

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA

*Análise das tiol peroxidases Ohr, OsmC e Gpx na virulência de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando como modelo de infecção larvas de *Galleria mellonella**

Igor Nascimento de Carvalho

Orientador: Diogo de Abreu Meireles

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

FEVEREIRO, 2025

Análise das tiol peroxidases Ohr, OsmC e Gpx na virulência de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando como modelo de infecção larvas de *Galleria mellonella*

IGOR NASCIMENTO DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Diogo de Abreu Meireles

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C331 Carvalho, Igor Nascimento de.

Análise das tiol peroxidases Ohr, OsmC e Gpx na virulência de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando como modelo de infecção larvas de *Galleria mellonella*. / Igor Nascimento de Carvalho. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

122 f.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.

Orientador: Diogo de Abreu Meireles.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Tiol peroxidase. 4. Enzimas antioxidantes. 5. *Galleria mellonella*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

Análise das tiol peroxidases Ohr, OsmC e Gpx na virulência de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando como modelo de infecção larvas de *Galleria mellonella*

IGOR NASCIMENTO DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2025

Comissão examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDO GOMES**
Data: 15/04/2025 18:32:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Fernando Gomes (Dr. em Ciências - Genética) – IB/USP

Documento assinado digitalmente
 **ANA ELIZA ZERAIK**
Data: 23/04/2025 15:09:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Ana Eliza Zeraik (Dr^a em Física Aplicada – Biomolecular) – CBB/LQFPP/UENF

Documento assinado digitalmente
 **ANTONIO JESUS DORIGHETTO COGO**
Data: 18/04/2025 14:54:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Antônio Jesus Dorighetto Cogo (Dr. em Biociências e Biotecnologia) – CBB/LBCT/UENF

Documento assinado digitalmente
 **DIOGO DE ABREU MEIRELES**
Data: 30/04/2025 16:38:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Diogo de Abreu Meireles (Dr. em Ciências - Bioquímica) – CBB/LFBM/UENF (Orientador)

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada à minha mãe, Roselane, minha maior inspiração. Ela me mostrou, na prática, que a educação tem o poder de transformar vidas. Aos 40 anos, conciliando o trabalho e a criação de dois filhos, ingressou na faculdade e, ao concluir a graduação, foi aprovada em dois concursos, mudando a realidade da nossa família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Antônio Cláudio e Roselane, por todo o apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim. Sou imensamente grato por todas as oportunidades que me proporcionaram, fruto de muito esforço e dedicação. Um agradecimento especial à minha mãe, meu porto seguro. Obrigado por estar sempre ao meu lado, me dando força nos momentos mais difíceis e me inspirando a ser uma pessoa melhor a cada dia. Seu jeito único e resiliente, sua capacidade de enfrentar desafios e a pessoa incrível que se tornou mesmo com as adversidades da vida me motivam a crescer e evoluir diariamente.

Ao meu irmão mais velho, Caio, meu melhor amigo e exemplo de vida. Sou grato por todos os ensinamentos, pelas conversas e pelo apoio incondicional, especialmente nos momentos de tristeza e incerteza. Obrigado por sempre acreditar em mim e por me inspirar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos amigos Ana Júlia Hygino, Juliana Cardoso, Kissila Defanti, Lucas Gomes, Ludimila Peçanha, Nathália Souza, Paloma Cruz e Willians Guimarães, que a graduação me deu e que se tornaram amigos da vida. Sou imensamente grato por ter vocês ao meu lado e feliz por ver nossa amizade resistir ao tempo, à distância e às mudanças da vida. Obrigado por cada momento compartilhado, por todas as conversas e risadas.

Aos amigos Ana Júlia Dias, Davi Resende, Erika Couto, Gabriel Naklhe, Kaillany Nunes, Lívia Soares, Mariah Silveira e Paula Monteiro, que tive a alegria de conhecer durante minha graduação em Odontologia, minha mais profunda gratidão. Obrigado por todas as conversas, pelo apoio e por estarem ao meu lado nesse grande desafio que é conciliar uma segunda graduação com a pós-graduação. A amizade de vocês fez toda a diferença, tornando essa jornada mais leve, motivadora e especial.

Aos amigos Isabel Lyrio, Keila Mesquita, Kleber Scafura e Philipe Passos, minha eterna gratidão por tantos anos de amizade. Obrigado por estarem ao meu lado nos momentos difíceis, por me auxiliarem sempre que precisei e por me incentivarem a crescer e me tornar uma pessoa melhor. Com vocês, aprendi o verdadeiro significado da palavra amizade.

A todos que fizeram ou fazem parte do grupo de pesquisa Redox do LFBM ao longo da minha trajetória, meu sincero agradecimento, especialmente a Júlia, Louyse, Rafaela e Rayssa. Sou grato pelo companheirismo, pela troca de experiências e pelo apoio em cada experimento. Trabalhar ao lado de vocês tornou essa jornada mais leve, enriquecedora e motivadora.

Um agradecimento mais que especial à Lais Nogueira, que esteve comigo desde a graduação, dividindo disciplinas, desafios e a Iniciação Científica. O destino ainda nos levou ao mesmo grupo de pesquisa no mestrado, e sua presença tornou essa jornada muito mais leve. Sou grato por todas as conversas, risadas, reflexões e, claro, pelas idas ao posto para comer salgadinho e falar sobre a vida. Ter você ao meu lado diariamente no laboratório fez toda a diferença, tornando os dias mais fáceis e motivadores. Tenho imenso orgulho da sua trajetória e da pessoa incrível que você se tornou.

Meu agradecimento a Allan Conceição, Arielle Bessiatti, Kissila Soares e Larissa Resende por tornarem cada dia no laboratório mais leve, divertido e cheio de boas risadas. A convivência com vocês transformou a rotina mais leve de ser vivida e sou grato por cada momento compartilhado.

Ao meu orientador Prof^o Dr. Diogo de Abreu Meireles agradeço por todos os ensinamentos, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e por todo apoio.

Aos professores do LFBM e aos que fizeram parte da minha jornada no mestrado, meu sincero agradecimento por todo o conhecimento compartilhado e pelo papel fundamental na minha formação.

Aos professores que gentilmente aceitaram participar da banca de defesa, agradeço pelas valiosas sugestões de melhoria, que certamente contribuirão para o avanço da pesquisa e para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Também expresso minha sincera gratidão ao CBB – Centro de Biociências e Biotecnologia, ao PGBB – Programa de Biociências e Biotecnologia, ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, e à FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio essencial que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para a minha formação acadêmica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. 18	
1.1.1. Características gerais	15
1.1.2. Fatores de virulência	16
1.1.3. Mecanismos de resistência	19
1.2. Espécies reativas de oxigênio (EROs)	22
1.3. Sistemas antioxidantes	26
1.4. Família Ohr/OsmC	30
1.5. Glutathiona peroxidase	36
1.6. 41	
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo geral:	42
2.2. Objetivos específicos:	42
3. METODOLOGIA	43
3.1. Organismos de estudo	43
3.2. Desenho dos oligonucleotídeos para deleção dos genes	46
3.3. Desenho dos oligonucleotídeos para complementação funcional das linhagens	48
3.4. Extração do DNA genômico	46
3.5. PCR deleção	46
3.6. Purificação das amostras	47
3.7. Digestão das amostras	48
3.8. Ligação das amostras	48
3.9. Transformação de células competentes de	52
3.10. Extração de DNA plasmidial (Miniprep)	49
3.11. Obtenção de mutantes nulos	54
3.12. Confirmação do genótipo das linhagens de	55
3.13. Construção dos plasmídeos para complementação dos mutantes nulos nos genes	56
3.14. Curvas de crescimento	52
3.15. Quantificação da solução de H ₂ O ₂ e NaClO	52
3.16. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	53
3.17. Ensaio de spot assay	53

3.18.	Avaliação da virulência de células planctônicas de	58
3.19.	Análises estatísticas	55
4.	RESULTADOS	55
4.1.	Construção dos plasmídeos pEX18Ap_del_59	
4.2.	Obtenção do mutante 62	
4.3.	Confirmação do genótipo das linhagens de	68
4.4.	Construção dos plasmídeos para complementação dos mutantes nulos nos genes	71
4.5.	Avaliação do impacto da ausência de Gpx, OsmC, Ohr e suas combinações no crescimento bacteriano	69
4.6.	Avaliação da sensibilidade dos mutantes simples, duplos e do mutante triplo nos genes	76
4.6.1.	CIM	72
4.6.2.	Spot Assay	74
4.6.2.1.	tBOOH	75
4.6.2.2.	H ₂ O ₂	77
4.6.2.3.	Padronização NaOCl	79
4.6.2.4.	NaOCl	81
4.7.	Avaliação do estresse osmótico nas diferentes linhagens testadas	83
4.8.	Ensaio de infecção entre	93
5.	DISCUSSÃO	91
6.	CONCLUSÕES	103
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Os mecanismos de resistência antimicrobiana em <i>P. aeruginosa</i>	25
Figura 2: Intermediários da redução parcial do oxigênio molecular e alguns dos possíveis produtos que podem ser gerados.....	29
Figura 3: Esquema do arsenal antioxidante de <i>P. aeruginosa</i> contra a ação de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	30
Figura 4: O ciclo catalítico das peroxirredoxinas (Prxs).....	32
Figura 5: Alinhamentos de sequências múltiplas para membros selecionados dos subgrupos Ohr, OsmC e Ohr-like.....	35
Figura 6: O ciclo catalítico da proteína Ohr envolve mudanças conformacionais e reações químicas que permitem a redução de hidroperóxidos lipídicos.....	38
Figura 7: Localização e representatividade (%) das instituições que realizam estudos com <i>G. mellonella</i>	41
Figura 8: O uso de <i>G. mellonella</i> como modelo alternativo para o estudo de patógenos bacterianos oferece diversas vantagens experimentais.....	43
Figura 9: Esquema dos principais componentes do sistema imunológico inato de <i>G. mellonella</i>	44
Figura 10: <i>G. mellonella</i> é usada como modelo para identificação de genes relacionados à virulência de <i>P. aeruginosa</i>	45
Figura 11: Estratégia de deleção dos genes <i>gpx2</i> e <i>gpx3</i> para a obtenção dos mutantes nulos $\Delta gpx2$ e $\Delta gpx3$	47
Figura 12: Confirmação da amplificação dos fragmentos de PCR que serão usados para clonagem no vetor pEX18Ap. Eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE 1 X mostrando a amplificação dos fragmentos que flanqueiam as regiões à montante e à jusante dos genes <i>gpx2</i> e <i>gpx3</i>	61
Figura 13 : Confirmação da amplificação dos fragmentos de PCR que serão usados para clonagem no vetor pEX18Ap. Eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE 1 X das construções pEX18Ap- <i>gpx2</i> (raias 1, 2 e 3) e pEX18Ap- <i>gpx3</i> (raias 4, 5 e 6) digeridas com as enzimas: HindIII/BamHI (raias 1 e 4); HindIII/XbaI (raias 2 e 5); BamHI/XbaI (raias 3 e 6).....	62

Figura 14: Diagrama ilustrativo do evento de recombinação homóloga.....	65
Figura 15: Confirmação do mutante nulo $\Delta osmC$ obtido por recombinação homóloga através da PCR.....	67
Figura 16: Confirmação do mutante nulo $\Delta osmC/\Delta gpx$ obtido por recombinação homóloga através da PCR.....	68
Figura 17: Confirmação do genótipo dos mutantes simples Δgpx , Δohr e $\Delta osmC$, obtidos por recombinação homóloga através da PCR.....	70
Figura 18: Confirmação do genótipo dos mutantes duplos $\Delta gpx/\Delta ohr$ e $\Delta ohr/\Delta osmC$ e do triplo $\Delta gpx/\Delta ohr/\Delta osmC$, obtidos por recombinação homóloga, através da PCR.	71
Figura 19: Amplificação dos produtos de PCR correspondentes aos genes <i>ohr</i> , <i>osmC</i> , <i>gpx1</i> , <i>gpx2</i> e <i>gpx3</i> que serão usados nos ensaios de complementação funcional.....	72
Figura 20: Confirmação da clonagem dos fragmentos correspondentes aos genes <i>ohr</i> , <i>osmC</i> , <i>gpx1</i> , <i>gpx2</i> e <i>gpx3</i> no vetor <i>miniCTX-2</i>	73
Figura 21: Cinética de crescimento das linhagens de <i>P. aeruginosa</i> selvagem, os mutantes simples, duplos e triplo em meios LB e M9 suplementados com diferentes fontes de carbono.....	76
Figura 22: Determinação da CIM da linhagem selvagem e dos mutantes Δohr , $\Delta osmC$, $\Delta ohr/\Delta osmC$ e $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$ ao tBOOH.....	77
Figura 23: Determinação da CIM da linhagem selvagem e dos mutantes Δohr , Δgpx , $\Delta ohr/\Delta gpx$ e $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$ ao tBOOH.....	78
Figura 24: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por tBOOH (0,5 mM) na linhagem selvagem e nos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	79
Figura 25: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por tBOOH (0,5 mM) na linhagem selvagem e nos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	80

Figura 26: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por H ₂ O ₂ (10 mM) na linhagem selvagem e nos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	81
Figura 27: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por H ₂ O ₂ (10 mM) na linhagem selvagem e nos mutantes duplos ($\Delta ohr/\Delta osmC$, e $\Delta ohr/\Delta gpx$ e $\Delta gpx/\Delta osmC$) e no mutante triplo ($\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$) pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	82
Figura 28: Padronização da concentração inibitória mínima de NaOCl (0-0,5 mM) na linhagem selvagem de <i>P. aeruginosa</i> PA14 por meio do ensaio de <i>Spot Assay</i>	83
Figura 29: Padronização da concentração inibitória mínima de NaOCl (0-10 mM) na linhagem selvagem de <i>P. aeruginosa</i> PA14 por meio do ensaio de <i>Spot Assay</i>	84
Figura 30: Padronização da concentração inibitória mínima de NaOCl (0-5 mM) na linhagem selvagem de <i>P. aeruginosa</i> PA14 por meio do ensaio de <i>Spot Assay</i>	85
Figura 31: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por NaOCl (1 mM) na linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	86
Figura 32: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por NaOCl (2 mM) na linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	87
Figura 33: Avaliação da sensibilidade ao estresse osmótico induzido por sacarose (1 M) na linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	88
Figura 34: Avaliação da sensibilidade ao estresse osmótico induzido por sacarose (0,3 M) na linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	89
Figura 35: Avaliação da sensibilidade ao estresse osmótico induzido por sacarose (0,5 M) na linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	90

Figura 36: Cinética de crescimento da linhagem selvagem e dos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx de <i>P. aeruginosa</i> em meio LB suplementado com 0,5 M de sacarose.....	91
Figura 37: Avaliação da sensibilidade ao estresse osmótico induzido por NaCl (1 M) na linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	92
Figura 38: Avaliação da sensibilidade ao estresse osmótico induzido por NaCl (0,5 M) na linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de <i>Spot Assay</i>	93
Figura 39: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier das larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas com a linhagem de <i>P. aeruginosa</i> wt, D12 e triplo mutante.....	95

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Lista dos oligonucleotídeos desenhados para o processo de obtenção dos mutantes nulos $\Delta gpx2$ e $\Delta gpx3$48

Tabela 2: Lista dos oligonucleotídeos desenhados para a complementação funcional dos mutantes nulos Δohr , $\Delta osmC$, $\Delta gpx1$, $\Delta gpx2$ e $\Delta gpx3$49

LISTA DE ABREVIATURAS

- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DO_{600nm} – Densidade Óptica a 600 nm
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- Gpx – Glutathione Peroxidase
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- HOBr - Ácido Hipobromoso
- HOCl – Ácido Hipocloroso
- HOI – Ácido Hipoiodoso
- LB – *Lysogeny Broth* (meio de cultura)
- MPO- Mieloperoxidase
- NaOCl – Hipoclorito de Sódio
- NAGGN – N-acetilglutaminilglutamina amida
- OHPs – Hidroperóxidos orgânicos
- OMVs – Vesículas de Membrana Externa (*Outer Membrane Vesicles*)
- ORF – *Open Reading Frame* (Região de Leitura Aberta)
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- Prxs – Peroxirredoxinas
- QS – *Quorum Sensing*
- RND – Resistência-Nodulação-Divisão (*Resistance-Nodulation-Division*)
- TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA
- tBOOH – *tert*-Butil Hidroperóxido
- UFC – Unidade Formadora de Colônia
- UTI – Unidade de Terapia Intensiva

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa ubíqua que atua como patógeno oportunista, possuindo grande relevância clínica. A redução parcial do O₂ leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são naturalmente produzidas tanto pelo metabolismo celular quanto pela interação patógeno-hospedeiro. O acúmulo das EROs pode induzir modificações estruturais e funcionais em macromoléculas celulares, comprometendo a viabilidade da célula. Para lidar com o estresse oxidativo, as células microbianas possuem eficientes sistemas antioxidantes. Dentre esses sistemas, *P. aeruginosa* apresenta cerca de 14 tiol peroxidases anotadas, incluindo as famílias Ohr/OsmC e GPx, que atuam na detoxificação de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos. No entanto, poucos estudos investigam o papel dessas enzimas na fisiologia bacteriana e na interação patógeno-hospedeiro. *Galleria mellonella* tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para estudar infecções, devido à similaridade de seu sistema imune inato com o de mamíferos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel das tiol peroxidases das famílias Ohr/OsmC e Gpx na fisiologia e virulência de *P. aeruginosa*, utilizando larvas de *G. mellonella* como modelo de infecção. Para isso, foram gerados mutantes nulos simples (Δohr , Δgpx e $\Delta osmC$), duplos ($\Delta ohr/\Delta gpx$, $\Delta ohr/\Delta osmC$ e $\Delta osmC/\Delta gpx$) e um mutante triplo ($\Delta ohr/\Delta gpx/\Delta osmC$) por recombinação homóloga, com confirmação por PCR. Além disso, foram construídos os plasmídeos *pEX18Ap_del_gpx2* e *pEX18Ap_del_gpx3*, visando a obtenção futura dos mutantes $\Delta gpx2$ e $\Delta gpx3$. O perfil de crescimento da linhagem selvagem e dos mutantes foi avaliado em meio complexo e mínimo suplementado com diferentes fontes de C. Observou-se que a ausência desses genes não afetou o crescimento bacteriano nos meios testados. Nos ensaios de sensibilidade (*CIM* e *spot assay*), a linhagem Δohr apresentou maior sensibilidade ao tBOOH em comparação com $\Delta osmC$ e Δgpx , cujos níveis de resistência foram semelhantes aos da linhagem selvagem. Além disso, os ensaios de *spot assay* revelaram que os mutantes duplos sem *ohr* e o mutante triplo exibiram sensibilidade semelhante à linhagem Δohr , enquanto o mutante duplo $\Delta osmC/\Delta gpx$ manteve resistência comparável à da linhagem selvagem. Esses achados reforçam a importância da enzima Ohr como um fator crítico na defesa contra hidroperóxidos orgânicos. Nos ensaios utilizando o H₂O₂, a linhagem $\Delta osmC$ apresentou uma leve sensibilidade em comparação com as demais linhagens, sugerindo um possível papel acessório da OsmC na resposta ao peróxido de hidrogênio. No ensaio de *Spot assay* utilizando NaOCl, as concentrações de 1 mM e 2 mM foram selecionadas para investigar a sensibilidade das linhagens, contudo, não foram observadas diferenças significativas entre a linhagem selvagem e os mutantes simples. O estresse osmótico foi avaliado utilizando 0,5 M de sacarose e 1 M de NaCl, e, em ambos os casos, não foi observado aumento na sensibilidade das linhagens com deleção simples em relação à linhagem selvagem. Nos ensaios de infecção em *G. mellonella*, foram utilizadas a linhagem selvagem, o mutante triplo e o mutante D12, este último conhecido por apresentar virulência atenuada em diferentes modelos de infecção, sendo empregado como controle positivo dos nossos ensaios. Os resultados indicaram que as larvas infectadas com o mutante triplo apresentaram uma menor taxa de sobrevivência em comparação com as outras linhagens. No entanto, esses achados são preliminares, uma vez que os experimentos ainda estão em fase de padronização pelo grupo. No futuro, será essencial investigar como *P. aeruginosa* compensa a falta destas tiol peroxidases e entender melhor seu papel durante a infecção.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; espécies reativas de oxigênio; tiol peroxidase; *Galleria mellonella*

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative bacterium that acts as an opportunistic pathogen with significant clinical relevance. Partial reduction of O₂ leads to the formation of reactive oxygen species (ROS), which are naturally produced both by cellular metabolism and by pathogen-host interactions. The accumulation of ROS can induce structural and functional modifications in cellular macromolecules, compromising cell viability. To cope with oxidative stress, microbial cells possess efficient antioxidant systems. Among these systems, *P. aeruginosa* has approximately 14 annotated thiol peroxidases, including the Ohr/OsmC and GPx families, which detoxify organic and inorganic hydroperoxides. However, few studies have investigated the role of these enzymes in bacterial physiology and pathogen-host interactions. *Galleria mellonella* has been widely used as an experimental model to study infections due to the similarity of its innate immune system to that of mammals. In this context, the aim of this study was to investigate the role of thiol peroxidases from the Ohr/OsmC and Gpx families in the physiology and virulence of *P. aeruginosa*, using *G. mellonella* larvae as an infection model. For this purpose, single (Δohr , Δgpx , and $\Delta osmC$), double ($\Delta ohr/\Delta gpx$, $\Delta ohr/\Delta osmC$, and $\Delta osmC/\Delta gpx$), and triple ($\Delta ohr/\Delta gpx/\Delta osmC$) null mutants were generated by homologous recombination and confirmed by PCR. Additionally, the plasmids pEX18Ap_del_gpx2 and pEX18Ap_del_gpx3 were constructed to obtain $\Delta gpx2$ and $\Delta gpx3$ mutants in future studies. The growth profiles of the wild-type strain and mutants were evaluated in complex and minimal media supplemented with different carbon sources. The absence of these genes did not affect bacterial growth under the tested conditions. In sensitivity assays (MIC and spot assay), the Δohr strain exhibited greater sensitivity to tBOOH compared to $\Delta osmC$ and Δgpx , whose resistance levels were similar to those of the wild-type strain. Moreover, spot assay results revealed that double mutants lacking *ohr* and the triple mutant displayed sensitivity similar to the Δohr strain, while the double mutant $\Delta osmC/\Delta gpx$ maintained resistance comparable to that of the wild-type strain. These findings highlight the importance of Ohr as a critical factor in defense against organic hydroperoxides. In assays using H₂O₂, the $\Delta osmC$ strain showed slight sensitivity compared to the other strains, suggesting a possible auxiliary role of OsmC in the hydrogen peroxide response. In the spot assay with NaOCl, concentrations of 1 mM and 2 mM were used to assess strain sensitivity; however, no significant differences were observed between the wild-type strain and single mutants. Osmotic stress was evaluated using 0.5 M sucrose and 1 M NaCl, and in both cases, no increased sensitivity was observed in single deletion strains compared to the wild-type strain. For infection assays in *G. mellonella*, the wild-type strain, the triple mutant, and the D12 mutant (known for its attenuated virulence in different infection models and used as a positive control in our experiments) were tested. The results indicated that larvae infected with the triple mutant had a lower survival rate than those infected with other strains. However, these findings are preliminary, as the experiments are still being standardized by the group. In the future, it will be essential to investigate how *P. aeruginosa* compensates for the absence of these thiol peroxidases and to further understand their role during infection.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; reactive oxygen species; thiol peroxidase; *Galleria mellonella*

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1. Características gerais

P. aeruginosa é uma bactéria gram-negativa amplamente distribuída em diversos ambientes, sendo considerada uma espécie ubíqua (SILBY et al., 2011). Essa capacidade pode estar relacionada ao tamanho do seu genoma (5,5 - 7 Mbp), que é superior ao de outras bactérias como *Escherichia coli* (4,6 Mbp), *Bacillus subtilis* (4,2 Mbp) e *Mycobacterium tuberculosis* (4,4 Mbp). Seu genoma, caracterizado por alta plasticidade, codifica uma ampla variedade de enzimas reguladoras cruciais para o metabolismo, transporte e efluxo de compostos orgânicos (GROSSO-BECERRA et al., 2014). Esses atributos genéticos conferem à bactéria a capacidade de se adaptar a mudanças ambientais, o que contribui para sua persistência em condições adversas (KLOCKGETHER et al., 2011).

P. aeruginosa é um patógeno oportunista com notável versatilidade metabólica, capaz de causar infecções agudas e crônicas em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo humanos, animais e plantas (REYNOLDS e KOLLEF, 2021). Este microrganismo desempenha um papel crucial como agente causador de infecções nosocomiais, destacando-se pelo alto potencial de colonização em ambientes hospitalares (MORADALI; GHODS; REHM, 2017). Sua prevalência nesse contexto vai além da colonização de superfícies bióticas, abrangendo a capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos, implantes e instrumentação hospitalar, o que eleva significativamente o risco de infecções em pacientes hospitalizados (ESTRADA; BORGATTA; RELLO, 2016). Embora raramente afete indivíduos saudáveis, *P. aeruginosa* está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos ou com doenças respiratórias crônicas, incluindo casos relacionados à COVID-19 (ROSSI et al., 2020; CENDRA e TORRENTS, 2021). De fato, diversos estudos publicados recentemente têm destacado a coinfeção por *P. aeruginosa* como um fator relevante em pacientes acometidos pela COVID-19, evidenciando sua associação com esta condição (SANTOS et al., 2022; HOJAT et al., 2023; ZHANG et al., 2024).

Nos últimos anos, *P. aeruginosa* tem sido considerada um patógeno de grande relevância clínica, sendo as linhagens com comprovada resistência aos carbapenêmicos, classificadas como uma séria ameaça entre as Ameaças Atuais de Resistência a Antibióticos nos EUA (CDC, 2019). Além disso, foi incluída na lista dos três patógenos mais críticos em relação à iminente escassez de terapias antimicrobianas disponíveis (WHO, 2017). Em 2024, *P. aeruginosa* foi classificada no grupo de alta prioridade para o desenvolvimento de novas terapias (WHO, 2024). Este grupo inclui espécies de bactérias gram-negativas que apresentam extrema dificuldade de tratamento, causam uma carga substancial de doenças (com alta mortalidade e morbidade), exibem tendências crescentes de resistência, são particularmente difíceis de prevenir, possuem alta transmissibilidade e enfrentam um número limitado de tratamentos potenciais em desenvolvimento. Como um patógeno oportunista, pertence aos patógenos ESKAPE MDR, compreendendo *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacter* (MURRAY *et al.*, 2022). As espécies presentes nesse grupo são resistentes a um grande número de antibióticos, incluindo carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração – os melhores antibióticos disponíveis para o tratamento de bactérias multirresistentes (DAVIES, 2017).

P. aeruginosa é um dos principais agentes causadores de infecções bacterianas resistentes a antibióticos, representando 12,9% das infecções resistentes na Europa (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019). Em 2019, estimou-se que esse patógeno foi responsável por 51.000 mortes associadas à resistência bacteriana a antimicrobianos nos 35 países da Região das Américas da OMS (AGUILAR *et al.*, 2023). No ambiente hospitalar, *P. aeruginosa* está frequentemente associada a surtos em unidades de terapia intensiva (UTIs) e ocupa uma posição de destaque entre as causas de infecções adquiridas, representando quase 9% na Europa, 7,1% nos Estados Unidos (LÓPEZ-CALLEJA *et al.*, 2019; MCCARTHY e PATERSON, 2017) e 7,96% das infecções nosocomiais na China, de acordo com a China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) (FENG *et al.*, 2017). Esse microrganismo é responsável também por infecções graves, como pneumonia, infecções do trato urinário e infecções da corrente sanguínea (HAQUE *et al.*, 2018), consolidando-se como uma ameaça global de grande relevância à saúde pública.

1.1.2. Fatores de virulência

P. aeruginosa exibe um vasto repertório de fatores de virulência, tanto associados à célula quanto extracelulares, que contribuem para sua patogênese. Esses fatores são controlados por circuitos regulatórios e sistemas de sinalização complexos e interconectados, conferindo a este patógeno grande plasticidade metabólica (JIMENEZ *et al.*, 2012). Esses sistemas, interconectados de maneira hierárquica, formam uma rede altamente adaptável, permitindo à bactéria responder eficientemente a estressores externos e facilitando sua colonização em diversos nichos ecológicos (LEE e ZHANG, 2014). Essa habilidade adaptativa é crucial para a persistência de *P. aeruginosa* no trato respiratório de pacientes suscetíveis, como os com fibrose cística, nos quais a bactéria pode estabelecer infecções crônicas duradouras, mesmo com os avanços no tratamento e nas condições de vida (GELLATLY e HANCOCK, 2013).

Uma das principais formas de regulação dos fatores de virulência de *P. aeruginosa* é mediada pela densidade celular, através da liberação de autoindutores dos sistemas de quorum sensing (QS) Las, Rhl, Pqs e Iqs. O QS é um mecanismo amplamente utilizado por diversas bactérias, tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas, para a comunicação célula-célula, permitindo a coordenação da expressão gênica e comportamentos coletivos, essenciais para a sobrevivência em ambientes hostis (RUTHERFORD e BASSLER, 2012). Embora o QS seja considerado um dos sistemas regulatórios mais importantes em *P. aeruginosa*, contribuindo substancialmente para sua fisiologia e patogênese, as terapias direcionadas a esse sistema ainda são insatisfatórias, com poucos sucessos em tratamentos *in vivo* (GHOSH *et al.*, 2022; PIEWNGAM *et al.*, 2020).

No contexto da infecção, *P. aeruginosa* possui cinco sistemas de secreção que secretam uma ampla variedade de toxinas e enzimas hidrolíticas que contribuem para a invasão e estabelecimento da infecção no hospedeiro (BLEVES *et al.*, 2010). O sistema de secreção mais relevante no contexto da infecção é o sistema de secreção do tipo III (T3SS), que promove a injeção de proteínas efetoras como ExoU, ExoS e ExoT, diretamente no citosol da célula hospedeira (ANANTHARAJAH *et al.*, 2016). Esses efetores podem perturbar o citoesqueleto de actina, interferindo na adesão entre as células e promovendo a apoptose das células hospedeiras (HORNA e RUIZ, 2021).

P. aeruginosa possui a capacidade de formar biofilmes robustos, um sistema complexo que está intimamente relacionado à sua virulência. Esse biofilme contribui para a evasão do sistema imunológico do hospedeiro (LEWIS, 2001), favorece a persistência

bacteriana no ambiente, sendo uma das principais estratégias para a sobrevivência das espécies durante mudanças inesperadas nas condições de vida, como flutuação de temperatura e disponibilidade de nutrientes (ROLLET; GAL; GUZZO, 2008) e dificulta a penetração de antimicrobianos nas células, comprometendo sua eficácia e facilitando o estabelecimento de infecções crônicas, o que representa um grande desafio na área médica (LEE e YOON, 2017). A formação desses biofilmes ocorre por meio da secreção de três tipos principais de exopolissacarídeos: alginato, Psl e Pel, os quais desempenham papéis cruciais na fixação da bactéria a superfícies bióticas ou abióticas, bem como na formação e manutenção da estrutura do biofilme (THI et al., 2020).

Além disso, *P. aeruginosa* é capaz de produzir diversos pigmentos, incluindo a piocianina, um metabólito secundário de coloração azul com atividade redox, frequentemente detectado no escarro de pacientes com infecções pulmonares causadas por essa bactéria (LAU et al., 2004). No contexto da infecção, a característica zwitteriônica da piocianina facilita sua penetração na membrana citoplasmática das células hospedeiras, onde induz estresse oxidativo, contribuindo para sua citotoxicidade e causando danos significativos às células do hospedeiro (HALL et al., 2016). Embora nem todas as linhagens patogênicas produzam piocianina, sua presença auxilia na identificação de *P. aeruginosa*. Além disso, a bactéria também sintetiza pioverdina, um sideróforo essencial para a captação de íons de ferro, um elemento indispensável para seu crescimento e manutenção da virulência (CORNELIS, 2010).

Também se destacam o flagelo e o pili, que desempenham papéis essenciais na colonização do hospedeiro, adesão e movimentação, tanto swimming quanto por swarming, em resposta a sinais quimiotáticos. O pili do tipo IV (T4P) é uma fímbria composta por cópias repetidas de uma proteína de 15 kDa chamada pilina, crucial para o início da infecção, controlando a motilidade de contração e a fixação às células do hospedeiro (BURROWS, 2012). Por outro lado, *P. aeruginosa* apresenta um único flagelo polar, que é composto principalmente por subunidades proteicas chamadas flagelina, funcionando como um aparato de motilidade, este flagelo permite o movimento bacteriano e a quimiotaxia, além de contribuir para a adesão bacteriana via flagelina e promover a maturação do biofilme de *P. aeruginosa* (OZER et al., 2021). Além disso, o flagelo é um dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), podendo ativar a resposta imune do hospedeiro por meio do receptor Toll-like 5 (TLR5) e, portanto, são altamente imunogênicos (CAMPODÓNICO et al., 2009).

1.1.3. Mecanismos de resistência

A aquisição de resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa* é mediada por uma combinação de mecanismos intrínsecos e adquiridos, conforme ilustrado na Figura 1 (PANG et al., 2018). Esses mecanismos permitem que a bactéria desenvolva resistência de forma rápida a uma ampla gama de antibióticos, como aminoglicosídeos, quinolonas e β -lactâmicos (HANCOC e SPEERT, 2000). Ao longo da evolução, foram selecionadas células que apresentam diversos mecanismos de resistência genética, conferindo-lhes uma notável plasticidade para enfrentar moléculas prejudiciais e responder de forma eficaz a diversas ameaças como antibióticos convencionais, compostos químicos e peptídeos antimicrobianos (BREIDENSTEIN; FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011). A resistência em *P. aeruginosa* é multifacetada, envolvendo mecanismos primários como alterações na permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo e enzimas inativadoras de antibióticos.

Para tratar infecções por *P. aeruginosa*, os antibióticos precisam atravessar sua membrana externa, que atua como uma barreira específica, dificultando a penetração desses compostos (LAMBERT, 2002). Essa membrana é composta por fosfolípidios, LPS e porinas, que desempenham papéis fundamentais na captação de substâncias extracelulares. Essa captação específica e não específica de substâncias extracelulares depende de diferentes funções de porina (Figura 1.①), (WELTE et al., 1995; SAMANTA et al., 2018). *P. aeruginosa* apresenta mecanismos de regulação da expressão das porinas para limitar a entrada de antibióticos e aumentar sua resistência. Por exemplo, a porina OprF favorece a formação e fixação de biofilmes que protegem a bactéria da ação dos antimicrobianos (SONG et al., 2018; VALENTINI e FILLOUX, 2016), enquanto mutações na porina OprD envolvendo características conformacionais estão associadas à resistência aos carbapenêmicos (LI et al., 2012). Já a porina OprH interage com o LPS para estabilizar a membrana e regular a resistência (LEE et al., 2017), enquanto as porinas que atuam como bombas de efluxo (OprM, OprN e OprJ) promovem a expulsão ativa de diversos antibióticos, como tetraciclina e β -lactâmicos (LI; NIKAIDO; POOLE, 1995). Além disso, vesículas da membrana externa (OMVs) secretadas por *P. aeruginosa* transportam fatores de virulência e enzimas, como β -lactamase, para o citoplasma do hospedeiro, contribuindo para a resistência. Apesar de prejudiciais, as OMVs têm sido estudadas como potenciais veículos para entrega de

tratamentos ou vacinas contra infecções e câncer (BOMBERGER et al., 2009; FARJAH et al., 2014).

Os compostos tóxicos resultantes do metabolismo ou da ação de antimicrobianos são eliminados por *P. aeruginosa* principalmente por meio de bombas de efluxo (Figura 1.②). Esses mecanismos altamente conservados desempenham um papel crucial na remoção de antibióticos, contribuindo para a manutenção da homeostase bacteriana. (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015). Entre as cinco famílias descritas, a família de resistência-nodulação-divisão (RND) é a mais associada à resistência a antibióticos, incluindo doze bombas identificadas em *P. aeruginosa* (DREIER e RUGGERONE, 2015). A efluxo multidroga AB-porina de membrana externa M (MexAB-OprM) é essencial para resistência a carbapenêmicos (LI; NIKAIDO; POOLE, 1995), enquanto a efluxo multidroga CD-porina de membrana externa J (MexCD-OprJ) está ligado à resistência a ciprofloxacina, cefepima e cloranfenicol (JEANNOT et al., 2008). Já o efluxo multidrogas EF-porina de membrana externa N (MexEF-OprN) é super produzido pela deficiência de QS (LLANES et al., 2011), e o efluxo multidrogas XY-porina de membrana externa M (MexXY-OprM) contribui para resistência a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e cefalosporinas (GUÉNARD et al., 2013). Apesar de semelhanças nos substratos, as bombas possuem diferentes afinidades e graus de atividade antimicrobiana. Estudos ressaltam o potencial de estratégias terapêuticas focadas nas bombas de efluxo, como a inibição da bomba MexAB-OprM ou o aumento da expressão do repressor MexR, como formas promissoras para superar a resistência bacteriana e aprimorar os tratamentos (BISWAS; PANJA; BANDOPADHYAY, 2019).

Os antibióticos, frequentemente compostos por ligações químicas como amidas e ésteres, podem ser inativados por enzimas hidrolíticas produzidas por bactérias, resultando em resistência (RAFIEE et al., 2014). *P. aeruginosa* é altamente resistente a diversos antibióticos, incluindo penicilina, cefalosporinas e aztreonam (RAWAT e NAIR, 2010). Isolados de *P. aeruginosa* podem adquirir genes bla, que codificam β -lactamases, por meio de mecanismos de transferência gênica horizontal (ADAM e ELHAG, 2018). Os genes bla, que codificam β -lactamases, são comumente associados a elementos genéticos móveis, estando predominantemente inseridos em transposons compostos localizados no cromossomo, embora também possam ser encontrados em plasmídeos em determinados casos (HUSSAIN et al., 2021). A transferência horizontal de genes pode

ocorrer entre diferentes espécies de bactérias, proporcionando o potencial para *P. aeruginosa* adquirir β -lactamases de espécies não relacionadas, como de uma variedade de espécies de Enterobacteriaceae (LERMINIAUX e CAMERON, 2019). *P. aeruginosa* pode modificar os grupos amino e glicosídicos dos antibióticos aminoglicosídeos para produzir resistência aos antibióticos por meio de enzimas modificadoras, tornando-os inativos e conferindo resistência (Figura 1.④). Três mecanismos principais são conhecidos: aminoglicosídeo fosfotransferase (APH), que inativa a estreptomicina ao transferir grupos fosfato (HAINRICHSON et al., 2007); aminoglicosídeo acetiltransferase (AAC), que confere resistência à gentamicina ao transferir grupos acetil (POOLE, 2005); e aminoglicosídeo nucleotídeo transferase (ANT), que torna a amicacina ineficaz ao adicionar grupos adenosina (SUBEDI; VIJAY; WILLCOX, 2017).

Assim como descritos para outros patógenos, *P. aeruginosa* também pode adquirir resistência a antibióticos através de mutações genéticas ou transferência horizontal de genes (Figura 1.⑥) (LERMINIAUX e CAMERON, 2018; WOODFORD e ELLINGTON, 2006). Mutações no *oprD* conferem resistência a carbapenênicos (LI et al., 2012), enquanto mutações de ponto na DNA girase (GyrA) resultam em resistência às quinolonas (YONEZAWA et al., 1995; ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014). Além disso, mutações no gene da β -lactamase ampC aumentam significativamente a resistência às cefalosporinas (BERRAZEG et al., 2015). A transferência horizontal permite que *P. aeruginosa* obtenha rapidamente genes de resistência de outras bactérias, aumentando sua capacidade de adaptação e complicando o desenvolvimento de novas terapias eficazes (BONOMO e SZABO, 2006).

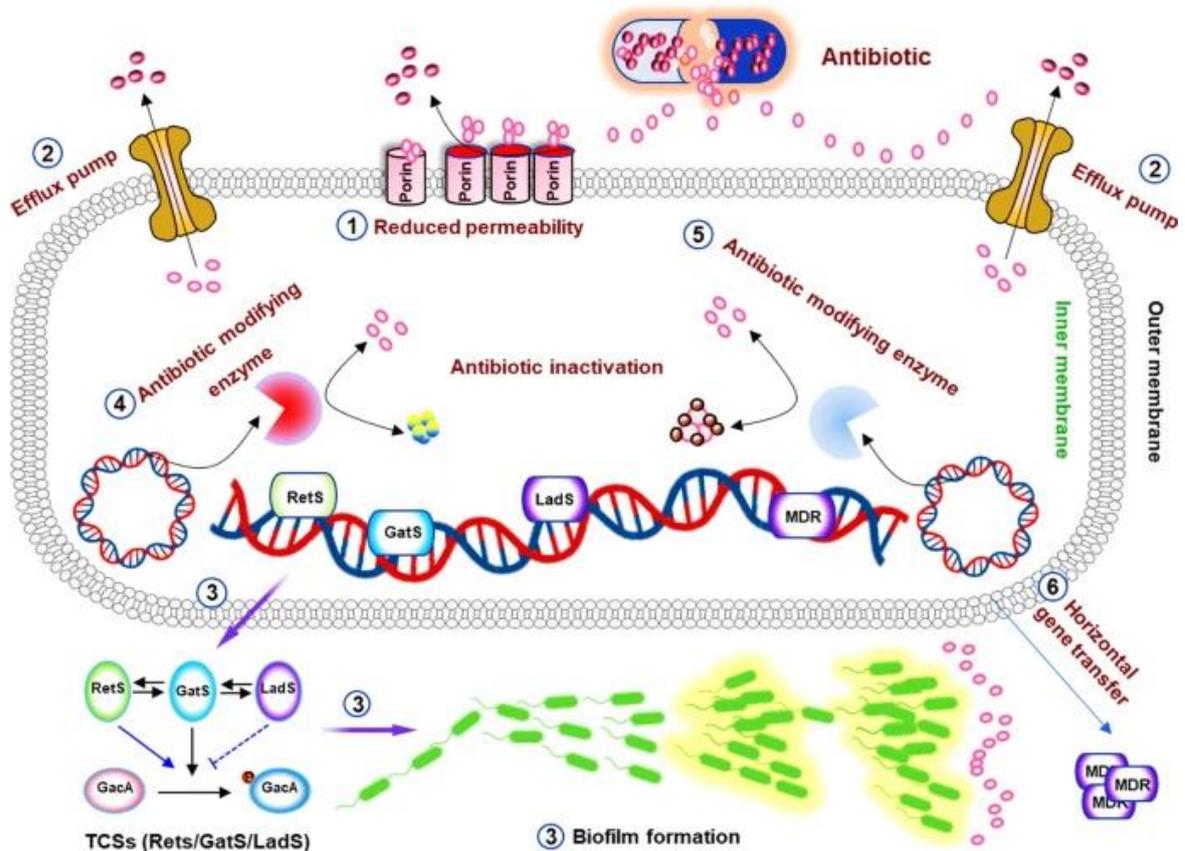


Figura 1: Estratégias de Resistência Antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. Os mecanismos de resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* podem ser divididos em resistência intrínseca a antibióticos (① permeabilidade da membrana externa, ② sistemas de efluxo, enzimas modificadoras de antibióticos, ④ codificadas por plasmídeos ou ⑤ codificadas pelo cromossomo (⑥ resistência por mutações e aquisição de genes de resistência) e resistência adaptativa a antibióticos (③ resistência mediada por biofilme). A modificação das porinas da membrana externa reduz a permeabilidade celular, dificultando a entrada de medicamentos. Sistemas de efluxo expulsam antibióticos, enquanto enzimas especializadas os inativam ou alteram seus alvos, impedindo sua ação. Genes de resistência, frequentemente em plasmídeos, podem ser adquiridos por transferência horizontal entre bactérias. Além disso, moléculas de *quorum sensing* estimulam a formação de biofilmes, que funcionam como barreiras físicas, dificultando a penetração de antibióticos e favorecendo a sobrevivência bacteriana. Fonte: QIN et al., 2022.

1.2. Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As células estão constantemente expostas as EROs provenientes de fontes exógenas e endógenas. A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é uma das principais fontes endógenas de EROs em organismos eucarióticos (QUINLAN *et al.*, 2014). Na etapa final da cadeia transportadora de elétrons, o complexo IV, também conhecido como citocromo c oxidase, desempenha um papel crucial. Este complexo é responsável por transferir quatro elétrons de quatro moléculas de citocromo c reduzido para uma molécula de oxigênio (O_2), reduzindo-a a duas moléculas de água (H_2O). O complexo citocromo c oxidase transfere os elétrons um a um, evitando que espécies parcialmente reduzidas, como EROs, escapem. Contudo, em cerca de 0,1 a 0,01% das ocasiões, pode ocorrer um vazamento em etapas anteriores, especialmente no sítio da ubiquinona, dando origem ao radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}), respectivamente (Figura 2) (CUSSIOL, 2010; FISCHER *et al.*, 2013).

Em procariotos, as flavoproteínas são consideradas como uma importante fonte endógena de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (KORSHUNOV e IMLAY, 2010). Estudos demonstraram que as EROs são geradas predominantemente pela auto-oxidação de flavoproteínas reduzidas que não participam da cadeia respiratória, uma vez que mutantes bacterianos desprovidos de componentes respiratórios também produzem EROs em taxas semelhantes (IMLAY, 2013). Entre essas enzimas, destacam-se a NADH desidrogenase II, que atua na cadeia respiratória aeróbica como um dos principais sítios de transferência de elétrons para o oxigênio, e a fumarato redutase, uma oxidase terminal ativa em condições anaeróbicas. A fumarato redutase reage rapidamente com o oxigênio e é considerada a principal fonte de estresse oxidativo quando anaeróbios facultativos passam a habitar ambientes aeróbicos (STORZ e IMLAY, 1999).

Além da produção endógena de EROs, as bactérias estão expostas a EROs exógenas provenientes de diversas fontes ambientais. Por exemplo, H_2O_2 pode ser gerado por processos como a oxidação química de metais reduzidos e compostos de enxofre em superfícies oxi-anóxicas, pela redução de oxigênio molecular mediada por flavinas e cromóforos, pela secreção de H_2O_2 por bactérias ácido-láticas e pela produção de H_2O_2 por NADPH oxidases em fagócitos de mamíferos e plantas (IMLAY, 2018). Fontes exógenas para geração de EROs incluem fatores externos como exposição à radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante e medicamentos quimioterápicos (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014).

As EROs desempenham um papel essencial na resposta imune inata contra patógenos microbianos (ANDRÉS et al., 2022). Fagócitos profissionais, como neutrófilos e macrófagos, atuam como as principais fontes de EROs, sendo rapidamente recrutados ao local da infecção para promover a eliminação precoce dos patógenos. Esses fagócitos reconhecem PAMPs por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), o que ativa diversas funções microbicidas, incluindo a liberação de mediadores inflamatórios, a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), a degranulação, o aumento da capacidade fagocítica e a produção de EROs. A ativação de fagócitos por partículas fagocitadas, como bactérias, induz um aumento significativo no consumo de oxigênio, resultando na liberação de espécies tóxicas de oxigênio. Durante a fagocitose bacteriana, por exemplo, a concentração de H_2O_2 pode aumentar mais de 50 vezes em relação às condições basais, nas quais sua concentração é inferior a 0,1 nmol/mL por minuto (ROOT et al., 1975). A montagem do complexo proteico NADPH-oxidase na membrana do fagossomo, presente em macrófagos e neutrófilos, resulta em uma produção intensa de $O_2^{\bullet-}$, um processo conhecido como "burst" respiratório ou oxidativo. Esse fenômeno é considerado um dos principais mecanismos de defesa do sistema imune, desempenhando um papel crucial na eliminação de patógenos (KANNER; KINSELLA, 1983). Outro componente essencial nesse processo, expresso exclusivamente em neutrófilos e ausente em macrófagos, é a enzima mieloperoxidase (MPO) (KLEBANOFF, 2005). A MPO catalisa a reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com haletos inorgânicos (Cl^- , Br^- , I^-), resultando na formação de poderosos agentes oxidantes, como os oxiácidos de halogênio: ácido hipocloroso (HOCl), hipobromoso (HOBr) e hipiodoso (HOI). Esses compostos desempenham um papel crucial na atividade microbicida dos neutrófilos (DAVIES, 2010). Estudos também demonstraram que cerca de 10^7 leucócitos podem produzir aproximadamente 1,03 nmol de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em apenas 15 minutos (BABIOR; KIPNES; CURNUTTE, 1973). Pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC), uma condição em que os granulócitos são incapazes de produzir $O_2^{\bullet-}$ devido à deficiência na atividade da NADPH oxidase do fagócito, apresentam elevada susceptibilidade a infecções fúngicas, especialmente por espécies do gênero *Aspergillus*. Além disso, esses pacientes são mais vulneráveis a infecções por bactérias catalase-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Burkholderia cepacia* (ARATANI, 2018).

Estudos indicam que, além dos mecanismos tradicionais de ação, a letalidade dos antibióticos é parcialmente mediada pela geração de EROs. A produção dessas espécies é desencadeada por alterações no metabolismo bacteriano, na respiração celular e na homeostase do ferro (DWYER; COLLINS; WALKER, 2015). Por exemplo, um estudo realizado com *P. aeruginosa* demonstrou que a exposição a antibióticos acelera a morte celular ao estimular a reação de Fenton, na qual o radical hidroxila ($\text{HO}\bullet$) é formado pela interação entre ferro ferroso (Fe^{2+}) e H_2O_2 (YEOM; IMLAY; PARK, 2010). Além disso, observou-se que a exposição de *E. coli* a concentrações subletais de antibióticos aumenta a produção de EROs, promovendo danos oxidativos ao DNA e elevando as taxas de mutação. Esse efeito contribui para o surgimento de resistência múltipla a drogas (MDR) (KOHANSKI; DEPRISTO; COLLINS, 2010). De forma complementar, Foti et al. (2012) propuseram que a letalidade dos antibióticos também pode estar relacionada à falha no reparo de nucleotídeos oxidados, como a 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG). Quando esses danos ocorrem em regiões próximas do DNA, podem resultar na formação de quebras de fita dupla, intensificando os efeitos letais dos antibióticos (FOTI et al., 2012).

A exposição excessiva das células às EROs ou a deficiência de mecanismos antioxidantes, condições que resultam no chamado estresse oxidativo, podem causar danos significativos aos componentes celulares. No entanto, é sabido que, mesmo em células não submetidas a condições de estresse oxidativo, as EROs, como o H_2O_2 e o $\text{NO}\bullet$, podem atuar como segundos mensageiros em vias de sinalização associadas a receptores agonistas, como fatores de crescimento e hormônios. Esses mensageiros desempenham um papel crucial na regulação de processos como proliferação celular e alterações metabólicas induzidas por esses compostos (WINTERBOURN e HAMPTON, 2008).

As EROs apresentam diferenças marcantes em termos de reatividade. O $\text{O}_2\bullet^-$ é menos reativo do que o $\text{HO}\bullet$ em solução aquosa e pH fisiológico. No entanto, sua forma protonada, o radical ânion superóxido, exibe maior reatividade e hidrofobicidade, o que facilita sua penetração em membranas celulares, onde pode desencadear a peroxidação lipídica, resultando na formação de peróxidos lipídicos altamente tóxicos (GRANT e LOAKE, 2000). Além disso, o $\text{O}_2\bullet^-$ pode reagir rapidamente com o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), formando peroxinitrito (ONOO^-), uma espécie altamente citotóxica. O peroxinitrito pode se decompor em nitrato, ânion hidroxila e radicais altamente reativos, como nitrito e hidroxila, por vias independentes de metais (PFEIFFER et al., 1997).

A redução do H_2O_2 por metais de transição, como Fe^{2+} ou Cu^+ , resulta na formação do $\text{HO}\cdot$, que apresenta altíssima reatividade com praticamente todos os tipos de moléculas orgânicas (BUXTON et al., 1988). O $\text{HO}\cdot$ possui um alto potencial redutor (+2,31 V), sendo extremamente reativo e capaz de causar danos severos ao DNA, proteínas e lipídios das membranas celulares. Sua formação ocorre por meio da reação de Fenton, que envolve H_2O_2 e metais de transição como Fe^{2+} , ou pela fissão homolítica da água induzida por luz UV. Devido à sua curta meia-vida e elevada reatividade, o $\text{HO}\cdot$ atua de forma altamente localizada, não desempenhando funções como molécula sinalizadora.

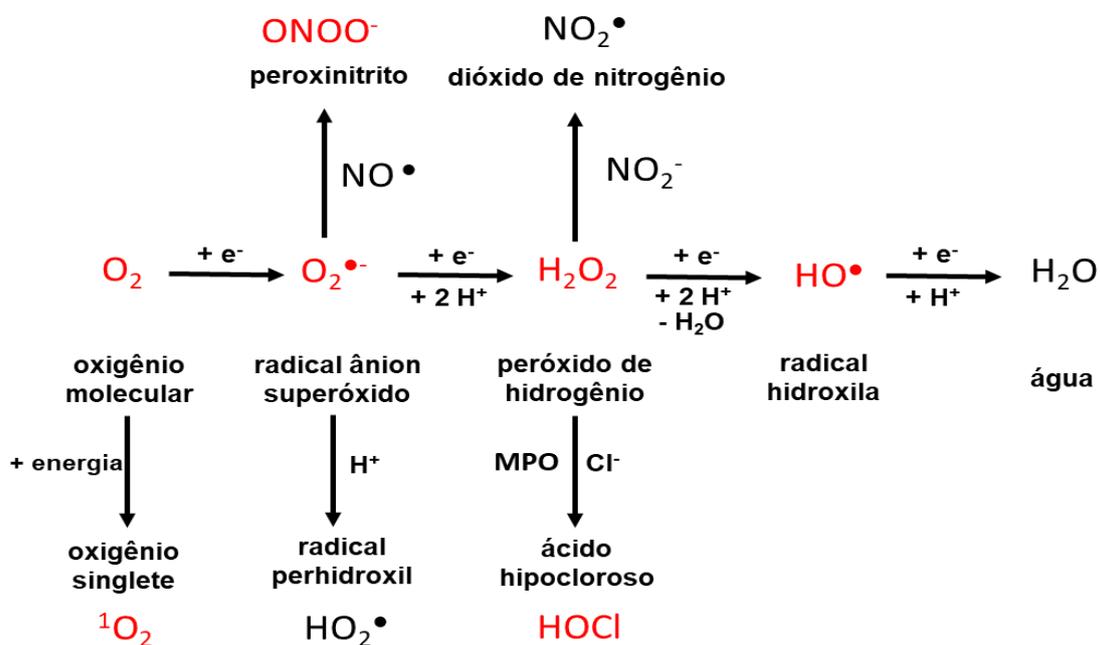


Figura 2: Intermediários da redução parcial do oxigênio molecular e alguns dos possíveis produtos que podem ser gerados. Fonte: Grupo Microbiologia Redox LFBM

1.3. Sistemas antioxidantes

A remoção de agentes oxidantes é uma estratégia essencial para a sobrevivência celular em condições de estresse oxidativo (ROMSANG et al., 2014). Esse processo é mediado por enzimas especializadas, como catalases, superóxido dismutases (SODs), peroxidases e alquil-hidroperoxidases. Essas enzimas catalisam a conversão de espécies tóxicas em compostos menos prejudiciais, sendo fundamentais para a sobrevivência bacteriana em condições de estresse oxidativo (CRAWFORD e DAVIES, 1994; STAERCK et al., 2017). As SODs desempenham um papel central nesse processo, catalisando a conversão do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , enquanto catalases e peroxidases transformam

o H₂O₂ em água (H₂O) e oxigênio molecular (O₂). Essas enzimas atuam de forma coordenada, sendo as SODs a primeira linha de defesa contra os superóxidos (CAVINATO et al., 2020). Além disso, células aeróbias contam com sistemas antioxidantes não enzimáticos que complementam a detoxificação das EROs, como a glutationa (GSH) e o ácido ascórbico (HALLIWELL e JOHN, 2015).

P. aeruginosa apresenta um vasto repertório enzimático dedicado à remoção ou neutralização de moléculas oxidantes como demonstrado na Figura 3. No entanto, há uma lacuna significativa em estudos que buscam compreender o papel específico de cada componente redox durante a interação patógeno-hospedeiro.

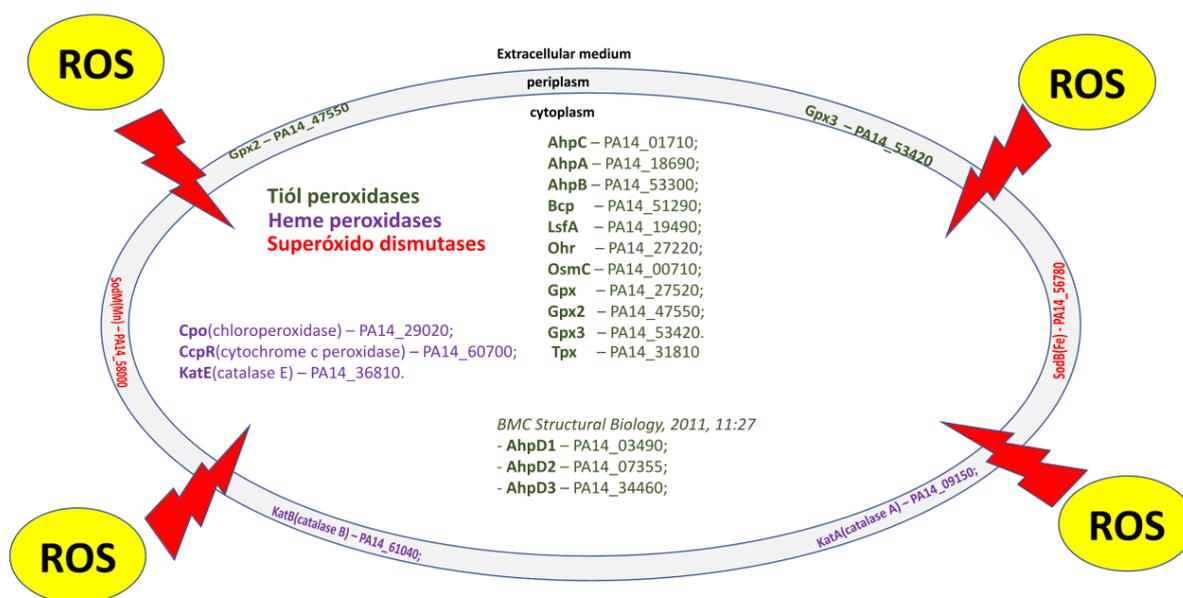


Figura 3: Esquema do arsenal antioxidante de *P. aeruginosa* contra a ação de espécies reativas de oxigênio (ERO). A linhagem UCBPP_PA14 apresenta em seu sistema antioxidante diversas enzimas, como as superóxidos dismutases (SodM e SodB), hemeperoxidases (cloroperoxidase, citocromo c peroxidase) e catalases (KatA, KatB e KatE). Além disso, contém tiol peroxidases, incluindo Tpx, glutationa peroxidase (GPx, GPx2 e GPx3), proteína C osmoticamente induzível (OsmC), proteína de resistência a hidroperóxido orgânico (Ohr), proteína comigratória de bacterioferritina (Bcp), 1-Cys-peroxirredoxina (LsfA) e alquil hidroperóxido redutases (AhpC, AhpA e AhpB). Fonte: Grupo Microbiologia Redox LFBM

Em *P. aeruginosa*, foram identificadas duas isoformas de SOD: a Fe-SOD (SodB), dependente de ferro e expressa em todas as condições de crescimento, e a Mn-SOD (SodM, anteriormente SodA), que utiliza manganês como cofator e é induzida em situações de privação de ferro e produção de alginato (HASSETT et al., 1993). Dentre essas isoformas, a Fe-SOD apresenta maior impacto no crescimento aeróbico, na proteção contra superóxidos e na produção de piocianina (GHORBAL et al., 2016). Além disso, mutantes deficientes em Fe-SOD demonstraram uma redução significativa na atividade catalítica em comparação aos mutantes Mn-SOD, evidenciando o papel crucial da Fe-SOD na proteção contra o estresse oxidativo (HASSETT; SCHWEIZER; OHMAN, 1995). Adicionalmente, a Fe-SOD contribui para a sobrevivência prolongada de *P. aeruginosa* em macrófagos humanos e murinos, inibe a ativação da autofagia (CAVINATO et al., 2020) e participa do processo de infecção em modelos de *Bombyx mori* (IIYAMA et al., 2007).

P. aeruginosa possui três catalases (KatA, KatB e KatC) que desempenham papéis cruciais na detoxificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Dentre as catalases, KatA é a principal e mais estudada, sendo extremamente estável e expressa continuamente durante todas as fases de crescimento bacteriano, com superexpressão na fase estacionária. Sua expressão é regulada por diversos sistemas, como quorum sensing (QS), níveis de ferro, regulador anaeróbico (ANR), OxyR e IscR (SU et al., 2014; HEO et al., 2010). Além de sua função antioxidante, KatA também está diretamente envolvida na virulência de *P. aeruginosa*, como demonstrado em modelos de infecção com *Drosophila melanogaster* e camundongos, nos quais mutantes deficientes em KatA apresentaram redução significativa na letalidade em comparação à cepa selvagem (LEE et al., 2005). Em contraste, a expressão de KatB é induzida especificamente em resposta ao estresse por H₂O₂ (ELKINS et al., 1999). Já KatC, também conhecida como KatE devido à sua homologia com a catalase KatE de *Escherichia coli*, é uma catalase induzível por temperatura, cuja atividade depende da formação de ligações dissulfeto (MOSSIALOS et al., 2006). No entanto, seu papel em processos celulares e mecanismos de proteção ainda não foi completamente elucidado (ORLANDI; MARTEGANI; BOLOGNESE, 2018).

Um outro grupo de enzimas antioxidantes corresponde a superfamília das tiol peroxidases. Elas têm a sua atividade centrada em grupos tiólicos presentes em resíduos de cisteína altamente reativos (CUSSIOL et al., 2003; RHEE et al., 2005; TOPPO et al.,

2009) e apresentam como mecanismo geral de redução de hidroperóxidos: $2R^1SH + R^2OOH \rightarrow R^1SSR^1 + R^2OH + H_2O$. As tiol peroxidases são compostas principalmente pelas famílias das peroxirredoxinas (Prxs) (Figura 4), glutaciona peroxidases (GPxs), proteínas redutoras de OHPs (Ohr/OsmC) e alquil hidroperóxido redutases (AhpC, AhpA e AhpB). Com exceção dos membros da família Ohr/OsmC, que apresenta especificidade pela redução de hidroperóxidos orgânicos, essas enzimas têm a capacidade de detoxificar uma ampla variedade de OHPs e inorgânicos com elevada eficiência catalítica (FLOHÉ, 2015). Diferentemente de peroxidases dependente de grupos prostéticos de ferro-heme (como catalase e mieloperoxidase), a atividade peroxidase de tiol peroxidases é baseada na oxidação do tiolato de um resíduo de cisteína (PS-) a ácido sulfênico (PSOH) (FLOHÉ, 2015). A redução do PSOH para tiolato, que completa o ciclo catalítico, depende de parceiros redutores.

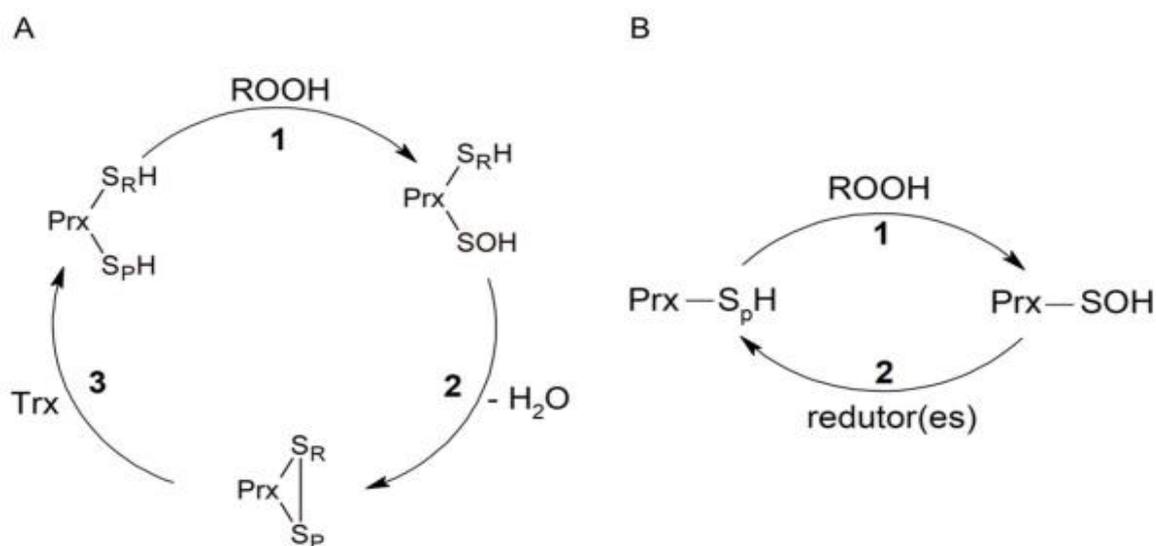


Figura 4: O ciclo catalítico das peroxirredoxinas (Prxs) pode ser representado da seguinte forma: Inicialmente, 1) o peróxido reage com a cisteína peroxidásica (S_pH), promovendo sua oxidação e formando ácido sulfênico (R-SOH), água e álcool (não representados na figura). 2) Em seguida, o ácido sulfênico interage com a cisteína de resolução (S_R), resultando na formação de uma ligação dissulfeto (S_R-S_p). 3) Por fim, a enzima é reconstituída por meio da redução da ligação dissulfeto, mediada por uma tioredoxina (Trx). De maneira simplificada, as Prxs são oxidadas pelo hidroperóxido ($ROOH$), gerando ácido sulfênico em um primeiro momento, e ao término do ciclo catalítico,

agentes redutores restauram a enzima à sua forma funcional. Fonte: Adaptado de Flohé, 2015; Condeles, 2017.

As alquil-hidroperóxido redutases complementam a ação das catalases, convertendo H_2O_2 e OHPs em água e álcoois, contribuindo para a defesa contra estresse oxidativo. Entre elas, AhpA é continuamente expressa ao longo de todas as fases de crescimento aeróbico, desempenhando um papel crucial na resposta ao estresse oxidativo causado por EROs produzidas endogenamente (OCHSNER et al., 2000). Por outro lado, AhpCF é superexpressa em situações de estresse oxidativo exógeno, funcionando como uma importante proteína protetora contra os danos causados por agentes oxidantes (HARE et al., 2011). Além de sua função na remoção de hidroperóxidos, AhpCF também possui atividade de chaperona molecular, contribuindo para a manutenção da funcionalidade proteica em condições adversas (HONG et al., 2020).

Em relação às peroxirredoxinas, os trabalhos mostraram que o mutante nulo no gene *lsfA* apresentou maior sensibilidade ao H_2O_2 , mas não aos OHPs e redução na virulência quando avaliada utilizando o modelo de infecção aguda de pneumonia em camundongos (KAIHAMI et al., 2014). A deleção de *ahpC1* tornou a *P. aeruginosa* mais sensível ao desafio por H_2O_2 , ácido hipocloroso e ao hidroperóxido de ácido úrico (um OHP) e menos virulenta no modelo de infecção aguda de pneumonia em camundongos (ROCHA et al., 2021). Por outro lado, a deleção de *tpx* não atenuou a virulência de *P. aeruginosa* no verme *C. elegans* (SOMPRASONG et al., 2012), apesar de Tpx apresentar alta eficiência catalítica na redução de OHPs e H_2O_2 (SOMPRASONG et al., 2012).

Dados sobre o papel de Ohr no contexto da infecção, mostraram que o mutante nulo no gene *ohr* não apresentou redução na virulência quando avaliada no verme *C. elegans* (ATICHARTPONGKUL et al., 2010) ou em camundongos (GUERCIO, 2019), apesar da ausência desta enzima ser crucial na resposta ao desafio por OHPs, especialmente os derivados de ácidos graxos.

1.4. Família Ohr/OsmC

Inicialmente, acreditava-se que as enzimas da família Ohr/OsmC estavam restritas ao domínio bacteriano (ATICHARTPONGKUL et al., 2001). No entanto, buscas recentes por homólogos conduzida por Meireles et al. (2022), utilizando ferramentas como delta-BLAST e Jackhmmer no banco de dados NCBI nr, identificaram a presença de 392

proteínas eucarióticas pertencentes à família Ohr/OsmC. Análises de alinhamentos sucessivos dessas sequências revelaram que 189 delas pertencem ao subgrupo Ohr, enquanto apenas 5 foram classificadas como parte do subgrupo OsmC. Além disso, foi identificado um terceiro subgrupo distinto de proteínas Ohr/OsmC, denominado Ohr-like, que compreende 198 sequências de organismos eucarióticos e ainda carece de caracterização funcional detalhada, mas que são desprovidas de atividade peroxidásica, como é observado nos membros dos subgrupos Ohr e OsmC (MEIRELES et al., 2017).

Membros da família Ohr/OsmC foram identificados em todos os grupos eucarióticos, com exceção dos Metazoários, conforme a Árvore da Vida e a taxonomia descrita por Hinchliff et al. (2015). A maior concentração de homólogos foi encontrada em fungos, representando 76% (300 de 392) das sequências detectadas, com predominância nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. As proteínas Ohr/OsmC também estão presentes em protistas, como a ameba social *Dictyostelium discoideum*, que possui uma cópia dos genes *osmC* e *ohr-like*, e em *Trichomonas vaginalis*, que apresenta quatro membros do subgrupo Ohr-like (NÝVLTOVÁ et al., 2016). Além disso, algumas plantas não vasculares, como *Physcomitrium* (*Physcomitrella patens*), possuem uma cópia dos genes *ohr* e *ohr-like* (MEIRELES et al., 2017).

Uma característica notável é a expressiva variação no número de genes que codificam os membros dos três subgrupos entre diferentes microrganismos. Por exemplo, *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa do filo *Proteobacteria*, possui a presença de uma OsmC e de uma Ohr-like (conhecido como YhfA), mas não apresenta Ohr. Em contraste, *P. aeruginosa*, também pertencente ao filo *Proteobacteria*, contém uma Ohr e uma OsmC, além de três Ohr-like. Já *B. subtilis*, uma bactéria Gram-positiva do filo *Firmicutes*, possui duas Ohrs, uma Ohr-like e não apresenta OsmC. Essa diversidade na distribuição dos membros dos subgrupos Ohr, OsmC e Ohr-like entre diferentes grupos bacterianos não segue um padrão evolutivo definido, sugerindo que eventos como a transferência horizontal de genes podem ter influenciado essa distribuição (MEIRELES et al., 2017; HUSNIK e MCCUTCHEON, 2017).

As proteínas dos grupos Ohr, OsmC e Ohr-like compartilham um par conservado de cisteínas catalíticas separadas por aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos na sequência primária (Figura 5). Essa característica é considerada um marco distintivo das proteínas da família Ohr/OsmC. Além disso, dois outros resíduos, uma arginina (Arg) e

um glutamato (Glu), essenciais para a atividade peroxidática (OLIVEIRA et al., 2006; CUSSIOL et al., 2010) estão totalmente conservados nos subgrupos Ohr e OsmC, mas ausentes nas proteínas do subgrupo Ohr-like.

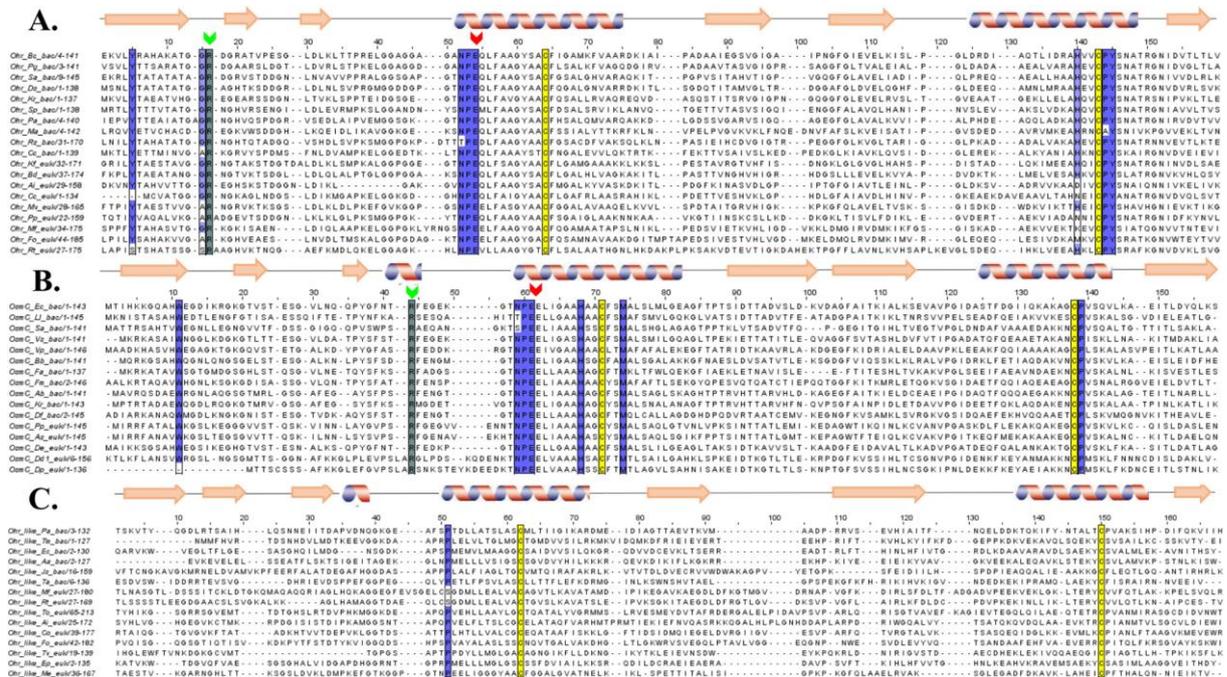


Figura 5: Análise comparativa de seqüências e estruturas de Ohr, OsmC e Ohr-like. Alinhamentos múltiplos de seqüências foram realizados para membros selecionados dos subgrupos Ohr, OsmC e Ohr-like utilizando o algoritmo L-INS-I do MAFFT. Para cada subgrupo, foram alinhadas seqüências de diferentes filos bacterianos e eucarióticos. As estruturas secundárias 4NOZ de *Burkholderia cenocepacia* J2315 (para Ohr), 1QLM de *Escherichia coli* (para OsmC) e 2PN2 de *Psychrobacter arcticus* (para Ohr-like) orientaram os alinhamentos. No caso de Ohr, foram selecionadas seqüências bacterianas como *Ralstonia solanacearum* (Rs_Ohr) e *Deinococcus swuensis* (Ds_Ohr), além de eucarióticas, como *Physcomitrella patens* (Pp_Ohr) e *Mortierella elongata* (Me_Ohr). Para OsmC, as seqüências bacterianas incluíram *Azospirillum brasilense* (Ab_OsmC) e *Flavobacterium aquatile* (Fa_OsmC), enquanto eucarióticas como *Dictyostelium discoideum* (Dd1_OsmC) também foram analisadas. Já no grupo Ohr-like, foram alinhadas seqüências bacterianas como *Thermotoga maritima* (Tm_Ohr_like) e eucarióticas como *Exaiptasia pallida* (Ep_Ohr_like) e *Capsaspora owczarzaki* (Co_Ohr_like). Nos alinhamentos, as posições dos resíduos catalíticos Arg (setas verdes) e Glu (setas vermelhas) foram destacadas, sendo conservados em Ohr e OsmC, mas

ausentes em Ohr-like, indicando diferenças funcionais significativas entre os subgrupos. Adaptado de Meireles et al., 2017.

A identificação inicial do gene *ohr* foi feita em *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Este gene codifica uma proteína de 14,5 kDa na época com função desconhecida que poderia restaurar a resistência do tipo selvagem à sensibilidade a OHPs de um mutante *ahpCF* de *E. coli* (MONGKOLSUK *et al.*, 1998). Além disso, o mutante Δ *ohr* de *X. campestris* pv. *phaseoli* exibiu um fenótipo único: sensibilidade aumentada e específica a OHPs artificiais (tBOOH ou CuOOH), mas não a H₂O₂ ou geradores de radical ânion superóxido. Foi observado também que o gene *ohr* foi altamente induzido por OHPs, fracamente induzido por H₂O₂ e não induzido por um gerador de superóxido (MONGKOLSUK *et al.*, 1998). Em seguida, homólogos de Ohr de outras bactérias, como *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, também foram descritos como exibindo um perfil de expressão semelhante e papel na resistência aos OHPs (OCHSNER *et al.*, 2001).

A Ohr é uma peroxidase dependente de tiol, possuindo mecanismo catalítico de redução de hidroperóxidos centrado em um par de cisteína redox-ativa (CUSSIOL *et al.*, 2003). O primeiro resíduo de cisteína (Cys61) é chamado de cisteína catalítica ou peroxidásica (Cp), enquanto o segundo resíduo de cisteína (Cys125) é chamado de cisteína de resolução (Cr), pois está envolvida na formação da ponte dissulfeto intramolecular. Esses resíduos de cisteínas estão relacionados diretamente na atividade peroxidásica dessa enzima, visto que, mutações que substituíram Cys por Ser resultaram na perda da atividade peroxidásica da enzima (CUSSIOL *et al.*, 2003). Ohr é funcionalmente homodimérica e os resíduos de cisteína estão posicionados em cada monômero como parte de dois sítios ativos idênticos localizados em lados opostos (LESNIAK *et al.*, 2003). Dois outros resíduos do sítio ativo que participam da catálise são: uma arginina (Arg) e um ácido glutâmico (Glu) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A estrutura cristalina inicial da Ohr de *P. aeruginosa* (PaOhr) revelou que o Cp está próximo de um resíduo Arg e um Glu (LESNIAK, 2002), formando uma tríade catalítica no chamado estado fechado (CS) (PICCIRILLO *et al.*, 2018). Esses resíduos, Arg catalítico (Rc) e Glu catalítico (Ec), são altamente conservados entre as Ohrs descritas, interagindo por meio de ligações polares que estabilizam o Cp no estado tiolato, diminuindo o valor do pKa deste resíduo de cisteína, pKa - o valor de pKa determinado para diferentes Ohrs variou de 5.2 a 5.9 (MEIRELES *et al.*, 2014; MEIRELES *et al.*,

2017; PICCIRILLO et al., 2018), além de contribuir para o aumento de sua nucleofilicidade. No entanto, mudanças estruturais no sítio ativo podem ocorrer, como no estado aberto (OS), onde o Arg-loop expõe o Rc ao solvente, interrompendo as interações polares da tríade catalítica e reduzindo o impedimento estérico, favorecendo a interação com proteínas lipoiladas. Essa alternância estrutural entre CS e OS, crucial para o ciclo catalítico da Ohr, otimiza o sítio ativo para a redução de hidroperóxidos no CS e facilita a redução de dissulfetos no OS.

O ciclo catalítico da Ohr (Figura 6) é semelhante ao mecanismo das peroxirredoxinas atípicas de 2-Cys, caracterizando-se pela formação de um intermediário dissulfeto intramolecular. Na etapa inicial (Figura 6B e C), o substrato hidroperóxido reage com o tiolato da C_p-S^- . Essa reação ocorre via um mecanismo de substituição nucleofílica (SN_2), resultando na formação de um ácido sulfênico (C_p-SOH). O ciclo catalítico continua com uma reação de condensação (Figura 6C) entre o ácido sulfênico (C_p-SOH) e o tiolato da cisteína de resolução (C_r-SH). Essa reação resulta na formação de uma ligação dissulfeto intra-subunidade ($C_p-S-S-C_r$), confirmada por espectrometria de massa e cristalografia (OLIVEIRA et al., 2006). Posteriormente, essa ligação dissulfeto é reduzida por proteínas lipoiladas por meio de duas reações consecutivas de troca tiol-dissulfeto (DOMINGOS et al., 2020)

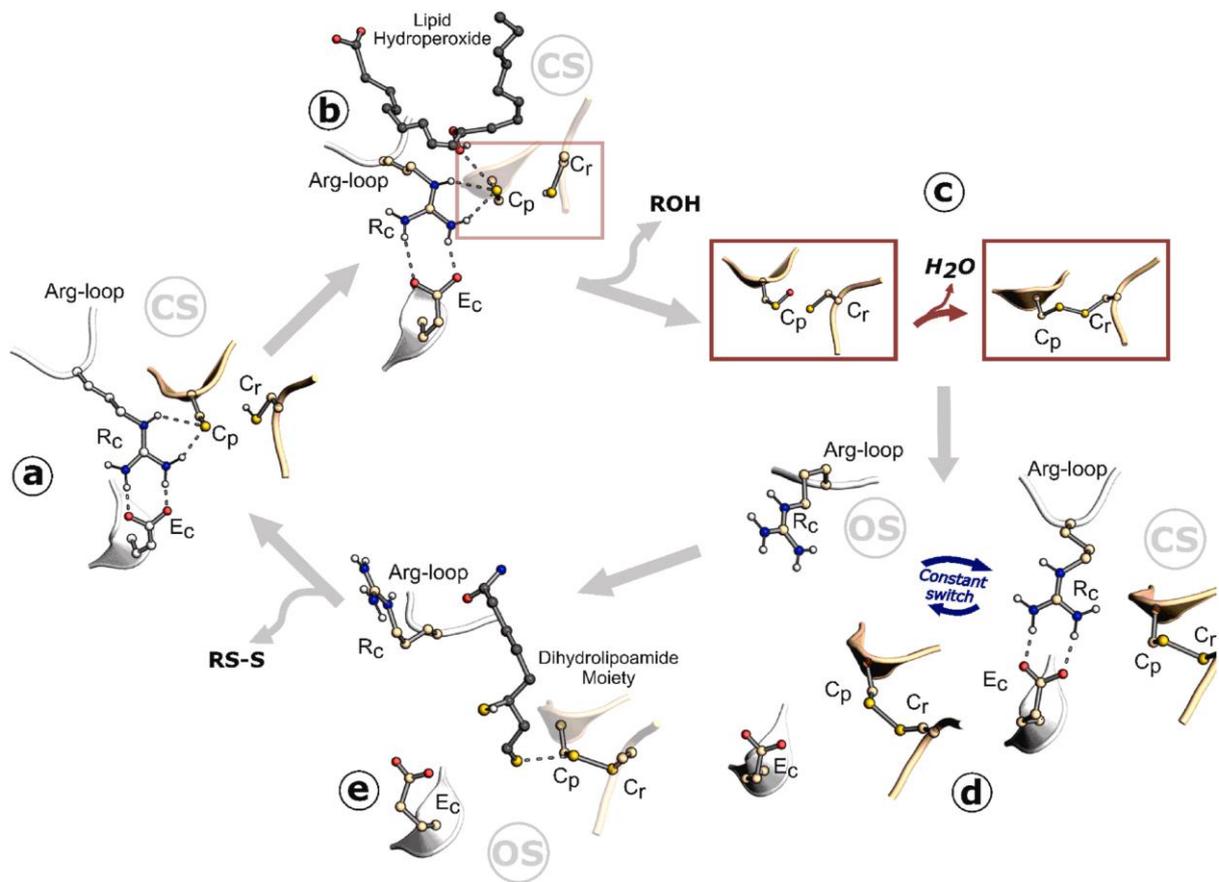


Figura 6: O ciclo catalítico da proteína Ohr envolve mudanças conformacionais e reações químicas que permitem a redução de hidroperóxidos lipídicos. (A) No estado reduzido, o tiolato da cisteína peroxidática (C_p) forma ligações de hidrogênio com a arginina catalítica (R_a) e o glutamato catalítico (E_a), estabilizando a enzima no estado fechado (CS). (B) O hidroperóxido de ácido graxo se liga ao sítio ativo, permitindo uma reação nucleofílica (S_N2) com o tiolato de C_p . (C) Após a oxidação, C_p forma um dissulfeto intra-subunidade com a cisteína de resolução (C_r), liberando água e passando para o estado dissulfeto. (D) Nesse estágio, o "Arg-loop" se afasta de C_p , estabilizando o estado aberto (OS), onde o álcool derivado do hidroperóxido é liberado. (E) No OS, o impedimento estérico para a entrada de agentes redutores é eliminado, permitindo que dihidroipoamida ou proteínas lipoiladas reduzam o dissulfeto, restaurando o estado reduzido da enzima. Adaptado de Meireles et al., 2022.

O gene *osmC* foi primeiramente descrito em *E. coli* em um estudo analisando genes induzidos por estresse osmótico (GUTIERREZ e DEVEDJIAN, 1991). O padrão de expressão de *osmC* em *E. coli* é complexo e depende não apenas da pressão osmótica, mas também da fase de crescimento e de outros reguladores transcricionais. Naquele momento, nenhuma semelhança significativa foi encontrada entre OsmC e outras

proteínas e a função dessa proteína de 14 kDa permaneceu desconhecida. Mais tarde, percebeu-se que OsmCs e Ohrs são membros de dois grupos distintos da superfamília Ohr/OsmC (ATICHARTPONGKUL *et al.*, 2001). A transcrição do gene *osmC* é induzida quando as bactérias entram na fase estacionária (GORDIA e GUTIERREZ, 1996), refletindo seu papel essencial durante a fome prolongada e o alto estresse salino em *E. coli* (CONTER *et al.*, 2001).

Além das diferenças nas sequências de aminoácidos, os genes *osmC* e *ohr* possuem padrões de expressão distintos: *osmC* é induzido por estresse salino/osmótico, enquanto *ohr* responde a hidroperóxidos orgânicos (OHPs) (ATICHARTPONGKUL *et al.*, 2001). Apesar da importância de OsmC nas respostas celulares ao estresse e ao crescimento, sua relação com suas atividades como tiol peroxidase ainda não está totalmente esclarecida (CONTER *et al.*, 2001). Para os membros semelhantes a Ohr, o terceiro subgrupo da família Ohr/OsmC, ainda é necessária uma caracterização mais aprofundada em relação à atividade peroxidásica, expressão gênica e papel funcional.

As proteínas OsmC também possuem atividade de peroxidase de tiol, demonstrando preferência por OHPs em vez de H₂O₂ (SHIN *et al.*, 2004). Contudo, ao contrário das proteínas Ohr, as OsmC estão mais frequentemente associadas à resposta bacteriana ao estresse osmótico do que ao estresse oxidativo (ATICHARTPONGKUL *et al.*, 2001). Embora os papéis fisiológicos da atividade de peroxidase das OsmC ainda não estejam completamente claros, há evidências de interações entre os estresses osmótico e oxidativo, como os papéis osmoprotetores das catalases em bactérias (LEE *et al.*, 2005). Em plantas, por exemplo, a produção de oxidantes aumenta em resposta à elevação da pressão osmótica (HOSSAIN e DIETZ, 2016). Além disso, diferenças sutis nos sítios ativos de Ohrs e OsmCs, como variações nas superfícies hidrofóbicas, na composição de resíduos aromáticos e na conformação estrutural, podem refletir especificidades distintas para diferentes OHPs (SHIN *et al.*, 2004).

OsmC recombinante de *E. coli* foi testada quanto à atividade peroxidásica em relação ao H₂O₂ e ao tBOOH, os resultados demonstraram que OsmC apresenta maior capacidade de reduzir OHP quando comparado a capacidade desta enzima de remover peróxido de hidrogênio (LESNIAK *et al.*, 2003). Estudos identificaram que a ausência de OsmC em *E. coli* tornou esta bactéria mais sensível ao tBOOH do que a linhagem selvagem, sugerindo que OsmC está relacionado a defesa contra o estresse oxidativo, assim como o seu homólogo Ohr (CONTER *et al.*, 2001).

1.5. Glutathione peroxidases

As glutathione peroxidases (GPxs) são um grupo essencial de enzimas em eucariotos, com papel crucial na defesa contra danos oxidativos. A GPx1 foi a primeira selenoproteína identificada em mamíferos (ROTRUCK et al., 1973), protegendo a hemoglobina nas células vermelhas contra a oxidação (MILLS, 1957). Dez anos depois, descobriu-se a GPx4, que difere por ser monomérica e atuar na redução de fosfolipídios peroxidados e ésteres de colesterol em biomembranas (URSINI et al., 1982). Em 1987, a GPx3, uma glicoproteína tetramérica sintetizada nos rins e na placenta, foi identificada como protetora do espaço extracelular contra estresse oxidativo (TAKAHASHI et al., 1987; AVISSAR et al., 1994). No início da década de 1990, o GPx2 foi reconhecido por regular o equilíbrio entre proliferação e apoptose no epitélio intestinal e destacar-se em estudos sobre carcinogênese (CHU, 1994; ESWORTHY et al., 2001; KIPP, 2018). A última GPx contendo selênio identificada foi a GPx6, expressa no lobo olfativo humano e possivelmente envolvida em processos olfativos, embora seu papel exato permaneça incerto (KRYUKOV et al., 2003; DEAR; CAMPBELL; RABBITTS, 1991).

Nem todas as glutathione peroxidases encontradas em vertebrados são selenoproteínas. Em GPx 5, 7 e 8 de humanos e, como mencionado, em algumas espécies também em GPx6, o sítio ativo selenocisteína é substituído por cisteína (URSINI et al., 1995). O denominador comum dos membros da família GPx é que todos eles são peroxidases, mas as especificidades do substrato, não apenas em relação aos hidroperóxidos, mas também para os substratos redutores, diferem substancialmente. Foram identificadas mais de 700 sequências homólogas de CysGpx em todos os domínios da vida, evidenciando que a minoria das Gpx são selenoproteínas (BRIGELIUS-FLOHÉ e MAIORINO, 2013). Em eucariotos, sua função biológica inclui a capacidade de reduzir hidroperóxidos lipídicos aos álcoois correspondentes, assim como converter o H_2O_2 em H_2O . No entanto, existe uma lacuna significativa de pesquisas sobre a função biológica das Gpx em organismos procariotos.

Em relação à contribuição das GPxs para virulência de bactérias, foi demonstrado que o mutante nulo de *Streptococcus pyogenes* em uma putativa Gpx mostrou atenuação da virulência em modelos murinos de infecção mas não em *zebrafish* (BRENOT et al., 2004). *E.coli* possui um gene denominado *btuE*, que codifica uma putativa glutathione peroxidase independente de selênio, que apresenta capacidade de reduzir uma variedade

de hidroperóxidos, principalmente hidroperóxidos lipídicos (ARENAS *et al.*, 2010). Em *Listeria monocytogenes*, o mutante nulo numa Gpx, curiosamente resultou no aumento da eficiência de invasão e adesão em células Caco-2, e contraintuitivamente na elevação da resistência ao estresse oxidativo quando exposta a íons de cobre e ferro e, também no aumento da patogenicidade em infecções de camundongos (ZHANG *et al.*, 2023). Estes dados sugerem a ocorrência de algum mecanismo de compensação que deve ser melhor elucidados. *P. aeruginosa* possui anotada em seu genoma três membros na família das Gpxs, nomeadas aqui como Gpx1 (PA14_27520), Gpx2 (PA14_47550) e Gpx3 (PA14_53420) e há poucos estudos buscando entender seu papel funcional nesta bactéria.

1.6. *Galleria mellonella*

A larva da traça da cera *G. mellonella* é amplamente aceita pela comunidade científica em todo o mundo como um modelo experimental para estudar interações entre hospedeiros e patógenos, bem como a eficácia de agentes antimicrobianos (CUTULI *et al.* 2019). No PubMed há mais de dois mil artigos científicos publicados sobre *G. mellonella*, dos quais 271 foram publicados apenas em 2019, demonstrando a crescente popularidade deste modelo de infecção (Figura 7). Em particular, houve uma expansão na diversidade de patógenos bacterianos estudados, e os modelos de infecção *G. mellonella*-patógeno têm feito uma contribuição inestimável para a pesquisa com patógenos bacterianos humanos e veterinários (COOLS *et al.*, 2019).

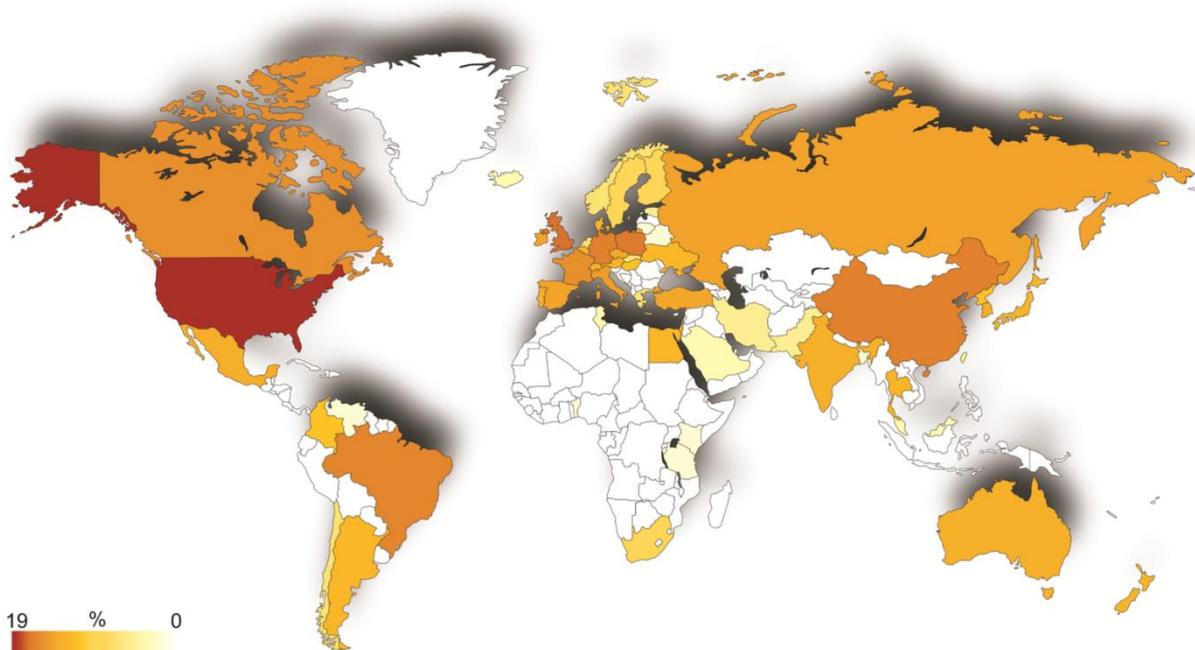


Figura 7: Localização e representatividade (%) das instituições que realizam estudos com *G. mellonella*. Para construir uma visão global da pesquisa envolvendo esse modelo, foram analisados os países das instituições de afiliação dos autores correspondentes. Os dados foram obtidos por meio de uma busca bibliográfica no PubMed (base de dados MEDLINE) realizada em julho de 2020, utilizando a palavra-chave "*Galleria mellonella*". Fonte: Pereira *et al.*, 2020.

O uso do modelo *G. mellonella* reforça a importância da aplicação dos princípios das "3Rs" (redução, refinamento e substituição) na experimentação animal, visando substituir modelos de infecção em vertebrados e, conseqüentemente, reduzir o número de mamíferos utilizados em pesquisas. Como invertebrado, o *G. mellonella* não está incluído na legislação de bem-estar animal e diretrizes éticas (HUBRECHT e CARTER, 2019). As vantagens do uso do modelo *G. mellonella* são numerosas. Criar *G. mellonella* é menos custoso e mais fácil de manter do que modelos de mamíferos, e não requer grandes adaptações na infraestrutura do laboratório. O tamanho grande das larvas (12-20 mm) permite uma manipulação fácil e facilita a coleta de tecidos e análises. O tamanho grande das larvas também permite a quantificação precisa dos inóculos, que podem ser injetados diretamente no hemocélio larval (COOK e MCARTHUR, 2013). O ciclo de vida curto desse inseto o torna adequado para estudos de alto rendimento (TSAI *et al.*, 2016).

Algumas características fisiológicas e imunológicas do *G. mellonella* são fundamentais para o sucesso do modelo. As larvas podem ser mantidas a 37°C, equivalente à temperatura corporal de hospedeiros mamíferos. Como foi demonstrado que a temperatura afeta a expressão de fatores de virulência microbiana, esse recurso é importante ao avaliar a virulência de patógenos de mamíferos (TWITTENHOFF *et al.*, 2020). Apesar de não possuir uma resposta imune adaptativa, o sistema imunológico do *G. mellonella* compartilha muitas semelhanças com a resposta imune inata de mamíferos e, como consequência, pode ser explorado para avaliar a virulência de patógenos

microbianos e produzir resultados comparáveis aos obtidos com sistemas mamíferos (SHEEHAN *et al.*, 2018).

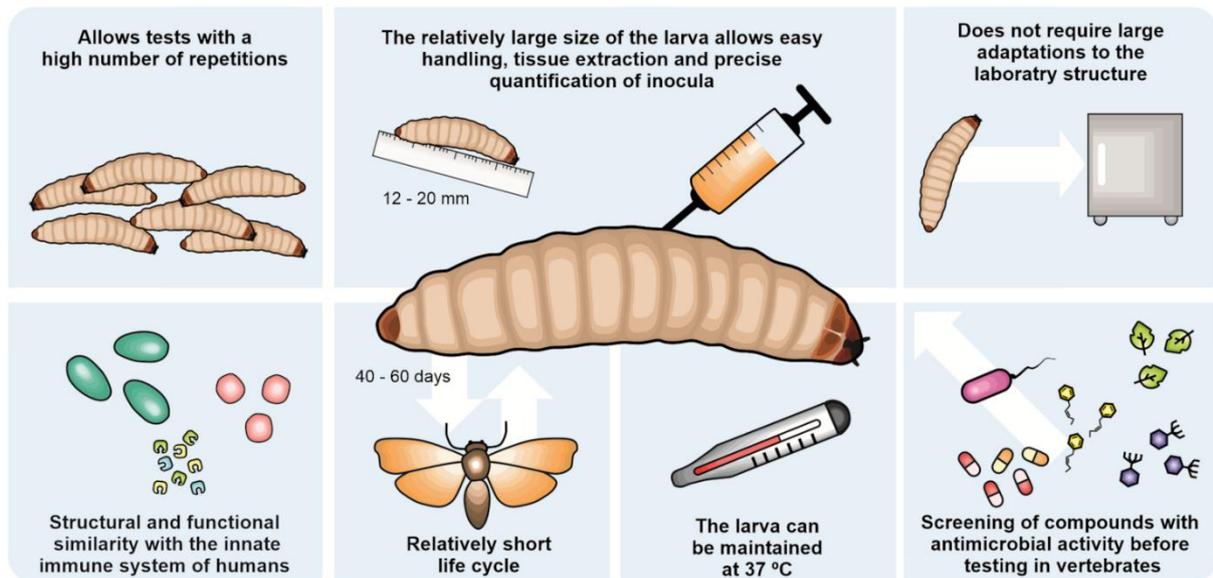


Figura 8: O uso de *G. mellonella* como modelo alternativo para o estudo de patógenos bacterianos oferece diversas vantagens experimentais. Sua alta capacidade reprodutiva e o tamanho das larvas (12-20 mm) facilitam estudos com muitas repetições, além de simplificar procedimentos como extração de fluidos e inoculação na hemocele. As larvas são fáceis de criar em laboratório, sem necessidade de equipamentos especializados, tornando o modelo acessível e prático. Apesar de não possuírem imunidade adaptativa, seu sistema imunológico inato apresenta similaridades estruturais com o de mamíferos, sendo adequado para estudos de respostas imunológicas. Outras vantagens incluem o ciclo de vida curto (40-60 dias), a capacidade de sobrevivência a 37°C (temperatura que simula a de mamíferos) e seu uso consolidado em triagens rápidas de compostos antimicrobianos, agilizando o desenvolvimento de tratamentos antes dos testes em vertebrados. Fonte: (Pereira *et al.*, 2020).

O sucesso de *G. mellonella* como modelo para o estudo da virulência microbiana está relacionado à notável similaridade estrutural e funcional de seu sistema imunológico inato com o dos vertebrados. Sua resposta imune é composta por dois componentes integrados: o celular, mediado por hemócitos análogos aos fagócitos humanos e o humoral, como demonstrado na Figura 9 (BROWNE, HEELAN, KAVANAGH, 2013). Os hemócitos desempenham funções essenciais, como fagocitose, encapsulamento e nodulação de agentes invasores, e incluem diferentes tipos (WU *et al.*, 2016). Essas células podem ser encontradas livres na hemolinfa ou aderidas a órgãos internos, como o

trato digestivo e o corpo adiposo, e sua concentração varia ao longo do ciclo de vida da larva e em resposta a infecções (PEREIRA *et al.*, 2015; ARTEAGA BLANCO *et al.*, 2017). A resposta humoral de *G. mellonella* envolve moléculas solúveis, como peptídeos antimicrobianos (AMPs), proteínas semelhantes à do sistema complemento (opsoninas), melanina e produtos de cascatas proteolíticas, que atuam na imobilização ou eliminação de patógenos (SHEEHAN *et al.*, 2018). Os principais componentes da resposta imune inata presentes em *G. mellonella* são mostrados na Figura 9.

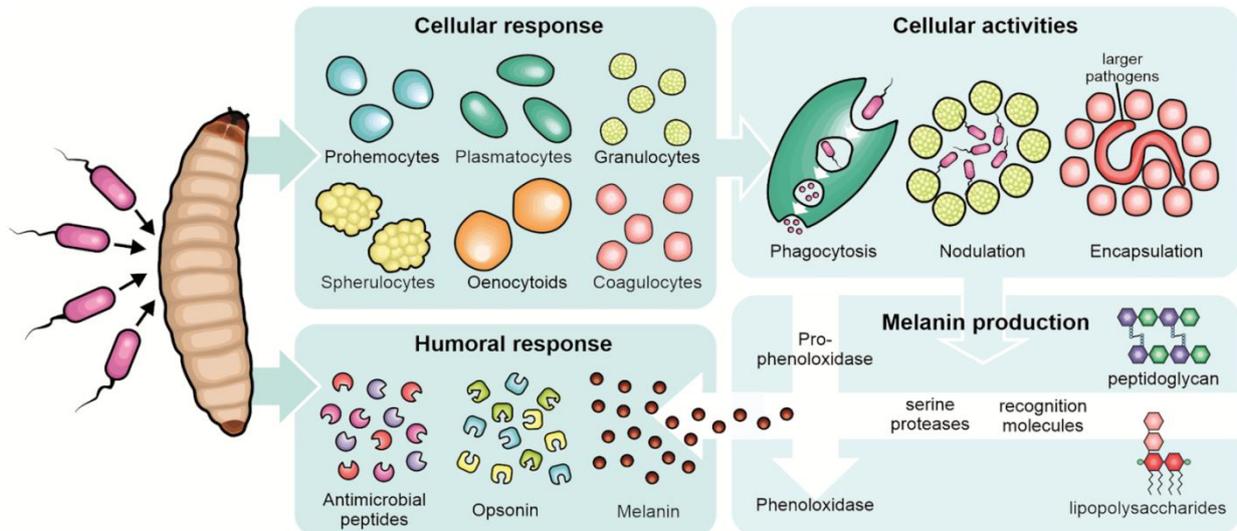


Figura 9: Esquema dos principais componentes do sistema imunológico inato de *G. mellonella*. O sistema imunológico inclui a resposta celular e a resposta humoral, ambas complementares. A resposta celular (canto superior esquerdo) é mediada por hemócitos, como pró-hemócitos, plasmócitos, granulócitos, esferócitos, oenocitoides e coagulócitos, que desempenham funções de fagocitose, nodulação e encapsulamento de patógenos (canto superior direito). Já a resposta humoral (canto inferior esquerdo) envolve moléculas efetoras solúveis, como peptídeos antimicrobianos, opsoninas e melanina, que atuam na eliminação de patógenos. Além disso, ao reconhecer padrões moleculares associados a patógenos, como peptidoglicano e LPS (canto inferior direito), algumas células ativam a via da fenoloxidase para a produção de melanina. *Fonte: Pereira et al., 2020.*

Além das diversas vantagens associadas ao uso de *G. mellonella* como modelo experimental, estudos têm demonstrado uma alta similaridade nos resultados de virulência obtidos com esse organismo e aqueles encontrados em modelos de camundongos. Em uma pesquisa conduzida por Jander, Rahme e Ausubel (2000), a análise de variância revelou uma correlação significativa ($P < 0,001$) entre o aumento da DL_{50} em *G. mellonella* e a redução da letalidade em camundongos. Esses dados indicam

que isolados mutantes de *P. aeruginosa* PA14 com menor virulência nas larvas de *G. mellonella* tendem a apresentar também menor virulência em camundongos, conforme demonstrado na Figura 10. Assim, os resultados sugerem que *G. mellonella* é um modelo de estudo altamente preditivo para investigar o processo de infecção em mamíferos.

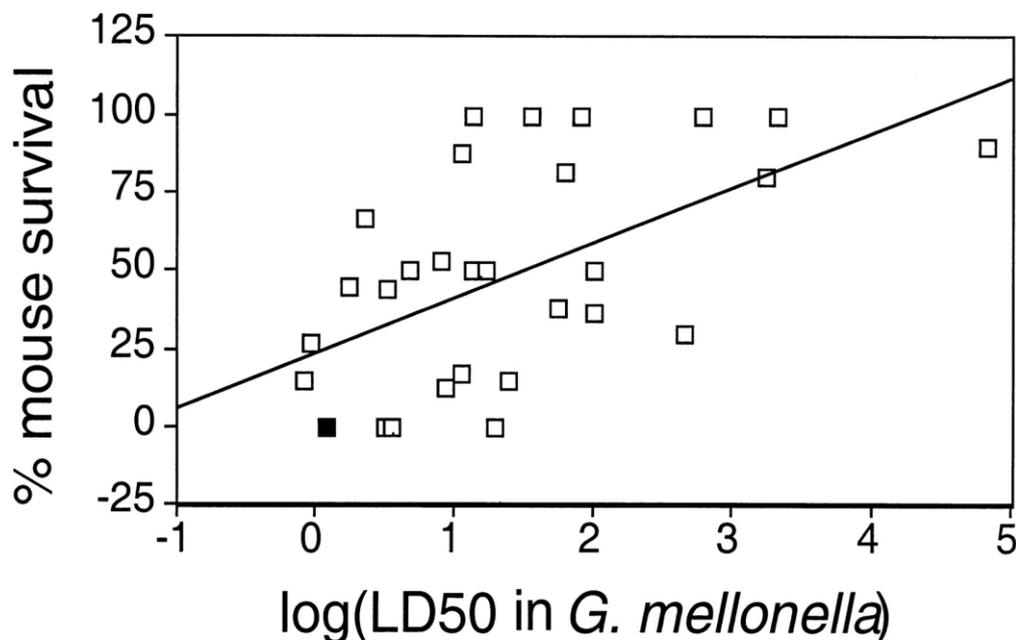


Figura 10: *G. mellonella* é usada como modelo para identificação de genes relacionados à virulência de *P. aeruginosa*. Esse dado demonstra que mutantes nulos em genes comprovadamente associados à virulência de *P. aeruginosa* apresentam correlação positiva com a atenuação da virulência no modelo de infecção utilizando *G. mellonella*. Esses resultados reforçam a eficácia do uso de *G. mellonella* como modelo experimental *in vivo*, sugerindo que sua aplicação na triagem de mutantes menos virulentos pode ser uma estratégia eficiente para identificar novos genes de *P. aeruginosa* envolvidos nos mecanismos de infecção em mamíferos. Fonte: JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Investigar o papel das tiol peroxidases Ohr, OsmC e Gpx, sabidamente envolvidas com o metabolismo de OHPs, na virulência e fisiologia de *P. aeruginosa*, usando como modelo de infecção larvas do inseto *G. mellonella*.

2.2. Objetivos específicos:

- a. Manter uma colônia de *G. mellonella* no LFBM;
- b. Obtenção dos mutantes $\Delta gpx2$ e $\Delta gpx3$ através de recombinação homóloga;
- c. Complementar os mutantes nulos simples e combinados pela inserção dos genes *ohr*, *osmC* ou *gpx* selvagens como cópia única no sítio *attB* do cromossomo bacteriano;
- d. Confirmar os genótipos dos mutantes simples nos genes *ohr*, *osmC* e *gpx* de *P. aeruginosa*;
- e. Obter, através de recombinação homóloga, os mutantes duplos, $\Delta ohr/\Delta osmC$, $\Delta ohr/\Delta gpx$ e $\Delta osmC/\Delta gpx$ e o mutante triplo $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$;
- f. Caracterizar os mutantes nulos quanto ao crescimento em meio rico e em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de C, a fim descartar qualquer alteração no crescimento aeróbio;
- g. Investigar o efeito da ausência destas tiol peroxidases quanto a sensibilidade ao H_2O_2 , ao tBOOH e ao NaOCl;
- h. Determinar a susceptibilidade das larvas de *G. mellonella* à infecção experimental pela linhagem de *P. aeruginosa* selvagem e do mutante triplo $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$.

3. METODOLOGIA

3.1. Organismos de estudo

Neste estudo, foi utilizada a linhagem de *P. aeruginosa* UCBPP_PA14, um isolado clínico humano de infecção sanguínea proveniente de um paciente queimado, capaz de infectar hospedeiros filogeneticamente distintos (RAHME., 1995). Uma colônia de *G. mellonella* está sendo mantida no LFBM. As larvas estão sendo criadas em BOD a 27 °C, no escuro e alimentadas com dieta artificial. Para os ensaios de infecção, foram usadas as larvas no último instar, que pesam entre 250-300 mg cada.

3.2. Desenho dos oligonucleotídeos para deleção dos genes *gpx2* e *gpx3*

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência genômica de *P. aeruginosa* UCBPP_PA14, obtida a partir do banco de dados presente no “*The*

Pseudomonas Genome Database”. Para a deleção dos genes *gpx2* e *gpx3*, foi selecionada uma região de aproximadamente mil *pb* a montante do gene *gpx2* ou *gpx3*, a partir da qual foi desenhado um par de oligonucleotídeos que incluiu apenas alguns códons no início da região codificante. Da mesma forma, foi selecionada uma região de aproximadamente mil *pb* a jusante desses genes para gerar um segundo par de oligonucleotídeos, contendo apenas alguns códons no final da região codificante. Dessa forma, a fusão da região amplificada a montante ao gene alvo com a região amplificada a jusante gerou um fragmento no qual a parte central da região codificante foi excluída. Assim, para o gene *gpx2* foi planejada a deleção dos 555 codons centrais, enquanto para o gene *gpx3* 483 códons. Essa estratégia, ao unir os primeiros códons do gene-alvo com os últimos códons do mesmo gene, garantiu a manutenção da fase de leitura. Assim, a recombinação homóloga resultou em uma mutação limpa e não polar, ou seja, com impacto mínimo na expressão dos genes a jusante da região cromossômica deletada.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Exxtend e ressuspensos em volume de solução de Tris-HCl pH 8.0, ajustando o volume para obter uma concentração final da solução estoque de 100 μ M. Posteriormente, a solução de trabalho foi ajustada para uma concentração final de 25 μ M, a partir da diluição da solução estoque.

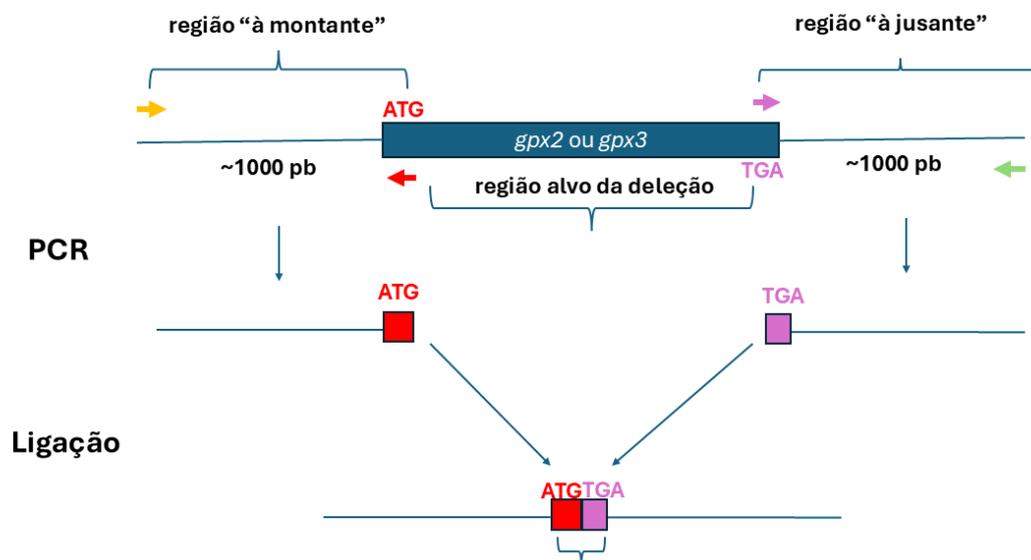


Figura 11: Estratégia de deleção dos genes *gpx2* e *gpx3* para a obtenção dos mutantes nulos $\Delta gpx2$ e $\Delta gpx3$.

Tabela 1: Lista dos oligonucleotídeos desenhados para o processo de obtenção dos mutantes nulos $\Delta gpx2$ e $\Delta gpx3$. Em negrito estão destacados os sítios de restrição usados no processo união dos pares de fragmentos e clonagem no vetor pEX18Ap.

Nome	Sequência (5' - 3')
PA14_47550_DEL_HindIII_L	AGT CAAGCTT CATGGCGATGGGTATCTC
PA14_47550_DEL_XbaI_R	AGTCTCTAGACACGCGAGGTTTCATGGAATG
PA14_47550_DEL_XbaI_L	AGTCTCTAG AAGCC AGCCCTGAGGAGCA
PA14_47550_DEL_BamHI_R	AGT CGGATCC GGCATCTACGTGCCCTAC
PA14_53420_DEL_HindIII_L	AGT CAAGCTT TTTCTTCCCGGGCACACC
PA14_53420_DEL_XbaI_R	AGTCTCTAG AATCGT GAAAGGCACTCATGACG
PA14_53420_DEL_XbaI_L	AGTCTCTAGAGCCCTGGGTTGATCTCCCG
PA14_53420_DEL_BamHI_R	AGT CGGATCC GGTGCCTTCGCTGACGAT

3.3. Desenho dos oligonucleotídeos para complementação funcional das linhagens Δohr , $\Delta osmC$, Δgpx , $\Delta gpx2$ e $\Delta gpx3$

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência genômica de *P. aeruginosa* UCBPP_PA14, obtida a partir do banco de dados “The Pseudomonas Genome Database”. Para a estratégia de complementação dos genes deletados, foi selecionada a região do gene de interesse, incluindo 500 pb a montante e 100 pb a jusante do gene a ser complementado. A região de interesse foi amplificada por PCR, seguida de purificação, digestão enzimática e ligação ao vetor *minictx2*, previamente purificado e digerido. Tanto os fragmentos quanto o vetor foram digeridos com as enzimas BamHI/HindIII. Nesse contexto, o vetor *mini-ctx2* (HOANG et al., 2000) promove a integração dos fragmentos clonados no sítio *attB* presente no cromossomo de *P. aeruginosa*.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Exxtend e ressuspensos em volume de solução de Tris-HCl pH 8.0, ajustando o volume para obter uma concentração final de 100 μ M. Posteriormente, a solução de trabalho foi ajustada para uma concentração final de 25 μ M, a partir da diluição da solução estoque.

Tabela 2: Lista dos oligonucleotídeos desenhados para a complementação funcional dos mutantes nulos Δohr , $\Delta osmC$, $\Delta gpx1$ $\Delta gpx2$ e $\Delta gpx3$. Em negrito estão destacados os sítios de restrição usados no processo de clonagem no vetor mini-ctx2.

Nome	Sequência (5' - 3')
PA14_00710_L_compl	GGCAAGGACTACTTCGAC
PA14_00710_HindIII_R_compl	AGTCA AGCT TTTTTCATGACCCGTCACTC
PA14_27220_BamHI_L_compl	AGTC GGATC CATGACCAAGGTCTACAAG
PA14_27220_R_compl	GTCAAGGCCTGATCCTTT
PA14_27520_BamHI_L_compl	AGTC GGATC CGACAAACCCTGGACTCCTG
PA14_27520_HindIII_R	AGTCA AGCT TCTTTTCCCCGGGTGCTCAT
PA14_47550_BamHI_L_compl	AGTC GGATC CGTAGTGATCGTGCTGTTC
PA14_47550_HindIII_R_compl	AGTCA AGCT TTTACCTATCGCTTCTGAT
PA14_53420_BamHI_L_compl	AGTC GGATC CGACGCCTATGGCGAATAC
PA14_53420_HindIII_R_compl	AGTCA AGCT TCAAGACAGGAAAGGAAGC

3.4. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada conforme o protocolo descrito por Chen e Kuo (1993). As células de *P. aeruginosa* PA14 foram cultivadas em meio LB (Lysogenic Broth) em erlenmeyer overnight. No dia seguinte, 1,5 mL da cultura foi transferida para um tubo Eppendorf e centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e ao pellet foram adicionados 400 µL de tampão de lise (400 mM Tris-acetato, pH 7.8; 20 mM NaOAc; 1 mM EDTA; 1% SDS). O pellet foi ressuspenso cuidadosamente com uma pipeta, seguido pela adição de 132 µL de NaCl 5 M. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 40 minutos a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e reservado, enquanto o pellet foi descartado. Ao sobrenadante, foram adicionados 500 µL de clorofórmio (CHCl₃), e a mistura foi homogeneizada por inversão por aproximadamente 10 minutos, até adquirir um aspecto branco-leitoso. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 12000 rpm a

4°C, gerando três fases distintas no tubo. A fase superior foi coletada, e a ela foram adicionados 900 µL de EtOH 100% gelado para precipitar o DNA, misturando por inversão cerca de 15 vezes. A precipitação do DNA foi seguida de duas lavagens com EtOH 70% gelado. Na primeira lavagem, o tubo foi centrifugado por 3 minutos a 12000 rpm a 4°C; na segunda, por 5 minutos sob as mesmas condições. Após as lavagens, o tubo foi colocado em estufa para evaporar o EtOH residual. Por fim, 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) contendo RNase (20 µg/mL) foi adicionado ao pellet seco para a solubilização do DNA. Por fim, alíquotas do DNA diluído 10 vezes foram preparadas para seu uso como molde em reações de PCR.

3.5. PCR para a amplificação das regiões que flanqueiam os genes que foram deletados

Para a PCR, foram utilizados os oligonucleotídeos descritos anteriormente, específicos para amplificar as regiões que flanqueiam os genes *gpx2* e *gpx3* no cromossomo de *P. aeruginosa*. A mistura de reação (MIX) foi preparada utilizando o kit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µL), contendo 1x Phusion CG Buffer, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM do par de oligonucleotídeos, 5% de DMSO, 0,02 U/µL de Phusion DNA Polymerase e água ultrapura estéril para completar o volume final de 50 µL. O ciclo para amplificação utilizado foi a desnaturação inicial à 98°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 98°C por 15 segundos, hibridização a 60°C por 15 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Após o término do ciclo, a verificação da amplificação dos produtos da PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%. Foi preparado 0,5 g de agarose para 50 mL de tris-acetato EDTA (TAE) 1x, em que a agarose foi aquecida em micro-ondas, colocada na cuba do gel juntamente com o pente que criou os poços para as amostras serem depositadas. Para o preparo do TAE foi feito um estoque do tampão a 50 x que foi diluído posteriormente para 1 x (1:50), adicionando 242 g de base tris; 57,1 mL de ácido acético glacial e 100 mL de solução EDTA 0,5 M (pH 8,0) e ajustando o volume final para 1 L de água ultrapura. Após a solidificação do gel, o pente foi retirado cuidadosamente. Em seguida as amostras foram diluídas no tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25 µL de azul de bromofenol) para 1:6 e em seguida foram depositadas nos poços. Foi utilizado como tampão de corrida, na preparação da eletroforese, a solução de TAE 1 X de modo que esta solução cobrisse completamente o gel previamente preparado e que foi posicionado na cuba de

eletroforese. Os eletrodos foram conectados e a eletroforese teve a duração de 60 minutos numa amperagem de 400 W e 90 V. Para a visualização do DNA, foi necessário corar o gel que foi submerso por 5 minutos, numa solução de brometo de etídio (EtBr) diluída e após o mesmo foi descorado em água destilada por 10 minutos, para eliminar o excesso de corante. Logo após este procedimento, o gel foi visualizado em um fotodocumentador sob luz ultravioleta.

3.6. Purificação das amostras amplificadas por PCR

A purificação das amostras foi realizada utilizando o kit "PCR Purification Kit" (Cellco), seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, 250 µL do tampão de ligação foram adicionados a 50 µL da amostra de DNA, misturando bem para garantir a homogeneização. Em seguida, uma coluna de centrifugação (Spin Column) foi posicionada em um microtubo de 2 mL, e 100 µL do tampão de ativação foram adicionados à coluna, seguida de centrifugação a 10000 g por 30 segundos. Após essa etapa, a amostra preparada foi transferida para a coluna e submetida a nova centrifugação a 10000 g por 30 segundos, descartando o sobrenadante. A seguir, 700 µL do tampão de lavagem foram adicionados à coluna, que foi centrifugada novamente a 10000 g por 30 segundos. Para garantir a remoção completa de resíduos do tampão de lavagem, uma segunda centrifugação foi realizada por 2 minutos sob as mesmas condições. Por fim, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL. Para a eluição do DNA, 40 µL do tampão de eluição foram adicionados à coluna, seguidos por uma centrifugação a 10000 g por 1 minuto. O DNA eluído foi então recuperado para uso posterior.

3.7. Digestão das amostras que foram amplificadas e purificadas

A seleção das enzimas de restrição foi realizada com base no sítio de restrição presente no vetor pEX18Ap. Após a purificação das amostras de DNA e do vetor pEX18Ap, ambos foram submetidos à digestão com diferentes enzimas de restrição, conforme descrito a seguir. O primeiro par de oligonucleotídeos do gene *gpx2* (PA14_47550_DEL_HindIII_L e PA14_47550_DEL_XbaI_R) e o primeiro par do gene *gpx3* (PA14_53420_DEL_HindIII_L e PA14_53420_DEL_XbaI_R) foram digeridos com as enzimas HindIII e XbaI (ThermoFisher). A reação de digestão foi preparada utilizando 25 µL do produto de PCR, 5 µL do tampão Tango 1x, 1 µL da enzima HindIII 10U/µL, 0,5 µL da enzima XbaI 10 U/µL e 18,5 µL de água ultrapura, totalizando 50 µL

de volume final. O segundo par de oligonucleotídeos do gene *gpx2* (PA14_47550_DEL_XbaI_L e PA14_47550_DEL_BamHI_R) e o segundo par do gene *gpx3* (PA14_53420_DEL_XbaI_L e PA14_53420_DEL_BamHI_R) foram digeridos com as enzimas BamHI e XbaI (ThermoFisher). A mistura de digestão continha 25 µL do produto de PCR, 5 µL do tampão Tango 1x, 1 µL da enzima BamHI 10 U/µL, 1 µL da enzima XbaI 10 U/µL e 18 µL de água ultrapura, também totalizando 50 µL de volume final. O vetor pEX18Ap foi digerido com as enzimas BamHI e HindIII. A reação de digestão foi feita com 20 µL do vetor purificado (2 µg de DNA), 5 µL do tampão BamHI 1x, 1 µL da enzima HindIII 10 U/µL, 1 µL da enzima BamHI 10 U/µL e 23 µL de água ultrapura, totalizando 50 µL de volume final. As digestões foram incubadas a 37°C por 16 horas. Após esse período, as reações de digestão foram inativadas por aquecimento na temperatura de 65 °C por 15 minutos.

3.8. Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor pEX18Ap

Após a purificação, os fragmentos de DNA e o vetor pEX18Ap foram ligados utilizando o kit T4 DNA Ligase (ThermoFisher). Para os pares 1 e 2 do gene *gpx2*, a reação de ligação foi preparada utilizando 3 µL do 1º par de oligonucleotídeos (36,3 ng/µL), 4 µL do 2º par de oligonucleotídeos (26,6 ng/µL), 0,6 µL do vetor pEX18Ap (120,6 ng/µL), 2 µL do tampão T4 DNA Ligase 1x, 0,25 µL da enzima T4 DNA Ligase (1 U/µL) e 10,15 µL de água ultrapura estéril, totalizando 20 µL de volume final. Para os pares 1 e 2 do gene *gpx3*, a reação foi composta por 8 µL do 1º par de oligonucleotídeos (12,7 ng/µL), 8 µL do 2º par de oligonucleotídeos (14,3 ng/µL), 0,4 µL do vetor pEX18Ap (120,6 ng/µL), 2 µL do tampão T4 DNA Ligase 1x, 0,25 µL da enzima T4 DNA Ligase (1 U/µL) e 7,75 µL de água ultrapura estéril, também totalizando 20 µL. Após a montagem das reações, as amostras foram incubadas a 22°C por 2 horas e, em seguida, armazenadas a 4°C durante a noite. No dia seguinte, a enzima T4 DNA Ligase foi inativada pela incubação das amostras a 70°C por 5 minutos. Posteriormente, as ligações foram transformadas na linhagem de *E. coli* DH5α por meio de eletroporação.

3.9. Transformação de células competentes de *E.coli*

Uma alíquota de 1 µL de cada reação de ligação entre os produtos da PCR de *gpx2* ou de *gpx3* com o vetor pEX18Ap foi adicionada a 50 µL da linhagem *E. coli* DH5α competente. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm e

submetida a um pulso de voltagem utilizando o MicroPulser Electroporator (Bio-Rad Laboratories). O eletroporador foi configurado na opção "Ec2" para cubetas de 0,2 cm. Após garantir o posicionamento correto da cubeta na câmara, foi aplicado o pulso elétrico. Imediatamente após a eletroporação, a suspensão de células submetida ao pulso elétrico foi diluída em 950 µL de meio LB e incubadas sob agitação a 37°C por 1 hora para permitir sua recuperação. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio sólido contendo LB e Ampicilina (100 µg/mL) e incubada overnight a 37°C. A formação de colônias após a incubação indicou a eficácia da transformação.

3.10. Extração de DNA plasmidial (Miniprep)

Para verificar a eficácia da ligação entre os fragmentos de DNA e o vetor, foi realizado um protocolo de extração/isolamento do DNA plasmidial. As colônias resultantes da transformação foram cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) sob agitação a 175 rpm, overnight. No dia seguinte, 1,5 mL de cada cultura foi transferido para microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e o procedimento foi repetido para garantir uma maior concentração de células no pellet. Após o descarte do sobrenadante, 150 µL da Solução I (1 M glicose, 1 M Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M EDTA, água ultrapura) foram adicionados ao pellet, seguido de agitação em vórtex até completa homogeneização. Em seguida, 200 µL da Solução II (0,2 M NaOH, 1% SDS, água ultrapura) foram adicionados e misturados por inversão suave (10 vezes), até que a solução adquirisse uma aparência viscosa. Após isso, 300 µL da Solução III (Acetato de potássio 3 M) foram adicionados e a mistura foi novamente homogeneizada por inversão (10 vezes). A mistura foi então centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante resultante foi transferido cuidadosamente para um novo microtubo de 1,5 mL contendo 1000 µL de etanol 100%. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados novamente a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e 500 µL de etanol 70% foram adicionados ao pellet, seguido de uma nova centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, os tubos foram colocados em uma estufa à temperatura ambiente até que todo o etanol evaporasse completamente. O pellet seco foi então ressuspensão em 40 µL de TE contendo RNase A (20 µg/mL), garantindo a preservação do DNA plasmidial. Após a obtenção do DNA plasmidial, foi realizada a digestão das amostras e, em seguida,

a eletroforese em gel de agarose 1% que possibilitou observar se o tamanho dos fragmentos e do vetor estavam conforme o tamanho esperado, garantindo que a ligação entre o vetor e os fragmentos de DNA ocorreu de forma correta.

3.11. Obtenção de mutantes nulos $\Delta osmC$ e $\Delta osmC/\Delta gpx$

Os mutantes simples não polares de *P. aeruginosa* nos genes *ohr* e *gpx* foram obtidas previamente através de recombinação homóloga (Meireles, D.A., dados não publicados). O mutante para o gene *osmC* foi obtido por recombinação homóloga a partir da construção pEX18Ap_del_ *osmC*, já disponível no grupo (Meireles, D.A., dados não publicados). A construção pEX18Ap_del_ *osmC* também foi utilizada para a obtenção do mutante duplo $\Delta osmC/\Delta gpx$. As construções usadas na deleção de cada gene (clonadas do plasmídeo suicida pEX18Ap, pEX18Ap_del_ *osmC*, pEX18Ap_del_ *ohr* e pEX18Ap_del_ *gpx*) foram usadas para a obtenção dos mutantes duplos, $\Delta ohr/\Delta osmC$, $\Delta ohr/\Delta ogpx$ e $\Delta osmC/\Delta gpx$ e triplo $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$. Para a obtenção dos mutantes foi feita a conjugação entre a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* e *E. coli* S17. Essa conjugação foi feita em placa de meio LB, sendo necessário adicionar uma quantidade maior de *E. coli* em relação à *P. aeruginosa* para otimizar o processo. Após algumas horas de incubação, as culturas de *P. aeruginosa* e *E. coli* S17 pEX18Ap contendo os fragmentos relacionados a deleção dos diferentes genes de interesse foram plaqueadas em meio LB contendo carbenicilina (300 µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL). Apenas as células de *P. aeruginosa* que receberam o plasmídeo pEX18Ap da linhagem conjugativa de *E. coli* foram capazes de crescer neste meio seletivo. Estas células, chamadas de transconjugantes, realizaram o primeiro evento de recombinação homóloga, isto é, tiveram a integração do vetor pEX18Ap + fragmentos ao cromossomo de *P. aeruginosa*. A linhagem merodiplóide foi cultivada em meio LB sem antibiótico para favorecer o segundo evento de recombinação homóloga. Durante essa etapa, conhecida como crossover duplo, a estrutura do plasmídeo é excisada do cromossomo por meio de um evento de recombinação. Após o cultivo inicial em meio LB, foi realizada uma diluição seriada da suspensão de células, e duas diluições foram plaqueadas em meio LB suplementado com 10% de sacarose. As colônias que cresceram nesse meio indicaram a ocorrência do segundo evento de recombinação homóloga, evidenciado pela perda da expressão do gene *sacB*. A confirmação das mutações foi realizada por PCR, utilizando-

se oligonucleotídeos específicos para cada região do cromossomo submetida às etapas de recombinação homóloga.

3.12. Confirmação do genótipo das linhagens de *P. aeruginosa* por PCR de colônia

Para a PCR foram utilizados oligonucleotídeos descritos anteriormente na tabela 2 específicos para amplificar a região correspondente aos genes *ohr*, *osmC* e *gpx* no cromossomo de *P. aeruginosa*. Para a extração do DNA, foi necessário inicialmente a seleção de uma colônia isolada em placa de LB ágar. Usando uma ponteira a colônia foi selecionada tocando levemente na placa e logo após colocada em um microtubo estéril contendo 20 µL da solução de extração (Tris-HCl pH 8.0 10 mM). A amostra foi aquecida a 100°C por 5 minutos para lisar as células e promover a liberação do DNA e em seguida centrifugada a 4°C por 10 minutos em 12000 rpm. Posteriormente foi preparada a mistura da PCR (MIX) que continha os seguintes componentes: água ultrapura, dNTPs (0,2 mM), DMSO (5%), oligonucleotídeos, taq DNA polimerase, MgCl₂ (25 mM) e por fim 1 µL do DNA molde extraído a partir de uma colônia isolada conforme descrito acima. O volume final da reação foi ajustado para 50 µL. O ciclo para amplificação utilizado consistiu em uma desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização a 60°C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após o término do ciclo, a verificação da amplificação dos produtos da PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito anteriormente. Após a solidificação do gel, o pente foi retirado cuidadosamente. Em seguida as amostras foram diluídas no tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25 µL de azul de bromofenol) para 1:6 e em seguida foram depositadas nos poços. Foi utilizado como tampão de corrida, na preparação da eletroforese, a solução de TAE 1 X de modo que esta solução cobrisse completamente o gel previamente preparado e que foi posicionado na cuba de eletroforese. Os eletrodos foram conectados e a eletroforese teve a duração de 60 minutos numa amperagem de 400 W e 90 V. Para a visualização do DNA, foi necessário corar o gel que foi submerso por 5 minutos, numa solução de brometo de etídio (EtBr) diluída e após o mesmo foi descorado em água destilada por 10 minutos, para eliminar o excesso de corante. Logo após este procedimento, o gel foi visualizado em um fotodocumentador sob luz ultravioleta.

3.13. Construção dos plasmídeos para complementação dos mutantes nulos nos genes *ohr*, *gpx* e *osmC*

Os fragmentos correspondentes aos genes *ohr*, *gpx1*, *gpx2*, *gpx3* e *osmC* foram amplificados por PCR com seus promotores nativos a partir do DNA genômico da linhagem PA14 utilizando os primers desenhados para este fim, clonados em sítios de restrição BamHI/HindIII do vetor mini-CTX2 e sequenciado, originando as construções mini-CTX2 *pohr*, *posmC*, *pgpx1*, *pgpx2* e *pgpx3*.

3.14. Curvas de crescimento

Neste estudo, as linhagens foram cultivadas em diferentes meios de cultura, incluindo o meio LB (Lysogenic Broth) descrito por Bertani (1952) e o meio mínimo M9, conforme Miller (1972), suplementado com diversas fontes de C. Composição do meio LB: 10 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl e 5 g/L de extrato de levedura (Bertani, 1951). Composição do meio mínimo M9: 20 mM de NH₄Cl; 12 mM de Na₂HPO₄; 22 mM de KH₂PO₄; 8.6 mM de NaCl; 2 mM de MgSO₄ e 40 μM de CaCl₂ (Miller, 1972). A curva de crescimento foi realizada em placas de 96 poços e o crescimento monitorado na leitora de placas Biotek Synergy H1 configurada para leituras a cada 15 min no modo absorvância no comprimento de onda de DO_{600nm} com rotação de 240 rpm. As culturas foram iniciadas através da diluição de um pré-inóculo, previamente crescido em meio LB ou meio mínimo, resultando em uma densidade óptica inicial DO_{600nm} 0,05 ou 0,1. A concentração de cada fonte de C utilizada para o crescimento em meio mínimo foram: glicose (2% ou 111 mM), citrato (40 mM), itaconato (40 mM), succinato (40 mM) e casaminoácido (10%). As soluções-estoque de ácido itacônico e succínico tiveram seus pHs ajustados para 6,8 antes de serem adicionados ao meio M9. Além disso, foi utilizado sacarose 0,5 M para avaliar o estresse osmótico das diferentes linhagens.

3.15. Quantificação da solução de H₂O₂ e NaOCl

A quantificação de H₂O₂ foi realizada por espectrofotometria medindo sua absorvância intrínseca em água ultrapura ($\epsilon_{240\text{ nm}} = 43,6\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) (Noble e Gibson, 1970). A concentração da solução de NaOCl (Topbel 5%) foi determinada

espectrofotometricamente, medindo sua absorvância intrínseca em hidróxido de potássio 200 mM (ϵ 292 nm = 350 M⁻¹ cm⁻¹) (KETTLE e WINTERBOURNE, 1994).

3.16. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Neste experimento, as linhagens de *P. aeruginosa* (wt, mutantes simples, duplos e triplo) foram inicialmente cultivadas em Erlenmeyer contendo meio LB a 37 °C, sob agitação de 300 rpm, até alcançarem uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,5. Em seguida, as culturas foram diluídas em meio LB para ajustar a DO_{600nm} para 0,1. Posteriormente, foram adicionados 20 µL de t-BOOH em diferentes concentrações a uma placa de 96 poços, seguidos de 180 µL das culturas ajustadas. A placa foi então incubada a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, por 16 horas. As concentrações de t-BOOH avaliadas variaram de 0 mM a 1 mM, sendo realizadas duas réplicas para cada concentração testada. A avaliação da CIM foi feita utilizando uma leitora de placas Biotek Synergy H1 com uma absorvância no comprimento de onda de 600 nm. Os valores de cada resultado foram avaliados e uma média dos experimentos foi utilizada como base para a confecção dos gráficos demonstrados na Figura 22 e Figura 23.

3.17. Ensaio de *Spot assay*

A linhagem selvagem e os mutantes de *P. aeruginosa* foram cultivados em frascos Erlenmeyer contendo meio LB a 37°C, sob agitação constante de 300 rpm, até atingirem uma DO_{600nm} de 1. Posteriormente, para o ensaio com tBOOH, foram adicionados a um microtubo de 1,5 mL: 50 µL de tBOOH a 0,5 mM, 450 µL de MgSO₄ a 10 mM e 500 µL das culturas ajustadas para DO_{600nm} 0,5, totalizando um volume final de 1 mL. Para o ensaio com H₂O₂, foram adicionados a um microtubo de 1,5 mL: 100 µL de H₂O₂ a 10 mM, 400 µL de MgSO₄ a 10 mM e 500 µL das culturas ajustadas para DO_{600nm} 0,5, totalizando um volume final de 1 mL. Para o ensaio com NaOCl, foram testadas diferentes concentrações, adicionando-se: 100 µL de NaOCl a 0,1 mM, 200 µL a 0,2 mM, 300 µL a 0,3 mM, e assim sucessivamente. Além disso, foram acrescentados 500 µL das culturas ajustadas para DO_{600nm} 0,5, e o volume restante foi completado com MgSO₄ a 10 mM, totalizando 1 mL. As amostras foram incubadas em um Thermomixer (Eppendorf) a 37°C, sob agitação constante de 300 rpm, por 30 minutos. Após a incubação, os oxidantes foram removidos pela lavagem das células com 1 mL de meio LB estéril. Após a lavagem,

o pellet foi ressuspensão em 1 mL de meio LB e a suspensão de células submetida a diluições seriadas. Em seguida, alíquotas de 10 µL de cada diluição, de 10⁻¹ a 10⁻⁶, foram inoculadas em duplicata em placas contendo LB-ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por 16 horas, e o crescimento das colônias foi avaliado. A ausência de crescimento ou o crescimento reduzido sob determinadas condições foram interpretados como indicativos de sensibilidade da linhagem testada. Este experimento teve como objetivo avaliar a capacidade de crescimento da linhagem selvagem de *P. aeruginosa* (wt) e dos mutantes simples (Δohr , Δgpx e $\Delta osmC$), bem como dos mutantes duplos e triplo, quando desafiados com diferentes agentes oxidativos, como tBOOH, H₂O₂ e NaOCl.

3.18. Avaliação da virulência de células planctônicas de *P. aeruginosa* em *G. mellonella*

Antes de realizar os ensaios de infecção com *G. mellonella*, foi determinada a dose letal necessária para o experimento. O objetivo dessa etapa foi identificar a quantidade de células de *P. aeruginosa* da linhagem selvagem necessária para causar a morte de 50% dos hospedeiros experimentais (*G. mellonella*), estabelecendo assim a DL₅₀. Para isso, foi necessário correlacionar a concentração de células por mL com a DO_{600nm}. As culturas de *P. aeruginosa* foram inicialmente crescidas até atingir uma DO_{600nm} de 3, sendo então diluídas para uma DO_{600nm} de 0,1 em solução de MgSO₄ a 10 mM. A partir desta diluição inicial, foi realizada uma série de diluições seriadas, e cada diluição foi plaqueada em meio LB para quantificar as unidades formadoras de colônia (UFCs).

As culturas bacterianas foram cultivadas em meio LB até atingirem uma DO_{600nm} de 3, sendo posteriormente diluídas para uma DO_{600nm} de 0,1. A partir dessa concentração, as suspensões foram preparadas em solução de MgSO₄ a 10 mM. Um inóculo de 10 µL das suspensões bacterianas na diluição de 10⁻⁶ foi injetado na última proleg inferior direita de lagartas no 6º instar. Como controle, lagartas foram inoculadas apenas com solução de MgSO₄ a 10 mM, permitindo o monitoramento do estado de saúde de *G. mellonella* ao longo do experimento. Cada grupo experimental contou com 15 lagartas, com peso médio de 280-320 mg. Todos os procedimentos foram realizados em cabine de segurança biológica, seguindo normas de biossegurança, e utilizando luvas resistentes à perfuração (HexArmor modelo SharpsMaster II 9014). Após a inoculação, as lagartas foram

acondicionadas em placas de Petri e incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica. A mortalidade foi registrada a cada 24 horas durante 7 dias. Lagartas eram consideradas mortas quando não apresentavam nenhum movimento ao serem tocadas. O experimento foi encerrado quando todas as lagartas do grupo experimental morreram ou se transformaram em pupas. A inoculação foi realizada utilizando seringas de insulina (modelo BD Ultra-Fine 100 UI) Agulha 8 x 0,3 mm de calibre de 30G), escolhidas devido à sua precisão e facilidade de manuseio.

3.19. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com base em pelo menos três réplicas biológicas para cada experimento, cada uma contendo triplicatas técnicas. Os testes estatísticos foram escolhidos de acordo com o experimento de modo a evitar a inserção de vieses que comprometessem a interpretação dos resultados. A análise dos dados foi conduzida utilizando o software GraphPad Prism. No teste de probabilidade de sobrevivência foi utilizado o teste de Log-Rank feito no software GraphPad Prism.

4. RESULTADOS

4.1. Construção dos plasmídeos pEX18Ap_del_gpx2 e pEX18Ap_del_gpx3

Inicialmente, oligonucleotídeos foram desenhados para as regiões que flanqueiam os genes a serem deletados. Posteriormente, foi realizada uma PCR para amplificar essas regiões de interesse. Os resultados apresentados pela Figura 12 indicaram a amplificação bem-sucedida de fragmentos únicos e de tamanho esperado, confirmando a adequação dos oligonucleotídeos desenhados (tabela 1). Após a amplificação, os produtos gerados foram purificados, digeridos com enzimas de restrição e ligados ao vetor pEX18Ap. O vetor suicida pEX18Ap é amplamente utilizado na manipulação genética de *P. aeruginosa* já que não se replica nesta bactéria, permitindo que ocorra a recombinação das regiões homólogas ao cromossomo bacteriano que foram clonadas no vetor. Além disso, ele apresenta: (1) um cassete de resistência a um β -lactâmico; (2) um marcador *sacB*, que permite a contra-seleção em meios contendo sacarose; (3) um alelo *lacZ α* para triagem azul-branco em meios suplementados com X-Gal; (4) um *oriT*, que possibilita a

transferência do plasmídeo mediada por conjugação; e (5) um sítio múltiplo de clonagem que permite a clonagem dos fragmentos de DNA de interesse. (HOANG et al., 1998).

Posteriormente, a reação de ligação entre os fragmentos e o vetor foram transformadas em células de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes, conforme descrito por HANAHAN (1983). A eficácia desse processo foi confirmada por análises de digestões enzimáticas realizadas de plasmídeos extraídos das colônias obtidas após o processo de transformação, onde a digestão com HindIII e BamHI, liberou um fragmento de aproximadamente 2000 pb, correspondente ao fragmento originado da união dos fragmentos amplificados *downstream* e *upstream* ao gene alvo, validando a clonagem no vetor pEX18Ap (Figura 13, raias 1 e 4, genes *gpx2* e *gpx3*, respectivamente). Adicionalmente, fragmentos de 1000 pb liberados nas digestões realizadas com combinações HindIII/XbaI (Figura 13, raias 2 e 5, genes *gpx2* e *gpx3*, respectivamente) ou BamHI/XbaI (Figura 13, raias 3 e 6, genes *gpx2* e *gpx3*, respectivamente) corroboraram a especificidade do processo de clonagem dos fragmentos. A presença de uma banda correspondente ao vetor pEX18Ap de 5842 pb, nas raias 1 e 2 e de 6842 pb, nas raias 2, 3, 5 e 6) do gel apresentado na Figura 13, indicou a integridade do vetor e a ausência de degradação durante os procedimentos experimentais. A correta ligação entre os fragmentos amplificados e o vetor foi um passo essencial na construção de mutantes, pois garante que as sequências-alvo estão posicionadas de maneira apropriada para a substituição genética nas linhagens de estudo.

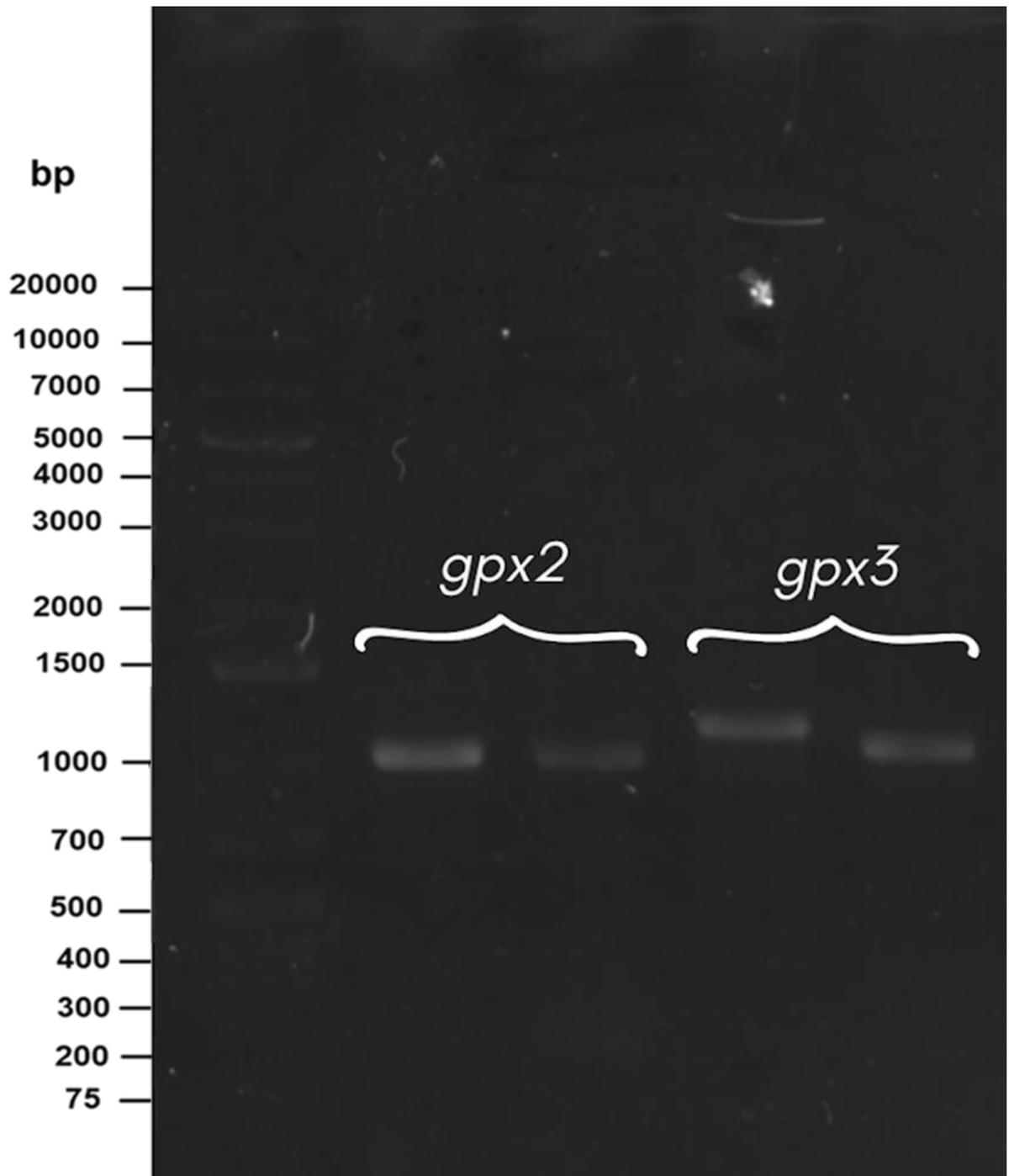


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE 1 X mostrando a amplificação dos fragmentos que flanqueiam as regiões à montante e à jusante dos genes

gpx2

e

gpx3.

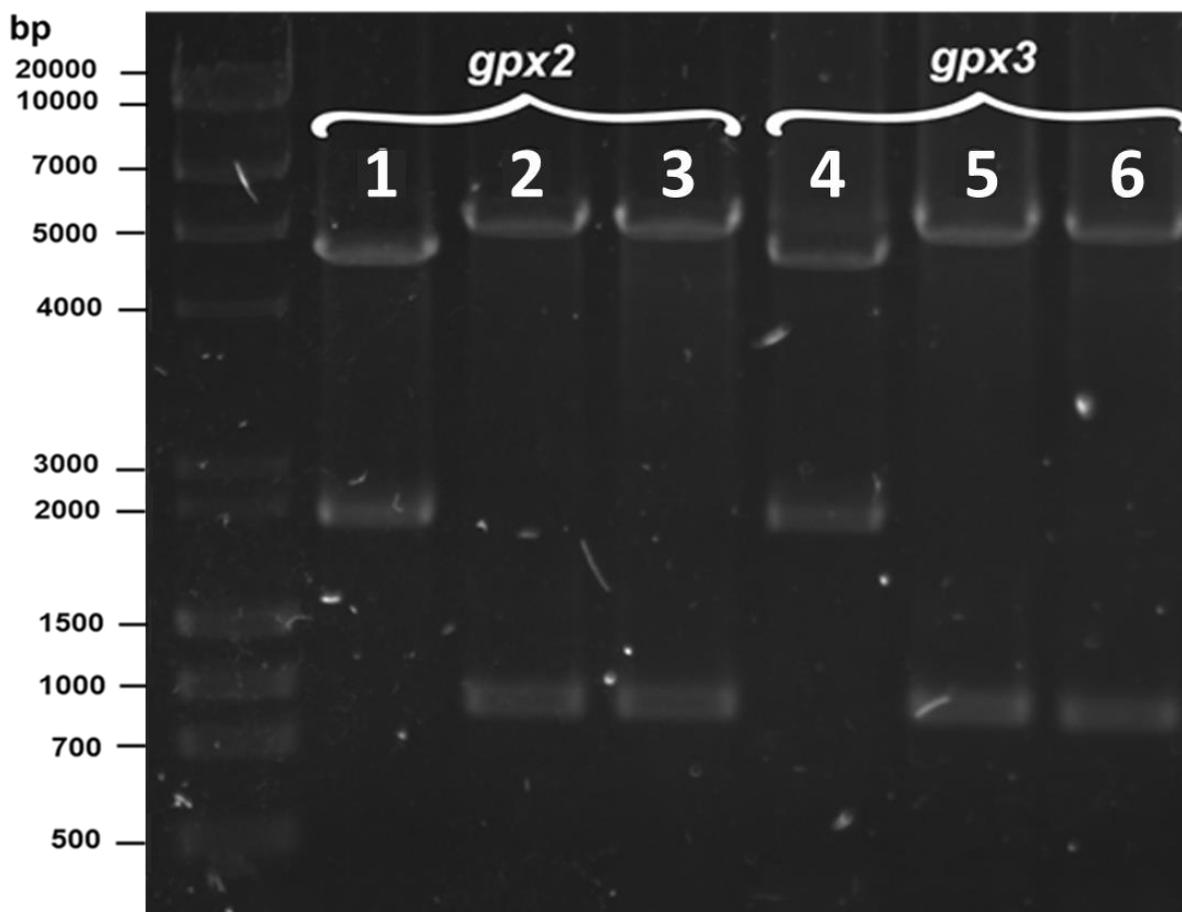


Figura 13 : Eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE 1 X mostrando o padrão de digestão das construções pEX18Ap-*gpx2* (raias 1, 2 e 3) e pEX18Ap-*gpx3* (raias 4, 5 e 6). As construções pEX18Ap-*gpx2* e pEX18Ap-*gpx3* foram digeridas com as enzimas: HindIII/BamHI (raias 1 e 4), onde foi possível observar a amplificação de um produto de PCR com um tamanho esperado de 2000 pb; HindIII/XbaI (raias 2 e 5), onde foi possível observar a amplificação de um produto de PCR com um tamanho esperado de 1000 pb; BamHI/XbaI (raias 3 e 6), onde foi possível observar a amplificação de um produto de PCR com um tamanho esperado de aproximadamente 1000 pb.

4.2. Obtenção dos mutantes $\Delta osmC$ e $\Delta osmC/\Delta gpx$ a partir da construção pEX18Ap-del-*osmC*

O mutante para o gene *osmC* foi obtido por recombinação homóloga utilizando a construção pEX18Ap-del-*osmC*, previamente desenvolvida pelo grupo (Meireles, D.A., dados não publicados). Para esse procedimento, a linhagem de *E. coli* S17, carregando a construção pEX18Ap-del-*osmC*, foi cultivada em meio seletivo com ampicilina (100

µg/mL). Em seguida, foi realizada a conjugação entre a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* e *E. coli* S17 pEX18Ap_del_oscC. Essa conjugação foi feita em placa de meio LB, sendo necessário adicionar uma quantidade maior de *E. coli* em relação à *P. aeruginosa* para otimizar o processo. Após algumas horas de incubação, as culturas de *P. aeruginosa* e *E. coli* S17 pEX18Ap_del_oscC foram plaqueadas em meio LB contendo carbenicilina (300 µg/mL) e ácido nalidíxico (20 µg/mL). Apenas as células de *P. aeruginosa* que receberam o plasmídeo pEX18Ap_del_oscC da linhagem conjugativa de *E. coli* foram capazes de crescer neste meio seletivo. Estas células, chamadas de transconjugantes, realizaram o primeiro evento de recombinação homóloga, isto é, tiveram a integração do pEX18Ap_del_oscC ao cromossomo de *P. aeruginosa*. De fato, ao analisar o genótipo de um dos transconjugantes obtidos (Figura 15, raia 2), podemos observar o resultado do primeiro evento de recombinação, que foi evidenciado pela amplificação de dois fragmentos distintos: um correspondente à amplificação da região do cromossomo selvagem (~1000 pb, Figura 15 raia 1) e outro correspondente à amplificação da mesma região contendo a deleção (~684 pb, Figura 15 raia 3), portanto este transconjugantes representam um merodiplóide. Esse processo foi crucial para obter resistência ao marcador de antibiótico codificado no vetor suicida pEX18Ap, uma vez que plasmídeos desse tipo não podem se replicar em *P. aeruginosa*. Esse evento de integração, denominado cruzamento único, ocorreu pela inserção do vetor no cromossomo bacteriano em regiões homólogas. (HMELO et al., 2015).

Em seguida, a linhagem merodiplóide foi cultivada em meio LB sem antibiótico para favorecer o segundo evento de recombinação homóloga. Durante essa etapa, conhecida como crossover duplo, a estrutura do plasmídeo é excisada do cromossomo por meio de um evento de recombinação. O mutante resultante do crossover duplo é isolado por contra-seleção, que consiste em selecionar células que perderam um gene que confere sensibilidade a determinado agente presente no meio de cultivo. Embora existam diferentes métodos de contra-seleção (BOCHNER et al., 1980), muitos vetores de troca alélica utilizados em bactérias Gram-negativas, incluindo aqueles aplicados em *P. aeruginosa*, codificam o gene *sacB* de *Bacillus subtilis*. O gene *sacB* codifica a levansucrase, uma enzima que catalisa a hidrólise da sacarose e a síntese de polissacarídeos compostos de alto peso molecular. Embora a base molecular da toxicidade permaneça pouco compreendida, sabe-se que, em bactérias Gram-negativas, a atividade da levansucrase é localizada principalmente no periplasma, o que confere

sensibilidade aguda à sacarose (RIED e COLLMER, 1987; STEINMETZ et al., 1983; GAY et al., 1985).

Após o cultivo inicial em meio LB, foi realizada uma diluição seriada da suspensão de células, e duas diluições foram plaqueadas em meio LB suplementado com 10% de sacarose. As colônias que cresceram nesse meio indicaram a ocorrência do segundo evento de recombinação homóloga, evidenciado pela perda da expressão do gene *sacB*, como mostrado na Figura 14. No entanto, a contra-seleção com sacarose pode resultar na perda tanto do alelo selvagem quanto do mutante no cromossomo, exigindo a realização de PCR para confirmar a correta obtenção do mutante. Esse processo resultou em duas possíveis configurações genéticas: (i) o retorno ao genótipo parental, evidenciado pela amplificação de um único produto de PCR de ~1000 pb, conforme foi observado na raia 4 da Figura 15; (ii) fixação da região que apresentou a deleção, confirmada pela amplificação de um único produto de PCR de ~684 pb, conforme foi evidenciado na raia 3 da Figura 15. Portanto, a colônia que apresentou amplificação de um fragmento único de ~684 pb, ou seja, que apresentou a deleção na região desejada foi armazenada no – 70 °C para posterior caracterização fenotípica. Esta triagem final permitiu a confirmação da obtenção do mutante $\Delta osmC$ e demonstrou a eficiência e precisão desta estratégia de edição genômica.

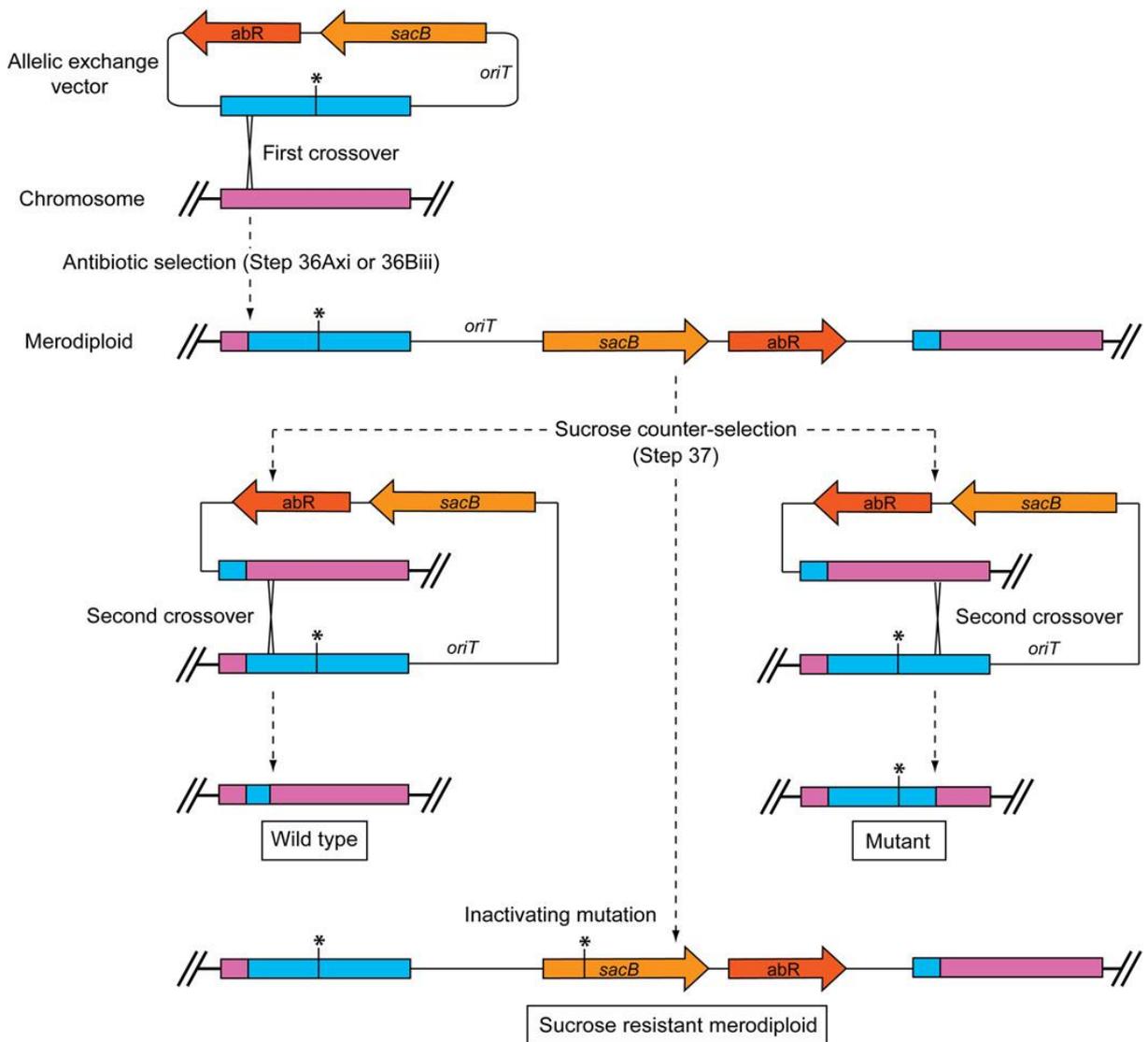


Figura 14: Diagrama ilustrativo do evento de recombinação homóloga. As proteínas da célula hospedeira promovem a recombinação homóloga entre o vetor de troca alélica e o cromossomo receptor. O asterisco indica qualquer modificação no DNA, incluindo inserções, deleções ou substituições de bases, que podem variar de grandes deleções (>10 kb) a alterações mínimas de um único nucleotídeo. As linhas tracejadas representam os produtos da recombinação homóloga selecionados em cada uma das duas etapas principais do processo. Na primeira etapa, logo após a conjugação, a seleção por antibióticos (Etapa 36) permite a identificação de merodiploides. Em seguida, a contra-seleção por sacarose (Etapa 37) promove a seleção de eventos de recombinação dupla. O desfecho dessa segunda recombinação depende do local físico em que ocorre: ela pode restaurar o alelo do tipo selvagem ou fixar o alelo mutante no cromossomo bacteriano. Um terceiro resultado, menos frequente, é o escape da contra-seleção, que leva à

formação de um merodiploide resistente tanto à sacarose quanto aos antibióticos. Esse escape ocorre devido a uma mutação inativadora no gene *sacB*. Fonte: Hmelo et al., 2015.

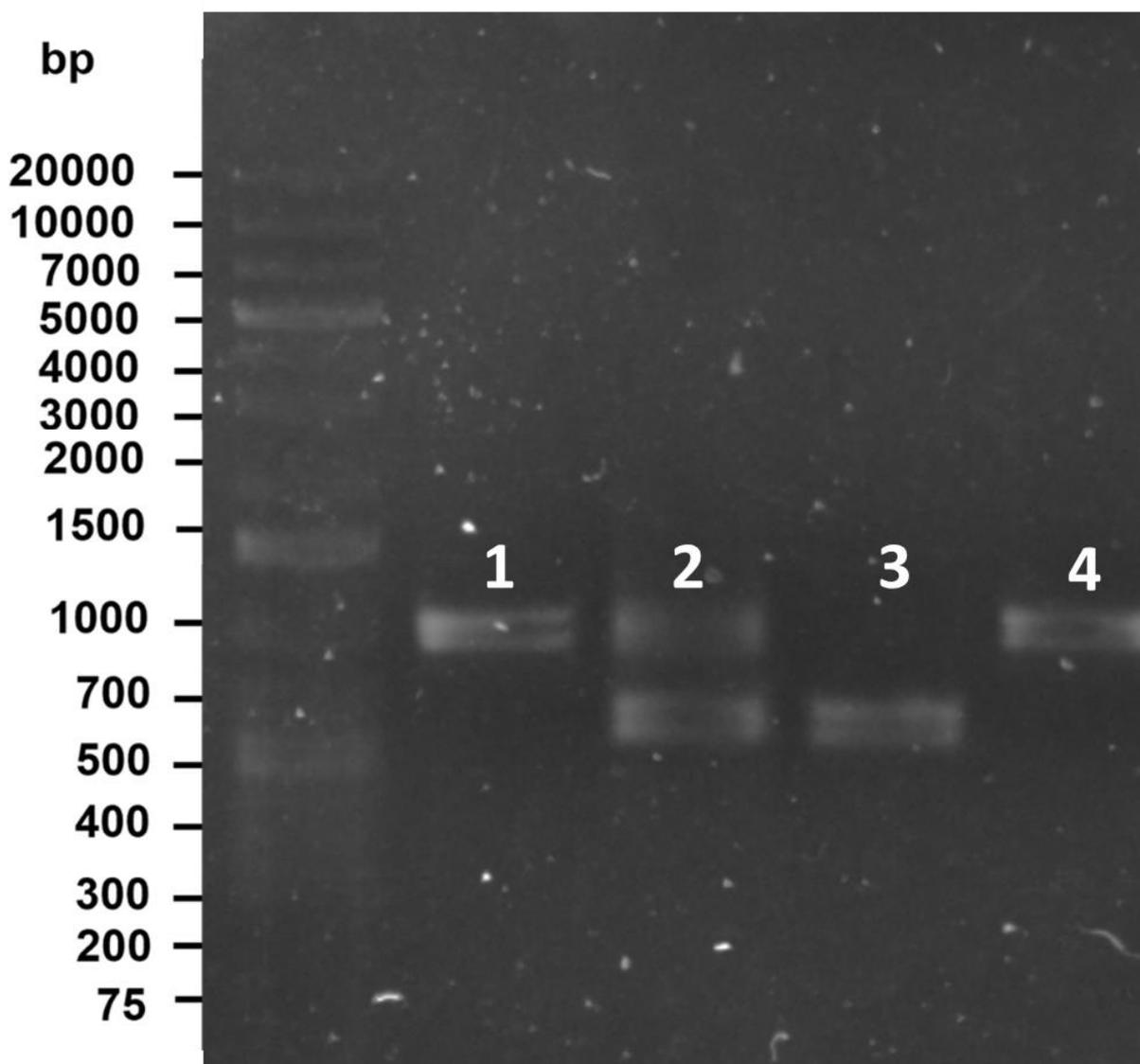


Figura 15: Confirmação do mutante nulo $\Delta osmC$ obtido por recombinação homóloga através da PCR. A eletroforese em gel de agarose a 1% foi utilizada para monitorar e selecionar colônias resultantes do processo de recombinação homóloga para a obtenção do mutante $\Delta osmC$. Raia 1: Produto da PCR utilizando DNA molde extraído da linhagem selvagem. Como esperado, observou-se a amplificação de uma única banda de aproximadamente 1000 pb; Raia 2: Produto da PCR de uma colônia transconjugante obtida após conjugação e seleção em LB + Carb (300 $\mu\text{g/mL}$). Foram observadas duas bandas, conforme esperado: uma de ~1000 pb, correspondente à região do cromossomo selvagem, e outra entre 500 e 700 pb, indicando a presença da região cromossômica contendo a deleção da região codificante do gene *osmC*; Raia 3: Produto da PCR de uma

colônia que carregava a mutação $\Delta osmC$, evidenciado pela ausência da banda de 1000 pb e pela presença exclusiva da banda menor (500–700 pb); Raia 4: Produto da PCR de uma colônia que apresentou o genótipo selvagem, ou seja, o segundo evento de recombinação levou ao retorno do estado selvagem, caracterizado pela amplificação de uma única banda de 1000 pb, correspondente à região codificante intacta de *osmC*, sem a deleção.

A linhagem de *E. coli* S17 contendo a construção pEX18Ap_del_ *osmC* também foi utilizada para a obtenção do mutante duplo $\Delta osmC/\Delta gpx$. Nesse caso, em vez de utilizar a linhagem selvagem de *P. aeruginosa*, o mutante simples Δgpx foi empregado como linhagem receptora. A conjugação entre *E. coli* S17, portadora da construção pEX18Ap_del_ *osmC*, e o mutante Δgpx permitiu a inserção do plasmídeo no genoma de *P. aeruginosa*, resultando na geração do mutante duplo $\Delta osmC/\Delta gpx$. Na Figura 16, observa-se o resultado da amplificação de diferentes colônias utilizando oligonucleotídeos direcionados à região do gene *osmC*. Na raia 1, a linhagem selvagem foi utilizada como molde, com a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1000 pb. Nas raias 2, 3, 4 e 5, foram selecionadas colônias após o segundo evento de recombinação, apresentando um fragmento de cerca de 500 pb, confirmando a ausência do gene *osmC*.

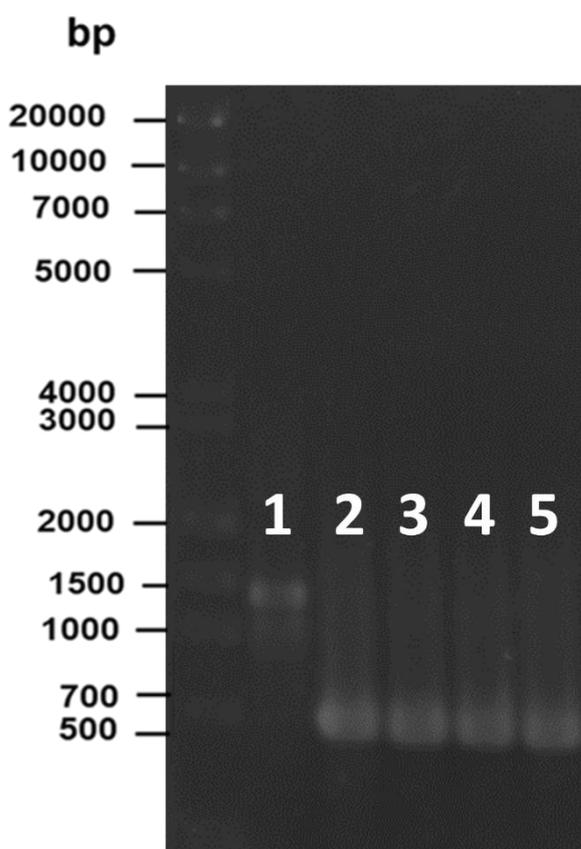


Figura 16: Confirmação do mutante nulo $\Delta osmC/\Delta gpx$ obtido por recombinação homóloga através da PCR. A eletroforese em gel de agarose a 1% foi empregada para verificar e selecionar as colônias resultantes do processo de recombinação homóloga na obtenção do mutante $\Delta osmC/\Delta gpx$. Na raia 1, observa-se a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1000 pb, relacionado a uma colônia proveniente de uma placa da linhagem selvagem, indicando a presença do gene *osmC*. Nas raias 2, 3, 4 e 5, é possível observar a amplificação de um fragmento de cerca de 500 pb, confirmando a ausência do gene *osmC*.

4.3. Confirmação do genótipo das linhagens de *P. aeruginosa* por PCR de colônia

O passo seguinte consistiu na verificação do genótipo das linhagens selvagem, mutantes nulos simples, mutantes duplos e mutante triplo por meio de PCR de colônia. Esse método é amplamente utilizado por sua eficiência em detectar rapidamente a presença ou ausência de sequências específicas de DNA em colônias isoladas, sem a necessidade de extração e purificação do DNA genômico (BERGKESSEL e GUTHRIE, 2013). Para isso, foram empregados pares de oligonucleotídeos específicos direcionados às regiões dos genes *gpx*, *ohr* e *osmC*. Na linhagem selvagem de *P. aeruginosa*, a amplificação por PCR com oligonucleotídeos específicos para os genes *gpx*, *ohr* e *osmC* resultou em fragmentos de aproximadamente 1000 pb (Figura 17, raias 1, 2 e 3, respectivamente), confirmando a presença íntegra desses genes na forma selvagem. Nos mutantes simples, a PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos revelou fragmentos reduzidos: 549 pb para Δgpx , 615 pb para Δohr e 684 pb para $\Delta osmC$ (Figura 17, raias 4, 8 e 12, respectivamente), correspondentes à deleção das respectivas regiões cromossômicas. Adicionalmente, a PCR em regiões não deletadas nas linhagens mutantes gerou fragmentos de cerca de 1000 pb, confirmando a manutenção da integridade dos genes restantes no cromossomo (Figura 17, linhagem Δgpx raias 5 e 6, linhagem Δohr nas raias 7 e 9, linhagem $\Delta osmC$, raias 10 e 11). Esses resultados confirmam que a estratégia de deleção foi bem-sucedida para os mutantes simples, com a ausência específica dos genes-alvo e a manutenção dos demais genes no genoma. Essa verificação genotípica é essencial para garantir a confiabilidade dos experimentos subsequentes, nos quais os fenótipos observados poderão ser diretamente relacionados às alterações genéticas realizadas.

Esse método também foi aplicado para a obtenção e caracterização dos mutantes duplos e triplo, sendo possível identificar a ausência dos genes de interesse por meio de fragmentos com tamanhos reduzidos em comparação aos fragmentos que indicam a presença dos genes. No resultado da Figura 18 é possível verificar que para o mutante duplo $\Delta ohr/\Delta osmC$, foram observados três fragmentos: um com 615 pb, relacionado à amplificação da região do gene *ohr* (Figura 18 raia 8); outro com 684 pb, correspondente à região do gene *osmC* (Figura 18 raia 9); e um terceiro fragmento de aproximadamente 1000 pb, relacionado à região do gene *gpx* (Figura 18 raia 7). Esses resultados confirmaram a ausência dos genes *ohr* e *osmC*, bem como a presença do gene *gpx*. No caso do mutante duplo $\Delta ohr/\Delta gpx$, os fragmentos obtidos foram de 615 pb e 549 pb, indicando a ausência dos genes *gpx* e *ohr*, respectivamente (Figura 18 raias 4 e 5). Além disso, foi observado um fragmento de cerca de 1000 pb, correspondente ao gene *osmC* (Figura 18 raia 6), confirmando a ausência dos genes *ohr* e *gpx*, assim como a presença do gene *osmC*. O mutante triplo, foram detectados três fragmentos: o primeiro, com 549 pb, relacionado à ausência do gene *gpx*; o segundo, com 615 pb, correspondente à ausência do gene *ohr*; e o terceiro, com 684 pb, indicando a ausência do gene *osmC* (Figura 18 raias 10, 11, 12). Esses resultados confirmaram a ausência simultânea dos três genes. Com base nesses dados, foi possível confirmar o genótipo das linhagens utilizadas nos ensaios, o que permitiu dar continuidade aos experimentos propostos neste estudo.

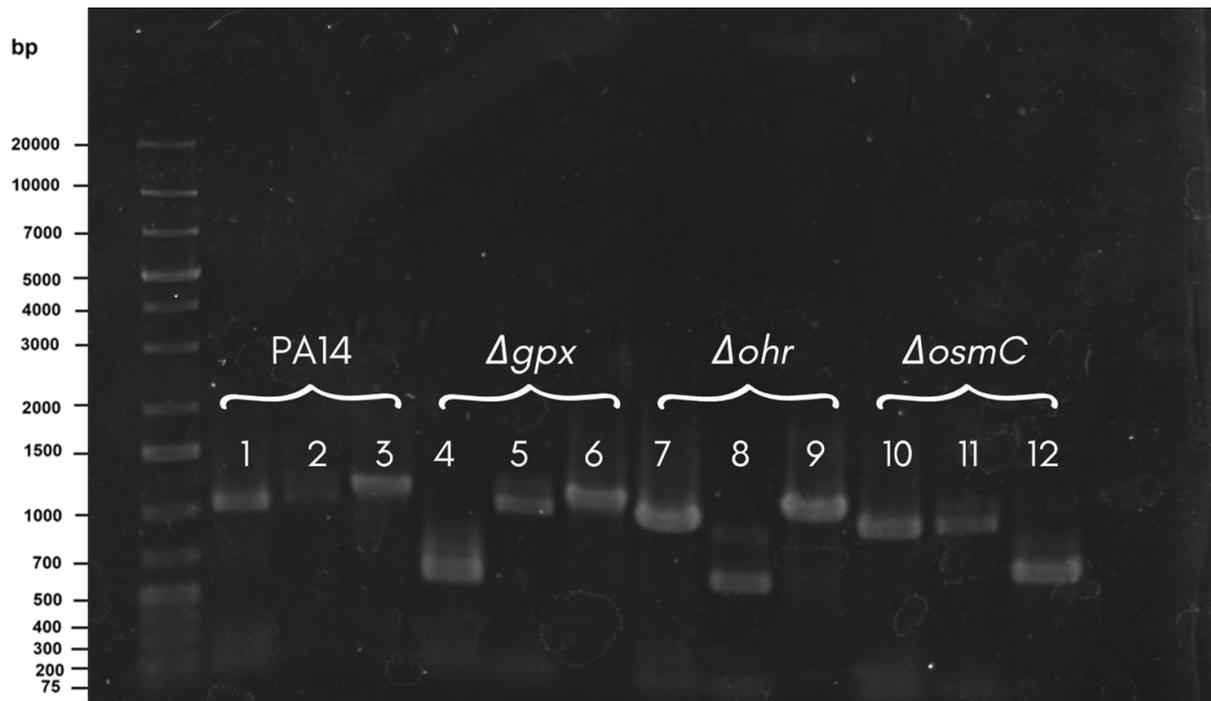


Figura 17: Confirmação do genótipo dos mutantes simples Δgpx , Δohr e $\Delta osmC$, obtidos por recombinação homóloga, através da PCR. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR obtidos de colônias selecionadas após o segundo evento de recombinação, utilizando construções para deleção dos genes *gpx*, *ohr* e *osmC* clonados no vetor suicida pEX18Ap. As raias 1, 2 e 3 correspondem à amplificação da linhagem selvagem com oligonucleotídeos específicos para os genes *gpx*, *ohr* e *osmC*, respectivamente, apresentando fragmentos de aproximadamente 1000 pb. As raias 4, 8 e 12 mostram os resultados das amplificações dos mutantes Δgpx , Δohr e $\Delta osmC$, respectivamente. Os fragmentos obtidos confirmam os tamanhos esperados para os mutantes: 549 pb para Δgpx , 615 pb para Δohr e 684 pb para $\Delta osmC$. Já as raias 5, 6, 7, 9, 10 e 11 corroboram que se trata das linhagens que apresentam mutações em um único gene, uma vez que apresentam amplificação dos genes *ohr* e *osmC* (raias 5 e 6), *gpx* e *osmC* (raias 7 e 9) e *gpx* e *ohr* (raias 10 e 11) de tamanhos próximos a 1000 pb.

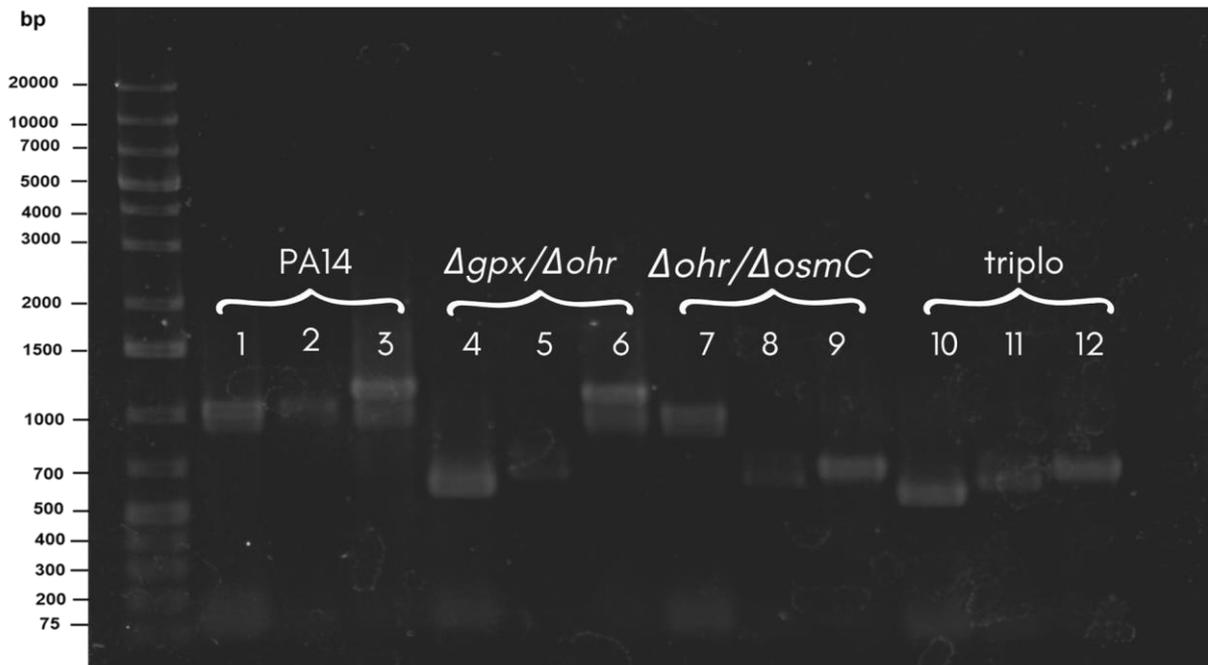


Figura 18: Confirmação do genótipo dos mutantes duplos $\Delta gpx/\Delta ohr$ e $\Delta ohr/\Delta osmC$ e do triplo $\Delta gpx/\Delta ohr/\Delta osmC$, obtidos por recombinação homóloga, através da PCR. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR obtidos de colônias selecionadas após o segundo evento de recombinação, utilizando construções para deleção dos genes *gpx*, *ohr* e *osmC*, clonados no vetor suicida pEX18Ap. As raias 1, 2 e 3 correspondem à amplificação da linhagem selvagem com oligonucleotídeos específicos para os genes *gpx*, *ohr* e *osmC*, respectivamente, apresentando fragmentos de aproximadamente 1000 pb. As raias 4 e 5 evidenciam o mutante $\Delta gpx/\Delta ohr$, que não apresenta amplificação dos dois genes, indicando a deleção dos mesmos. As raias 8 e 9 confirmam o mutante duplo $\Delta ohr/\Delta osmC$, que não apresenta amplificação de *ohr* nem de *osmC*. Já as raias 10, 11 e 12 confirmam o mutante triplo, que apresenta a ausência dos três genes (*gpx*, *ohr* e *osmC*). As raias 6 e 7 referem-se aos genes que permanecem presentes em cada mutante, evidenciando a amplificação de fragmentos esperados para os genes intactos. O tamanho esperado dos fragmentos de PCR para os mutantes é de 549 pb para Δgpx , 615 pb para Δohr e 684 pb para $\Delta osmC$.

4.4. Construção dos plasmídeos para complementação dos mutantes nulos nos genes *ohr*, *gpx* e *osmC*

A construção destes plasmídeos foi realizada com o objetivo de restaurar eventuais alterações observadas durante a caracterização fenotípica destas linhagens ou alterações da virulência apresentadas por estes mesmos mutantes. Esse processo consiste

na reintrodução do gene previamente deletado em uma região distinta do genoma de *P. aeruginosa*. Após a inserção correta do fragmento gênico e a obtenção das linhagens complementadas, espera-se que os mutantes recuperem o perfil fenotípico semelhante ao da linhagem selvagem, que possui todos os genes funcionalmente ativos. Os resultados apresentados nos géis da Figura 19 demonstram a amplificação de uma banda única e de tamanho esperado, por PCR, dos pares de oligonucleotídeos específicos para os genes *ohr*, *osmC*, *gpx1*, *gpx2* e *gpx3* (raias 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente).

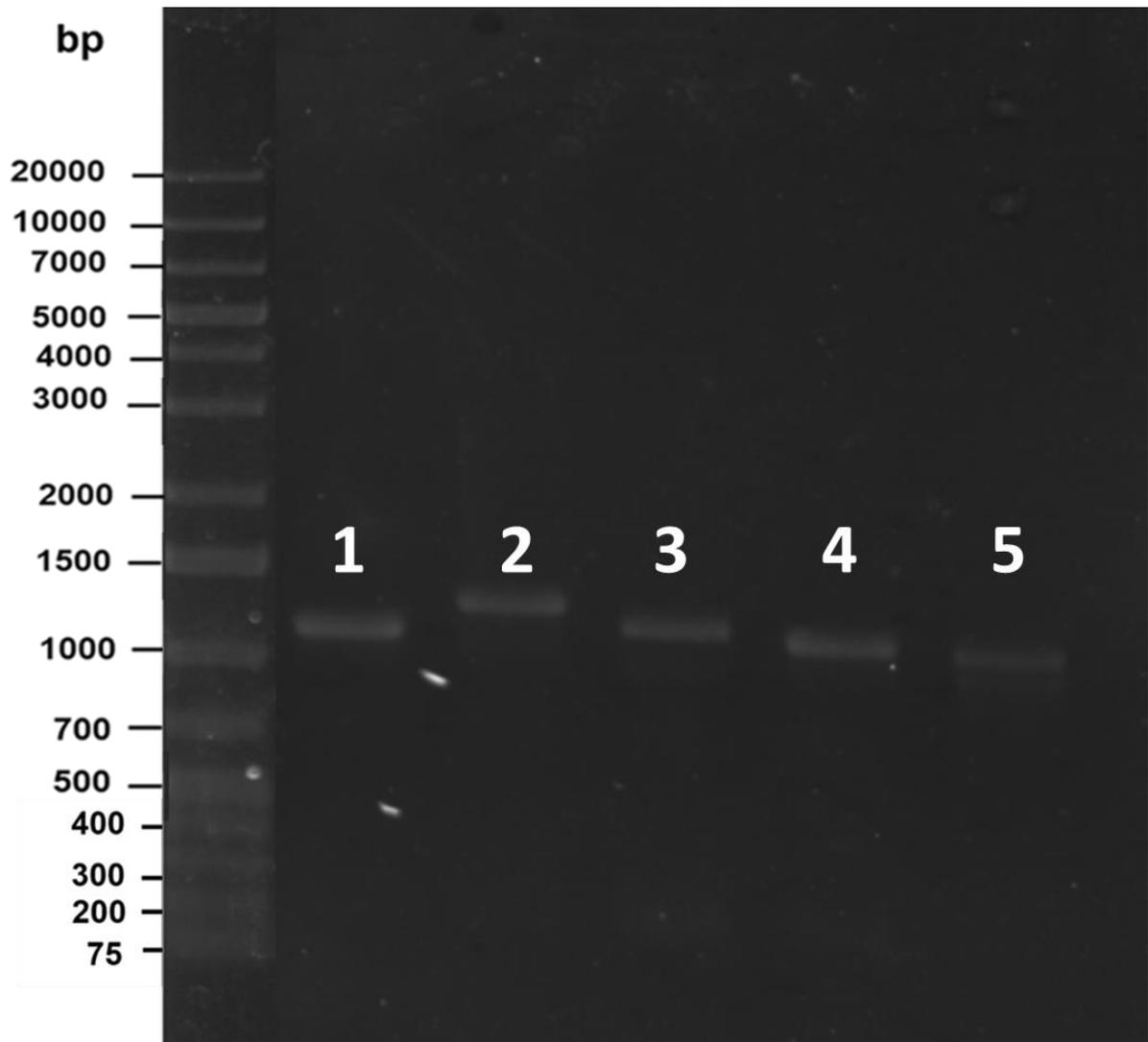


Figura 19: Amplificação dos produtos de PCR correspondentes aos genes *ohr*, *osmC*, *gpx1*, *gpx2* e *gpx3* que serão usados nos ensaios de complementação funcional. Cada par de oligos gerou um fragmento com tamanho aproximado de 1000 pb. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1X.

Após a amplificação das regiões do gene a serem complementadas, os produtos de PCR foram purificados e submetidos à digestão com as enzimas de restrição *BamHI/HindIII*. O vetor *miniCTX-2* também foi digerido com as mesmas enzimas para garantir compatibilidade. Em seguida, os fragmentos amplificados foram ligados ao vetor digerido, e essa construção foi transformada na linhagem de *E. coli* DH5 α por eletroporação. As colônias que cresceram em meio seletivo foram submetidas à extração de DNA plasmidial, seguida de digestão com as enzimas *BamHI/HindIII*. Uma eletroforese foi realizada para verificar a eficiência da ligação entre os fragmentos e o vetor. Na Figura 20, é possível observar o padrão de digestão de todas as colônias analisadas, sendo selecionadas aquelas que apresentaram dois fragmentos distintos: um de aproximadamente 1000 pb, correspondente ao fragmento amplificado por PCR, e outro de cerca de 6755 pb, referente ao vetor *miniCTX-2*. As colônias que exibiram o padrão esperado foram posteriormente submetidas ao sequenciamento genético para confirmação da fidelidade de replicação da DNA polimerase.

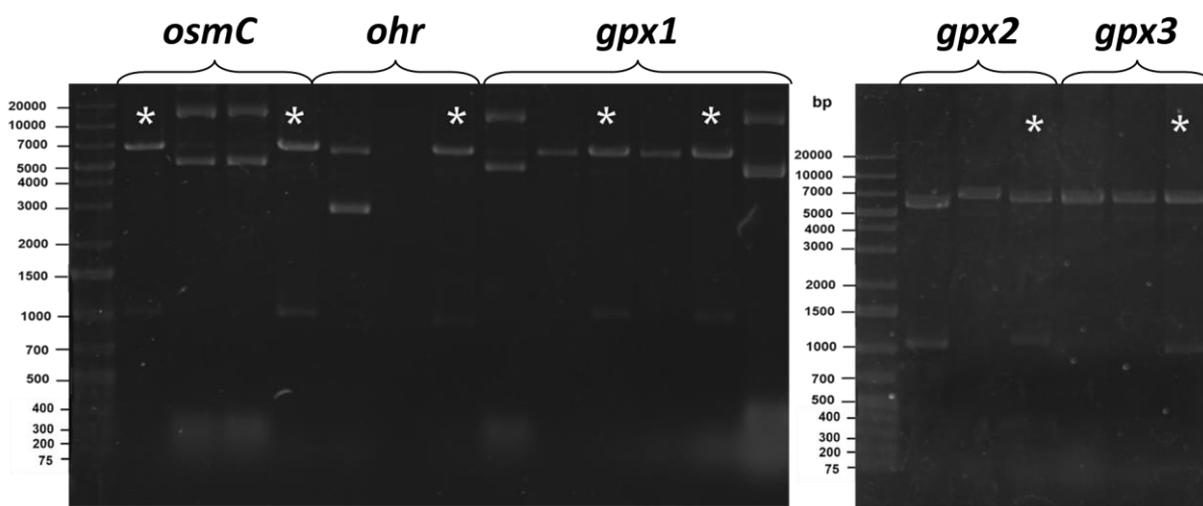
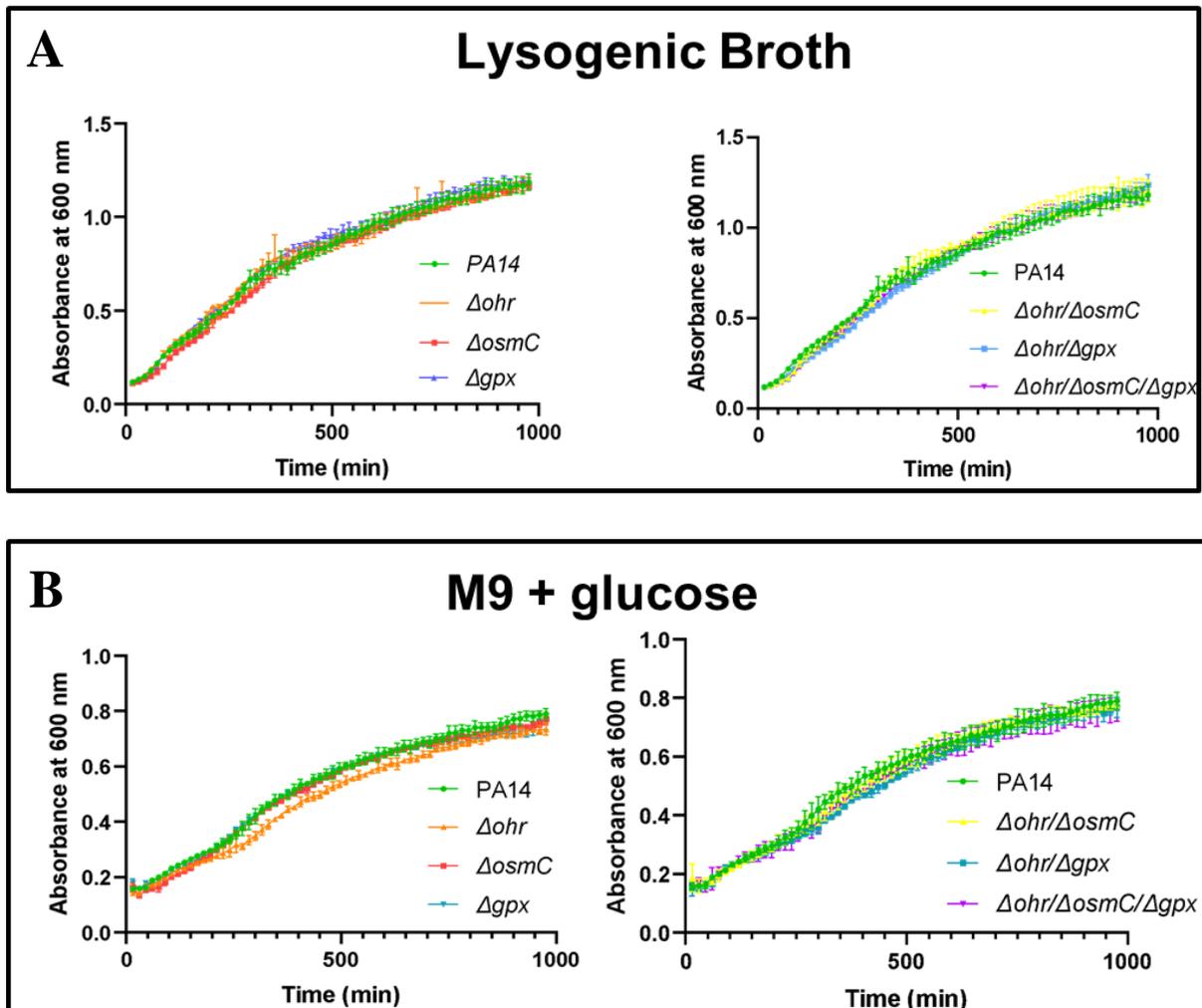
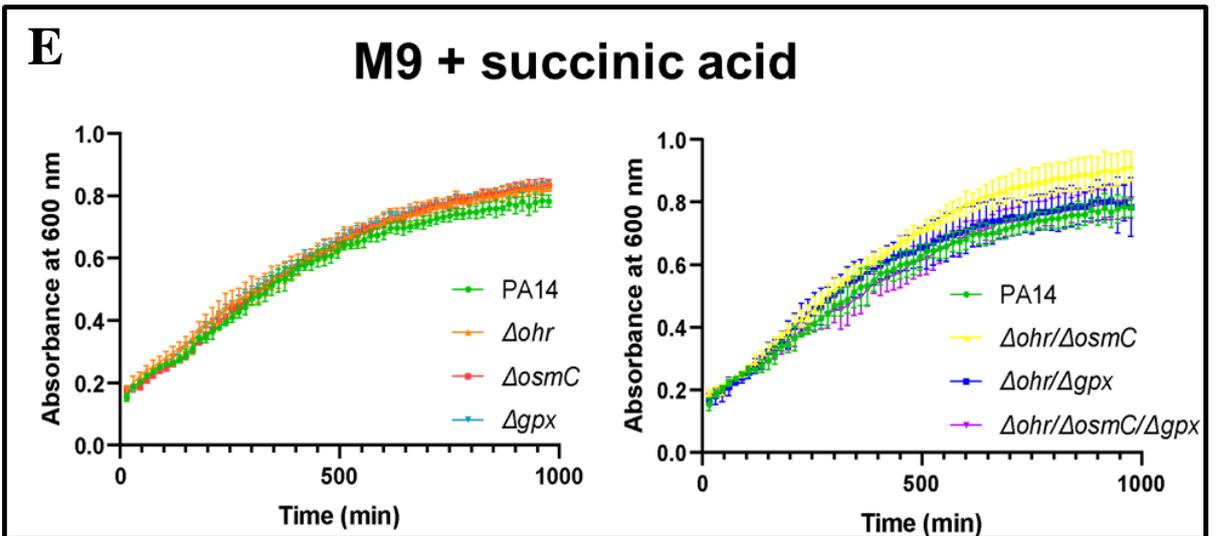
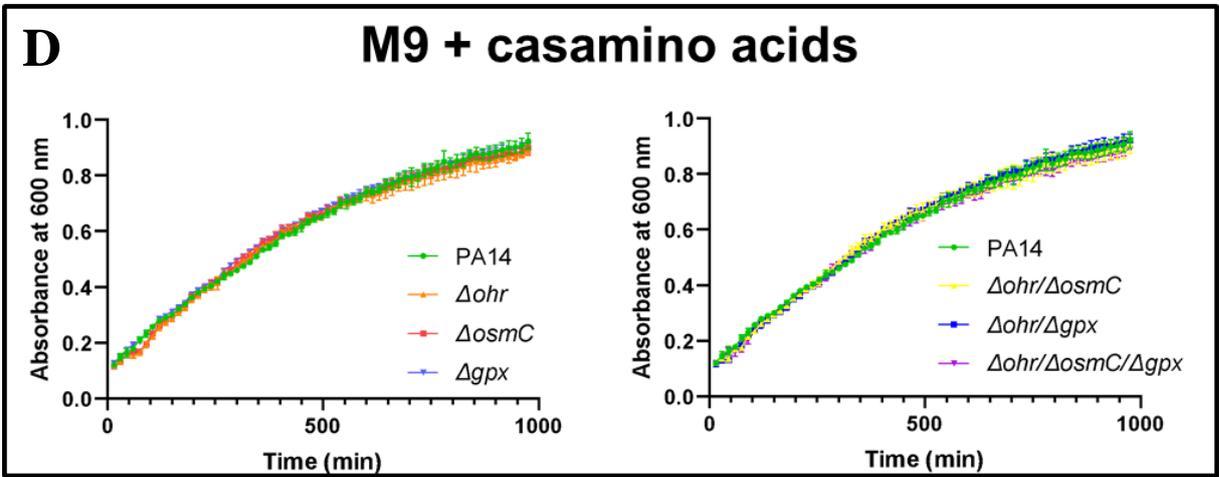
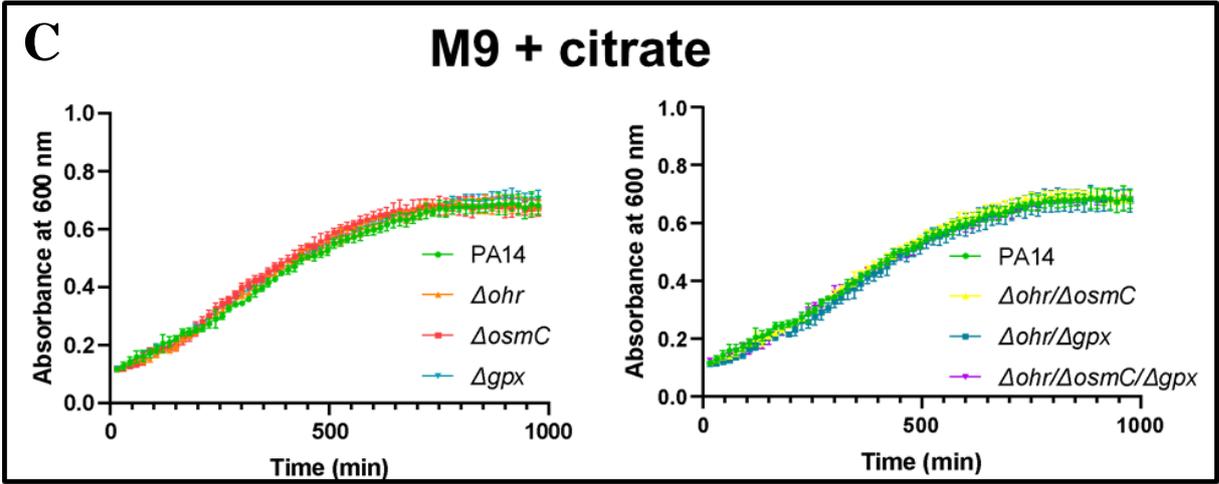


Figura 20: Confirmação da clonagem dos fragmentos correspondentes aos genes *ohr*, *osmC*, *gpx1*, *gpx2* e *gpx3* no vetor *miniCTX-2*. Eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando a digestão de cada gene após a extração do DNA plasmidial. As colônias marcadas com uma estrela apresentam dois fragmentos: um de aproximadamente 1000 pb, relacionado à região amplificada de cada gene pelo par de oligos usados (Tabela 2), e outro de cerca de 6755 pb, correspondente ao vetor *miniCTX-2*. Essas colônias foram selecionadas e, em seguida, sequenciadas para confirmar a inserção correta dos genes no vetor.

4.5. Avaliação do impacto da ausência de Gpx, OsmC, Ohr e suas combinações no crescimento bacteriano

Curvas de crescimento foram realizadas com a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* e com os mutantes nulos simples, duplos e triplo, visando avaliar o impacto da ausência dessas enzimas na cinética do crescimento bacteriano. Os experimentos foram conduzidos em diferentes condições, utilizando o meio rico LB (Figura 21A), e meio mínimo M9 suplementado com glicose (Figura 21B), citrato (Figura 21C), casaminoácidos (Figura 21D), succinato (Figura 21E) ou itaconato (Figura 21F). Os resultados obtidos indicaram que a ausência das enzimas analisadas não provocou alterações significativas no crescimento entre a linhagem selvagem e os diferentes mutantes nulos, independentemente do meio avaliado.





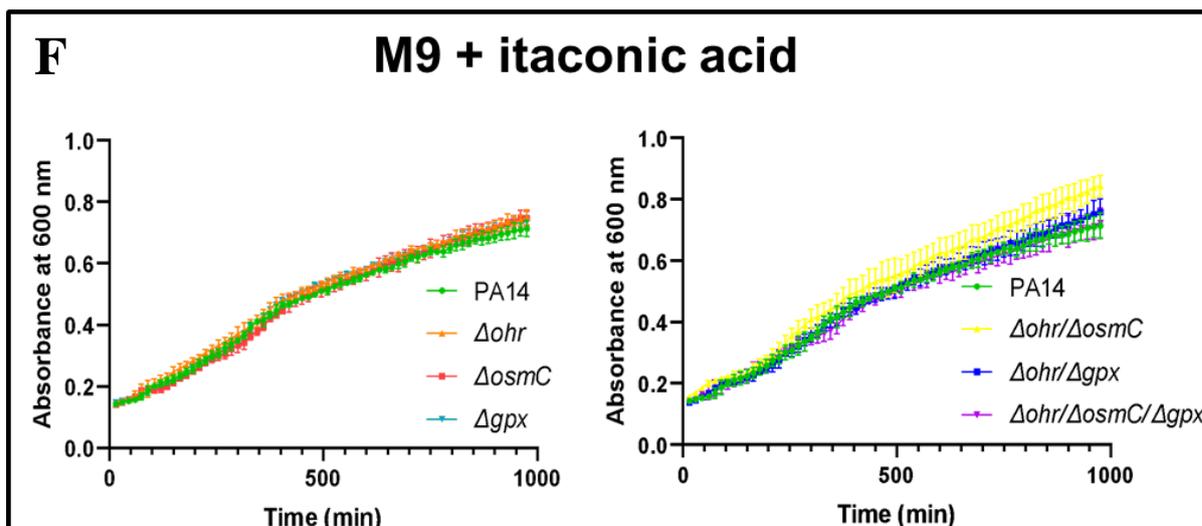


Figura 21: Cinética de crescimento das linhagens de *P. aeruginosa* selvagem, os mutantes simples, duplos e triplo em meios LB e M9 suplementados com diferentes fontes de C. As fontes de C foram glicose (2% ou 111 mM), citrato (40 mM), itaconato (40 mM), succinato (40 mM) e C D E F G 36 casaminoácido (10%). Os gráficos A, B, C, D, E, F, G comparam o perfil de crescimento entre as linhagens tendo no eixo x o tempo em horas e no eixo y a DO_{600nm} . Os desvios-padrão apresentados em cada ponto da curva foram calculados a partir de quadruplicatas técnicas de uma réplica biológica. Os dados representam uma série de três experimentos independentes (três réplicas biológicas), sendo representativos dos resultados obtidos.

4.6. Avaliação da sensibilidade dos mutantes simples, duplos e do mutante triplo nos genes *ohr*, *osmC* e *gpx* ao tBOOH, H_2O_2 , NaOCl

4.6.1. Determinação da CIM

O ensaio de CIM foi realizado para avaliar a sensibilidade dos mutantes simples, duplos e triplo ao tBOOH. Os resultados apresentados na Figura 22 mostram as respostas dos mutantes Δohr , $\Delta osmC$, $\Delta ohr/\Delta osmC$ e $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$ ao agente oxidante. Observou-se que a ausência do gene *ohr* torna os mutantes, tanto simples quanto duplos e triplo, mais sensíveis ao tBOOH, apresentando uma CIM de 600 μM . Em contrapartida, o mutante simples $\Delta osmC$ exibiu resistência semelhante à linhagem selvagem, com uma CIM de 800 μM . Esses dados sugerem que, apesar da ausência do gene *osmC*, a presença de *ohr* é suficiente para conferir proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo tBOOH.

O mesmo padrão foi observado nos resultados apresentados na Figura 23, que, neste caso, foi avaliado os mutantes Δgpx e $\Delta ohr/\Delta gpx$, além do mutante simples Δohr e do mutante triplo $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$. Os dados mostram que a ausência do gene *ohr* torna as linhagens significativamente mais sensíveis ao tBOOH, com uma CIM de 600 μM . Por outro lado, a ausência do gene *gpx* apresentou uma resistência semelhante à da linhagem selvagem, com uma CIM de 800 μM . Esses resultados reforçam o papel crítico de *ohr* na proteção contra o estresse oxidativo induzido por tBOOH, enquanto a ausência de *gpx* parece ter um impacto menos relevante nesse contexto específico.

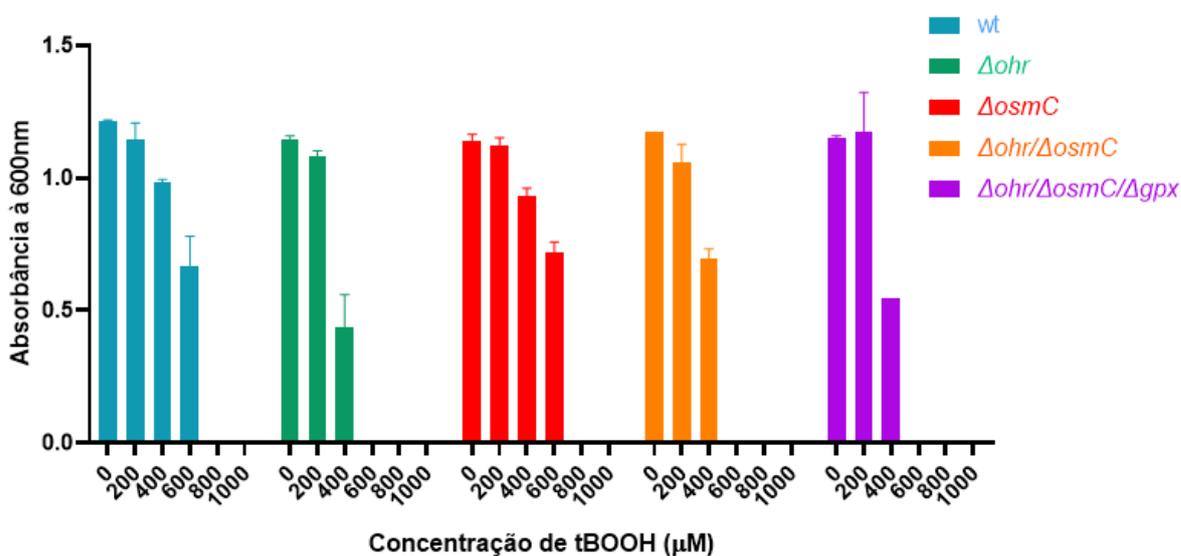


Figura 22: Determinação da CIM da linhagem selvagem e dos mutantes Δohr , $\Delta osmC$, $\Delta ohr/\Delta osmC$ e $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$, ao tBOOH. Nas concentrações testadas, observa-se que o mutante simples Δohr , o mutante duplo $\Delta ohr/\Delta osmC$ e o mutante triplo $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$ exibem sensibilidade semelhante, com uma CIM de 600 μM . Em contraste, o mutante simples $\Delta osmC$, assim como a linhagem selvagem, apresenta maior resistência, com uma CIM de 800 μM .

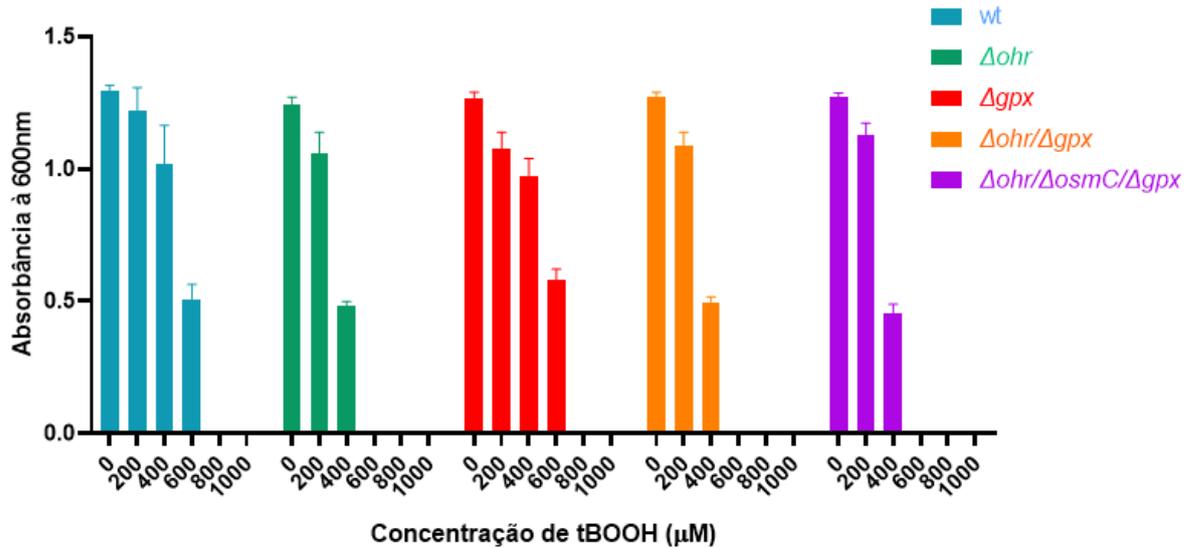


Figura 23: Determinação da CIM da linhagem selvagem e dos mutantes Δohr , Δgpx , $\Delta ohr/\Delta gpx$ e $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$ ao tBOOH. Nas concentrações testadas, observa-se que o mutante simples Δohr , o mutante duplo $\Delta ohr/\Delta gpx$ e o mutante triplo $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$ exibem sensibilidade semelhante, com uma CIM de 600 μM . Em contraste, o mutante simples Δgpx , assim como a linhagem selvagem, apresenta maior resistência, com uma CIM de 800 μM .

4.6.2. Spot Assay

O ensaio de *Spot Assay* foi realizado com o objetivo de avaliar a sensibilidade dos mutantes simples, duplos e triplo frente a diferentes condições de estresse oxidativo e osmótico. No contexto do estresse oxidativo, os agentes oxidantes utilizados foram tBOOH, H_2O_2 e NaOCl, conhecidos por induzirem danos oxidativos severos às células bacterianas. A análise visou investigar como a ausência das enzimas deletadas impacta a capacidade das linhagens mutantes de lidar com EROs geradas por esses compostos. Além disso, foi avaliada a sensibilidade das linhagens ao estresse osmótico utilizando concentrações diferentes de sacarose e NaCl. Essas condições mimetizam ambientes com alta pressão osmótica, desafiando a capacidade das bactérias de manterem a homeostase celular e a integridade de suas membranas. Os resultados obtidos no Spot Assay forneceram informações importantes sobre a resistência das linhagens mutantes em relação à linhagem selvagem, destacando o papel das enzimas deletadas na resposta ao estresse oxidativo e osmótico.

4.6.2.1. tBOOH

Para avaliar a sensibilidade das diferentes linhagens ao estresse oxidativo induzido por tBOOH (0,5 mM), foram conduzidos ensaios com a linhagem selvagem, os mutantes simples (Figura 24B) e os mutantes duplos e triplo (Figura 25B). Conforme esperado Alegria et al., (2016), a linhagem Δohr exibiu sensibilidade ao tBOOH, destacando o papel da enzima Ohr na proteção contra este oxidante. Em contrapartida, os mutantes simples $\Delta osmC$ e Δgpx não apresentaram alterações significativas na sensibilidade ao tBOOH, exibindo um fenótipo de resistência comparável ao da linhagem selvagem. Estes resultados foram comparados com uma placa controle, onde foram feitas as diluições seriadas de cada linhagem sem a presença do tBOOH (Figura 24A).

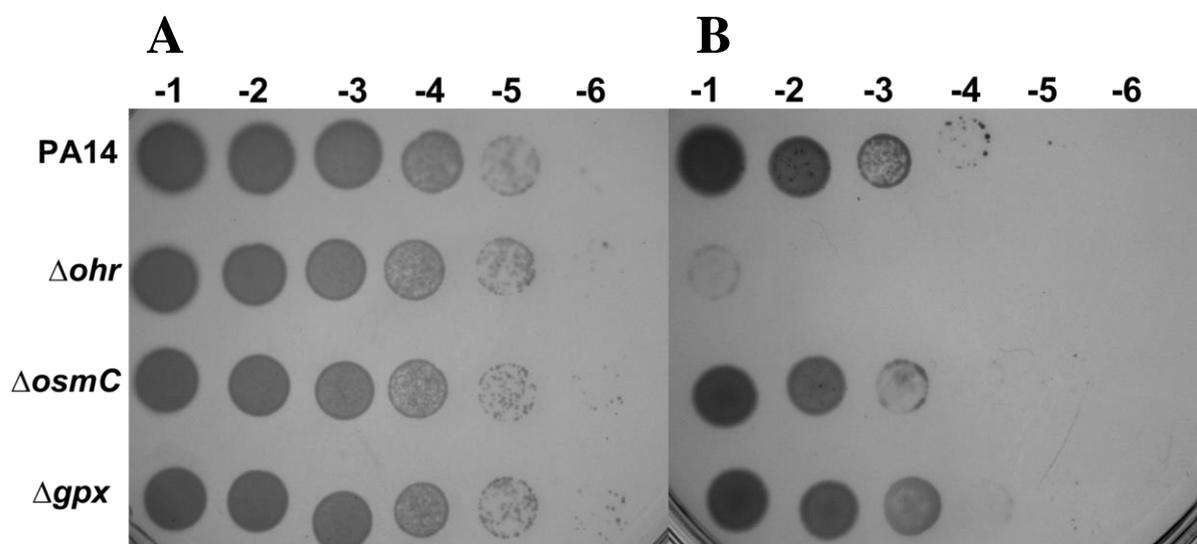


Figura 24: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por tBOOH (0,5 mM) nas linhagem selvagem e nos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Foi realizada uma diluição seriada de células em fase exponencial que não foram tratadas com tBOOH, plaqueadas de 10^{-1} à 10^{-6} , servindo como controle do ensaio. B) A figura apresenta uma série de diluições seriadas de células em fase exponencial tratadas com 0,5 mM de tBOOH, plaqueadas em diluições de 10^{-1} a 10^{-6} . O experimento foi realizado em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez utilizando culturas independentes, para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Nos ensaios realizados com os mutantes duplos e triplo, foi observado que os mutantes duplos que não possuíam o gene *ohr* ($\Delta ohr/\Delta osmC$ e $\Delta ohr/\Delta gpx$), assim como o mutante triplo ($\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$), apresentaram sensibilidade ao tBOOH semelhante

à do mutante simples Δohr . Por outro lado, o mutante duplo $\Delta osmC/\Delta gpx$ exibiu resistência comparável à da linhagem selvagem. (Figura 25B). Estes resultados foram comparados com uma placa controle, onde foram feitas as diluições seriadas de cada linhagem sem a presença do tBOOH (Figura 25A). Os resultados indicam que, mesmo na ausência das enzimas OsmC e Gpx, a presença de Ohr é suficiente para garantir a resistência ao tBOOH, enquanto sua ausência resulta em sensibilidade significativa, independentemente da presença das outras enzimas antioxidantes. Além disso, embora a enzima OsmC pertença à família Ohr/OsmC, os dados não demonstraram um papel relevante dessa enzima na detoxificação do hidroperóxido orgânico tBOOH, pelo menos no contexto avaliado.

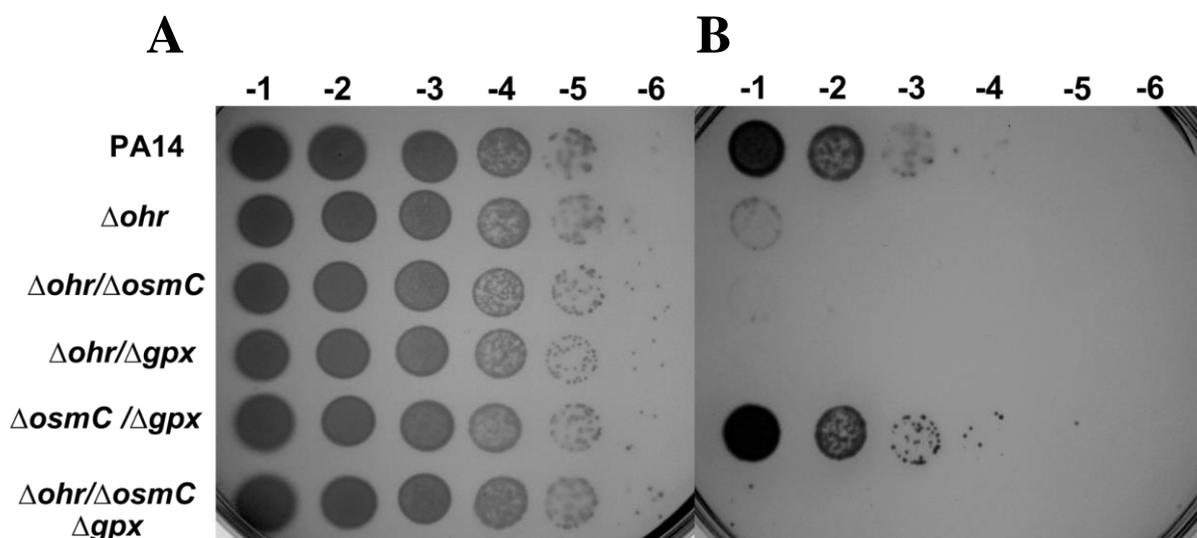


Figura 25: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por tBOOH (0,5 mM) nas linhagem selvagem e nos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Foi realizada uma diluição seriada da linhagem selvagem, do mutante simples Δohr , dos mutantes duplos ($\Delta ohr/\Delta osmC$, $\Delta ohr/\Delta gpx$, $\Delta osmC/\Delta gpx$) e do mutante triplo ($\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$) em fase exponencial sem tratamento com tBOOH, plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} , permitindo a comparação com as condições tratadas e atuando como controle. B) A figura apresenta uma série de diluições seriadas das mesmas linhagens todas em fase exponencial, tratadas com 0,5 mM de tBOOH. As diluições foram plaqueadas em diluições de 10^{-1} a 10^{-6} . O experimento foi realizado em duas placas distintas e repetido ao menos uma vez com culturas independentes, assegurando a reprodutibilidade dos resultados.

4.6.2.2. H₂O₂

Após os testes de sensibilidade ao hidroperóxido orgânico tBOOH, foi realizado o ensaio de *Spot Assay* para avaliar a sensibilidade dos mutantes simples, duplos e triplo ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 10 mM. Nos ensaios com H₂O₂, foi utilizada a linhagem $\Delta lsfa$ como controle positivo, uma vez que esta linhagem é conhecida por apresentar sensibilidade a este oxidante (KAIHAMI et al., 2014). Os resultados indicaram uma leve sensibilidade à concentração de 10 mM em algumas linhagens. Além do controle $\Delta lsfa$, que exibiu sensibilidade esperada, a linhagem $\Delta osmC$ também demonstrou uma redução no crescimento, sendo possível observar a formação de colônias até a diluição 10⁻⁴. Em contrapartida, os outros mutantes simples (Δohr e Δgpx) mantiveram o crescimento até a diluição 10⁻⁶, indicando uma resistência semelhante à da linhagem selvagem (Figura 26B).

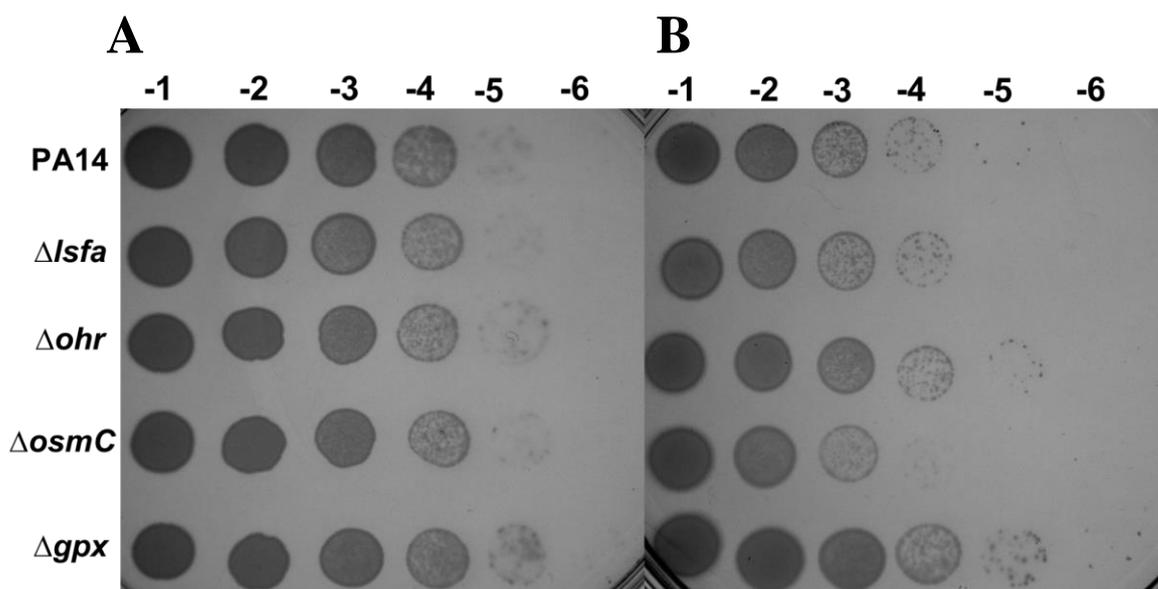


Figura 26: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂ (10 mM) nas linhagem selvagem e nos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Como controle, foi realizada uma diluição seriada da linhagem selvagem e dos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx em fase exponencial, sem tratamento com H₂O₂, plaqueadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶, permitindo a comparação com as condições tratadas. B) A figura apresenta uma série de diluições seriadas das mesmas linhagens em fase exponencial, após tratamento com 10 mM de H₂O₂. As diluições foram plaqueadas de 10⁻¹ à 10⁻⁶. O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos

uma vez, utilizando culturas independentes, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

O ensaio realizado com a linhagem selvagem, os mutantes duplos ($\Delta ohr/\Delta osmC$, $\Delta ohr/\Delta gpx$, $\Delta osmC/\Delta gpx$) e o mutante triplo ($\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$) revelou que o mutante duplo $\Delta ohr/\Delta osmC$ apresentou sensibilidade semelhante ao da linhagem $\Delta lsfa$, com crescimento bacteriano limitado até a diluição 10^{-3} . Em contraste, os demais mutantes duplos e o mutante triplo exibiram um perfil de crescimento semelhante ao da linhagem selvagem, com crescimento detectado até a diluição 10^{-4} (Figura 27B). Esses resultados sugerem que a ausência simultânea de *ohr* e *osmC* compromete de forma mais significativa a sobrevivência da bactéria sob estresse oxidativo do que a deleção combinada de *gpx* com qualquer um desses genes. A sensibilidade aumentada do mutante $\Delta ohr/\Delta osmC$ reforça a hipótese de que *osmC* pode desempenhar um papel acessório na resposta ao estresse oxidativo, corroborando achados anteriores que indicaram uma leve sensibilidade do mutante simples $\Delta osmC$ ao H_2O_2 .

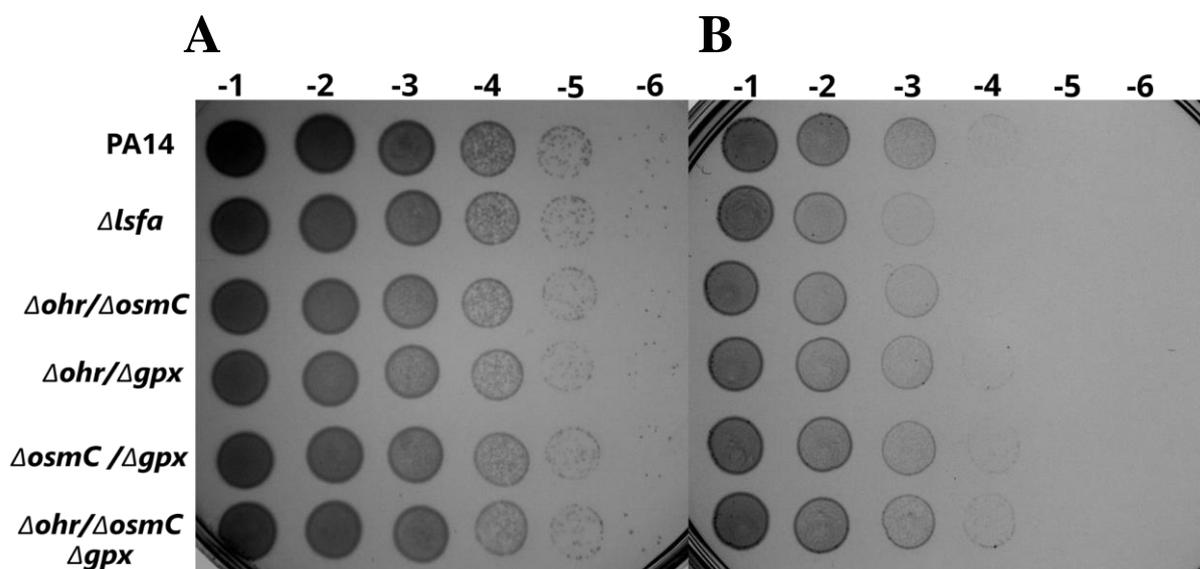


Figura 27: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 (10 mM) na linhagem selvagem e nos mutantes duplos ($\Delta ohr/\Delta osmC$, e $\Delta ohr/\Delta gpx$ e $\Delta gpx/\Delta osmC$) e no mutante triplo ($\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$) pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Como controle, foi realizada uma diluição seriada da linhagem selvagem, do mutante simples $\Delta lsfa$, dos mutantes duplos ($\Delta ohr/\Delta osmC$, $\Delta ohr/\Delta gpx$, $\Delta osmC/\Delta gpx$) e o mutante triplo ($\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$), em fase exponencial, sem tratamento com H_2O_2 , foram plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} , permitindo a comparação com as condições tratadas. B) A figura apresenta

uma série de diluições seriadas das mesmas linhagens em fase exponencial, após tratamento com 10 mM de H₂O₂. As diluições foram plaqueadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶. O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez, utilizando culturas independentes, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

4.6.2.3. Padronização NaOCl

Após os ensaios com tBOOH e H₂O₂, foi feito o ensaio utilizando NaOCl para avaliar a sensibilidade dos diferentes mutantes a esse oxidante, para isso, inicialmente foi feita a quantificação do NaOCl e após foram feitos ensaios de padronização utilizando apenas a linhagem selvagem de *P. aeruginosa*. Na primeira tentativa foram utilizadas concentrações de 0 mM a 0,5 mM e foi observado o crescimento da linhagem selvagem até a diluição 10⁻⁶ em todas as concentrações (Figura 28).

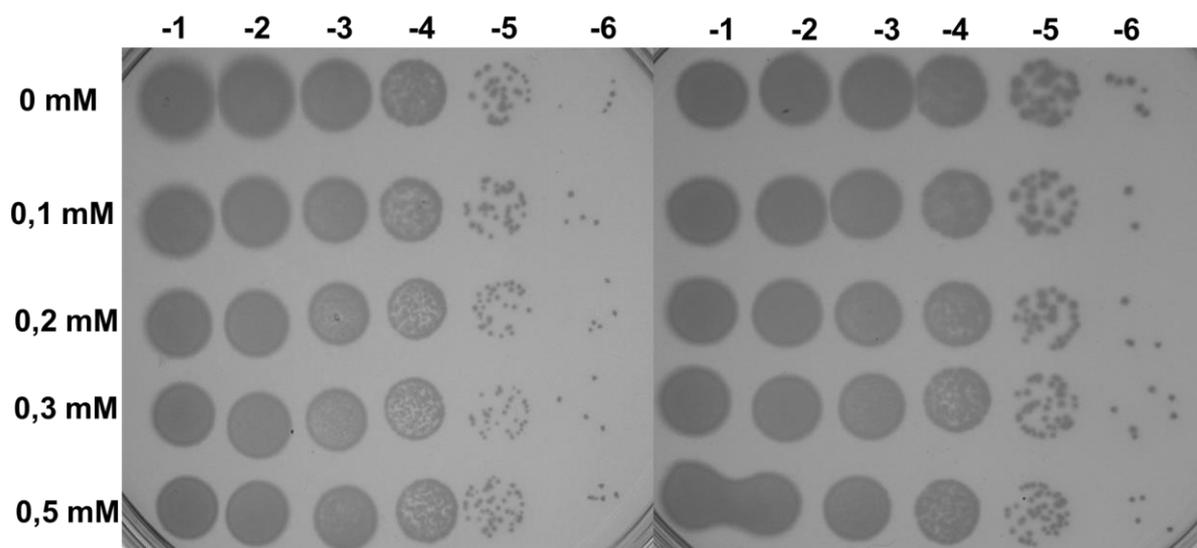


Figura 28: Padronização da concentração inibitória mínima de NaOCl (0-0,5 mM) na linhagem selvagem de *P. aeruginosa* PA14 por meio do ensaio de *Spot Assay*. A figura apresenta uma série de diluições seriadas da linhagem selvagem em fase exponencial, após tratamento com concentrações de NaOCl variando de 0 mM a 0,5 mM, conforme indicado na figura. As diluições foram plaqueadas em graduações de 10⁻¹ a 10⁻⁶. O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez com culturas independentes, garantindo a reprodutibilidade dos resultados.

Após observar o crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas anteriormente, foram estabelecidas novas concentrações de NaOCl, variando de 0 mM a

10 mM. Nos ensaios realizados, observou-se crescimento bacteriano até a concentração de 1 mM. Entretanto, nas concentrações de 5 mM e 10 mM, não foi detectado crescimento bacteriano, nem mesmo na diluição inicial (10^{-1}), indicando que essas concentrações são altamente inibitórias para as linhagens testadas (Figura 29).

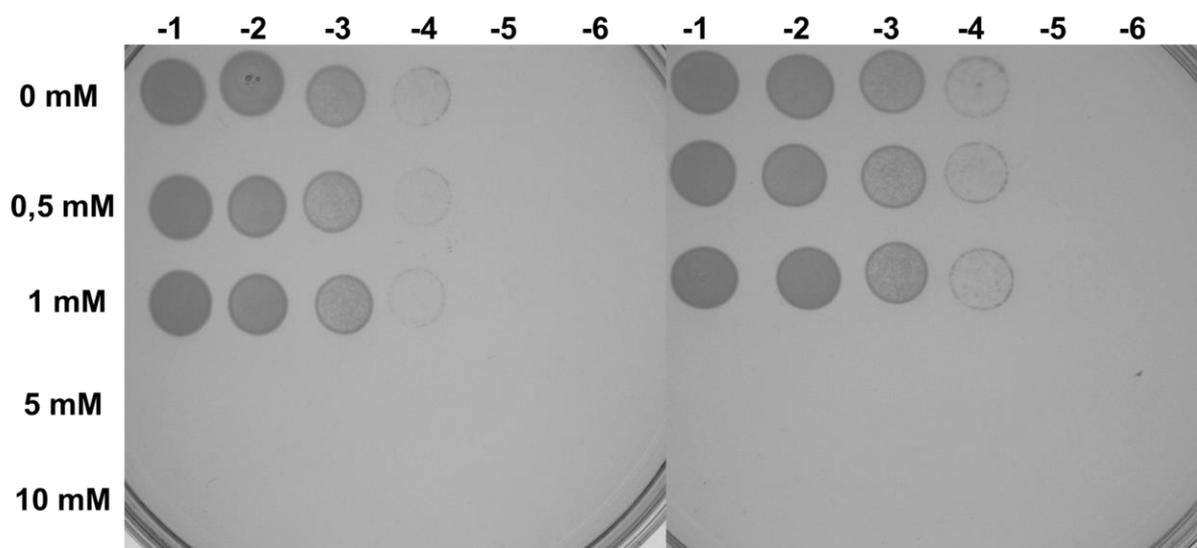


Figura 29: Padronização da concentração inibitória mínima de NaOCl (0-10 mM) na linhagem selvagem de *P. aeruginosa* PA14 por meio do ensaio de *Spot Assay*. A figura apresenta uma série de diluições seriadas da linhagem selvagem em fase exponencial, após tratamento com concentrações de NaOCl variando de 0 mM a 10 mM. As diluições foram plaqueadas em graduações de 10^{-1} a 10^{-6} . O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez com culturas independentes, garantindo a reprodutibilidade dos resultados.

Sendo assim, um novo teste foi feito utilizando concentrações de 0 mM a 5 mM para avaliar qual a concentração ideal para a realização do ensaio (Figura 30). A partir do resultado obtido, foi feito testes com 1 mM e 2 mM

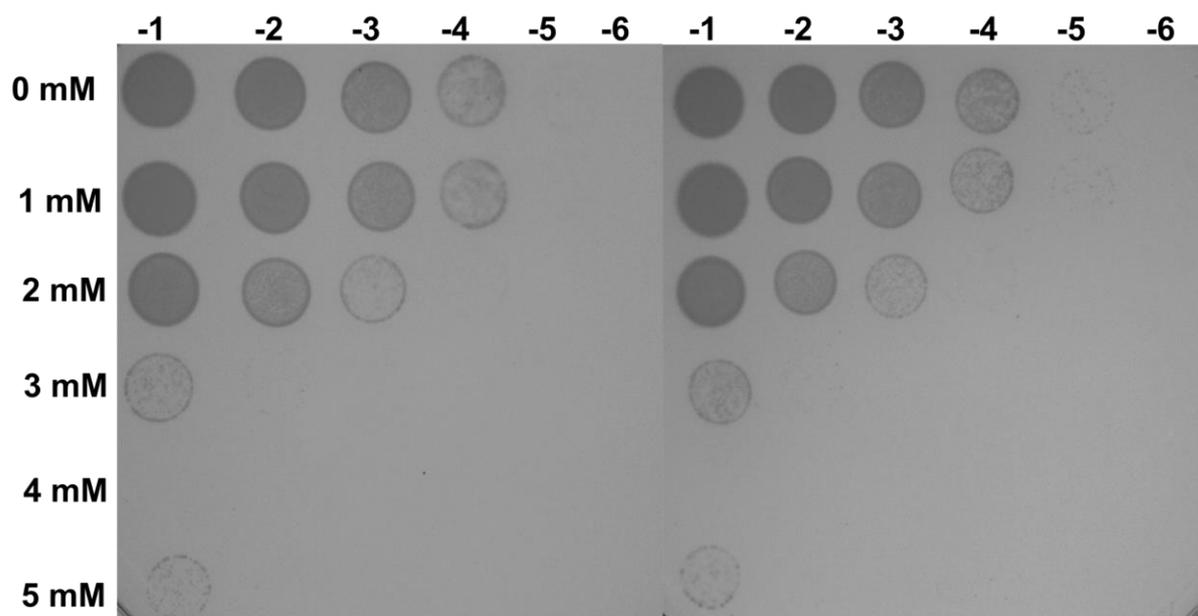


Figura 30: Padronização da concentração inibitória mínima de NaOCl (0-5 mM) na linhagem selvagem de *P. aeruginosa* PA14 por meio do ensaio de *Spot Assay*. A figura apresenta uma série de diluições seriadas da linhagem selvagem em fase exponencial, após tratamento com concentrações de NaOCl variando de 0 mM a 5 mM. As diluições foram plaqueadas em graduações de 10⁻¹ a 10⁻⁶. O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez com culturas independentes, garantindo a reprodutibilidade dos resultados.

4.6.2.4. NaOCl

O ensaio com NaOCl (1 mM) foi realizado utilizando a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* e os mutantes simples para avaliar possíveis diferenças de sensibilidade ao hipoclorito de sódio. Os resultados obtidos mostraram que não foram observadas diferenças significativas na sensibilidade dos mutantes em relação à linhagem selvagem. Na placa controle observou-se crescimento de colônias até a diluição 10⁻⁶ (Figura 31B), enquanto na placa tratada com NaOCl 1 mM, foi possível observar crescimento bacteriano até a diluição 10⁻⁵ (Figura 31A).

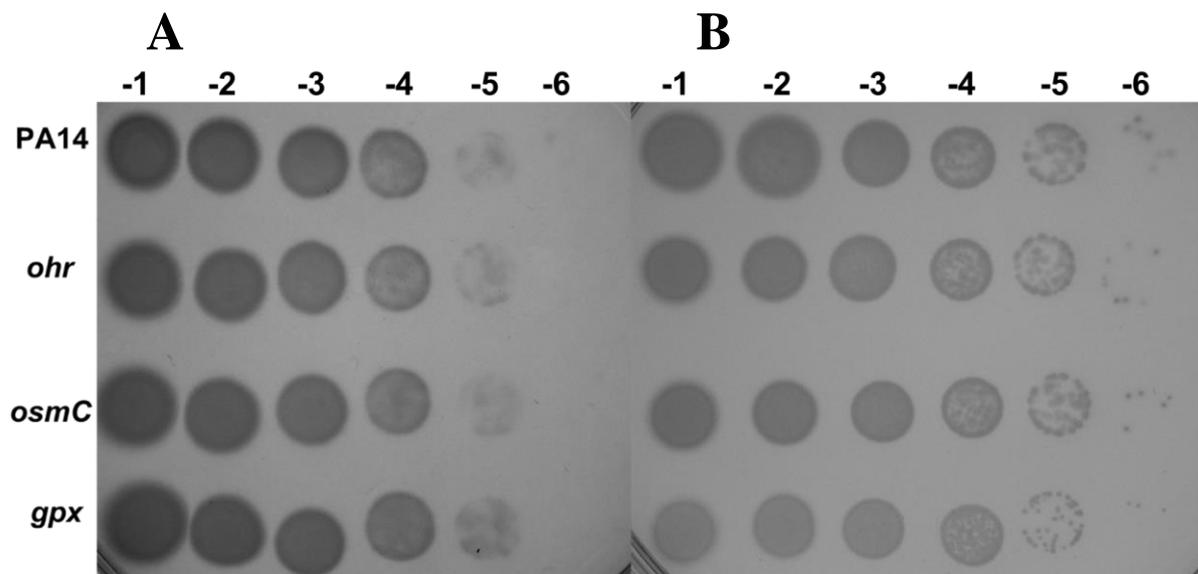


Figura 31: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por NaOCl (1 mM) nas linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Como controle, foi realizada uma diluição seriada da linhagem selvagem e dos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx , em fase exponencial, sem tratamento com NaOCl, plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} , permitindo a comparação com as condições tratadas. B) A figura apresenta uma série de diluições seriadas das mesmas linhagens em fase exponencial, após tratamento com 1 mM de NaOCl. As diluições foram plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} . O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez, utilizando culturas independentes, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

Dessa forma, foi realizado um ensaio utilizando NaOCl (2 mM) com o objetivo de investigar uma possível sensibilidade dos mutantes simples a esse oxidante em uma concentração mais elevada. Contudo, os resultados observados mostraram que o perfil de crescimento bacteriano das linhagens testadas, tanto na placa controle (Figura 32A) quanto na placa tratada com NaOCl (Figura 32B), foi bastante semelhante. Nas placas tratadas com NaOCl (2 mM), as diluições seriadas das diferentes linhagens, incluindo a linhagem selvagem e os mutantes simples, apresentaram crescimento bacteriano equivalente ao observado nas placas controle, onde não houve tratamento com o oxidante. Além disso, não foi observado diferenças no crescimento entre a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* tratada com NaOCl (2 mM) e os mutantes simples. Este padrão sugere que

a exposição ao NaOCl em concentração de 2 mM não foi suficiente para revelar diferenças de sensibilidade entre as linhagens testadas.

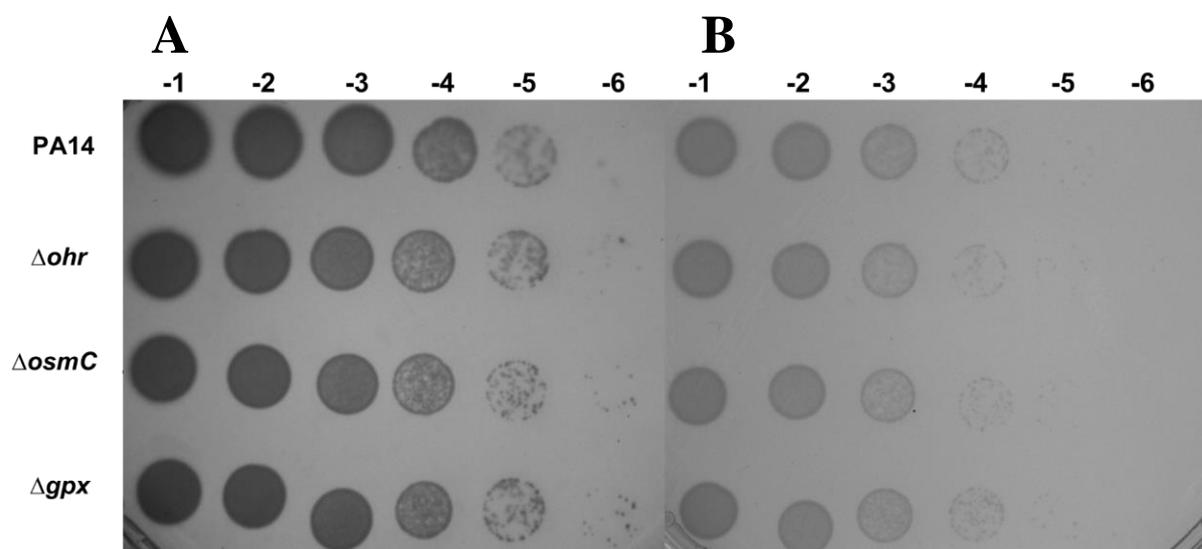


Figura 32: Avaliação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por NaOCl (2 mM) nas linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Como controle, foi realizada uma diluição seriada da linhagem selvagem e dos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx em fase exponencial, sem tratamento com NaOCl, plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} , permitindo a comparação com as condições tratadas. B) A figura apresenta uma série de diluições seriadas das mesmas linhagens em fase exponencial, após tratamento com 2 mM de NaOCl. As diluições foram plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} . O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez, utilizando culturas independentes, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

4.7. Avaliação do estresse osmótico nas diferentes linhagens testadas

Além de investigar o efeito dos diferentes oxidantes nas linhagens mutantes, foi também avaliado o impacto do estresse osmótico induzido por sacarose e NaCl. Inicialmente, foi realizado um ensaio utilizando sacarose 1 M para a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* e os mutantes simples. No entanto, os resultados revelaram a ausência de crescimento bacteriano em todas as linhagens testadas, já a partir da primeira diluição seriada (10^{-1}) (Figura 33B). Para efeito comparativo, foi utilizada uma placa controle, na qual todas as linhagens apresentaram crescimento bacteriano até a diluição 10^{-6} (Figura

33A), indicando que a sacarose 1 M foi uma concentração elevada o suficiente para inibir completamente o crescimento bacteriano.

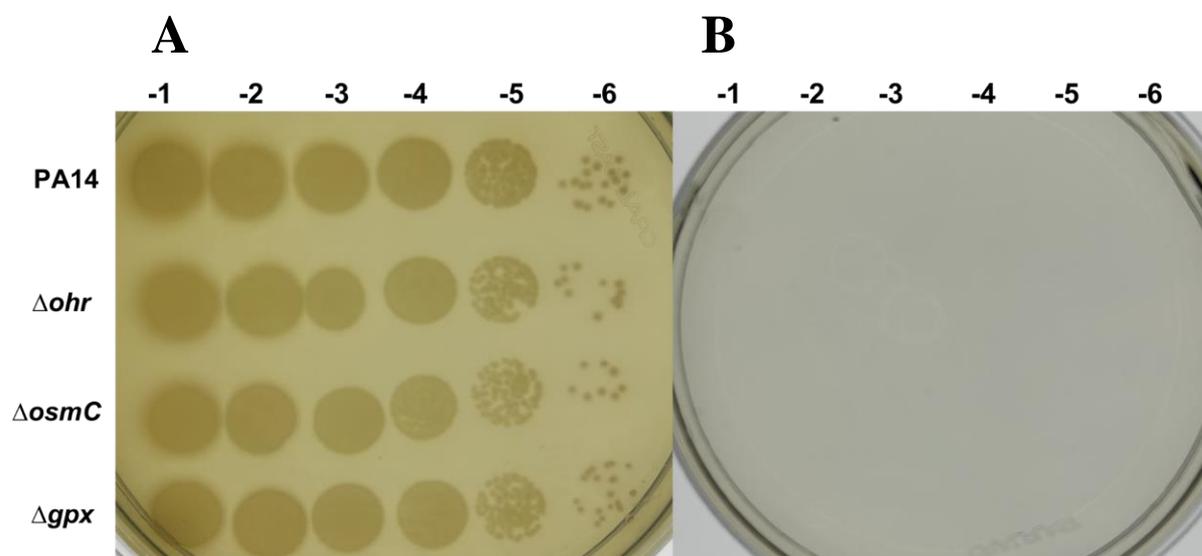


Figura 33: Avaliação da sensibilidade ao estresse osmótico induzido por sacarose (1 M) nas linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Como controle, foi realizada uma diluição seriada da linhagem selvagem e dos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx , em fase exponencial, sem tratamento com sacarose, plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} , permitindo a comparação com as condições tratadas. B) A figura apresenta uma série de diluições seriadas das mesmas linhagens em fase exponencial, após tratamento com 1M de sacarose. As diluições foram plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} . O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez, utilizando culturas independentes, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

Posteriormente, foi realizado um ensaio utilizando sacarose a 0,3 M, com o objetivo de investigar a possível sensibilidade das linhagens mutantes ao estresse osmótico induzido por essa solução. No entanto, conforme apresentado na Figura 34B, os resultados mostraram que tanto a linhagem selvagem quanto os mutantes simples cresceram até a diluição de 10^{-6} , de maneira semelhante à observada na placa controle (Figura 34A). Esses dados indicam que a concentração de 0,3 M de sacarose foi insuficiente para gerar um estresse osmótico significativo nas linhagens testadas, não permitindo a identificação de diferenças na sensibilidade das linhagens mutantes em relação à linhagem selvagem.

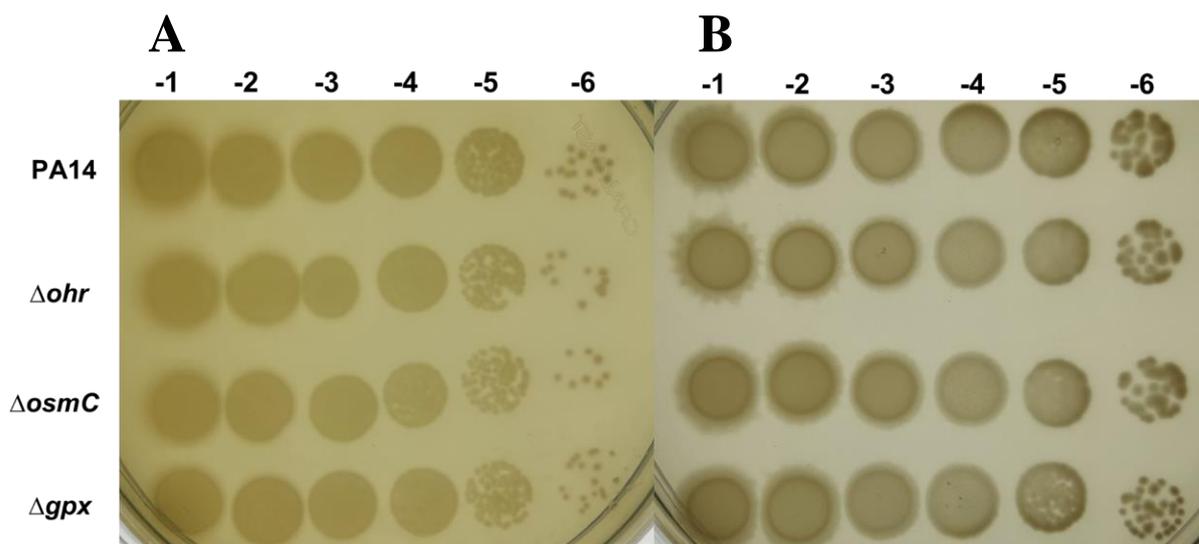


Figura 34: Avaliação da sensibilidade ao estresse osmótico induzido por sacarose (0,3 M) nas linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Como controle, foi realizada uma diluição seriada da linhagem selvagem e dos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx em fase exponencial, sem tratamento com sacarose, plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} , permitindo a comparação com as condições tratadas. B) A figura apresenta uma série de diluições seriadas das mesmas linhagens em fase exponencial, após tratamento com 0,3 M de sacarose. As diluições foram plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} . O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez, utilizando culturas independentes, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

Dessa forma, foi realizado um novo ensaio utilizando sacarose a 0,5 M para avaliar o impacto dessa concentração sobre as diferentes linhagens testadas. Conforme apresentado na Figura 35B, os resultados indicaram que tanto a linhagem selvagem quanto os mutantes apresentaram crescimento de colônias até a diluição de 10^{-5} . Esse padrão sugere que a presença de sacarose a 0,5 M exerce um efeito osmótico sobre as linhagens, reduzindo o crescimento bacteriano em comparação com a placa controle (sem sacarose) (Figura 35A). No entanto, o crescimento observado foi semelhante entre a linhagem selvagem e os mutantes, indicando que, mesmo sob essa concentração de sacarose, não foi possível identificar diferenças na sensibilidade ao estresse osmótico entre as linhagens. Esses resultados reforçam a ideia de que a ausência das enzimas deletadas nos mutantes não impactou de forma mensurável a resposta ao estresse osmótico induzido pela sacarose a 0,5 M.

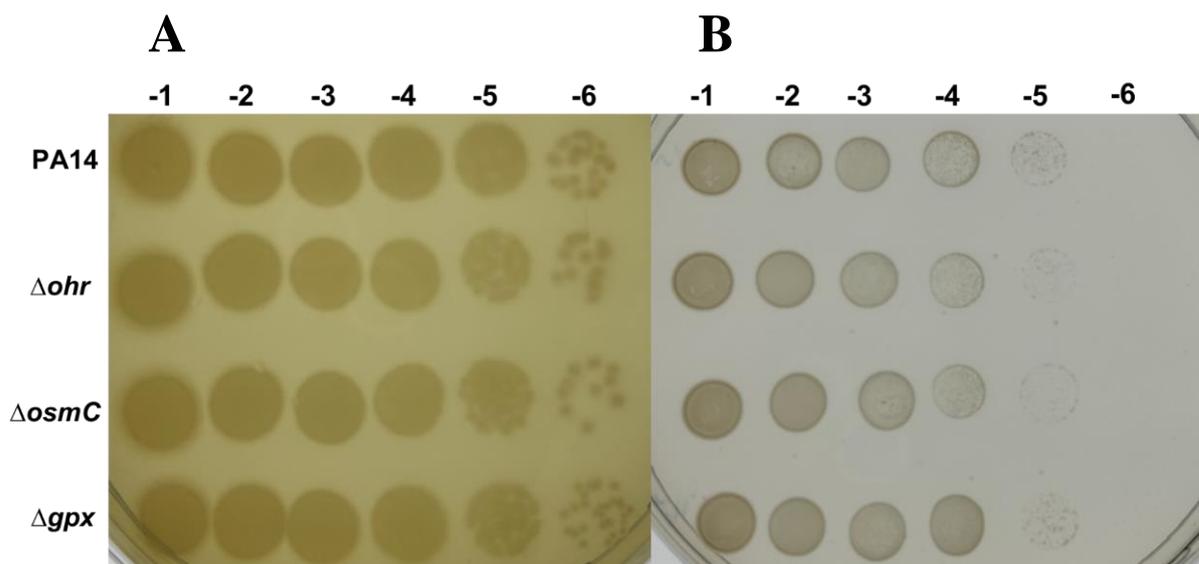


Figura 35: Avaliação da sensibilidade ao estresse osmótico induzido por sacarose (0,5 M) nas linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Como controle, foi realizada uma diluição seriada da linhagem selvagem e dos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx em fase exponencial, sem tratamento com sacarose, plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} , permitindo a comparação com as condições tratadas. B) A figura apresenta uma série de diluições seriadas das mesmas linhagens em fase exponencial, após tratamento com 0,3 M de sacarose. As diluições foram plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} . O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez, utilizando culturas independentes, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

Adicionalmente, foram realizadas curvas de crescimento para avaliar a resposta ao estresse osmótico induzido pela presença de sacarose, utilizando a linhagem selvagem e os mutantes nulos simples (Figura 36). Os resultados indicaram que a presença de sacarose não provocou um estresse osmótico mais acentuado nos mutantes simples em comparação à linhagem selvagem. O perfil de crescimento das linhagens mutantes foi semelhante ao da linhagem selvagem, sugerindo que os genes avaliados não desempenham um papel significativo na resposta ao estresse osmótico causado pela sacarose, pelo menos nas condições experimentais analisadas.

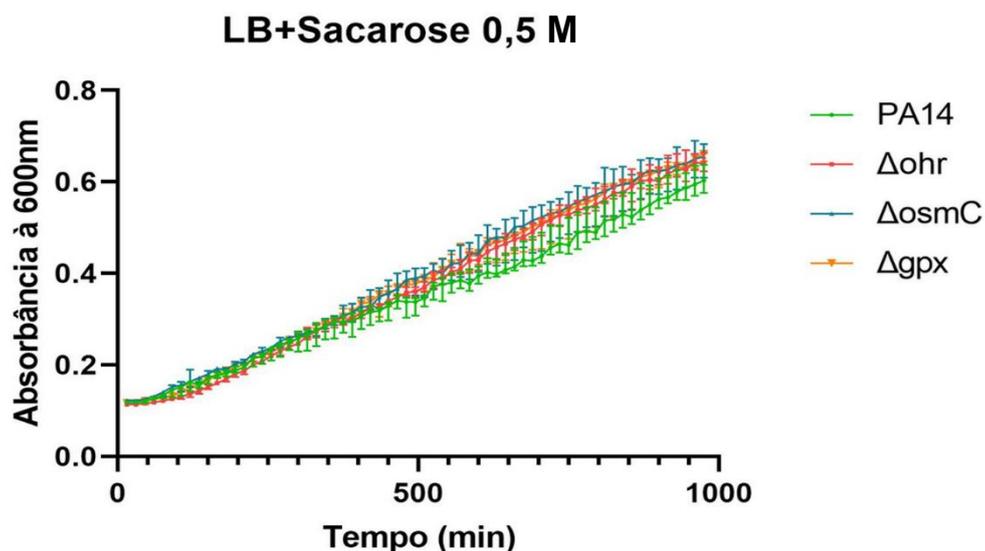


Figura 36: Cinética de crescimento da linhagem selvagem e dos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx de *P. aeruginosa* em meio LB suplementado com 0,5 M de sacarose. O gráfico apresenta o crescimento das linhagens ao longo do tempo, com o eixo x representando o tempo (em horas) e o eixo y a DO_{600nm} . Os desvios-padrão apresentados em cada ponto da curva foram calculados a partir de quadruplicatas técnicas de uma réplica biológica. Os dados representam uma média de três experimentos independentes (três réplicas biológicas) e são consistentes com os resultados observados em todas as repetições.

Além dos ensaios realizados com diferentes concentrações de sacarose, o impacto do estresse osmótico também foi investigado utilizando NaCl como agente osmótico. Inicialmente, a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* e os mutantes simples foram submetidos ao tratamento com NaCl a 1 M, seguido de diluições seriadas para avaliar o crescimento bacteriano. Os resultados, apresentados na Figura 37B, mostram que não houve crescimento bacteriano em nenhuma das linhagens testadas já a partir da primeira diluição (10^{-1}). Em contraste, nas placas controle (sem NaCl) (Figura 37A), todas as linhagens apresentaram crescimento até a diluição de 10^{-6} , destacando a diferença significativa no impacto causado pela presença de NaCl a 1 M. Esses resultados evidenciam que a concentração de 1 M de NaCl foi suficiente para inibir completamente o crescimento bacteriano das linhagens testadas.

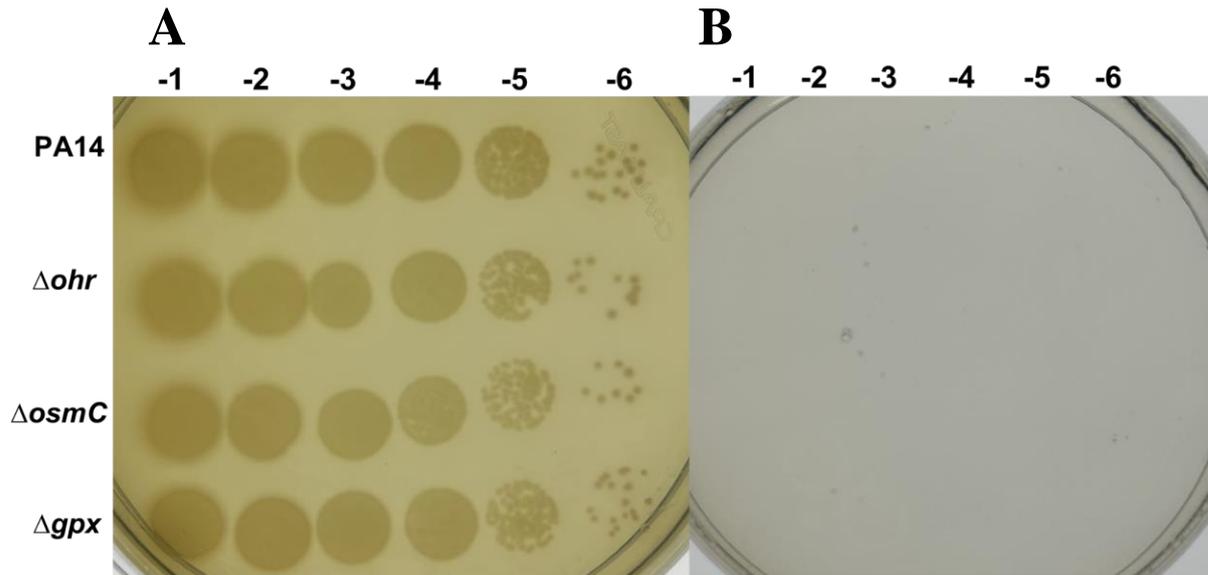


Figura 37: Avaliação da sensibilidade ao estresse osmótico induzido por NaCl (1 M) nas linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Como controle, foi realizada uma diluição seriada da linhagem selvagem e dos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx em fase exponencial, sem tratamento com NaCl, também plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} , permitindo a comparação com as condições tratadas. B) A figura apresenta uma série de diluições seriadas das mesmas linhagens, em fase exponencial, após tratamento com 1 M de NaCl. As diluições foram plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} . O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez, utilizando culturas independentes, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

Dando continuidade aos experimentos, foi realizado um novo teste utilizando NaCl na concentração de 0,5 M, com o objetivo de avaliar uma possível sensibilidade diferencial entre as linhagens mutantes e a linhagem selvagem. Os resultados, apresentados na Figura 38B, mostram que tanto a linhagem selvagem quanto os mutantes nulos exibiram uma inibição relativa do crescimento em resposta ao tratamento com NaCl 0,5 M. Nessas condições, o crescimento foi observado até a diluição 10^{-3} , em comparação com a placa controle, onde as linhagens cresceram até a diluição de 10^{-6} (Figura 38A). Apesar dessa redução no crescimento em ambas as condições tratadas, não foi possível identificar diferenças significativas entre a linhagem selvagem e os mutantes nulos. O perfil de crescimento observado foi semelhante entre todas as linhagens testadas, sugerindo que o estresse osmótico gerado por NaCl a 0,5 M afeta de maneira equivalente tanto a linhagem selvagem quanto os mutantes.

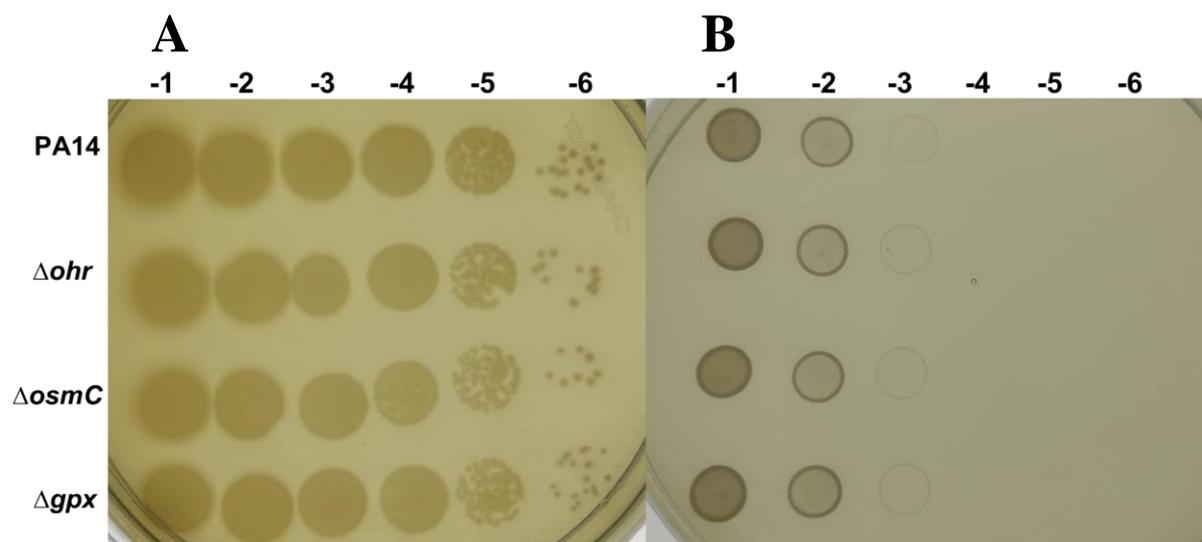


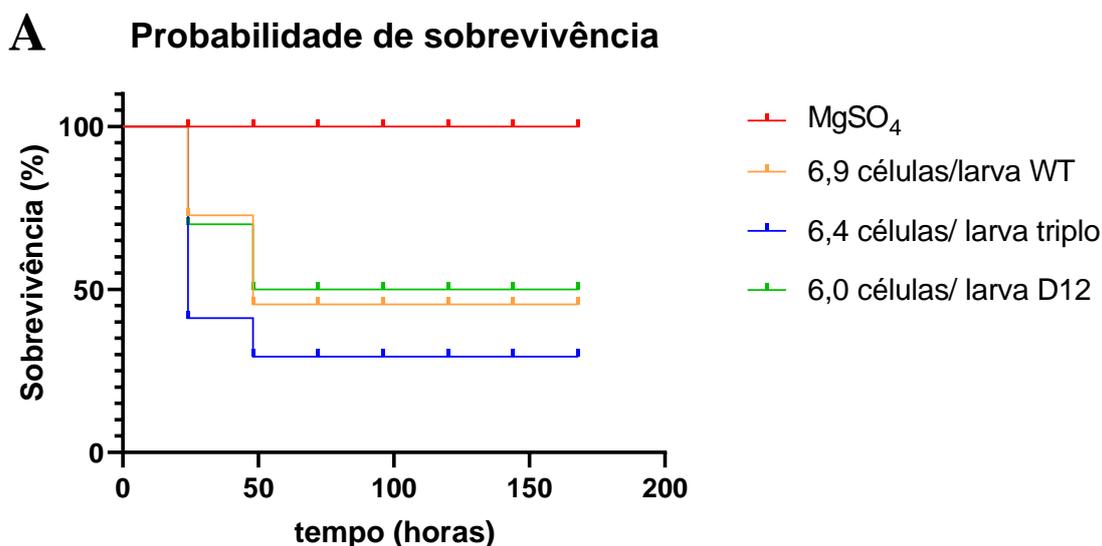
Figura 38: Avaliação da sensibilidade ao estresse osmótico induzido por NaCl (0,5 M) nas linhagem selvagem e mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx pelo ensaio de *Spot Assay*. A) Como controle, foi realizada uma diluição seriada da linhagem selvagem e dos mutantes simples Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx em fase exponencial, sem tratamento com NaCl, também plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} , permitindo a comparação com as condições tratadas. B) A figura apresenta uma série de diluições seriadas das mesmas linhagens em fase exponencial, após tratamento com 0,5 M de NaCl. As diluições foram plaqueadas de 10^{-1} a 10^{-6} . O experimento foi conduzido em duas placas distintas e repetido pelo menos uma vez, utilizando culturas independentes, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

4.8. Ensaio de infecção entre *G. mellonella* e *P. aeruginosa*

Os gráficos da curva de Kaplan-Meier (Figura 39) representam as repetições independentes do ensaio com as linhagens selvagem, o mutante D12 e o mutante triplo $\Delta ohr/osmC/\Delta gpx$. A linhagem D12 é reconhecidamente atenuada em virulência, conforme descrito por Apidianakis et al. (2005), e, por isso, foi utilizada como controle neste experimento. Em todas as repetições, as larvas do grupo controle, inoculadas com 10 mM de $MgSO_4$, apresentaram 100% de sobrevivência ao longo de sete dias, mantendo um aspecto saudável. No entanto, a linhagem selvagem e o mutante triplo exibiram diferentes padrões de mortalidade. Na Figura 39A, observa-se que as larvas inoculadas com o mutante triplo apresentaram uma sobrevivência inferior a 50% já nas primeiras 24 horas do ensaio. A linhagem selvagem, por sua vez, apresentou uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 50%, enquanto a linhagem D12 teve uma taxa ligeiramente superior

a 50%. Na Figura 39B, a quantidade de células bacterianas inoculadas foi aproximadamente a metade daquela utilizada na Figura 39A. Ainda assim, os resultados seguiram o mesmo padrão: o mutante triplo resultou em uma taxa de sobrevivência das larvas inferior à observada para a linhagem selvagem e o mutante D12. Já na Figura 39C, a carga bacteriana inoculada foi semelhante à da Figura 39B, e os resultados também se mantiveram consistentes. A linhagem selvagem apresentou uma taxa de sobrevivência de 50% após 48 horas da infecção, um valor ligeiramente inferior ao observado para o mutante triplo. Como esperado, a linhagem D12 demonstrou a maior taxa de sobrevivência das larvas. Esses achados reforçam que o mutante triplo pode estar envolvido na redução da sobrevivência de *G. mellonella* em comparação com as outras linhagens testadas.

Em todas as repetições a inoculação das larvas com $MgSO_4$ não afetaram a sobrevivência das larvas (Figura 39 A, B, C, curva de cor vermelha), indicando que o $MgSO_4$ na concentração de 10 mM não apresentou toxicidade às larvas e que as condições de incubação não afetaram as mortes observadas nas larvas infectadas. A comparação da sobrevivência das larvas infectadas pelo mutante triplo com a linhagem selvagem e a linhagem D12 não revelaram diferenças significativa nas três repetições deste ensaio ($p \geq 0,05$).



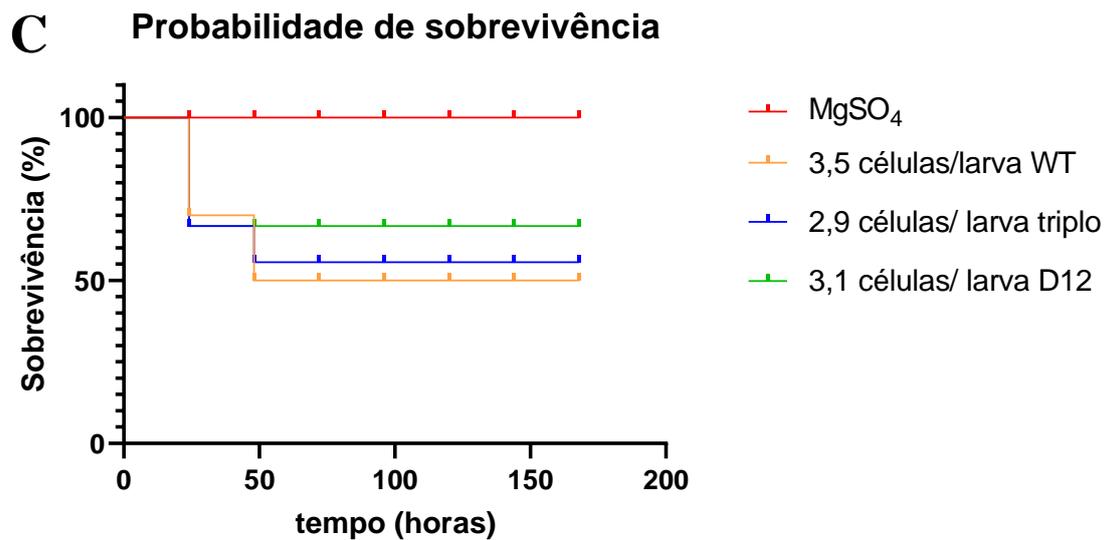
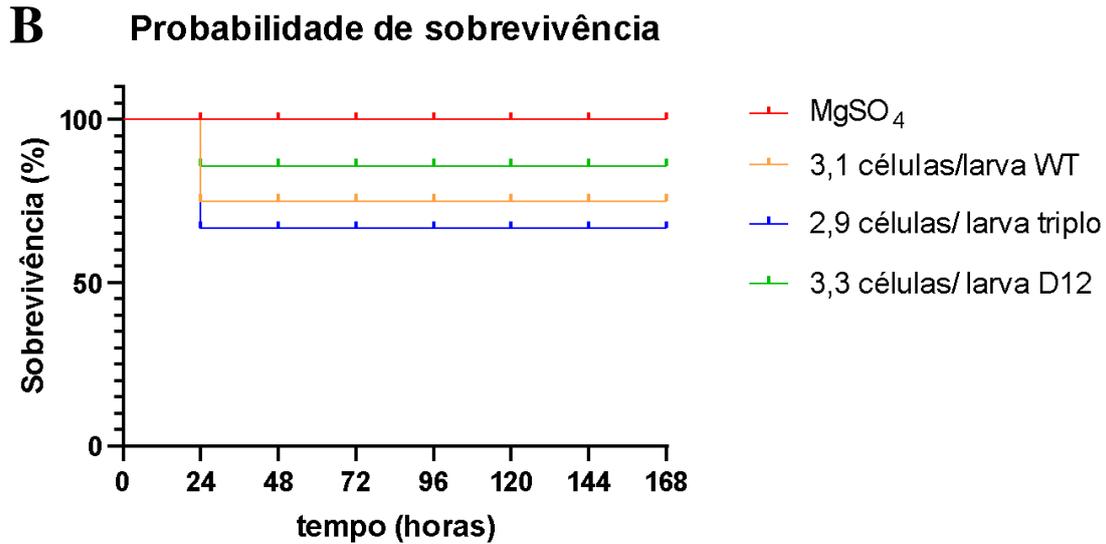


Figura 39: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier das larvas de *G. mellonella* inoculadas com a linhagem de *P. aeruginosa* wt, D12 e triplo mutante. As curvas representam três ensaios de infecção realizados em dias diferentes. No eixo X está representado o tempo em horas, enquanto no eixo Y está representado o percentual de sobrevivência das larvas. Em (A), (B) e (C) são apresentadas a probabilidade de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* inoculadas com a linhagem selvagem (wt), o mutante triplo e o mutante D12. As curvas para cada linhagem testada foram comparadas utilizando o Log-Rank Test ($n=15$).

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo aprofundar o conhecimento sobre o papel fisiológico das tiol peroxidases da família Ohr/OsmC e da família GPxs em *P. aeruginosa*. De acordo com a literatura, essas enzimas são as principais responsáveis pela detoxificação de OHPs, como os derivados de ácidos graxos (ALEGRIA et al., 2017). Essas moléculas possuem papel relevante em processos inflamatórios em animais e plantas, além de influenciar a interação patógeno-hospedeiro (REIS e SPICKETT, 2012; MOSBLECH; FEUSSNER; HEILMANN, 2009). Diante disso, a principal hipótese deste projeto esteve centrada em investigar o papel de enzimas diretamente envolvidas na detoxificação de OHPs, visando compreender melhor os mecanismos moleculares que contribuem para a patogenicidade dessa bactéria.

A primeira descrição de uma enzima diretamente envolvida na detoxificação de OHPs em bactérias foi feita por Mongkolsuk et al. (1998), ao identificar o gene *ohr* em *X. campestris* pv. *phaseoli*. Essa enzima foi nomeada como proteína de resistência a hidroperóxidos orgânicos (Ohr). Posteriormente, foi constatado que a Ohr está amplamente distribuída no Domínio Bacteria (ATICHARTPONGKUL et al., 2010 e MEIRELES et al., 2022), apresentando perfis de expressão similares aos descritos por Mongkolsuk et al. (1998) e desempenhando um papel primário na resistência aos OHPs (ALEGRIA et al., 2017; OCHSNER et al., 2001). Ao investigar o papel da enzima Ohr no contexto da infecção, observou-se que, embora sua expressão seja induzida durante a infecção (MONGKOLSUK et al., 1998), sua ausência não resultou em redução de virulência em modelos animais (ATICHARTPONGKUL et al., 2010; GUERCIO, 2019). Curiosamente, foi constatado que a superexpressão de *ohr*, induzida pela deleção do seu repressor transcricional OhrR, levou à atenuação da virulência em diferentes bactérias patogênicas (CHATTERJEE et al., 2006; ATICHARTPONGKUL et al., 2010; GUERCIO, 2019). Esses dados sugerem que os níveis de expressão de Ohr afetam a fisiologia bacteriana de maneira ainda não completamente compreendida, reforçando a necessidade de estudos adicionais para elucidar a contribuição desse sistema enzimático na virulência de diferentes espécies bacterianas. Além disso, tais observações indicam que, embora Ohr contribua diretamente para a resistência aos OHPs, sua função pode ser compensada por outros mecanismos de defesa bacteriana. Nesse contexto, *P. aeruginosa* apresenta um conjunto robusto de tiol peroxidases anotadas em seu genoma, com funções associadas à detoxificação de OHPs. Entre essas enzimas, destaca-se a presença de outra

proteína da família Ohr/OsmC, que, embora apresente maior afinidade por OHPs do que por H₂O₂ (SHIN et al., 2004), apresenta diferenças na regulação de sua expressão. Em *E.coli*, por exemplo, a expressão de *osmC* é induzida pelo estresse osmótico (GUTIERREZ & DEVEDJIAN, 1991), enquanto as proteínas Ohr estão mais frequentemente associadas à resposta ao estresse oxidativo (ATICHARTPONGKUL et al., 2001). Apesar do envolvimento de OsmC na detoxificação de OHPs, seu papel fisiológico e a regulação de sua expressão em *P. aeruginosa* permanecem pouco conhecidos.

Além de Ohr e OsmC, *P. aeruginosa* codifica as glutathione peroxidases (GPxs), outro grupo de tiol peroxidases importantes para a detoxificação de hidroperóxidos. Estudos prévios indicaram que a proteína codificada pelo gene *gpx1* desempenha um papel na resistência a OHPs (LAN et al., 2010; ALEGRIA et al., 2017). Assim, neste trabalho, considerando a hipótese inicial de que *P. aeruginosa* utiliza mecanismos compensatórios para lidar com a ausência de uma enzima específica, foram gerados mutantes duplos ($\Delta\text{ohr}/\Delta\text{osmC}$, $\Delta\text{ohr}/\Delta\text{gpx}$ e $\Delta\text{osmC}/\Delta\text{gpx}$) e um mutante triplo ($\Delta\text{ohr}/\Delta\text{osmC}/\Delta\text{gpx}$). Esses mutantes foram utilizados para investigar possíveis interações compensatórias e avaliar a sensibilidade da bactéria à ausência combinada dessas enzimas frente a insultos oxidativos gerados por hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos.

Adicionalmente, a virulência do mutante triplo foi avaliada utilizando o modelo de infecção em *G. mellonella*. Este mutante triplo é particularmente relevante, pois apresenta a ausência de três enzimas envolvidas na detoxificação de OHPs, tornando-o uma ferramenta importante para compreender os mecanismos de detoxificação de OHPs no contexto da infecção. Já é sabido que mutantes deficientes em sistemas enzimáticos envolvidos na detoxificação de H₂O₂, como catalases (ELKINS et al., 1999), AhpC1 (ROCHA et al., 2021) e LsfA (KAIHAMI et al., 2014), apresentam redução de virulência, o que reforça o impacto dessas enzimas na fisiologia bacteriana.

Por fim, considerando que *P. aeruginosa* possui mais duas enzimas da família das GPxs, este trabalho propôs a geração dos mutantes nulos Δgpx2 e Δgpx3 , complementando a investigação deste sistema enzimático composto por Gpx1 (PA14_27520), Gpx2 (PA14_47550) e Gpx3 (PA14_53420) em *P. aeruginosa*. Apesar do potencial funcional dessas enzimas, há poucos estudos que exploram seus papéis em

P. aeruginosa. Assim, a caracterização de linhagens com deleções individuais ou combinadas das GPxs poderá fornecer insights valiosos sobre a redundância e a especialização funcional destas tiol peroxidases nessa bactéria, especialmente no que diz respeito à remoção de OHPs. Embora tenha enfrentado dificuldades técnicas na construção dos plasmídeos usados na estratégia de deleção destes genes, estes plasmídeos foram obtidos e serão usados posteriormente para a geração dos mutantes nulos através de recombinação homóloga.

Outro objetivo abordado nesta dissertação foi construir as linhagens mutantes complementadas, através da reinserção do gene deletado no cromossomo bacteriano. Esse método permite restaurar o fenótipo selvagem, confirmando que as alterações fenotípicas são diretamente atribuíveis à ausência do gene específico, e não a outros fatores genéticos, sendo, portanto uma abordagem muito comum na área de genética bacteriana. Neste trabalho, clonamos com sucesso os fragmentos correspondentes às regiões codificantes dos genes *ohr*, *osmC*, *gpx1*, *gpx2* e *gpx3*, conservando suas respectivas regiões promotoras, no vetor mini-CTX2 (Figura 20). Assim, estas construções possibilitarão a integração desses genes tanto em linhagens com a deleção do gene correspondente, por exemplo reintroduzir o gene *ohr* na linhagem Δohr , quanto em outros backgrounds genéticos, por exemplo reintroduzir o gene *gpx1* na linhagem Δohr permitindo assim uma análise detalhada do papel individual de cada gene. Apesar de êxito na clonagem, será necessário realizar um novo sequenciamento das construções obtidas, a fim de detectar potenciais erros introduzidos durante a amplificação dos fragmentos de DNA, uma vez que os sequenciamentos anteriores não apresentaram qualidade satisfatória.

Após obter as linhagens com deleções nos genes selecionados, iniciamos sua caracterização fenotípica para identificar possíveis alterações no crescimento aeróbio e na resposta a diferentes condições de estresse.

Como já mencionado, a notável versatilidade metabólica de *P. aeruginosa* permite que essa bactéria explore uma ampla variedade de fontes de C para sustentar seu crescimento (AMBREETHA et al, 2024). A análise das curvas de crescimento bacteriano foi crucial para investigar a dinâmica de desenvolvimento da linhagem selvagem e dos mutantes sob diferentes condições de cultivo. Essa abordagem também assegurou que uma eventual redução na virulência observada em algumas linhagens nos ensaios não estivesse relacionada a alterações na capacidade replicativa das linhagens mutantes. A

capacidade de metabolizar diferentes fontes de C pode desencadear uma reconfiguração no metabolismo central, afetando a expressão de genes envolvidos na patogenicidade, como aqueles relacionados ao equilíbrio redox e à cadeia transportadora de elétrons (DOLAN et al., 2020). Além disso, a infecção pulmonar causada por *P. aeruginosa* desencadeia uma resposta inflamatória robusta, na qual células imunitárias, como os macrófagos, são ativadas por componentes bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), levando a uma reprogramação metabólica. Em vez de utilizarem predominantemente a fosforilação oxidativa para a geração de energia, os macrófagos passam a priorizar a glicólise. Essa alteração metabólica resulta no acúmulo e liberação de succinato e espécies reativas de oxigênio (ROS) no microambiente infeccioso (TANNAHILL et al., 2013). O succinato exerce um papel pró-inflamatório ao induzir a estabilização do fator induzido por hipóxia 1 α (HIF1 α), estimulando a glicólise e promovendo a liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 β (MILLS et al., 2016). Durante a infecção, *P. aeruginosa* precisa se adaptar rapidamente aos metabólitos disponíveis, incluindo o succinato liberado pelos macrófagos. Diferentemente de muitas outras bactérias que priorizam glicose ou aminoácidos como fonte de carbono, *P. aeruginosa* consome preferencialmente succinato, um processo regulado pelo locus *crc*, antes de recorrer a outras fontes de carbono (VALENTINI e LAPOUGE, 2012). Além disso, cepas laboratoriais de *P. aeruginosa* cultivadas em altas concentrações de succinato apresentam adaptações metabólicas que lhes conferem maior resistência a elevados níveis de oxidantes (RIQUELME et al., 2019).

Para atenuar o estresse oxidativo induzido pela infecção, os macrófagos produzem itaconato, um metabólito com propriedades anti-inflamatórias (LAMPROPOULOU et al., 2016). Em infecções por bactérias Gram-negativas em superfícies mucosas, o itaconato atua como um regulador da resposta inflamatória, suprimindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias por meio da inibição da oxidação do succinato pela enzima succinato desidrogenase (CORDES et al., 2016). No entanto, *P. aeruginosa* apresenta a capacidade de metabolizar esse composto, utilizando-o como fonte de carbono para sustentar seu crescimento e persistência no hospedeiro. A bactéria expressa três genes (*ich*, *ict* e *icl*) essenciais para o metabolismo do itaconato, permitindo sua assimilação nas vias aéreas (SASIKARAN et al., 2014). Isolados clínicos de *P. aeruginosa* demonstram uma adaptação *in vivo* ao itaconato, caracterizada pelo aumento da expressão do locus *ict-ich-ccl* e pela indução da produção de biofilme. Como consequência, essas cepas

alteram sua preferência metabólica, substituindo o succinato pelo itaconato como principal fonte de C nas vias aéreas, o que pode favorecer a persistência da infecção (RIQUELME e PRINCE, 2020; RIQUELME et al., 2020). Portanto, diferentemente da glicose, o succinato, o citrato e os casaminoácidos são fontes de carbono preferenciais para *P. aeruginosa* (MCGILL et al., 2021), sem exercerem efeito antimicrobiano. Em contraste, o itaconato possui uma atividade microbicida bem estabelecida, sendo seu mecanismo de ação associado à inibição do ciclo do glioxilato em bactérias (MICHELUCCI et al., 2013).

Os resultados apresentados na Figura 21 mostram que não houve alteração no crescimento das linhagens mutantes em comparação à linhagem selvagem, tanto em meio complexo quanto em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de C. Podendo ser observado que mesmo na ausência de duas ou três enzimas não foi identificado alterações no crescimento. Esses achados indicam que a ausência das enzimas testadas não comprometeu o metabolismo da bactéria sob essas condições de cultivo. Observou-se ainda que, no geral, o crescimento das linhagens testadas foi menor em meio M9 suplementado com glicose, mesmo estando esta fonte de C mais de duas vezes concentrada em relação as demais (111 mM de glicose versus 40 mM de succinato e citrato). Esse resultado corrobora estudos anteriores que sugerem que, ao contrário de muitas bactérias entéricas, *P. aeruginosa* não utiliza preferencialmente a glicose como fonte primária de carbono (PALMER; AYE; WHITELEY, 2007). O crescimento mais robusto das linhagens foi observado em meio rico e na presença de succinato ou casaminoácidos como únicas fontes de carbono. Além disso, conforme descrito por Riquelme et al. (2020), observamos que a linhagem *P. aeruginosa* PA14 foi capaz de utilizar itaconato como fonte de carbono, apresentando um crescimento comparável ao observado na presença de glicose, mesmo sendo essa uma molécula que induz estresse à membrana celular (Figura 21) (MICHELUCCI et al., 2013).

Após confirmar que a deleção dos genes não afetou o crescimento das linhagens, foram realizados ensaios para avaliar se a ausência isolada ou combinada das enzimas influenciaria a sensibilidade a oxidantes orgânicos e inorgânicos. Conforme demonstrado nas Figuras 22 e 23, a CIM para tBOOH foi de 800 μ M na linhagem selvagem e nos mutantes simples $\Delta osmC$ e Δgpx , enquanto no mutante Δohr , nos mutantes duplos ($\Delta ohr/\Delta osmC$ e $\Delta ohr/\Delta gpx$) e no mutante triplo ($\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$), a CIM foi reduzida para 600 μ M. Como esperado, os resultados demonstraram que o mutante Δohr

apresentou sensibilidade ao tBOOH, assim como os mutantes duplos e o triplo. No entanto, a deleção de múltiplos genes não resultou em um aumento adicional na sensibilidade. Isso sugere que a ausência de *ohr* é determinante para a susceptibilidade ao estresse oxidativo e que *osmC* e *gpx* não exercem um papel compensatório significativo na detoxificação de OHP como era esperado na nossa hipótese. O mutante $\Delta osmC$ demonstrou resistência semelhante à linhagem selvagem, indicando que sua ausência não compromete a resposta ao tBOOH. Da mesma forma, a deleção de *gpx* não alterou a sensibilidade ao oxidante.

Na tentativa de observar uma possível diferença na sensibilidade aos OHPs atribuídas a ausência de OsmC e GPx realizamos o ensaio de *Spot assay*, já que apresenta maior sensibilidade que os ensaios de CIM. Assim, o *Spot assay*, foi utilizado para avaliar a sensibilidade ao tBOOH, H₂O₂ e NaOCl. Os resultados de *Spot assay* foram semelhantes aos ensaios de CIM, onde o mutante simples Δohr apresentou sensibilidade ao tBOOH, enquanto os mutantes $\Delta osmC$ e Δgpx não apresentaram sensibilidade significativa, exibindo um perfil de resistência semelhante ao da linhagem selvagem, sugerindo que essas enzimas não são essenciais para a defesa contra o tBOOH nas condições testadas. Estes dados corroboram que a Ohr é o principal sistema antioxidante envolvido na neutralização do tBOOH, já que os mutantes simples $\Delta osmC$ e Δgpx exibiram fenótipo semelhante à linhagem selvagem. Esses resultados também mostraram que, embora OsmC pertença à mesma família de Ohr/OsmC, sua contribuição na detoxificação do tBOOH para ser dispensável quando na presença de Ohr.

Em uma análise subsequente, na tentativa de dissecar o papel de OsmC e GPx, analisamos a sensibilidade dos mutantes duplos ($\Delta ohr/\Delta osmC$ e $\Delta ohr/\Delta gpx$) e triplo ($\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$) permitindo evidenciar um possível aumento de sensibilidade na ausência de Ohr. Os resultados obtidos mais uma vez corroboraram o papel primário de Ohr na detoxificação de OHPs, uma vez que a exclusão simultânea de *ohr* com *osmC* ou *gpx* resultou em um fenótipo de sensibilidade similar ao do mutante Δohr simples. Já o mutante duplo $\Delta osmC/\Delta gpx$, que manteve a enzima Ohr funcional, apresentou resistência semelhante à da linhagem selvagem. Assim, demonstramos que, em *P. aeruginosa*, a enzima Ohr é essencial para garantir proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo tBOOH. Além disso, este é o primeiro estudo a investigar a função de OsmC nesta bactéria, indicando que a proteção contra OHPs é primariamente desempenhada por Ohr, enquanto OsmC e Gpx possivelmente atuam em outros tipos de estresse ou em outras

condições fisiológicas. Também podemos considerar que o ensaio de *Spot assay* não foi suficientemente sensível para evidenciar a sensibilidade das linhagens $\Delta osmC$ e Δgpx , e que será preciso quantificar o número de células viáveis obtidas após o tratamento com este oxidante.

Como tanto a linhagem $\Delta osmC$ quanto Δgpx não apresentam sensibilidade aos OHPs, usamos o ensaio de *Spot assay* para verificar o papel destas tiol peroxidases na resistência ao H_2O_2 em *P. aeruginosa*. Como esperado, a linhagem controle, $\Delta lsfA$, conhecida por sua sensibilidade ao H_2O_2 , apresentou crescimento reduzido, validando a eficácia do ensaio. Entre os mutantes analisados na Figura 26, apenas $\Delta osmC$ demonstrou alguma sensibilidade ao H_2O_2 , enquanto Δohr e Δgpx apresentaram resistência semelhante à linhagem selvagem. Isso sugere que OsmC pode contribuir para detoxificação do H_2O_2 , assim como foi observado para LsfA, enquanto Ohr e Gpx não. Este resultado foi inesperado, já que OsmC apresenta preferência por OHPs e não ao H_2O_2 . Os mutantes duplos ($\Delta ohr/\Delta gpx$, $\Delta osmC/\Delta gpx$) e o triplo ($\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$) também não apresentaram sensibilidade significativa ao H_2O_2 . Enquanto o mutante duplo $\Delta ohr/\Delta osmC$ apresentou sensibilidade semelhante a linhagem $\Delta lsfA$ sendo mais um indicativo de um possível papel de OsmC na detoxificação de H_2O_2 . Vale ressaltar que *P. aeruginosa* possui sistemas redundantes altamente eficientes para a degradação de peróxido de hidrogênio. Entre os mecanismos possíveis estão a ação das catalases KatA e KatB, conhecidas por serem as principais enzimas responsáveis pela degradação de peróxido de hidrogênio na bactéria (SHIN; CHOI; CHO, 2008). Estudos prévios realizados por Elkins et al. (1999) indicam que a inativação dessas catalases resulta em uma sensibilidade acentuada ao H_2O_2 , ao contrário do observado para as tiol peroxidases testadas neste estudo. A ausência de um fenótipo de sensibilidade mais pronunciado nos mutantes duplos $\Delta ohr/\Delta gpx$, $\Delta osmC/\Delta gpx$ e triplo $\Delta ohr/\Delta osmC/\Delta gpx$ reforça a ideia de que em *P. aeruginosa* haja mecanismos de regulação complexos destes sistemas enzimáticos para lidar com o estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 , sendo as catalases os principais componentes dessa defesa. No entanto, a sensibilidade observada no mutante $\Delta osmC$ e no mutante duplo $\Delta ohr/\Delta osmC$ sugere que, embora OsmC não seja essencial para a degradação do H_2O_2 , sua participação pode ser relevante em determinadas condições de estresse, possivelmente atuando em conjunto com outras peroxidases ou enzimas reguladoras da resposta oxidativa. Esses achados ressaltam a complexidade da

rede antioxidante de *P. aeruginosa*, destacando que diferentes classes de peroxidases desempenham papéis específicos e contextuais na defesa contra o estresse oxidativo.

Como já mencionado, outro oxidante de grande relevância fisiológica no contexto da infecção é o HOCl, produzido pela ação da enzima mieloperoxidase, presente principalmente nos grânulos de neutrófilos (KLEBANOFF, 2005). Essa enzima é a única capaz de gerar HOCl em quantidades significativas, um agente oxidante essencial no combate a patógenos invasores (VLASOVA, 2018). Estudos anteriores demonstraram que a ausência das catalases KatA e KatE, assim como das alquil hidroperóxido redutases AhpC e AhpF, aumentou a susceptibilidade de *P. aeruginosa* PAO1 e PA14 ao NaOCl em comparação com as linhagens selvagens (NIZER et al., 2023). Ao mesmo tempo, foi mostrado que a superexpressão de Ohr levou a proteção ao estresse induzido por NaOCl (NIZER et al., 2023). Estudo publicado por Rocha et al., 2021, mostrou que a ausência de Ohr, Gpx, AhpC1, AhpC2 e LsfA levaram a uma diminuição na resistência a este oxidante. A padronização da concentração de NaOCl foi essencial para determinar a concentração ideal deste oxidante, permitindo a identificação de possíveis diferenças na sensibilidade entre as distintas linhagens de *P. aeruginosa*. Inicialmente, concentrações de até 0,5 mM não mostraram efeito inibitório significativo (Figura 28). Em seguida, testes com 0 a 10 mM revelaram que a bactéria cresce até 1 mM, mas não sobrevivia em 5 mM e 10 mM, indicando forte efeito inibitório (Figura 29). Com base nesses resultados, novas avaliações entre 0 e 5 mM foram realizadas (Figura 30), e as concentrações de 1 mM e 2 mM foram selecionadas para os ensaios subsequentes, pois tiveram efeito sem impedir completamente o crescimento bacteriano. Os ensaios de *Spot Assay* realizados com NaOCl na concentração de 1 mM (Figura 31) e 2 mM (Figura 32) não revelaram diferenças significativas na sensibilidade dos mutantes Δohr , $\Delta osmC$ e Δgpx em relação à linhagem selvagem de *P. aeruginosa*. Todas as linhagens testadas apresentaram crescimento similar, tanto na condição controle quanto na presença do oxidante, indicando que a ausência individual dessas enzimas antioxidantes não comprometeu a resistência da bactéria ao NaOCl. Esses resultados diferem dos observados por Rocha et al. (2021), que relataram um aumento na sensibilidade ao HOCl de 1,4x e 2,8x para as linhagens Δohr e Δgpx , respectivamente. No entanto, nossos dados são preliminares e indicam que metodologias adicionais poderiam ser utilizadas para uma análise mais detalhada do perfil fenotípico de sensibilidade. Por exemplo, ensaios de contagem de unidades formadoras de colônia poderiam proporcionar uma avaliação quantitativa mais

precisa, enquanto o uso de meio mínimo, ao invés de meio complexo, pode ser particularmente eficaz para evidenciar diferenças de sensibilidade, uma vez que elimina nutrientes e fatores de proteção adicionais presentes em meios ricos, que podem mascarar o impacto da ausência de determinadas enzimas antioxidantes. Em um meio mínimo, a bactéria é forçada a depender exclusivamente de seus próprios mecanismos de resistência e sobrevivência, permitindo que fenótipos de sensibilidade, como os relacionados à resistência ao NaOCl, sejam detectados com maior clareza e precisão. Além disso, essa abordagem proporciona condições mais controladas e reduz a interferência de componentes extracelulares que poderiam influenciar os resultados dos ensaios. Vale ressaltar que as divergências de resultados obtidas no grupo com os publicados por Rocha et al. (2021), mas não são inéditas. Por exemplo, dados gerados pelo LFBM em relação a sensibilidade da linhagem $\Delta ahpC1$ ao H_2O_2 , não pôde ser reproduzida pela aluna de Iniciação Científica Júlia Mello (DA SILVA, 2024). Além disso, há diferenças metodológicas importantes: enquanto Rocha et al. (2021) utilizaram linhagens derivadas de uma biblioteca de transposon (LIBERATI et al., 2006), neste estudo foram empregados mutantes nulos não polares, o que pode impactar os resultados e a interpretação dos dados. Essas diferenças destacam a importância de replicar experimentos em diferentes contextos experimentais e com metodologias complementares para melhor compreender a contribuição dessas enzimas antioxidantes na resistência ao NaOCl.

A investigação do impacto do estresse osmótico induzido por sacarose em *P. aeruginosa* revelou que concentrações elevadas, como 1 M (Figura 33), foram suficientes para inibir completamente o crescimento bacteriano, enquanto concentrações mais baixas observadas nas Figuras 34 e 35 (0,3 M e 0,5 M) não demonstraram efeitos diferenciados entre a linhagem selvagem e os mutantes nulos testados. Esses achados fornecem pistas sobre a resposta de *P. aeruginosa* ao estresse osmótico e sua robustez em ambientes de alta osmolaridade. A sacarose é um soluto osmótico e pode causar um aumento na osmolaridade extracelular, forçando a célula a ajustar sua homeostase iônica e ativar mecanismos de proteção. A sobrevivência sob estresse osmótico envolve a produção de osmoprotetores, como trealose e *N*-acetilglutaminilglutamina amida (NAGGN), além da regulação da fluidez da membrana por ácidos graxos insaturados e saturados (SAGOT et al., 2010). Neste presente estudo, a ausência de crescimento bacteriano em 1 M de sacarose demonstra que essa concentração impôs um estresse osmótico extremo,

provavelmente superando a capacidade de osmoproteção da bactéria. Entretanto, a ausência de diferenças de crescimento entre a linhagem selvagem e os mutantes nulos em 0,3 M e 0,5 M de sacarose sugere que os genes deletados nos mutantes não estão diretamente envolvidos na resposta ao estresse osmótico nessas condições. Os resultados das curvas de crescimento com 0,5 M de sacarose apresentadas na Figura 36 indicam que a presença de sacarose, nas concentrações testadas, não intensificou o estresse osmótico nos mutantes simples em comparação à linhagem selvagem. Os genes investigados no estudo pertencem à família Ohr/OsmC, cuja função está majoritariamente associada à resposta ao estresse oxidativo, mas também pode estar envolvida na adaptação osmótica. O gene *osmC* em *E coli*. é regulado pelo estresse osmótico e desempenha um papel crítico na sobrevivência sob condições de alta salinidade (GUTIERREZ e DEVEDJIAN, 1991). No entanto, os dados apresentados não indicam uma sensibilidade aumentada dos mutantes sob concentrações moderadas de sacarose, sugerindo que a ausência dessas proteínas não compromete a capacidade de *P. aeruginosa* de lidar com variações osmóticas nas condições experimentais testadas.

Os resultados obtidos empregando um estresse iônico induzido pelo NaCl demonstraram a inibição completa do crescimento bacteriano na concentração de 1 M (Figura 37). Esse efeito pode estar relacionado à interferência do NaCl na integridade da membrana, na atividade de transportadores iônicos e na disponibilidade de água intracelular, afetando processos essenciais, como a biossíntese de proteínas e a manutenção do potencial de membrana. Por outro lado, a redução no crescimento observada na presença de 0,5 M de NaCl (Figura 38), sem diferenças significativas entre a linhagem selvagem e os mutantes nulos, sugere que os genes estudados não desempenham um papel crítico na resposta ao estresse osmótico e iônico imposto por este soluto. A similaridade no perfil de crescimento entre todas as linhagens indica que *P. aeruginosa* pode estar utilizando mecanismos gerais de adaptação osmótica, como a produção de osmoprotetores (ex.: trealose e NAGGN) e a regulação de sistemas de transporte iônico, que não dependem diretamente dos genes deletados nos mutantes testados. Além disso, esses resultados corroboram os achados anteriores obtidos com sacarose, nos quais as linhagens mutantes não apresentaram sensibilidade aumentada a concentrações moderadas do soluto. Isso sugere que, apesar da possível regulação osmótica do gene *osmC* em outras bactérias, em *P. aeruginosa* sua ausência talvez não comprometa a sobrevivência sob essas condições específicas.

Após a caracterização fenotípica inicial, foi iniciada a avaliação da virulência do mutante triplo utilizando larvas de *G. mellonella* como modelo experimental. O uso de *G. mellonella* em estudos *in vivo* tem se tornado cada vez mais comum em todo o mundo, conforme demonstrado por Pereira et al. (2020), devido à sua relevância como modelo alternativo para investigação da patogênese bacteriana e resposta do hospedeiro. Isso se deve à similaridade entre os componentes do sistema imunológico de *G. mellonella* e o sistema imune inato humano (PEREIRA et al., 2020). Em relação à infecção de *G. mellonella* por *P. aeruginosa*, Jander, Rahme e Ausubel (2000) demonstraram uma correlação significativa entre o aumento da DL₅₀ em *G. mellonella* e a redução da letalidade em camundongos. Esses dados indicam que mutantes de *P. aeruginosa* que apresentam menor virulência nas larvas de *G. mellonella*, tendem a exibir também menor virulência em camundongos. Além disso, o estudo conduzido por Bismuth et al. (2021) investigou o papel das EROs produzidas pelo sistema imunológico de *G. mellonella* na resistência contra *Salmonella enterica*. A produção de EROs por *G. mellonella* foi evidenciada pelos defeitos de virulência observados em mutantes de *Salmonella* deficientes em catalases, peroxirredoxinas ou superóxido dismutases citoplasmáticas, tornando essas cepas altamente sensíveis aos oxidantes gerados pelo hospedeiro. Esses achados reforçam a relevância de *G. mellonella* como modelo para avaliar a virulência de mutantes bacterianos e sua capacidade de lidar com o estresse oxidativo imposto pelas EROs geradas pelas células do hospedeiro. As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier são preliminares. Embora as Figuras 39A e 39B indiquem uma menor porcentagem de sobrevivência nas larvas infectadas com o mutante triplo em comparação com aquelas infectadas com a linhagem selvagem e D12, a análise estatística não revelou uma diferença significativa entre as linhagens testadas. Embora tenhamos verificado que a ausência das enzimas deste estudo não tenham afetado o crescimento aeróbio sob diferentes condições nutricionais, tivemos dificuldades na padronização da quantidade de células inoculadas nas larvas. Outro dado importante, é que utilizamos como controle positivo a linhagem D12, que apresenta a ausência de uma proteína denominada KerV que é importante para infecção em animais, incluindo *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* e camundongos e plantas (AN et al., 2009). Como conclusão, consideramos que os resultados de infecção apresentados neste trabalho ainda são preliminares, principalmente por não encontrar uma condição em que tornasse evidente a atenuação da virulência na linhagem que utilizamos como controle em nossos experimentos. De fato, um estudo recente publicado por Axline et al. (2025) demonstrou que a infecção de *G.*

mellonella por *P. aeruginosa* apresenta desafios devido à alta agressividade dessa bactéria. Os autores destacaram que o tempo de infecção é um fator crucial na avaliação da atenuação da virulência entre diferentes linhagens. A partir de diversas observações, eles propuseram que a infecção por *P. aeruginosa* em *G. mellonella* deve ser avaliada com base no tempo letal médio necessário para matar 50% das larvas em vez de apenas considerar a dose letal média. Com base nesses achados e nas nossas próprias observações experimentais, torna-se essencial monitorar as larvas em intervalos de horas, em vez de dias, como foi realizado neste trabalho. Portanto, novos experimentos são necessários para verificar a reprodutibilidade desse resultado, especialmente considerando que os ensaios com *G. mellonella* ainda estão em fase de padronização pelo grupo.

6. CONCLUSÕES

- Foram construídos os plasmídeos pEX18Ap_del_gpx2 e pEX18Ap_del_gpx3, que serão utilizados futuramente para gerar os mutantes nulos $\Delta gpx2$ e $\Delta gpx3$.
- Os mutantes $\Delta osmC$ e $\Delta osmC/\Delta gpx$ foram obtidos com sucesso por meio de recombinação homóloga, utilizando a construção pEX18Ap_del_osmC.
- Foram construídas com sucesso as construções genéticas no vetor mini-CTX2 para complementar linhagens mutantes de *P. aeruginosa*, permitindo futuras validações fenotípicas e estudos funcionais detalhados.
- O genótipo dos mutantes simples, duplos e triplo foi confirmado por PCR de colônia, o que permitiu validar a deleção correta dos genes-alvo por meio da amplificação das regiões deletadas.
- A ausência simples ou combinada das enzimas Ohr, OsmC e GPxs não impactou a cinética de crescimento aeróbio de *P. aeruginosa* em meio complexo (LB) ou em meio mínimo (M9) suplementado com diferentes fontes de carbono, como citrato, glicose, succinato, itaconato ou casaminoácidos.
- Ensaios de CIM e *Spot Assay* demonstraram que a enzima Ohr desempenha um papel central na resistência de *P. aeruginosa* a hidroperóxidos orgânicos, como o tBOOH. A ausência de *ohr* resultou em sensibilidade aumentada ao estresse oxidativo, independentemente da deleção simultânea dos genes *osmC* e *gpx*.

- Ensaios de *Spot Assay* indicaram que as tiol peroxidases Ohr, OsmC e Gpx não desempenham um papel central na resistência ao H₂O₂. Apenas as linhagens $\Delta osmC$ e o mutante duplo $\Delta ohr/\Delta osmC$ exibiram alguma sensibilidade, ao H₂O₂.
- Resultados dos ensaios de *Spot Assay* utilizando o NaOCl mostraram que as enzimas Ohr, OsmC e Gpx não são essenciais para a resistência de *P. aeruginosa* a este oxidante, uma vez que a ausência individual dessas enzimas não afetou a sobrevivência bacteriana nas concentrações testadas.
- Os ensaios de estresse osmótico utilizando solutos não iônicos (sacarose) e iônicos (NaCl) demonstraram que *P. aeruginosa* exibe uma notável capacidade de adaptação a condições de osmolaridade moderada, mesmo na ausência dos genes *ohr* e *osmC*.
- Nos ensaios de infecção com *G. mellonella*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens testadas. Contudo, por serem dados preliminares, novos experimentos são necessários para confirmar essas observações e esclarecer os mecanismos envolvidos na virulência bacteriana neste modelo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, M. A.; ELHAG, W. I. Prevalence of metallo- β -lactamase acquired genes among carbapenems susceptible and resistant Gram-negative clinical isolates using multiplex PCR, Khartoum hospitals, Khartoum Sudan. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, dez. 2018.

AGUILAR, G. R. et al. The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 25, p. 100561–100561, 8 ago. 2023.

ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1565–1574, 27 fev. 2014.

ALEGRIA, T. G. P.; et al. Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxyxynitrite. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 114, n. 2, 27 dez. 2016.

AMBREETHA, S. et al. Genomic and metabolic versatility of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to its inter-kingdom transmission and survival. **Journal of Medical Microbiology**, v. 73, n. 2, 16 fev. 2024.

AN, D. et al. The Pathogenic Properties of a Novel and Conserved Gene Product, KerV, in Proteobacteria. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7167–e7167, 25 set. 2009.

ANANTHARAJAH, Ahalieyah; MINGEOT-LECLERCQ, Marie-Paule; VAN BAMBEKE, Françoise. Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 9, p. 734-749, set. 2016.

ANDRÉS, C. et al. The Role of Reactive Species on Innate Immunity. **Vaccines**, v. 10, n. 10, p. 1735, 17 out. 2022.

APIDIANAKIS, Y. et al. Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 7, p. 2573–2578, 4 fev. 2005.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 640, p. 47–52, 11 jan. 2018.

ARENAS, F. et al. The *Escherichia coli* *btuE* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 4, p. 690-694, ago. 2010.

ARTEAGA BLANCO, L. A. et al. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Cell and Tissue Research**, v. 370, n. 1, p. 153–168, 8 jul. 2017.

ATICHARTPONGKUL, S. et al. Bacterial Ohr and OsmC paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression. **Microbiology**, v. 147, n. 7, p. 1775–1782, 1 jul. 2001.

ATICHARTPONGKUL, Sopapan; FUANGTHONG, Mayuree; VATTANAVIBOON, Paiboon; MONGKOLSUK, Skorn. Analyses of the Regulatory Mechanism and Physiological Roles of *Pseudomonas aeruginosa* OhrR, a Transcription Regulator and a Sensor of Organic Hydroperoxides. **Journal Of Bacteriology**, v. 192, n. 8, p. 2093-2101, 15 abr. 2010.

AVISSAR, N. et al. Human placenta makes extracellular glutathione peroxidase and secretes it into maternal circulation. **AJP Endocrinology and Metabolism**, v. 267, n. 1, p. E68–E76, 1 jul. 1994.

AXLINE, C. M. R. et al. Refined methodology for quantifying *Pseudomonas aeruginosa* virulence using *Galleria mellonella*. **Microbiology Spectrum**, 12 dez. 2024.

BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. Biological Defense Mechanisms. THE PRODUCTION BY LEUKOCYTES OF SUPEROXIDE, A POTENTIAL BACTERICIDAL AGENT. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 3, p. 741–744, 1 mar. 1973.

BERGKESSEL M.; Guthrie C. Colony PCR. *Methods Enzymol.* 2013.

BERRAZEG, M. et al. Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6248–6255, 28 jul. 2015.

BERTANI, G. STUDIES ON LYSOGENESIS I. *Journal of Bacteriology*, v. 62, n. 3, p. 293–300, set. 1951.

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative Stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329-354, abr. 2014.

BISMUTH, H. D. et al. Bacterial Genetic Approach to the Study of Reactive Oxygen Species Production in *Galleria mellonella* During *Salmonella* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 1 mar. 2021.

BISWAS, R.; PANJA, A. S.; BANDOPADHYAY, R. Molecular Mechanism of Antibiotic Resistance: The Untouched Area of Future Hope. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 254–259, 22 jan. 2019.

BLEVES, Sophie; VIARRE, Véronique; SALACHA, Richard; MICHEL, Gérard P.F.; FILLOUX, Alain; VOULHOUX, Romé. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons. **International Journal Of Medical Microbiology**, v. 300, n. 8, p. 534-543, dez. 2010.

BOCHNER, B. R. et al. Positive selection for loss of tetracycline resistance. *Journal of Bacteriology*, v. 143, n. 2, p. 926–933, ago. 1980.

BOMBERGER, J. M. et al. Long-Distance Delivery of Bacterial Virulence Factors by *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000382–e1000382, 9 abr. 2009.

BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement_2, p. S49–S56, 7 ago. 2006.

BOTELHO, J.; GROSSO, F.; PEIXE, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – **Mechanisms, epidemiology and evolution. Drug Resistance Updates**, v. 44, p. 100640, maio 2019.

BREIDENSTEIN, E. B. M.; FUENTE-NÚÑEZ, C. DE LA; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419–426, 20 jun. 2011.

BRENOT, A. et al. Contribution of Glutathione Peroxidase to the Virulence of *Streptococcus pyogenes*. **Infection And Immunity**, v. 72, n. 1, p. 408-413, jan. 2004.
BRIGELIUS-FLOHÉ, R; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3289-3303, maio 2013.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, n. 7, p. 597–603, out. 2013.

- BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 493–520, 2 jul. 2012.
- BUXTON, George V.; GREENSTOCK, Clive L.; HELMAN, W. Phillips; ROSS, Alberta B.. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}-$) in Aqueous Solution. **Journal Of Physical And Chemical Reference**. v. 17, n. 2, p. 513-886, abr. 1988.
- CAMPODÓNICO V. L. et al. Evaluation of Flagella and Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as Vaccines. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 2, p. 746–755, 8 dez. 2009.
- CAVINATO, L. et al. Escaping the Phagocytic Oxidative Burst: The Role of SODB in the Survival of *Pseudomonas aeruginosa* Within Macrophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 10 mar. 2020.
- CDC. About Antimicrobial Resistance. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/about/index.html>>. Acesso em: 2 jan. 2025.
- CENDRA, M. DEL M.; TORRENTS, E. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. **Biotechnology Advances**, v. 49, p. 107734, jul. 2021.
- CHATTERJEE, S. S. et al. Intracellular Gene Expression Profile of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1323–1338, fev. 2006.
- CHEN, W.; KUO, T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 9, p. 2260–2260, 1 jan. 1993.
- CHU, F.-F. The human glutathione peroxidase genes GPX2, GPX3, and GPX4 map to chromosomes 14, 5, and 19, respectively. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 66, n. 2, p. 96–98, 1 jan. 1994.
- COHEN, S. N. et al. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 11, p. 3240–3244, 1 nov. 1973.
- CONDELES, A. L. Atividade peroxinitrito redutase de tiol peroxidase em células. Ribeirão Preto, 2017. Dissertação de mestrado- Área de concentração: Química.
- CONTER, A. et al. Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: effects of aeration, NaCl, and the rpoS and osmC gene products. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 17–26, 1 jan. 2001.
- CONTER, Annie; GANGNEUX, Catherine; SUZANNE, Magali; GUTIERREZ, Claude. Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: effects of aeration, nacl, and the rpos and osmc gene products. **Research In Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 17-26, jan. 2001.
- COOK, Simon M; MCARTHUR, Jason D. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 350-353, jul. 2013.

COOLS, F. et al. Optimization and Characterization of a *Galleria mellonella* Larval Infection Model for Virulence Studies and the Evaluation of Therapeutics Against *Streptococcus pneumoniae*. **Frontiers In Microbiology**, v. 10, 21 fev. 2019.

CORDES, T. et al. Immunoresponsive Gene 1 and Itaconate Inhibit Succinate Dehydrogenase to Modulate Intracellular Succinate Levels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 27, p. 14274–14284, 10 maio 2016.

CORNELIS, Pierre. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1637-1645, 30 mar. 2010.

CRAWFORD, D. R.; DAVIES, K. J. Adaptive response and oxidative stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. suppl 10, p. 25–28, 1 dez. 1994.

CUSSIOL, J. R. R. et al. Ohr (Organic Hydroperoxide Resistance Protein) Possesses a Previously Undescribed Activity, Lipoyl-dependent Peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 21943–21950, 13 maio 2010.

CUSSIOL, J. R. R. et al. Organic Hydroperoxide Resistance Gene Encodes a Thiol-dependent Peroxidase. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 278, n. 13, p. 11570-11578, mar. 2003

CUTULI, M. A. et al. *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: new developments in antibacterial strategies and novel drug testing. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 527-541, 1 jan. 2019.

DA SILVA, Júlia Mello. **Padronização dos ensaios de infecção em *Galleria mellonella* por *Pseudomonas aeruginosa*, com o objetivo de validar este modelo experimental para investigar o papel das tiol peroxidases na infecção.** 2024. 608 f. Monografia - Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2024.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 8–19, 2010.

DAVIES, Olivia Lawe. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.** 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 05 nov. 2023.

DEAR, T. N.; CAMPBELL, K.; RABBITS, T. H. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10376–10382, 1 out. 1991.

DOLAN S.K. et al. Contextual flexibility in *Pseudomonas aeruginosa* central carbon metabolism during growth in single carbon sources. **mBio**. 2020

DOMINGOS, R. M. et al. Substrate and Product-Assisted Catalysis: Molecular Aspects behind Structural Switches along Organic Hydroperoxide Resistance Protein Catalytic Cycle. **ACS Catalysis**, v. 10, n. 12, p. 6587–6602, 11 maio 2020.

- DREIER, J.; PAOLO RUGGERONE. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 8 jul. 2015.
- DWYER, D. J.; COLLINS, J. J.; WALKER, G. C. Unraveling the Physiological Complexities of Antibiotic Lethality. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 55, n. 1, p. 313–332, 6 jan. 2015.
- ELKINS, J. G. et al. Protective Role of Catalase in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Resistance to Hydrogen Peroxide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4594–4600, 1 out. 1999.
- ESTRADA, S. R.; BORGATTA, B.; RELLO, J. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. **Infection and Drug Resistance**, p. 7–7, 1 jan. 2016.
- ESWORTHY, R. S. et al. Mice with combined disruption of *Gpx1* and *Gpx2* genes have colitis. **AJP Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 3, p. G848–G855, 1 set. 2001.
- FARJAH, A. et al. Immunological evaluation of an alginate-based conjugate as a vaccine candidate against *Pseudomonas aeruginosa*. **Apmis**, v. 123, n. 2, p. 175–183, 3 dez. 2014.
- FENG, W. et al. Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 8, p. 142–147, 13 fev. 2017.
- FISCHER, Beat B.; HIDEG, Éva; KRIEGER-LISZKAY, Anja. Production, Detection, and Signaling of Singlet Oxygen in Photosynthetic Organisms. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 16, p. 2145–2162, jun. 2013.
- FLOHÉ, Leopold. The impact of thiol peroxidases on redox regulation. **Free Radical Research**, v. 50, n. 2, p. 126–142, 30 jul. 2015.
- FOTI, J. J. et al. Oxidation of the Guanine Nucleotide Pool Underlies Cell Death by Bactericidal Antibiotics. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 315–319, 19 abr. 2012.
- GAY, P. et al. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 164, n. 2, p. 918–921, nov. 1985.
- GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159–173, 15 mar. 2013.
- GHORBAL, B. et al. Antioxidant Defense Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: Role of Iron-Cofactored Superoxide Dismutase in Response to UV-C Radiations. **Current Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 159–164, 19 abr. 2016.
- GHOSH, S. et al. Phytocompound Mediated Blockage of Quorum Sensing Cascade in ESKAPE Pathogens. **Antibiotics**, v. 11, n. 1, p. 61–61, 5 jan. 2022.
- GORDIA, S.; GUTIERREZ, C. Growth-phase-dependent expression of the osmotically inducible gene *osmC* of *Escherichia coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 729–736, 1 fev. 1996.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 124, n. 1, p. 21–30, 1 set. 2000.

GROSSO-BECERRA, M. V. et al. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by two novel RNA thermometers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 43, p. 15562–15567, 13 out. 2014.

GUÉNARD, S. et al. Multiple Mutations Lead to MexXY-OprM-Dependent Aminoglycoside Resistance in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 221–228, 22 out. 2013.

GUERCIO, Anita Martins Fontes del. **Caracterização cinética do fator de transcrição do sistema Ohr/OhrR de *Pseudomonas aeruginosa* e análise de respostas fenotípicas e imunológicas**. 2019. 102 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

GUTIERREZ, Claude; DEVEDJIAN, Jean Christophe. Osmotic induction of gene *osmC* expression in *Escherichia coli* K12. **Journal Of Molecular Biology**, v. 220, n. 4, p. 959–973, ago. 1991.

HAINRICHSON, M. et al. Overexpression and Initial Characterization of the Chromosomal Aminoglycoside 3'-O-Phosphotransferase APH(3')-IIb from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 774–776, fev. 2007.

HALL, S. et al. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 236–236, 9 ago. 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free Radicals in Biology and Medicine. v.5, 22 out 2015.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1 jun. 1983.

HAQUE, M. et al. Health care-associated infections – an overview. **Infection and Drug Resistance**, v.11, p. 2321–2333, 1 nov. 2018.

HARE, N. J. et al. Proteomics of the oxidative stress response induced by hydrogen peroxide and paraquat reveals a novel AhpC-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*. **PROTEOMICS**, v. 11, n. 15, p. 3056–3069, 14 jun. 2011.

HASSETT, D. J. et al. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 23, p. 7658–7665, 1 dez. 1993.

HASSETT, D. J.; SCHWEIZER, H. P.; OHMAN, D. E. *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 22, p. 6330–6337, 1 nov. 1995.

- HEO, Y.-J. et al. The Major Catalase Gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Is under both Positive and Negative Control of the Global Transactivator OxyR in Response to Hydrogen Peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 381–390, 21 nov. 2009.
- HINCHLIFF, C. E. et al. Synthesis of phylogeny and taxonomy into a comprehensive tree of life. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 41, p. 12764–12769, 18 set. 2015.
- HMELO, L. R. et al. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. **Nature Protocols**, v. 10, n. 11, p. 1820–1841, 19 out. 2015.
- HOANG, T. T. et al. A broad-host-range Flp-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, 1 maio 1998.
- HOANG, T. T. et al. Integration-Proficient Plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: Site-Specific Integration and Use for Engineering of Reporter and Expression Strains. **Plasmid**, v. 43, n. 1, p. 59–72, 1 jan. 2000.
- HOJAT, L. S. et al. Association of COVID-19 coinfection with increased mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection in the Veterans Health Administration system. **Antimicrobial Stewardship & Healthcare Epidemiology**, v. 3, n. 1, 1 jan. 2023.
- HONG, S. H. et al. Functional properties and the oligomeric state of alkyl hydroperoxide reductase subunit F (AhpF) in *Pseudomonas aeruginosa*. **PROTOPLASMA**, v. 257, n. 3, p. 807–817, 7 jan. 2020.
- HORNA, Gertrudis; RUIZ, Joaquim. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological Research**, v. 246, p. 126719, maio 2021.
- HOSSAIN, M. S.; DIETZ, K.-J. Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 9 maio 2016.
- HUBRECHT; CARTER. The 3Rs and Humane Experimental Technique: implementing change. **Animals**, v. 9, n. 10, p. 754, 30 set. 2019.
- HUSNIK, F.; MCCUTCHEON, J. P. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 67–79, 27 nov. 2017.
- HUSSAIN, H. I. et al. Genetic basis of molecular mechanisms in β -lactam resistant gram-negative bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 105040–105040, 10 jun. 2021.
- IYAMA, K. et al. Effect of Superoxide Dismutase Gene Inactivation on Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the Silkworm, *Bombyx mori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1569–1575, 13 jan. 2007.
- IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 443–454, 28 maio 2013.

- IMLAY, J. A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 521–530, 11 out. 2018.
- JANDER, G.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3843–3845, 1 jul. 2000.
- JEANNOT, K. et al. Resistance and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Overproducing the MexCD-OprJ Efflux Pump. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2455–2462, 13 maio 2008.
- JIMENEZ, Pol Nadal; KOCH, Gudrun; THOMPSON, Jessica A.; XAVIER, Karina B.; COOL, Robbert H.; QUAX, Wim J. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 46-65, mar. 2012.
- KAIHAMI, G. H. et al. Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004442–e1004442, 16 out. 2014.
- KANNER, J.; KINSELLA, J. E. Initiation of lipid peroxidation by a peroxidase/hydrogen peroxide/halide system. **Lipids**, v. 18, n. 3, p. 204–210, 1 mar. 1983.
- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology**, p. 502–512, 1 jan. 1994.
- KIPP, A. P. GPx2. CRC Press eBooks, p. 95–110, 29 ago. 2018.
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598–625, 2 fev. 2005.
- KLOCKGETHER, Jens; CRAMER, Nina; WIEHLMANN, Lutz; DAVENPORT, Colin F.; TÜMMLER, Burkhard. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. **Frontiers In Microbiology**, v. 2, 2011.
- KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 311–320, 1 fev. 2010.
- KORSHUNOV, S.; IMLAY, J. A. Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1389–1401, 9 fev. 2010.
- KRYUKOV, G. V. et al. Characterization of Mammalian Selenoproteomes. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1439–1443, 29 maio 2003.
- LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 95, n. Suppl 41, p. 22, 2002.
- LAMPROPOULOU, V. et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 158–166, 1 jul. 2016.

- LAN, L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* OspR is an oxidative stress sensing regulator that affects pigment production, antibiotic resistance and dissemination during infection. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 76–91, jan. 2010.
- LANDY, A. et al. Digestion of deoxyribonucleic acids from bacteriophage T7, λ , and ϕ 80h with site-specific nucleases from *Hemophilus influenzae* strain Rc and strain Rd. **Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 2134–2142, 1 maio 1974.
- LAU, Gee W.; HASSETT, Daniel J.; RAN, Huimin; KONG, Fansheng. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Trends In Molecular Medicine**, v. 10, n. 12, p. 599-606, dez. 2004
- LEE, J. et al. Refinement of OprH-LPS Interactions by Molecular Simulations. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 2, p. 346–355, 1 jan. 2017.
- LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein & Cell**, v. 6, n. 1, p. 26–41, 24 set. 2014.
- LEE, J.-S. et al. KatA, the Major Catalase, Is Critical for Osmoprotection and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4399–4403, 22 jun. 2005.
- LEE, Keehoon; YOON, Sang Sun. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. **Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1053-1064, 28 jun. 2017.
- LEHMAN, I. R. DNA Ligase: Structure, Mechanism, and Function. **Science**, v. 186, n. 4166, p. 790–797, 29 nov. 1974.
- LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D. S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 34–44, 24 set. 2018.
- LESNIAK, Jacob; BARTON, William A.; NIKOLOV, Dimitar B. Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. **Protein Science**, v. 12, n. 12, p. 2838-2843, dez. 2003.
- LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999–1007, 1 abr. 2001.
- LI, H. et al. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 2, p. 63–68, 6 jan. 2012.
- LI, X. Z.; NIKAIDO, H.; POOLE, K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 1948–1953, 1 set. 1995.
- LI, X.-Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337–418, abr. 2015.

LIBERATI, N. T. et al. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2833–2838, 13 fev. 2006.

LLANES, C. et al. Role of the MexEF-OprN Efflux System in Low-Level Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5676–5684, dez. 2011.

LÓPEZ-CALLEJA, A. I. et al. Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam against multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Spanish hospital. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 32, n. 1, p. 68, 8 fev. 2019.

MCCARTHY, K.; PATERSON, D. Increased risk of death with recurrent *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 88, n. 2, p. 152–157, 7 mar. 2017.

MCGILL, S.L., Yung, Y., Hunt, K.A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* reverse diauxie is a multidimensional, optimized, resource utilization strategy. **Sci Rep** 11, 1457 (2021).

MEIRELES, D. A. et al. A 14.7 kDa Protein from *Francisella tularensis* subsp. *novicida* (Named FTN_1133), Involved in the Response to Oxidative Stress Induced by Organic Peroxides, Is Not Endowed with Thiol-Dependent Peroxidase Activity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99492–e99492, 24 jun. 2014.

MEIRELES, D. A. et al. Functional and evolutionary characterization of Ohr proteins in eukaryotes reveals many active homologs among pathogenic fungi. **Redox Biology**, v. 12, p. 600–609, ago. 2017.

MEIRELES, D. A. et al. Ohr – OhrR, a neglected and highly efficient antioxidant system: Structure, catalysis, phylogeny, regulation, and physiological roles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 185, p. 6–24, 19 abr. 2022.

MICHELUCCI A, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2013 May 7;110(19):7820-5.

MILLS, E. L. et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 457-470.e13, 22 set. 2016.

MILLS, Gordon C. HEMOGLOBIN CATABOLISM. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 229, n. 1, p. 189-197, nov. 1957.

MONGKOLSUK, S. et al. Identification and Characterization of a New Organic Hydroperoxide Resistance (*ohr*) Gene with a Novel Pattern of Oxidative Stress Regulation from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Journal Of Bacteriology**, v. 180, n. 10, p. 2636-2643, 15 maio 1998.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 15 fev. 2017.

MOSBLECH, A.; FEUSSNER, I.; HEILMANN, I. Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 511–517, jun. 2009.

MOSSIALOS, D. et al. Defects in a quinol oxidase lead to loss of KatC catalase activity in *Pseudomonas aeruginosa*: KatC activity is temperature dependent and it requires an intact disulphide bond formation system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 3, p. 697–702, 19 jan. 2006.

MURRAY, Christopher J L; IKUTA, Kevin Shunji; SHARARA, Fablina; SWETSCHINSKI, Lucien; AGUILAR, Gisela Robles; GRAY, Authia; HAN, Chieh; BISIGNANO, Catherine; RAO, Puja; WOOL, Eve. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, fev. 2022.

NIZER, W. S. DA C. et al. The secondary metabolite hydrogen cyanide protects *Pseudomonas aeruginosa* against sodium hypochlorite-induced oxidative stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 16 nov. 2023.

NÝVLTOVÁ, E. et al. OsmC and incomplete glycine decarboxylase complex mediate reductive detoxification of peroxides in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 206, n. 1-2, p. 29–38, 18 jan. 2016.

OCHSNER, U. A. et al. Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* Operon in Oxidative Stress Defense and DNA Repair: OxyR-Dependent Regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 16, p. 4533–4544, 15 ago. 2000.

OCHSNER, U. A.; HASSETT, D. J.; VASIL, M. L. Genetic and Physiological Characterization of *ohr*, Encoding a Protein Involved in Organic Hydroperoxide Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 2, p. 773–778, 15 jan. 2001.

OLIVEIRA, M. A. et al. Structural Insights into Enzyme–Substrate Interaction and Characterization of Enzymatic Intermediates of Organic Hydroperoxide Resistance Protein from *Xylella fastidiosa*. **Journal of Molecular Biology**, v. 359, n. 2, p. 433–445, jun. 2006.

ORLANDI, V. T.; MARTEGANI, E.; BOLOGNESE, F. Catalase A is involved in the response to photooxidative stress in *Pseudomonas aeruginosa*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 22, p. 233–240, 27 abr. 2018.

OZER, E. et al. An inside look at a biofilm: *Pseudomonas aeruginosa* flagella biotracking. **Science Advances**, v. 7, n. 24, 11 jun. 2021.

PALMER, K. L.; AYE, L. M.; WHITELEY, M. Nutritional Cues Control *Pseudomonas aeruginosa* Multicellular Behavior in Cystic Fibrosis Sputum. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8079–8087, 15 set. 2007.

PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177–192, 27 nov. 2018.

- PEREIRA, M. F. et al. *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 8, 18 set. 2020.
- PEREIRA, M. F. et al. *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, v. 161, n. 2, p. 387–400, 21 nov. 2014.
- PFEIFFER, S. et al. Interference of Carboxy-PTIO with Nitric Oxide- and Peroxynitrite-Mediated Reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 787–794, 1 jan. 1997.
- PICCIRILLO, E. et al. Structural insights on the efficient catalysis of hydroperoxide reduction by Ohr: Crystallographic and molecular dynamics approaches. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0196918–e0196918, 21 maio 2018.
- PIEWNGAM, P. et al. Alternative approaches to treat bacterial infections: targeting quorum-sensing. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 18, n. 6, p. 499–510, 3 abr. 2020.
- POOLE, K. Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 479–487, 26 jan. 2005.
- QUINLAN, Casey L. et al. The 2-Oxoacid Dehydrogenase Complexes in Mitochondria Can Produce Superoxide/Hydrogen Peroxide at Much Higher Rates Than Complex I. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 289, n. 12, p. 8312-8325, mar. 2014.
- RAFIEE, R. et al. Prevalence of Extended-Spectrum and Metallo β -Lactamase Production in AmpC β -Lactamase Producing *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates From Burns. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 9, 23 ago. 2014.
- RAHME, L. G. et al., Common Virulence Factors for Bacterial Pathogenicity in Plants and Animals. **Science**, v. 268, n. 5219, p. 1899-1902, 30 jun. 1995.
- RAWAT, D.; NAIR, D. Extended-spectrum β -lactamases in gram negative bacteria. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 263–263, 1 jan. 2010.
- REIS, A.; SPICKETT, C. M. Chemistry of phospholipid oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1818, n. 10, p. 2374–2387, 10 fev. 2012.
- REYNOLDS, D.; KOLLEF, M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. **Drugs**, v. 81, n. 18, p. 2117–2131, 7 nov. 2021.
- RHEE, Sue Goo; CHAE, Ho Zoon; KIM, Kanghwa. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 38, n. 12, p. 1543-1552, jun. 2005.
- RIED, J. L.; COLLMER, A. An nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. **Gene**, v. 57, n. 2-3, p. 239–246, 1 jan. 1987.

RIQUELME, S. A. et al. CFTR-PTEN–dependent mitochondrial metabolic dysfunction promotes *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 499, 3 jul. 2019.

RIQUELME, S. A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Utilizes Host-Derived Itaconate to Redirect Its Metabolism to Promote Biofilm Formation. **Cell Metabolism**, v. 31, n. 6, p. 1091-1106.e6, jun. 2020.

RIQUELME, S. A.; PRINCE, A. Airway immunometabolites fuel *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Respiratory Research**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2020.

ROCHA, L. S. et al. Peroxiredoxin AhpC1 protects *Pseudomonas aeruginosa* against the inflammatory oxidative burst and confers virulence. **Redox Biology**, v. 46, p. 102075, out. 2021.

ROLLET, C.; GAL, L.; GUZZO, J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 290, n. 2, p. 135–142, 27 nov. 2008.

ROMSANG, A. et al. The Iron-Sulphur Cluster Biosynthesis Regulator IscR Contributes to Iron Homeostasis and Resistance to Oxidants in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86763–e86763, 22 jan. 2014.

ROOT, R. K. et al. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 55, n. 5, p. 945–955, 1 maio 1975.

ROSSI, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 331–342, 19 nov. 2020.

ROSSI, R. et al. COVID-19 Pandemic and Lockdown Measures Impact on Mental Health Among the General Population in Italy. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, 7 ago. 2020.

ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H. E.; SWANSON, A. B.; HAFEMAN, D. G.; HOEKSTRA, W. G.. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, n. 4073, p. 588-590, 9 fev. 1973.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, p. a012427–a012427, 1 nov. 2012.

SAGOT, B. et al. Osmotically induced synthesis of the dipeptide N-acetylglutaminylglutamine amide is mediated by a new pathway conserved among bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 28, p. 12652–12657, 22 jun. 2010.

SAMANTA, S. et al. Getting Drugs through Small Pores: Exploiting the Porins Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 10, p. 1519–1528, 24 jul. 2018.

SANTOS, A. P. et al. Bacterial Co-Infection in Patients with COVID-19 Hospitalized (ICU and Not ICU): Review and Meta-Analysis. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 894–894, 4 jul. 2022.

SASIKARAN, J. et al. Bacterial itaconate degradation promotes pathogenicity. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 5, p. 371–377, 23 mar. 2014.

SHEEHAN, G. et al. Innate humoral immune defences in mammals and insects: the same, with differences ?. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 1625–1639, 13 out. 2018.

SHIN, D. H. et al. Structure of OsmC from *Escherichia coli*: a salt-shock-induced protein. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 60, n. 5, p. 903–911, 21 abr. 2004.

SHIN, D.-H.; CHOI, Y.-S.; CHO, Y.-H. Unusual Properties of Catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Are Associated with Its Biofilm Peroxide Resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2663–2670, 15 abr. 2008.

SILBY, Mark W.; WINSTANLEY, Craig; GODFREY, Scott A.C.; LEVY, Stuart B.; JACKSON, Robert W. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. **Fems Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. 652–680, jul. 2011.

SOMPRASONG, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Thiol Peroxidase Protects against Hydrogen Peroxide Toxicity and Displays Atypical Patterns of Gene Regulation. **Journal Of Bacteriology**, v. 194, n. 15, p. 3904–3912, ago. 2012.

SONG, F. et al. Cyclic-di-GMP and oprF Are Involved in the Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Substrate Material Stiffness during Attachment on Polydimethylsiloxane (PDMS). **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 1 fev. 2018.

STAERCK, C. et al. Microbial antioxidant defense enzymes. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 56–65, 17 jun. 2017.

STEINMETZ, M. et al. Analyse génétique de sacB, gène de structure d'une enzyme sécrétée, la lévane-saccharase de *Bacillus subtilis* Marburg. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 191, n. 1, p. 138–144, 1 jul. 1983.

STORZ, G.; IMLAYT, J. A. Oxidative stress. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 188–194, 1 abr. 1999.

SU, S. et al. Catalase (KatA) Plays a Role in Protection against Anaerobic Nitric Oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91813–e91813, 24 mar. 2014.

SUBEDI, D.; VIJAY, A. K.; WILLCOX, M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 101, n. 2, p. 162–171, 18 out. 2017.

TAKAHASHI, K. et al. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: A selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 256, n. 2, p. 677–686, 1 ago. 1987.

TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238–242, 22 mar. 2013.

THI, Minh Tam Tran; WIBOWO, David; REHM, Bernd H.A.. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8671, 17 nov. 2020.

TOPPO, S. et al. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1486-1500, nov. 2009.

TSAI, C.J.Y. et al. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 9 fev. 2016.

TWITTENHOFF, C. et al. An RNA thermometer dictates production of a secreted bacterial toxin. **Plos Pathogens**, v. 16, n. 1, 17 jan. 2020.

URSINI, F. et al. Diversity of glutathione peroxidases. **Methods in Enzymology**, p. 38–53, 1995.

URSINI, F. et al. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, v. 710, n. 2, p. 197–211, 1 fev. 1982.

VALENTINI, M.; ALAIN FILLOUX. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 24, p. 12547–12555, 22 abr. 2016.

VALENTINI, M.; LAPOUGE, K. Catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 regulates the uptake of C4-dicarboxylates depending on succinate concentration. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 1707–1716, 18 dez. 2012.

VLASOVA, I. I. Peroxidase Activity of Human Hemoproteins: Keeping the Fire under Control. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2561–2561, 8 out. 2018.

WELTE, W. et al. Structure and function of the porin channel. **Kidney International**, v. 48, n. 4, p. 930–940, out. 1995.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 549–561, set. 2008.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M. J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 1, p. 5–18, 27 jul. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO bacterial priority pathogens list, 2024. **World Health Organization**, 2024.

WU, G. et al. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. **Tissue and Cell**, v. 48, n. 4, p. 297–304, ago. 2016.

YEOM, J.; IMLAY, J. A.; PARK, W. Iron Homeostasis Affects Antibiotic-mediated Cell Death in *Pseudomonas* Species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22689–22695, 18 maio 2010.

YONEZAWA, M. et al. DNA gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 1970–1972, 1 set. 1995.

ZHANG, G. et al. Clinical and immunologic features of co-infection in COVID-19 patients, along with potential traditional Chinese medicine treatments. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 21 mar. 2024.

ZHANG, Y. et al. Destroying glutathione peroxidase improves the oxidative stress resistance and pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. **Frontiers In Microbiology**, v. 14, 22 mar. 2023.