAA, E. Z. Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as models for gram-positive and gram-negative bacteria. **The Journal of general and applied microbiology**, Applied Microbiology, Molecular and Cellular Biosciences Research Foundation, v. 63, n. 1, p. 36–43, 2017.
- 76 SIRITONGSUK, P. et al. Two-phase bactericidal mechanism of silver nanoparticles against *Burkholderia pseudomallei*. **PloS one**, Public Library of Science, v. 11, n. 12, p. e0168098, 2016.
- 77 KLUEH, U. et al. Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, Wiley Online Library, v. 53, n. 6, p. 621–631, 2000.
- 78 HOLT, K. B.; BARD, A. J. Interaction of silver (i) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar  $Ag^+$ . **Biochemistry**, ACS Publications, v. 44, n. 39, p. 13214–13223, 2005.
- 79 SCHREURS, W.; ROSENBERG, H. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 152, n. 1, p. 7–13, 1982.
- 80 MONTEIRO, D. R. et al. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. **Journal of Prosthodontics: Implant, Esthetic and Reconstructive Dentistry**, Wiley Online Library, v. 21, n. 1, p. 7–15, 2012.
- 81 LONG, Y.-M. et al. Surface ligand controls silver ion release of nanosilver and its antibacterial activity against *Escherichia coli*. **International journal of nanomedicine**, Dove Press, v. 12, p. 3193, 2017.
- 82 KAWETEERAWAT, C. et al. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria mediated by silver nanoparticles. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, Taylor & Francis, v. 80, n. 23-24, p. 1276–1289, 2017.
- 83 PANÁČEK, A. et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. **Nature nanotechnology**, Nature Publishing Group, v. 13, n. 1, p. 65, 2018.
- 84 KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 28, n. 1, p. 101–112, 2004.



- 85 MYLONAKIS, E. et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **PNAS**, National Acad Sciences, v. 99, n. 24, p. 15675–15680, 2002.
- 86 MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 73, n. 7, p. 3842–3850, 2005.
- 87 RIBEIRO, C.; BREHÉLIN, M. Insect haemocytes: what type of cell is that? **Journal of insect physiology**, Elsevier, v. 52, n. 5, p. 417–429, 2006.
- 88 CYTRYŃSKA, M. et al. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. **Peptides**, Elsevier, v. 28, n. 3, p. 533–546, 2007.
- 89 DUNPHY, G. B. et al. Pathogenicity of lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for larvae of *Galleria mellonella*: bacterial properties associated with virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, Elsevier, v. 47, n. 1, p. 48–55, 1986.
- 90 MIYATA, S. et al. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type iii secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 71, n. 5, p. 2404–2413, 2003.
- 91 DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **Journal of bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 190, n. 7, p. 2597–2606, 2008.
- 92 ALEXEYEV, M. F. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. **Biotechniques**, v. 26, p. 824–826, 1999. ISSN 0736-6205.
- 93 JENAL, U.; FUCHS, T. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. **The EMBO journal**, Nature Publishing Group, v. 17, n. 19, p. 5658–5669, 1998.
- 94 SCHWEIZER, H. P. *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. **Gene**, v. 97, p. 109–121, jan. 1991. ISSN 0378-1119.
- 95 MILLER, J. H. *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. [S.l.]: Cold spring harbor laboratory press New York, 1992. v. 1.
- 96 ECHOLS, H. et al. Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E. coli*. **Journal of molecular biology**, Elsevier, v. 3, n. 4, p. 425–438, 1961.
- 97 LEVINTHAL, C.; SIGNER, E. R.; FETHEROLF, K. Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. **PNAS**, National Academy of Sciences, v. 48, n. 7, p. 1230, 1962.
- 98 SPIRA, B. et al. Alternative promoters in the *pst* operon of *Escherichia coli*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 284, p. 489–498, 2010. ISSN 16174615.
- 99 HOANG, T. T. et al. A broad-host-range F1p-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: Application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Gene**, v. 212, n. 1, p. 77–86, 1998. ISSN 03781119.

- 100 JEONG, J.-Y. et al. One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. **Applied and environmental microbiology**, Am Soc Microbiol, v. 78, n. 15, p. 5440–5443, 2012.
- 101 CHEN, P. S. et al. Microdetermination of phosphorus. **Analytical chemistry**, ACS Publications, v. 28, p. 1756–1758, 1956.
- 102 CARLSSON, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pyocyanin negative strains are associated with bpi-anca and progressive lung disease. **Journal of Cystic Fibrosis**, Elsevier, v. 10, n. 4, p. 265–271, 2011.
- 103 MAK, P.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; CYTRYŃSKA, M. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. **Developmental & Comparative Immunology**, Elsevier, v. 34, n. 10, p. 1129–1136, 2010.
- 104 HWANG, S. et al. Circulating hemocytes from larvae of the japanese rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma* (linnaeus)(coleoptera: Scarabaeidae) and the cellular immune response to microorganisms. **PloS one**, Public Library of Science, v. 10, n. 6, p. e0128519, 2015.
- 105 OMELON, S.; GEORGIU, J.; HABRAKEN, W. A cautionary (spectral) tail: red-shifted fluorescence by dapi-dapi interactions. **Biochem Soc Trans**, v. 44, n. 1, p. 46–49, Feb 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1042/BST20150231>>.
- 106 KIM, D.-M.; SWARTZ, J. R. Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. **Biotechnology progress**, Wiley Online Library, v. 16, n. 3, p. 385–390, 2000.
- 107 STEED, P. M.; WANNER, B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. **Journal of bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 175, n. 21, p. 6797–6809, 1993.
- 108 CAIAZZA, N. C.; SHANKS, R. M. Q.; O'TOOLE, G. A. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 187, n. 21, p. 7351–7361, 2005.
- 109 LAU, G. W. et al. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 12, p. 599–606, 2004. ISSN 14714914.
- 110 MUNÉVAR, N. F. V.; ALMEIDA, L. G. de; SPIRA, B. Differential regulation of polyphosphate genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Genetics and Genomics**, Springer, p. 1–12, 2016.
- 111 ALBI, T.; SERRANO, A. Inorganic polyphosphate in the microbial world. emerging roles for a multifaceted biopolymer. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer, v. 32, n. 2, p. 1–12, 2016.
- 112 DAIGLE, F.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 63, n. 12, p. 4924–4927, 1995.
- 113 LAMARCHE, M. G. et al. Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* o78 strain. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 73, n. 7, p. 4138–4145, 2005.

- 114 FERREIRA, G. M.; SPIRA, B. The pst operon of enteropathogenic {*Escherichia coli*} enhances bacterial adherence to epithelial cells. *Microbiology, Soc General Microbiol*, v. 154, n. 7, p. 2025–2036, 2008.
- 115 PEIRS, P. et al. *Mycobacterium tuberculosis* with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins psts1 and psts2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced in vivo virulence. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 73, n. 3, p. 1898–1902, 2005.
- 116 LONG, J. et al. Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of *P aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. **Surgery**, Elsevier, v. 144, n. 2, p. 189–197, 2008.
- 117 MALLICK, P. K. The threat of antibiotic resistance and super bugs-a national and global perspective. **Journal of Neonatal Research and Pediatrics Care Review Article**, v. 1, n. 1.
- 118 ALMEIDA, L. G. de. *Acúmulo de polifosfato e o papel do gene phoU em Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação.
- 119 PLETZER, D. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ABC transporter NppA1A2BCD is required for uptake of peptidyl nucleoside antibiotics. **Journal of bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 197, n. 13, p. 2217–2228, 2015.
- 120 MINTZ, K. P.; FIVES-TAYLOR, P. M. *impA*, a gene coding for an inner membrane protein, influences colonial morphology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 68, n. 12, p. 6580–6586, 2000.
- 121 LIEBENS, V. et al. Membrane localization and topology of the dnpa protein control fluoroquinolone tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS microbiology letters**, Oxford University Press, v. 363, n. 17, 2016.
- 122 WAZER, J. R. V.; CALLIS, C. F. Metal complexing by phosphates. **Chemical Reviews**, ACS Publications, v. 58, n. 6, p. 1011–1046, 1958.
- 123 KATO, J.; ITO, A.; NIKATA, T. Phosphate taxis in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol**, v. 174, p. 5149–5151, ago. 1992.
- 124 HAROLD, F. M. Accumulation of inorganic polyphosphate in mutants of *Neurospora crassa*. **Biochimica et biophysica acta**, Elsevier, v. 45, p. 172–188, 1960.
- 125 CROOKE, E. et al. Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 9, p. 6290–6295, 1994. ISSN 00219258.
- 126 FRALEY, C. D. et al. A polyphosphate kinase 1 (*ppk1*) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. **PNAS**, National Acad Sciences, v. 104, p. 3526, 2007.
- 127 AKIYAMA, M.; CROOKE, E.; KORNBERG, A. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. the enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 268, n. 1, p. 633–639, 1993.
- 128 BOER, W. E. de; GOLTEN, C.; SCHEFFERS, W. Effects of some chemical factors on flagellation and swarming of *Vibrio alginolyticus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Springer, v. 41, n. 1, p. 385–403, 1975.

- 129 THAMPURAN, N.; SURENDRAN, P. Effect of chemical agents on swarming of *Bacillus species*. **Journal of applied bacteriology**, Wiley Online Library, v. 80, n. 3, p. 296–302, 1996.
- 130 WEISER, R. et al. Inhibition by ethylenediamine tetraacetic (edta) of swarming of *Proteus Mirabilis*. **Zentralblatt Fur Bakteriologie Parasitenkunde Infektions-krankheiten Und Hygiene Erste Abteilung Orginale Riehe A-medizinische Mikrobiologie Und Parasitologie**, v. 218, n. 4, p. 434, 1971.
- 131 THOMPSON, R. Q. et al. Comparison of methods for following alkaline phosphatase catalysis: spectrophotometric versus amperometric detection. **Analytical biochemistry**, Elsevier, v. 192, n. 1, p. 90–95, 1991.
- 132 HO, W.; ATHEY, D.; MCNEIL, C. Amperometric detection of alkaline phosphatase activity at a horseradish peroxidase enzyme electrode based on activated carbon: potential application to electrochemical immunoassay. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 10, n. 8, p. 683–691, 1995.
- 133 HANCOCK, R.; POOLE, K.; BENZ, R. Outer membrane protein p of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes. **Journal of bacteriology**, Am Soc Microbiol, v. 150, n. 2, p. 730–738, 1982.
- 134 OCHSNER, U. A. et al. Genechip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. **Molecular microbiology**, Wiley Online Library, v. 45, n. 5, p. 1277–1287, 2002.
- 135 TREDWELL, G. D. et al. The development of metabolomic sampling procedures for *Pichia pastoris*, and baseline metabolome data. **PloS one**, Public Library of Science, v. 6, n. 1, p. e16286, 2011.
- 136 ALKIM, C. et al. Optimization of ethylene glycol production from (d)-xylose via a synthetic pathway implemented in *Escherichia coli*. **Microbial cell factories**, BioMed Central, v. 14, n. 1, p. 127, 2015.
- 137 PANG, J. et al. Synthesis of ethylene glycol and terephthalic acid from biomass for producing pet. **Green Chemistry**, Royal Society of Chemistry, v. 18, n. 2, p. 342–359, 2016.
- 138 WATANABE, S. et al. Functional characterization of aconitase x as a cis-3-hydroxy-l-proline dehydratase. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group, v. 6, 2016.
- 139 CARRIÓN, O. et al. A novel pathway producing dimethylsulphide in bacteria is widespread in soil environments. **Nature communications**, Nature Publishing Group, v. 6, 2015.
- 140 NIKBIN, V. et al. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. **Iranian journal of microbiology**, Tehran University of Medical Sciences, v. 4, n. 3, p. 118, 2012.
- 141 MIKKELSEN, H.; MCMULLAN, R.; FILLOUX, A. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. **PloS one**, Public Library of Science, v. 6, n. 12, p. e29113, 2011.

- 142 REIMMANN, C. et al. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* pao1. **Microbiology**, Microbiology Society, v. 148, n. 4, p. 923–932, 2002.
- 143 O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, Wiley Online Library, v. 30, n. 2, p. 295–304, 1998.
- 144 RASHID, M. H.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. **PNAS**, National Acad Sciences, v. 97, n. 9, p. 4885–4890, 2000.
- 145 GALLARATO, L. A. et al. Exopolyphosphatase of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for the production of virulence factors, and its expression is controlled by ntrc and phob acting at two interspaced promoters. **Microbiology**, Microbiology Society, v. 160, n. 2, p. 406–417, 2014.
- 146 KURODA, A. et al. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 272, n. 34, p. 21240–21243, 1997.
- 147 ANDREJKO, M.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; CYTRYŃSKA, M. Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of invertebrate pathology**, Elsevier, v. 115, p. 14–25, 2014.
- 148 CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological reviews**, Wiley Online Library, v. 198, n. 1, p. 116–126, 2004.
- 149 World Health Organization(WHO). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. 2017.
- 150 ZABORINA, O. et al. Dynorphin activates quorum sensing quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS pathogens**, Public Library of Science, v. 3, n. 3, p. e35, 2007.
- 151 ZABORIN, A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* overrides the virulence inducing effect of opioids when it senses an abundance of phosphate. **PloS one**, Public Library of Science, v. 7, n. 4, p. e34883, 2012.
- 152 CANTEÓN, R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. **Clinical microbiology and infection**, Elsevier, v. 15, p. 20–25, 2009.
- 153 TSAI, C. J.-Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, Taylor & Francis, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016.
- 154 SPIRA, B. et al. The uncertain consequences of transferring bacterial strains between laboratories-rpos instability as an example. **BMC microbiology**, BioMed Central, v. 11, n. 1, p. 248, 2011.
- 155 POOLE, K. et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **J Bacteriol**, v. 175, p. 7363–7372, nov. 1993. ISSN 0021-9193.

156 KÖHLER, T. et al. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Am Soc Microbiol, v. 41, n. 11, p. 2540–2543, 1997.