

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

Construção de um mutante nulo no gene que codifica uma ciclopropano sintase de ácidos graxos (Cfa) de *Pseudomonas aeruginosa* para avaliar sua influência sobre o estresse oxidativo

Lais Nogueira Machado

Orientador: Diogo de Abreu Meireles

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

FEVEREIRO, 2026

Construção de um mutante nulo no gene que codifica uma ciclopropano sintase de ácidos graxos (Cfa) de *Pseudomonas aeruginosa* para avaliar sua influência sobre o estresse oxidativo

LAIS NOGUEIRA MACHADO

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 pela autora.

M149

Machado, Lais Nogueira.

"Construção de um mutante nulo no gene que codifica uma ciclopropano sintase de ácidos graxos (Cfa) de *Pseudomonas aeruginosa* para avaliar sua influência sobre o estresse oxidativo". / Lais Nogueira Machado. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

103 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.

Orientador: Diogo de Abreu Meireles.

Coorientador: Jan Schripsema.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Ciclopropano sintase de ácidos graxos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570


Construção de um mutante nulo no gene que codifica uma ciclopropano sintase de ácidos graxos (Cfa) de *Pseudomonas aeruginosa* para avaliar sua influência sobre o estresse oxidativo

LAIS NOGUEIRA MACHADO


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.

Aprovada em 06 de fevereiro de 2026


Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **REGINA LUCIA BALDINI**
Data: 06/02/2026 13:48:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia Baldini – IQ/USP

Documento assinado digitalmente
 **FELIPE ASTOLPHO DE ALMEIDA**
Data: 06/02/2026 15:13:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Felipe Astolpho de Almeida - LQFPP/UENF

Documento assinado digitalmente
 **DIOGO DE ABREU MEIRELES**
Data: 06/02/2026 16:16:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr Diogo de Abreu Meireles – LFBM/UENF

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao maior apoiador de minha trajetória, meu pai Ascendino Lopes Machado Júnior (in memoriam). Meu Dumbledore, meu mestre Yoda, meu Spock e, acima de tudo isso, meu melhor amigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todo o cuidado e por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais Ascendino Lopes Machado Júnior e Cristiane Nogueira Alonso Machado, que me criaram com tanto esforço se doando em tudo que puderam para que eu tivesse a melhor educação e chegar academicamente onde não puderam. Agradeço por todos os ensinamentos passados ao longo da vida, sem os quais eu não seria quem sou hoje. Meu amor por vocês é eterno.

À todos meus familiares, pelo apoio oferecido todos os dias e fé em minha capacidade.

Aos meus companheiros que estiveram presentes no grupo REDOX e que se tornaram grandes amigos, Rafaela Coelho, Rayssa Muzzi, Laís Parvan e Igor Nascimento, por todo apoio físico e emocional. Agradeço por cada auxílio, cada risada, cada choro e cada palavra de conforto. Essa experiência não teria sido a mesma sem vocês e sou muito grata por tudo o que vivi com cada um, seja na bancada, no posto comendo nossos infinitos salgadinhos ou na vida. Estarei sempre torcendo e aplaudindo cada um de vocês.

Aos meus companheiros do LFBM, muito obrigado por serem tão solícitos e pelo apoio diário. Agradeço muito por ter sido acolhida com tanta generosidade e pelos momentos compartilhados na sala dos alunos, tão importantes para nos fortalecer na nossa árdua jornada científica.

Ao meu amigo profissional e pessoal, Igor. Nunca expressarei o bastante o quanto sou grata por ter esbarrado com você nesse caminho científico. Você é uma pessoa gentil, determinada, inteligente e leal em tudo da sua vida. Obrigado pelos conselhos, pelo ombro e por basicamente tudo. Você é luz por onde quer que passe, é lindo ver o homem incrível que sua mãe criou com tanto orgulho.

Ao Prof. Dr. Jan Schripsema, pela coorientação e auxílio na realização de experimentos.

Ao Prof. Dr. Diogo de Abreu Meireles, pela orientação, pela oportunidade e pelo apoio na elaboração deste trabalho

Aos professores que me acompanharam ao longo do curso e que, com empenho, se dedicam à arte de ensinar.

Aos membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite para avaliação deste trabalho

À UENF e às instituições de fomento CNPq, FINEP, FAPERJ e CAPES (Código de Financiamento 001), que forneceram os meios que tornaram possível a realização desta pesquisa.

Ao meu amor, Bruna Kury, que me ajudou mais do que posso expressar. A sua gentileza e seu cuidado me toca todos os dias. Sem você não teria chegado até aqui. Amo você.

À todos que de alguma forma colaboraram em minha jornada acadêmica, na elaboração deste trabalho ou simplesmente me motivando todos os dias, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista de relevância clínica, amplamente associado a infecções hospitalares e reconhecido por sua elevada capacidade de adaptação a condições ambientais adversas. A ciclopropanação de ácidos graxos, uma modificação pós-sintética comum em lipídios de membrana bacteriana, permanece pouco explorada quanto ao seu papel fisiológico em *P. aeruginosa*. Neste trabalho, investigou-se a contribuição da ciclopropanação lipídica para a adaptação dessa bactéria a diferentes condições de estresse, com ênfase no estresse oxidativo. Análises *in silico* indicaram que o gene PA14_73140 codifica uma ciclopropano sintase conservada, estruturalmente similar às Cfa descritas em outras bactérias Gram-negativas. Com base nessas evidências, foi construída uma linhagem mutante nula para *cfa* por recombinação homóloga, cuja deleção foi confirmada por PCR. A análise funcional foi realizada por espectroscopia de RMN de ^1H , que permitiu a detecção inequívoca dos sinais característicos dos prótons do anel ciclopropano nos extratos lipídicos da linhagem selvagem, ausentes na linhagem Δcfa . A extração utilizando metanol e clorofórmio na proporção 2:1 (v/v) mostrou-se a condição mais eficiente para a preservação e detecção desses sinais, consolidando-se como uma metodologia robusta para análises de ciclopropanação em *P. aeruginosa*. Esses resultados demonstram de forma conclusiva que a linhagem PA14 possui um único gene funcional responsável pela ciclopropanação de ácidos graxos. A análise da regulação de *cfa* revelou que sua expressão é modulada pela densidade celular, sendo controlada transcricionalmente pelo regulador LasR, integrante central do sistema de quorum sensing. Apesar disso, ensaios de crescimento indicaram que a ausência de ciclopropanação não compromete a cinética de crescimento basal em meio rico ou em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de carbono. Em contraste, a linhagem Δcfa apresentou maior sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por hidroperóxidos orgânicos, indicando que a ciclopropanação contribui para a tolerância a agentes oxidantes hidrofóbicos. Ensaios de terapia fotodinâmica reforçaram esse papel: enquanto o Azul de Metileno não induziu diferenças fenotípicas detectáveis, o Rosa Bengala promoveu inibição do crescimento dependente de luz, com maior sensibilidade da linhagem Δcfa . A manutenção desse fenótipo na presença de azida sódica sugere o predomínio de reações fotodinâmicas do tipo I. De forma consistente, o tratamento com paraquat reproduziu o padrão de sensibilidade observado, sustentando que espécies radicalares, particularmente o radical ânion superóxido, são os principais mediadores do dano oxidativo exacerbado na ausência de ciclopropanação. Não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens quanto à sensibilidade a polimixinas, ao crescimento sob estresses abióticos, nem quanto à virulência no modelo experimental utilizado. Em conjunto, os resultados indicam que a ciclopropanação de ácidos graxos desempenha um papel específico

e relevante na tolerância ao estresse oxidativo em *P. aeruginosa*, contribuindo para a estabilidade da membrana frente às espécies reativas do oxigênio.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; espécies reativas de oxigênio; ciclopropano de ácidos graxos (Cfa).

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a clinically relevant opportunistic pathogen, widely associated with hospital-acquired infections and known for its remarkable ability to adapt to adverse environmental conditions. Fatty acid cyclopropanation, a post-synthetic modification commonly found in bacterial membrane lipids, remains poorly explored with respect to its physiological role in *P. aeruginosa*. In this study, we investigated the contribution of lipid cyclopropanation to bacterial adaptation under different stress conditions, with particular emphasis on oxidative stress. *In silico* analyses identified the gene *PA14_73140* as encoding a conserved cyclopropane fatty acid synthase, structurally similar to Cfa enzymes described in other Gram-negative bacteria. Based on these findings, a *cfa* null mutant was generated by allelic exchange, and the chromosomal deletion was confirmed by PCR. Functional validation was performed using ¹H NMR spectroscopy, which enabled the unequivocal detection of characteristic proton signals corresponding to the cyclopropane ring in lipid extracts from the wild-type strain, while these signals were absent in the Δcfa mutant. Lipid extraction using methanol and chloroform at a 2:1 (v/v) ratio proved to be optimal for preserving and detecting these spectral features, establishing a robust methodological approach for the analysis of cyclopropanation in *P. aeruginosa*. Collectively, these results conclusively demonstrate that PA14 harbors a single functional gene responsible for fatty acid cyclopropanation. Expression analyses revealed that *cfa* transcription is modulated by cell density and is under the control of LasR, a key regulator of the quorum sensing network. Despite this regulation, growth kinetics assays showed no significant differences between the wild-type and Δcfa strains in rich medium or in minimal medium supplemented with different carbon sources, indicating that cyclopropanation is not required for basal growth under the conditions tested. In contrast, the Δcfa strain displayed increased sensitivity to oxidative stress induced by organic hydroperoxides, suggesting that fatty acid cyclopropanation contributes to tolerance against hydrophobic oxidizing agents. Photodynamic therapy assays further supported this role: while Methylene Blue did not induce detectable phenotypic differences between strains, Rose Bengal caused light-dependent growth inhibition, with the Δcfa strain being consistently more sensitive. The persistence of this phenotype in the presence of sodium azide indicates a predominance of type I photodynamic reactions. Consistently, paraquat treatment reproduced the sensitivity pattern observed under photodynamic conditions, supporting the notion that radical species—particularly the superoxide anion—are the main mediators of the enhanced oxidative damage observed in the absence of cyclopropanation. No significant differences were observed between strains regarding susceptibility to polymyxins, growth under abiotic stresses or virulence in the experimental model employed. Taken together, these findings indicate that

fatty acid cyclopropanation plays a specific and relevant role in oxidative stress tolerance in *P. aeruginosa*, contributing to membrane stability under conditions that promote the generation of reactive oxygen species.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, reactive oxygen species, cyclopropane fatty acid (Cfa).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Principais mecanismos de resistência a antimicrobianos em <i>P. aeruginosa</i> .	22
Figura 2 — Estruturas dos substratos e produtos da reação catalisada pela síntese de ácidos graxos ciclopropanos.	25
Figura 3 — Principais espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas a partir do oxigênio molecular.	29
Figura 4 — Principais vantagens do uso de <i>G. mellonella</i> como modelo experimental de infecção.	34
Figura 5 — Representação esquemática dos principais componentes da resposta imune inata de <i>Galleria mellonella</i> frente à infecção por microrganismos.	35
Figura 6 — Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos.	50
Figura 7 — Predição de estruturas de <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> através do AlphaFold3. ..	51
Figura 8 — Análise por PCR da região cromossômica do gene <i>cfa</i> em <i>P. aeruginosa</i> PA14.	52
Figura 9 — Curvas de crescimento das linhagens <i>P. aeruginosa</i> PA14 WT, DM42 e DM43 em diferentes meios de cultura.	54
Figura 10 — Espectros de RMN de ¹ H obtidos a partir de extratos lipídicos das linhagens <i>P. aeruginosa</i> PA14 selvagem (WT) e da mutante DM30.	55
Figura 11 — Espectro diferencial de RMN de ¹ H entre as linhagens WT e DM30 em cinza, no qual são observados sinais característicos que permitem a distinção entre as linhagens.	55
Figura 12 — Espectros de RMN de ¹ H obtidos a partir de extratos lipídicos das linhagens <i>P. aeruginosa</i> PA14 selvagem, DM30, DM42 e DM43.	56
Figura 13 — Atividade do promotor do gene <i>cfa</i> avaliada por ensaio de β-galactosidase ao longo do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> PA14.	58
Figura 14 — Sensibilidade ao estresse oxidativo em <i>P. aeruginosa</i> na fase exponencial de crescimento.	59
Figura 15 — Sensibilidade ao estresse oxidativo em <i>P. aeruginosa</i> na fase estacionária de crescimento.	60
Figura 16 — Teste de sensibilidade ao terc-butil hidroperóxido (t-BOOH) por microdiluição.	61
Figura 17 — Avaliação da sensibilidade das linhagens <i>P. aeruginosa</i> selvagem (PA14 WT), Δohr e DM42 ao hidroperóxido orgânico t-BOOH por ensaio de spot assay.	62
Figura 18 — Avaliação do efeito do azul de metileno sob exposição à luz em <i>P. aeruginosa</i>	63
Figura 19 — Avaliação do efeito do azul de metileno sob exposição à luz em <i>E. coli</i>	64
Figura 20 — Avaliação do efeito do azul de metileno sob exposição à luz em <i>B. subtilis</i>	65
Figura 21 — Avaliação do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> em diferentes concentrações de rosa bengala sob condições de ausência e presença de luz.	65
Figura 22 — Curvas de crescimento das linhagens selvagem, DM42 e DM43 na presença de 10 μM de rosa bengala sob condições de ausência e presença de luz.	66
Figura 23 — Ensaio exploratório para determinação da concentração de azida sódica (AS) a ser utilizada em experimentos de terapia fotodinâmica com rosa bengala (RB)..	68

Figura 24 — Curvas de crescimento das linhagens selvagem, DM42 e DM43 na presença de Rosa Bengala (10 µM) associado à azida sódica (0,25 mM).....	69
Figura 25 — Curvas de crescimento sob tratamento com paraquat.....	70
Figura 26 — Ensaio de difusão em disco com colistina em <i>P. aeruginosa</i>	71
Figura 27 — Ensaio de difusão em disco com polimixina B em <i>P. aeruginosa</i>	72
Figura 28 — Avaliação da susceptibilidade ao estresse osmótico induzido por sacarose em <i>P. aeruginosa</i>	73
Figura 29 — Curvas de crescimento das linhagens PA14 selvagem e DM30, cultivadas em diferentes temperaturas.	74
Figura 30 — Curvas de crescimento das linhagens PA14 selvagem e DM30 cultivadas sob diferentes condições de pH sem tamponamento.....	75
Figura 31 — Curvas de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> após infecção com diferentes linhagens bacterianas.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista das principais linhagens de <i>P. aeruginosa</i> utilizadas ao longo do trabalho	38
Tabela 2: Lista dos oligonucleotídeos desenhados para o processo de obtenção dos mutantes nulos	39
Tabela 3: Lista dos oligonucleotídeos desenhados para a complementação funcional dos mutantes nulos	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como modelo de estudo.....	18
1.1.1. Aspectos gerais e importância biológica	18
1.1.2. <i>P. aeruginosa</i> como patógeno oportunista e organismo de relevância clínica.....	19
1.1.3. Fatores de virulência, biofilme e resistência antimicrobiana.....	19
1.1.4. Estrutura celular, composição da membrana e adaptação a estresses	22
1.2. Ciclopropano de ácidos graxos (Cfa)	24
1.2.1. Ciclopropanação de ácidos graxos como estratégia adaptativa bacteriana	24
1.2.2. Regulação da expressão do gene <i>cfa</i>	27
1.3. Espécies reativas de oxigênio (ROS)	29
1.3.1. Definição e classificação das ROS.....	29
1.3.2. Formação de ROS e estresse oxidativo em sistemas biológicos	31
1.3.3. Alvos moleculares das ROS e impacto na integridade da membrana....	32
1.4. <i>Galleria mellonella</i> como modelo experimental de infecção.....	33
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral:	35
2.2. Objetivos específicos:	36
3. METODOLOGIA	36
3.1. Organismos de estudo e condições de cultivo	36
3.2. Investigação bioinformática de homólogos do gene <i>cfa</i> em <i>P. aeruginosa</i> PA14 e predição estrutura tridimensional de Cfa.....	38
3.3. Desenho dos oligonucleotídeos para deleção do gene <i>cfa</i>	38
3.4. Desenho dos oligonucleotídeos para complementação do gene <i>cfa</i>	39
3.5. Amplificação das regiões flanqueadoras do gene <i>cfa</i>	39
3.6. Verificação da amplificação por eletroforese em gel de agarose.....	40
3.7. Purificação das amostras de PCR.....	40
3.8. Digestão enzimática dos produtos de PCR.....	40
3.9. Ligação dos fragmentos ao vetor pEX18Ap.....	41
3.10. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i>	41
3.11. Construção do vetor de deleção pEX18Gm- Δ <i>cfa</i> por colaboração interinstitucional	41
3.12. Conjugação e recombinação homóloga	42
3.13. PCR de colônia para confirmação do mutante	42
3.14. Retirada do cassete de resistência a tetraciclina da linhagem DM43 originando a linhagem DM45	42
3.15. Curvas de crescimento em diferentes meios de cultura.....	43
3.16. Cultivo bacteriano e preparo da biomassa para análises de ressonância magnética nuclear (RMN).....	43

3.17. Extração lipídica para RMN	43
3.18. Caracterização da resposta bacteriana à geração fotoinduzida de ROS	44
3.19. Caracterização do mecanismo fotodinâmico envolvido na resposta de <i>P. aeruginosa</i> ao Rosa bengala	44
3.20. Avaliação da sensibilidade ao Paraquat.....	45
3.21. Ensaio de sensibilidade a peróxidos por difusão em disco	45
3.22. Ensaio de sensibilidade a antibióticos por difusão em disco	45
3.23. Ensaio de atividade de β -galactosidase	46
3.24. Avaliação do impacto do estresse osmótico causado por sacarose	46
3.25. Avaliação do impacto de diferentes temperaturas e pH no crescimento das linhagens.....	47
3.26. Spot assay para avaliação de sensibilidade ao t-BOOH.....	47
3.27. Ensaio de virulência em <i>Galleria mellonella</i>	47
3.28. Análises estatísticas	48
3.29. Ferramentas de apoio à escrita científica	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Resultados das análises pela busca de homólogos de Cfa e sobreposição das estruturas preditas.	49
4.2. Análise por eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das linhagens de <i>P. aeruginosa</i> utilizadas neste estudo.....	51
4.3. Curvas de crescimento.....	53
4.4. Avaliação de ausência de ciclopropanação por ensaios de RMN	54
4.5. Avaliação de atividade transcricional do promotor de <i>cfa</i> através de sistema repórter lacZ.....	57
4.6. Avaliação de sensibilidade a peróxidos por difusão em disco.....	58
4.7. Avaliação da sensibilidade ao t-BOOH por ensaio de microdiluição	60
4.8. Avaliação qualitativa de susceptibilidade ao t-BOOH por spot assay	62
4.9. Caracterização da resposta bacteriana à geração fotoinduzida de ROS	63
4.10. Caracterização do mecanismo fotodinâmico envolvido na resposta de <i>P. aeruginosa</i> ao FS Rosa bengala	67
4.11. Ensaio de sensibilidade ao Paraquat.....	69
4.12. Ensaio de sensibilidade à antibióticos por ensaio de difusão em disco	71
4.13. Avaliação de susceptibilidade a estresse osmótico causado por sacarose.....	72
4.14. Impacto de diferentes temperaturas e pH no crescimento celular.....	74
4.15. Avaliação de virulência por ensaios de infecção em <i>G. mellonella</i>	75
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÃO	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DO₆₀₀ - Densidade Óptica a 600 nm
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
Cfa - Ciclopropano sintase de ácidos graxos
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
LB - Lysogeny Broth (meio de cultura)
MPO - Mieloperoxidase
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
QS - Quorum Sensing
TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA
tBOOH - tert-Butil Hidroperóxido
•OH - Radical hidroxila
¹O₂ - Oxigênio Singlete
MUFAs - Ácidos graxos monoinsaturados
PUFAs - Ácidos graxos poli-insaturados
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
ATP - Adenosina Trifosfato
SAM ou AdoMet - S-adenosil-L-metionina
O₂•⁻ - Ânion superóxido
LFBM - Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos
ONPG - o-Nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
AS - Azida sódica
RB - Rosa bengala
AM - Azul de metileno
PDT - Terapia fotodinâmica
FS - Fotossensibilizador
PE - Fosfatidiletanolamina
PG - Fosfatidilglicerol
MI - membrana interna
ME - membrana externa
sRNA - small RNA (Ácido ribonucleico)
LPS - Lipopolissacarídeos

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Pseudomonas aeruginosa* como modelo de estudo

1.1.1. Aspectos gerais e importância biológica

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa pertencente à classe Gammaproteobacteria, amplamente distribuída em ambientes naturais como solo, água e superfícies úmidas (CRONE *et al.*, 2020). Essa ampla distribuição ambiental se relaciona à elevada versatilidade metabólica apresentada pelo gênero *Pseudomonas* (PALLERONI, 2010). Trata-se de um bacilo aeróbio estrito, que não produz esporos, capaz de utilizar uma grande diversidade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, o que contribui significativamente para sua adaptação a diferentes nichos ecológicos (MORADALI; GLOVER; REHM, 2017).

A elevada plasticidade fisiológica de *P. aeruginosa* está diretamente relacionada à complexidade e ao tamanho de seu genoma. O sequenciamento completo da linhagem altamente virulenta PA14, realizado por Lee *et al.* (2006), revelou um genoma com aproximadamente 6,5 Mb, contendo um grande número de genes associados a metabolismo, regulação, virulência e resposta a estresses ambientais. De forma relevante, esse estudo demonstrou que a PA14 compartilha um núcleo genômico conservado com outra linhagem rotineiramente usada como linhagem modelo da espécie *P. aeruginosa*, a PAO1, mas apresenta um conjunto adicional de genes acessórios, incluindo ilhas genômicas associadas à virulência e à adaptação a diferentes hospedeiros. Essa composição genética mais diversa contribui para a elevada capacidade adaptativa da PA14, tornando-a um modelo amplamente utilizado em estudos de patogenicidade, fisiologia bacteriana e interação entre patógeno e hospedeiro (LEE *et al.*, 2006; STOVER, *et al* 2000; RAHME *et al.*, 1995).

Além disso, *P. aeruginosa* apresenta elevada tolerância a diferentes tipos de estresse físico-químico, incluindo estresse oxidativo, osmótico e exposição a compostos tóxicos (GHSSEIN; EZZEDDINE, 2022; KIM *et al.*, 2019; ÇETINER *et al.*, 2017). Nesse contexto, a investigação de componentes estruturais da célula, como a membrana bacteriana, torna-se particularmente relevante para a compreensão das estratégias adaptativas empregadas por *P. aeruginosa* frente a condições adversas (MORADALI; GLOVER; REHM, 2017).

1.1.2. *P. aeruginosa* como patógeno oportunista e organismo de relevância clínica

Desde 2017 *P. aeruginosa* está presente nas listas de patógenos com iminente escassez de novos tipos de tratamento e em 2024 se consolidou como grupo de alta prioridade para o desenvolvimento de novas terapias (WHO, 2024). Esse bacilo é amplamente reconhecido como um importante patógeno oportunista de interesse clínico, integrando o grupo de patógenos SKAPE, grupo que engloba grande parte das bactérias multirresistentes, mesmo frente à carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração (MURRAY *et al.*, 2022; DAVIES, 2017). Essa espécie está frequentemente associada a infecções em indivíduos imunocomprometidos e pacientes hospitalizados, sendo responsável por infecções do trato respiratório, urinário, feridas, queimaduras e septicemias (DRISCOLL; BRODY; KOLLEF, 2007). A elevada adaptabilidade fisiológica desse bacilo contribui significativamente para sua capacidade de persistir em ambientes hospitalares e no interior do hospedeiro (WEIMANN *et al.*, 2024).

P. aeruginosa é o principal patógeno associado a infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística, sendo capaz de persistir no trato respiratório mesmo diante de intensa resposta inflamatória e tratamentos antibióticos prolongados (DAVIES, 2002). Nesse ambiente, caracterizado por acúmulo de muco espesso, baixa disponibilidade de oxigênio e elevada produção de espécies reativas de oxigênio por células do sistema imune, a bactéria expressa um conjunto específico de fatores de virulência que favorecem sua adaptação e persistência (MORADALI; GLOVER; REHM, 2017)

Em pacientes acometidos por fibrose cística, *P. aeruginosa* é submetida continuamente a diferentes estresses durante as interações patógeno hospedeiro, o que favorece a seleção de fenótipos altamente adaptados (HOIBY *et al.*, 2010; CIOFU *et al.*, 2005). Assim, a compreensão dos mecanismos celulares que contribuem para a sobrevivência de *P. aeruginosa* nesse contexto é fundamental para o entendimento de sua patogenicidade.

1.1.3. Fatores de virulência, biofilme e resistência antimicrobiana

A virulência de *P. aeruginosa* resulta da ação coordenada de diversos fatores, incluindo a produção de toxinas, enzimas extracelulares, sideróforos e sistemas de secreção especializados (LIAO *et al.*, 2022). Esses fatores permitem à bactéria colonizar o hospedeiro, evadir a resposta imune e obter nutrientes essenciais para sua sobrevivência. A expressão desses mecanismos está intimamente ligada à capacidade adaptativa da espécie frente a diferentes condições ambientais (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

A exotoxina A (ExoA), uma das toxinas mais bem caracterizadas dessa espécie, atua inibindo a síntese proteica em células eucarióticas por meio da ADP-ribosilação do fator de alongação EF-2, levando à morte celular e contribuindo para a patogenicidade em diferentes tipos de infecção (MICHALSKA; WOLF, 2015; GELLATLY; HANCOCK, 2013). O bacilo *P. aeruginosa* também produz uma variedade de enzimas hidrolíticas, como elastases (LasA e LasB), proteases alcalinas e fosfolipases, que promovem degradação de componentes da matriz extracelular, comprometem a integridade de tecidos e modulam a resposta inflamatória do hospedeiro (KESSLER *et al.*, 1998).

Outro fator central na virulência de *P. aeruginosa* é a capacidade de adquirir ferro em ambientes onde esse micronutriente é limitante, como no interior do hospedeiro. Para isso, a bactéria sintetiza sideróforos de alta afinidade, principalmente pioverdina e pioquelina, que sequestram ferro do ambiente e o transportam para o interior da célula por sistemas de captação específicos (DURÁN *et al.*, 2022; MEYER *et al.*, 1996). A pioverdina, além de seu papel na aquisição de ferro, atua como regulador indireto da expressão de outros fatores de virulência, reforçando sua importância na adaptação e patogenicidade de *P. aeruginosa* (LAMONT *et al.*, 2002). A limitação de ferro no hospedeiro, portanto, funciona como um sinal ambiental que ativa respostas virulentas coordenadas, ampliando o potencial patogênico da bactéria.

Adicionalmente, *P. aeruginosa* dispõe de sistemas de secreção especializados que permitem a entrega direta de efetores tóxicos às células do hospedeiro. O sistema de secreção do tipo III (T3SS) é um dos mais estudados e está associado à virulência aguda, sendo responsável pela injeção de exotoxinas como ExoS, ExoT, ExoU e ExoY diretamente no citoplasma de células eucarióticas (HAUSER, 2009). A ExoU atua como uma fosfolipase A2 capaz de hidrolisar ácidos graxos esterificados na posição sn-2 de fosfolipídeos da membrana plasmática, resultando em uma rápida lise celular (FOULKES *et al.*, 2019).

Entre os principais determinantes de virulência, a formação de biofilmes também merece destaque. Biofilmes são comunidades bacterianas organizadas, envoltas por uma matriz extracelular que confere proteção adicional contra estresses ambientais e antimicrobianos. A vida em biofilme representa uma estratégia adaptativa que favorece a persistência bacteriana em infecções crônicas (COSTERTON *et al.*, 1999). Em *P. aeruginosa*, a formação de biofilmes está associada a alterações fisiológicas importantes, incluindo mudanças no metabolismo (HOIBY *et al.*, 2010).

P. aeruginosa secreta também a lipoxigenase LoxA, uma enzima que oxida ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) do hospedeiro, como os ácidos araquidônico e linoleico (MASHIMA; OKUYAMA, 2015). Essa atividade enzimática contribui para a patogênese pulmonar, induzindo a produção de mediadores como a lipoxina A4, que inibem o recrutamento de leucócitos e a secreção de quimiocinas essenciais, como MIPs e KC. Além disso, a LoxA está associada à indução de ferroptose em células epiteliais brônquicas, um processo de morte celular desencadeado pela oxidação excessiva de fosfolipídeos da membrana (MORELLO *et al.*, 2019).

Paralelamente, *P. aeruginosa* apresenta elevada resistência intrínseca e adquirida a diferentes classes de antibióticos (Figura 1). Entre os principais mecanismos estão a baixa permeabilidade da membrana externa, associada à composição do lipopolissacarídeo e à regulação negativa de porinas específicas, como OprD, que limita a entrada de diversos antibióticos (NIKAIDO, 2003). Além disso, a superexpressão de sistemas de efluxo do tipo RND, como MexAB-OprM e MexXY-OprM, promove a extrusão ativa de diferentes classes de fármacos, reduzindo sua concentração intracelular. A resistência também pode ser ampliada por mutações cromossômicas ou pela aquisição de genes de resistência, resultando na produção de β -lactamases, como AmpC, e na alteração de alvos celulares essenciais, incluindo DNA girase, topoisomerase IV e ribossomos (LETIZIA; DIGGLE; WHITELEY, 2025). Estudos recentes reforçam que alterações na estrutura e na composição da membrana bacteriana podem impactar diretamente a eficácia desses mecanismos de resistência, influenciando a suscetibilidade da bactéria a antibióticos e outros agentes estressores (ELFADADNY *et al.*, 2024). A atuação conjunta desses mecanismos contribui para o perfil de multirresistência característico de *P. aeruginosa* e representa um grande desafio para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno.

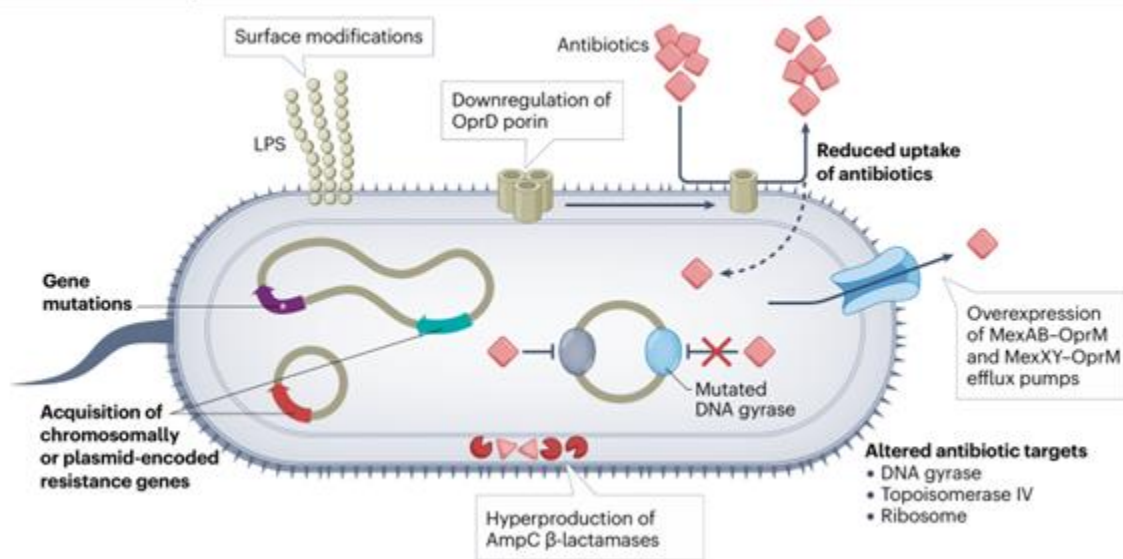


Figura 1 — Principais mecanismos de resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa*.

A resistência pode ocorrer por modificações na superfície celular, incluindo alterações nos lipopolissacarídeos (LPS), redução da permeabilidade da membrana externa por diminuição da expressão de porinas, como OprD, e superexpressão de sistemas de efluxo, como MexAB-OprM e MexXY-OprM, resultando na redução da concentração intracelular de antibióticos. Adicionalmente, mutações em genes cromossômicos ou a aquisição de genes de resistência via elementos móveis podem levar à produção de β -lactamases do tipo AmpC e à modificação dos alvos antibióticos, como DNA girase, topoisomerase IV e ribossomos, comprometendo a eficácia terapêutica. Fonte: LETIZIA; DIGGLE; WHITELEY, 2025

Nesse contexto, o *quorum sensing* constitui um sistema central de comunicação entre células que coordena a expressão gênica em função da densidade populacional, desempenhando papel fundamental na regulação de fatores de virulência, formação de biofilme e adaptação a ambientes hostis (WILLIAMS; CÁMARA, 2009). Esse sistema é organizado de forma hierárquica e envolve principalmente os circuitos Las, Rhl e Pqs, que utilizam diferentes moléculas sinalizadoras para modular a expressão de genes associados à produção de exoenzimas, toxinas, sideróforos e componentes da matriz extracelular do biofilme (JIMENEZ *et al.*, 2012). A ativação coordenada desses sistemas permite que a bactéria transite de um estado planctônico para comunidades estruturadas, aumentando a tolerância a antibióticos, ao estresse oxidativo e à resposta imune do hospedeiro, o que contribui significativamente para sua persistência em infecções crônicas (LEE; ZHANG, 2015; HENTZER; GIVSKOV, 2003).

1.1.4. Estrutura celular, composição da membrana e adaptação a estresses

A membrana biológica constitui a primeira linha de defesa contra estresses ambientais e o local de processos metabólicos vitais, sendo a preservação de sua integridade e homeostase um requisito indispensável para a sobrevivência bacteriana (BIANCO; FRÖHLICH; VANDERPOOL, 2019). Em bactérias Gram-negativas, como a *P. aeruginosa*, o envelope

celular apresenta uma estrutura complexa na qual a membrana interna (MI) e a membrana externa (ME) desempenham papéis distintos: enquanto a MI abriga sistemas essenciais de transporte e geração de energia, a ME atua como uma barreira de permeabilidade intrínseca que restringe a entrada de antibióticos e compostos tóxicos (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Em *P. aeruginosa* os lipídios estão presentes principalmente na forma de fosfolipídios, sendo as classes majoritárias a fosfatidiletanolamina (PE), que representa cerca de 60% do total na fase logarítmica, seguida pelo fosfatidilglicerol (PG) (aproximadamente 21-27%) e pela cardiolipina. Outras classes menores, como o ácido fosfatídico, a fosfatidilcolina e lipídios de ornitina, também são detectadas em proporções reduzidas (BENAMARA *et al.*, 2014).

A capacidade de adaptação bacteriana a flutuações de temperatura, pH e osmolaridade depende da modulação ativa das propriedades biofísicas da membrana, um processo conhecido como adaptação homeoviscosa (BIANCO; FRÖHLICH; VANDERPOOL, 2019; GHORBAL *et al.*, 2013). A fluidez da membrana é regulada principalmente pelo ajuste da proporção entre ácidos graxos saturados (SFAs) e insaturados (UFAs). Enquanto os SFAs, como o ácido palmítico, promovem um empacotamento denso e reduzem a permeabilidade, os UFAs aumentam a flexibilidade e a fluidez devido à presença de "dobras" em suas cadeias acil (MAITI; KUMAR; DASCHAKRABORTY, 2023; KIM *et al.*, 2019). Além da composição lipídica, a célula utiliza canais mecanossensíveis (MscL e MscS) para regular a pressão de turgor contra choques osmóticos abruptos, funcionando como válvulas de liberação de solutos para evitar a lise celular (ÇETINER *et al.*, 2017).

Os ácidos graxos insaturados presentes nas membranas bacterianas são classificados conforme o número de ligações duplas em suas cadeias (GHORBAL *et al.*, 2013). Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), como o ácido palmitoleico (C16:1) e o cis-vacênico (C18:1), possuem uma única insaturação e são os principais constituintes das membranas bacterianas, sendo frequentemente considerados virtualmente imunes à peroxidação (CHAO; WOLFAARDT; ARTS, 2010). Em contraste, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são altamente vulneráveis a danos oxidativos e geralmente não são sintetizados *de novo* por bactérias. Contudo, a *P. aeruginosa* possui a capacidade de incorporar PUFAs exógenos do hospedeiro em seus fosfolipídeos. Essa incorporação aumenta a permeabilidade da membrana, altera a resistência a peptídeos antimicrobianos e estimula significativamente a formação de biofilmes, impactando diretamente a persistência do patógeno (BAKER *et al.*, 2018; GHORBAL *et al.*, 2013).

No que diz respeito à composição de ácidos graxos de *P. aeruginosa* o SFA mais abundante é o ácido palmítico (C16:0), que compõe entre 26,7% e 35,6% do total de ácidos graxos (CHAO; WOLFAARDT; ARTS, 2010). Outros saturados relevantes incluem o ácido mirístico (14:0) e o ácido esteárico (18:0). Entre os MUFAs, os componentes principais são o ácido cis-vacênico (18:1n-7), representando cerca de 31% a 35%, e o ácido palmitoleico (16:1n-7), que varia entre 9% e 13% (GHORBAL *et al.*, 2013). A proporção de MUFAs para SFAs em linhagens selvagens de *P. aeruginosa* sob condições aeróbias padrão é de aproximadamente 1,8 a 1,9 (ZHU *et al.*, 2006). Durante o meio da fase exponencial SFAs constituem cerca de 42,6% dos lipídios totais, enquanto os UFAs (predominantemente MUFAs) somam 57,4%. Essa proporção é vital para a adaptação homeoviscosa, permitindo que a bactéria ajuste a fluidez da membrana em resposta a flutuações de temperatura ou exposição a agentes químicos (GHORBAL *et al.*, 2013).

Embora o ajuste da razão entre MUFAs e SFAs via síntese *de novo* ou dessaturação aeróbia, pela enzima DesB, seja um mecanismo adaptativo central, as bactérias frequentemente enfrentam estresses súbitos que exigem modificações mais rápidas nas estruturas já incorporadas (BIANCO; FRÖHLICH; VANDERPOOL, 2019; KIM *et al.*, 2019). Diante de condições hostis ou durante a transição para estágios de crescimento lento, a célula recorre a modificações pós-sintéticas das cadeias acil (CHANG; CRONAN, 1999). Uma das estratégias mais sofisticadas e energeticamente custosas envolve a transformação direta da ligação dupla de um UFA preexistente em uma estrutura cíclica saturada, processo este mediado pela via da ciclopropanação de ácidos graxos, que será discutida detalhadamente a seguir.

1.2. Ciclopropano de ácidos graxos (Cfa)

1.2.1. Ciclopropanação de ácidos graxos como estratégia adaptativa bacteriana

A ciclopropanação de ácidos graxos constitui uma das modificações lipídicas pós-sintéticas do envelope celular bacteriano, atuando como um mecanismo central para a manutenção da homeostase sob estresses ambientais diversos (BIANCO; FRÖHLICH; VANDERPOOL, 2019). Este processo é catalisado pela enzima ciclopropano ácido graxo sintase, uma metiltransferase dependente de S-adenosil-L-metionina (SAM ou AdoMet) que atua diretamente em bicamadas lipídicas pré-formadas (Figura 2). A enzima funciona como um homodímero, onde cada monômero possui um domínio N-terminal de ligação a lipídeos e um domínio C-terminal catalítico; estruturalmente, uma subunidade ancora o complexo na membrana enquanto a outra executa a catálise, extraindo e modificando a ligação dupla cis de

UFAs preexistentes para formar o anel ciclopropano. Devido à necessidade de reciclagem do cofator SAM, a biossíntese de cada anel consome o equivalente a três moléculas de ATP, custo elevado que ocorre pois a enzima SAM sintetase cliva toda a cadeia de tripolifosfato da molécula de ATP, que é então degradada a pirofosfato e fosfato. Esse investimento metabólico significativo que ocorre predominantemente durante a transição da fase exponencial tardia para a fase estacionária ou sob condições de estresse (CRONAN; LUK, 2022; JIANG *et al*, 2019).

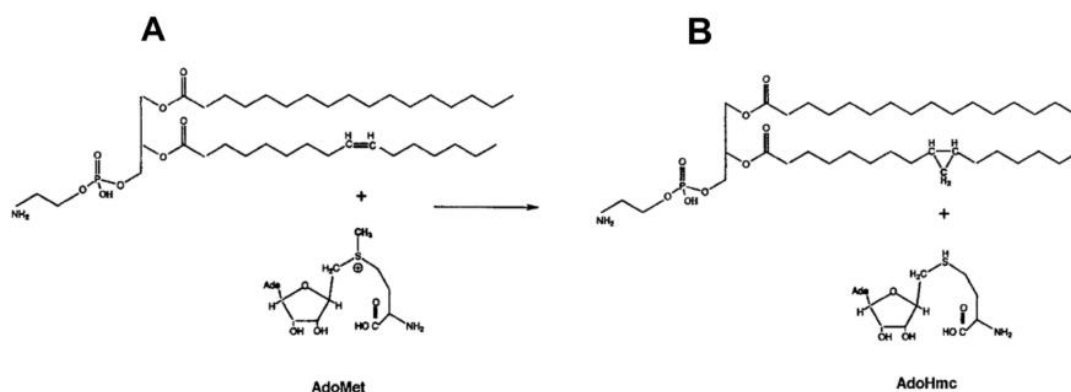


Figura 2 — Estruturas dos substratos e produtos da reação catalisada pela síntese de ácidos graxos ciclopropanos.

Em A, fosfolipídio contendo ácido graxo insaturado (UFA), exemplificado por uma fosfatidiletanolamina típica de membranas de bactérias Gram-negativas, e a S-adenosil-L-metionina (AdoMet), doadora do grupo metileno. Em B, fosfolipídio contendo ácido graxo ciclopropânico formado após a reação, juntamente com a S-adenosil-L-homocisteína (AdoHmc) como subproduto. Fonte: adaptado de GROGAN; CRONAN, 1997

Embora visões clássicas sugerissem que esses anéis aumentavam a rigidez da membrana, simulações modernas de dinâmica molecular demonstram que os anéis de ciclopropano exercem uma função dual (POGER; MARK, 2015). Eles aumentam significativamente o ordenamento das cadeias acil, o que estabiliza a membrana contra agressões químicas e térmicas, mas, simultaneamente, promovem a fluidez que evitam a transição deletéria para a fase gel durante o resfriamento (choque frio) (MAITI; KUMAR; DASCHAKRABORTY, 2023). Uma das características funcionais mais críticas da ciclopropanação é a redução drástica da permeabilidade da membrana a prótons, o que provê uma resistência vital a ambientes de pH extremo, permitindo que a célula mantenha seu potencial de membrana mesmo sob estresse ácido severo (SHABALA; ROSS, 2008). Na década de 90 estudos com *E. coli* já demonstraram que mutantes deficientes em *cfp* apresentam redução significativa da sobrevivência sob condições ácidas, evidenciando que os ácidos graxos que apresentam ciclopropanação desempenham papel central na resistência a valores letais de pH, especialmente durante a fase estacionária de crescimento (CHANG; CRONAN,

1999). Resultados semelhantes foram observados em outras bactérias Gram-negativas, nas quais o acúmulo de ácidos graxos que apresentam ciclopropanação está associado a uma resposta adaptativa ao estresse ácido, reforçando o caráter conservado desse mecanismo entre diferentes grupos bacterianos (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2008).

Em *E. coli*, embora a ciclopropanação seja tradicionalmente relacionada à tolerância ao estresse ácido, evidências indicam que os ácidos graxos que apresentam ciclopropanação também influenciam a resistência a condições oxidativas, afetando a estabilidade da membrana celular (CHEN; GÄNZLE, 2016). A disparidade na vulnerabilidade química entre PUFAs e MUFAs é um fator determinante na sobrevivência bacteriana sob estresse oxidativo, uma vez que a arquitetura das insaturações dita a capacidade de propagação do dano na membrana celular, sendo PUFAs alvos fundamentais para a destruição sistêmica do microrganismo (MASLOVSKA; KOMPLIKEYVYC; HNATUSH, 2023; CHEN; GÄNZLE, 2016).

No caso de *P. aeruginosa* o papel específico do gene *cfa* e da ciclopropanação de ácidos graxos em sua fisiologia permaneceu, por muitos anos, pouco explorado. Entretanto, o crescente interesse na remodelação lipídica como componente das respostas adaptativas em *P. aeruginosa* tem impulsionado investigações mais recentes voltadas à compreensão do papel de modificações estruturais dos ácidos graxos nessa espécie. Esses estudos emergentes indicam que a ciclopropanação pode representar um mecanismo relevante para a adaptação dessa bactéria a condições de estresse, particularmente aquelas associadas ao estresse oxidativo, reforçando a necessidade de análises funcionais específicas em linhagens de *P. aeruginosa* (EZEDURU *et al.*, 2024).

Em *P. aeruginosa*, a síntese de ácidos graxos ciclopropanos ocorre através de uma modificação pós-sintética de cadeias de MUFAs que já se encontram esterificadas em fosfolipídios funcionais da membrana, como a PE e o PG mencionados anteriormente. Essa biossíntese é estritamente coordenada com a fase de crescimento: durante a fase exponencial ativa, os níveis de ciclopropanos são mínimos ou indetectáveis, mas a expressão do gene é fortemente induzida na transição para a fase estacionária, começando a ser detectada quando a cultura atinge uma densidade óptica de aproximadamente $DO_{600} = 1$. Em culturas planctônicas que atingem a fase estacionária tardia (DO_{600} aproximadamente 3,6), os anéis de ciclopropanos se acumulam, alcançando uma abundância de aproximadamente 45% do extrato lipídico total (EZEDURU *et al.*, 2024)

A ciclopropanação lipídica também tem sido associada à virulência bacteriana em diferentes espécies, uma vez que a adaptação da membrana celular é determinante para a sobrevivência do patógeno em ambientes hostis do hospedeiro (LIN; HUANG; ZHANG, 2002). Em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, mutantes deficientes em *cfa* apresentam redução significativa da virulência, evidenciando a importância dessa modificação lipídica durante a infecção (KARLINSEY *et al.*, 2022). De forma semelhante, em *Mycobacterium tuberculosis*, a ciclopropanação de lipídios da parede celular está diretamente relacionada à persistência e à virulência, influenciando a interação com o sistema imune do hospedeiro (GLICKMAN; COX; JACOBS JR., 2000). A síntese de ácidos graxos que apresentam ciclopropanação também constitui um determinante central da virulência de *Helicobacter pylori*, sendo indispensável para a manutenção da integridade da membrana plasmática, a resistência ao estresse ácido gástrico e a capacidade de persistência da colonização *in vivo* (JIANG *et al.*, 2019). Esses estudos indicam que a ciclopropanação lipídica contribui para a patogenicidade bacteriana ao favorecer a adaptação a condições adversas encontradas no hospedeiro, ressaltando a necessidade de um controle preciso da expressão do gene *cfa* em resposta a diferentes sinais ambientais e fisiológicos.

1.2.2. Regulação da expressão do gene *cfa*

Em *E. coli*, a regulação transcricional de *cfa* está intimamente associada ao fator sigma alternativo σ^S (RpoS), considerado o principal regulador global da resposta ao estresse geral (WANG; CRONAN, 1994). A ativação de RpoS durante a fase estacionária promove o aumento da transcrição de *cfa*, resultando em maior incorporação de ácidos graxos que apresentam ciclopropanação na membrana (GROGAN; CRONAN, 1997). Esse mecanismo contribui para a maior resistência da célula às diferentes condições de estresse frequentemente encontradas tanto no ambiente quanto durante a infecção do hospedeiro, como descrito anteriormente.

A expressão de *cfa* é regulada de forma refinada em nível pós-transcricional, principalmente por pequenos RNAs regulatórios (sRNAs), o que permite uma resposta rápida a mudanças ambientais abruptas. Em *E. coli*, foi demonstrado que o mRNA de *cfa* apresenta uma região 5' não traduzida longa, que serve como plataforma para interação com diferentes sRNAs dependentes da proteína Hfq (BIANCO; FRÖHLICH; VANDERPOOL, 2019).

Entre os sRNAs descritos, RydC atua como um regulador positivo da expressão de *cfa*, estabilizando o mRNA e aumentando a tradução da Ciclopropano Sintase, especialmente

sob condições de estresse ácido (FRÖHLICH *et al.*, 2013). Em contraste, outros sRNAs, como ArrS e CpxQ, exercem efeitos moduladores distintos, evidenciando que a expressão de *cfa* resulta do balanço entre sinais regulatórios positivos e negativos (BIANCO; FRÖHLICH; VANDERPOOL, 2019). Esse controle pós-transcricional confere plasticidade à resposta adaptativa, permitindo que a célula ajuste rapidamente a composição da membrana sem depender exclusivamente de novos eventos de transcrição. Esse tipo de regulação é particularmente relevante para genes associados à homeostase da membrana, uma vez que alterações abruptas na fluidez e permeabilidade podem comprometer a viabilidade celular (FARLEY *et al.*, 2025). Assim, o controle pós-transcricional de *cfa* assegura que a ciclopropanação ocorra de maneira coordenada com outras respostas fisiológicas ao estresse, integrando-se aos sistemas globais de regulação bacteriana.

Em *P. aeruginosa* a regulação da síntese de ácidos graxos ciclopropanos é fortemente coordenada com a fase de crescimento, apresentando uma indução robusta da expressão do gene durante a transição para a fase estacionária. Esse aumento transcricional resulta em um acúmulo massivo de anéis ciclopropanos na membrana celular que podem atingir cerca de 45% do extrato lipídico total. Esse processo é acompanhado pela perda gradual de MUFAs, que são convertidos diretamente em ácidos graxos ciclopropanos (EZEDURU *et al.*, 2024).

Além da regulação dependente da fase de crescimento, a expressão do gene *cfa* em *P. aeruginosa* é controlada dinamicamente pelo regulador da resposta ao estresse oxidativo, OxyR. A identificação de um sítio de ligação de OxyR na região promotora de *cfa* confirma que a biossíntese é parte integrante do regulon de defesa antioxidante da bactéria. Sob condições de desafio oxidativo, como a exposição ao paraquat (um agente gerador de superóxido), a transcrição de *cfa* é induzida em até cinco vezes de forma estritamente dependente de OxyR, sendo essa resposta ausente em mutantes $\Delta oxyR$. Essa regulação é uma estratégia de defesa ativa para blindar a bicamada contra a peroxidação e os danos provocados por espécies reativas de oxigênio (EZEDURU *et al.*, 2024).

A regulação transcricional e pós-transcricional de *cfa* permite que a síntese de ciclopropano sintase seja ajustada rapidamente a mudanças ambientais, conferindo à membrana celular maior resistência a agentes tóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS) (EZEDURU *et al.*, 2024; ZHANG; ROCK, 2008; GROGAN; CRONAN, 1997). Diante disso, a compreensão do papel das ROS na fisiologia bacteriana é essencial para contextualizar a importância funcional da ciclopropanação.

1.3. Espécies reativas de oxigênio (ROS)

1.3.1. Definição e classificação das ROS

As ROS correspondem a moléculas e radicais derivados da redução parcial do oxigênio molecular, caracterizados por elevada reatividade química e potencial de causar danos celulares. Entre as principais ROS biologicamente relevantes estão o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o oxigênio singleto (1O_2), os quais diferem quanto à estabilidade, capacidade de difusão e mecanismos de ação sobre macromoléculas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; IMLAY, 2013). As ROS compreendem um conjunto diverso de moléculas com propriedades químicas distintas, cujos efeitos biológicos variam de acordo com cada uma delas (Figura 3).

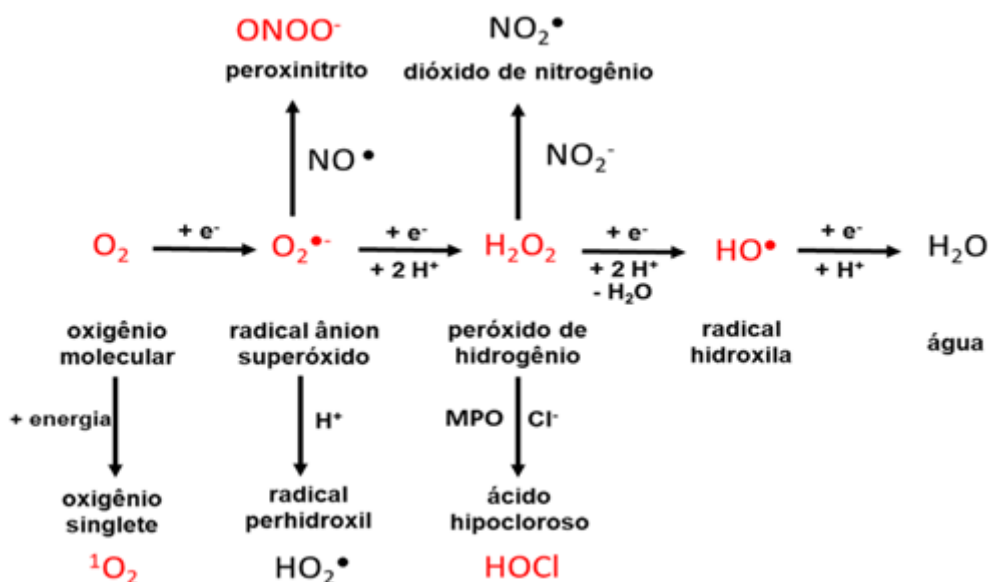


Figura 3 — Principais espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas a partir do oxigênio molecular.

A redução do O_2 leva à formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que pode originar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, subsequentemente, o radical hidroxila (HO^\bullet). O oxigênio molecular também pode ser convertido em oxigênio singleto (1O_2) por excitação energética. O superóxido pode reagir com o óxido nítrico (NO^\bullet), formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa de nitrogênio altamente oxidante. Adicionalmente, o peróxido de hidrogênio pode dar origem a outras espécies reativas, como o ácido hipocloroso ($HOCl$), em reações catalisadas por peroxidases, e ao radical perhidroxil (HO_2^\bullet). Essas espécies apresentam diferentes reatividades e contribuem para danos oxidativos em componentes celulares. Fonte: Grupo Microbiologia Redox LFBM

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é uma espécie reativa de oxigênio radicalar formada principalmente pela redução eletrônica do oxigênio molecular, processo que ocorre de forma espontânea em sistemas biológicos que utilizam cadeias de transporte de elétrons (STORZ; IMLAY, 1999). Apesar de apresentar reatividade relativamente limitada quando comparado a outras ROS, o superóxido desempenha papel central no estresse oxidativo por atuar como precursor de espécies mais reativas, como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Em

sistemas celulares, o $O_2^{\bullet-}$ reage preferencialmente com centros metálicos e proteínas contendo grupos ferro-enxofre, podendo comprometer funções metabólicas essenciais (IMLAY, 2013).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa de oxigênio não radicalar, formada tanto pela dismutação do ânion superóxido quanto por reações oxidativas específicas do metabolismo celular (ANDRÉS *et al.*, 2022; BAEHNER *et al.*, 1975). Diferentemente de ROS altamente reativas, o H_2O_2 apresenta maior estabilidade química e capacidade de difusão através das membranas, o que lhe confere papel relevante como mediador de estresse oxidativo em compartimentos celulares distintos (IMLAY, 2013). Embora menos reativo, o H_2O_2 pode participar da reação de Fenton-Haber-Weiss na presença de metais de transição, levando à formação do radical hidroxila, altamente citotóxico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

O radical hidroxila ($\bullet OH$) é considerado a espécie reativa de oxigênio mais agressiva do ponto de vista biológico, devido à sua elevada reatividade e ausência de mecanismos celulares específicos de detoxificação (STORZ; IMLAY, 1999). Esse radical é gerado principalmente pela reação de Fenton-Haber-Weiss, nas quais o peróxido de hidrogênio reage com íons metálicos reduzidos, como Fe^{2+} . O $\bullet OH$ reage de maneira praticamente indiscriminada com biomoléculas próximas ao seu local de formação, promovendo oxidação de proteínas, danos ao DNA e peroxidação lipídica. Devido à sua vida extremamente curta, seus efeitos são localizados, porém potencialmente letais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

O oxigênio singlete (1O_2) é uma espécie reativa de oxigênio que não se origina de reações de transferência de elétrons, mas de um estado eletrônico excitado do oxigênio molecular, característica que lhe confere elevada reatividade química. Diferentemente das ROS geradas predominantemente por reações redox metabólicas, o 1O_2 é comumente produzido em processos fotoquímicos, especialmente na presença de fotossensibilizadores expostos à luz visível (HAMBLIN; HASAN, 2004). O oxigênio singleto é amplamente reconhecido como um dos principais mediadores de dano celular em contextos de estresse fotoinduzido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

1.3.2. Formação de ROS e estresse oxidativo em sistemas biológicos

As ROS podem ser geradas tanto por fontes endógenas, associadas ao metabolismo celular, quanto por fontes exógenas, relacionadas a fatores ambientais e químicos externos. Em organismos aeróbios e facultativos, a principal via endógena de geração de ROS está associada à transferência de elétrons durante processos metabólicos oxidativos, nos quais o oxigênio pode

sofrer redução incompleta, originando o radical ânion superóxido (STORZ; IMLAY, 1999). Esse processo ocorre continuamente mesmo em condições fisiológicas normais, sendo intensificado em situações de elevado fluxo metabólico ou desequilíbrio redox intracelular (IMLAY, 2013).

Além das fontes endógenas, a produção de ROS pode ser estimulada por fatores exógenos, como a presença de compostos redox-ativos, metais de transição e exposição à radiação luminosa na presença de fotossensibilizadores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Nessas condições, diferentes espécies oxidantes podem ser formadas por mecanismos distintos, incluindo reações do tipo Fenton-Haber-Weiss e processos fotodinâmicos, ampliando o espectro e a reatividade das ROS presentes no ambiente celular (MEYERSTEIN, 2021).

Quando a taxa de geração dessas espécies excede a capacidade da célula de manter o equilíbrio redox, estabelece-se o estresse oxidativo, caracterizado pelo acúmulo de ROS e pela ocorrência de danos celulares progressivos (STORZ; IMLAY, 1999). As consequências do estresse oxidativo incluem modificações estruturais e funcionais em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, comprometendo processos essenciais como metabolismo energético, integridade de membranas e estabilidade do material genético (IMLAY, 2013). A persistência desse estado pode levar à perda de viabilidade celular, especialmente em ambientes biologicamente hostis ou sob condições de estresse prolongado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

No sistema imune humano, o “burst” oxidativo é um mecanismo central da imunidade inata, especialmente em neutrófilos e macrófagos, ativado após o reconhecimento e a fagocitose de microrganismos (BISMUTH *et al.*, 2021; WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016). Esse processo consiste na rápida produção de ROS, iniciada pela ativação e montagem do complexo NADPH oxidase na membrana, que catalisa a redução do oxigênio molecular ao transferir elétrons do NADPH para o oxigênio, gerando o O^{•-}. O superóxido pode ser subsequentemente convertido por dismutação em H₂O₂ e outras espécies reativas secundárias, como o ácido hipocloroso (HOCl) e radicais orgânicos, através da ação da enzima mieloperoxidase (MPO) (Figura 3). Essas espécies reativas atuam de forma sinérgica para danificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos do patógeno, sendo esses mecanismos oxidativos essenciais para a sua eliminação e para uma defesa antimicrobiana eficaz (WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016; DUBOVSKIY *et al.*, 2008).

1.3.3. Alvos moleculares das ROS e impacto na integridade da membrana

Proteínas constituem alvos frequentes de ROS, especialmente em resíduos de aminoácidos suscetíveis, como cisteína, metionina e histidina, o que pode resultar em inativação enzimática, alterações conformacionais, agregação proteica ou degradação acelerada (IMLAY, 2013; CECARINI *et al.*, 2007). O DNA também é altamente vulnerável ao dano oxidativo, podendo sofrer modificações em bases nitrogenadas, quebras de fita simples ou dupla e mutações decorrentes de processos de reparo incorretos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Historicamente, os lipídios de membrana bacterianos foram negligenciados em estudos de estresse oxidativo sob a premissa de que sua composição predominante por MUFAs os tornaria virtualmente imunes à peroxidação lipídica. Essa percepção baseia-se no contraste com as membranas eucarióticas, ricas em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), cuja estrutura com múltiplos carbonos bis-álílicos é essencial para sustentar a fase de propagação da reação radicalar em cadeia (NG *et al.*, 2022). Contudo, dados cinéticos indicam que as constantes de oxidação de MUFAs pelo $^1\text{O}_2$ são significativamente maiores que as suas constantes de auto-oxidação. Embora essas constantes sejam menores que as de PUFAs, isso sugere que o $^1\text{O}_2$ é capaz de formar hidroperóxidos lipídicos diretamente em MUFAs, evidenciando que estas membranas não estão protegidas contra todas as formas de estresse oxidativo (DOLEIDEN *et al.*, 1974; SLAWSON; STEIN, 1970). Essa vulnerabilidade específica pode explicar por que bactérias induzem a síntese de ácidos graxos ciclopropanos, que por serem quimicamente mais estáveis e resistentes ao $^1\text{O}_2$, podem atuar como uma estratégia de defesa ativa quando expostas a esse tipo de insulto (MASLOVSKA; KOMPLIKEYCH; HNATUSH, 2023)

A relevância dessa hipótese está associada a *P. aeruginosa*, onde o gene *cfa* não é apenas induzido na transição para a fase estacionária, mas é diretamente regulado pelo sensor OxyR sob estresse oxidativo, demonstrando que a bactéria investe um gasto energético para remodelar sua membrana como um escudo antioxidante importante para sua sobrevivência. Essa regulação foi demonstrada experimentalmente através do desafio com paraquat, um composto gerador de radicais superóxido que ativa respostas dependentes de OxyR, resultando em um aumento de cinco vezes na atividade do promotor de *cfa*s em linhagens selvagens, efeito que foi completamente anulado em mutantes ΔoxyR (EZEDURU *et al.*, 2024).

Além dos efeitos estruturais, a oxidação dos lipídios de membrana interfere na atividade de proteínas integrais e periféricas, impactando processos essenciais como transporte de solutos, transdução de sinais e respiração celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Dessa forma, a membrana celular não apenas representa um alvo preferencial das ROS, mas também um elemento determinante da sensibilidade celular ao estresse oxidativo, uma vez que suas propriedades físico-químicas modulam a extensão e a propagação dos danos oxidativos (JUAN *et al.*, 2021; AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

Considerando que a tolerância ao estresse oxidativo e a integridade da membrana celular influenciam diretamente a capacidade de sobrevivência bacteriana em ambientes hostis, especialmente aqueles associados à resposta imune do hospedeiro, torna-se relevante avaliar o impacto dessas adaptações em sistemas biológicos que reproduzam, ainda que de forma simplificada, as pressões encontradas durante a infecção (IMLAY, 2013; STAERCK *et al.*, 2017). Nesse contexto, modelos experimentais de infecção permitem integrar os efeitos de múltiplos estresses fisiológicos, incluindo a exposição a espécies reativas de oxigênio, possibilitando uma análise mais abrangente das consequências funcionais das modificações celulares observadas *in vitro* (KAVANAGH; REEVES, 2004).

1.4. *Galleria mellonella* como modelo experimental de infecção

A larva da mariposa-da-cera tem sido amplamente utilizada como modelo alternativo de infecção para o estudo da virulência e da sobrevivência de microrganismos patogênicos, incluindo bactérias gram-negativas de relevância clínica (TSAI; LOH; PROFT, 2016). Esse modelo experimental apresenta vantagens significativas (Figura 4), como baixo custo, facilidade de manutenção, ausência de restrições éticas associadas ao uso de vertebrados e a possibilidade de incubação a 37 °C, permitindo a avaliação de fenótipos bacterianos em condições próximas às encontradas no hospedeiro humano (MÉNARD *et al.*, 2021). Além disso, *G. mellonella* possibilita análises reprodutíveis da progressão da infecção por meio de curvas de sobrevivência do hospedeiro, avaliação da carga bacteriana e observação de alterações fisiológicas associadas à patogenicidade, sendo amplamente reconhecida como um modelo confiável para estudos iniciais de virulência *in vivo* (KAVANAGH; REEVES, 2004).

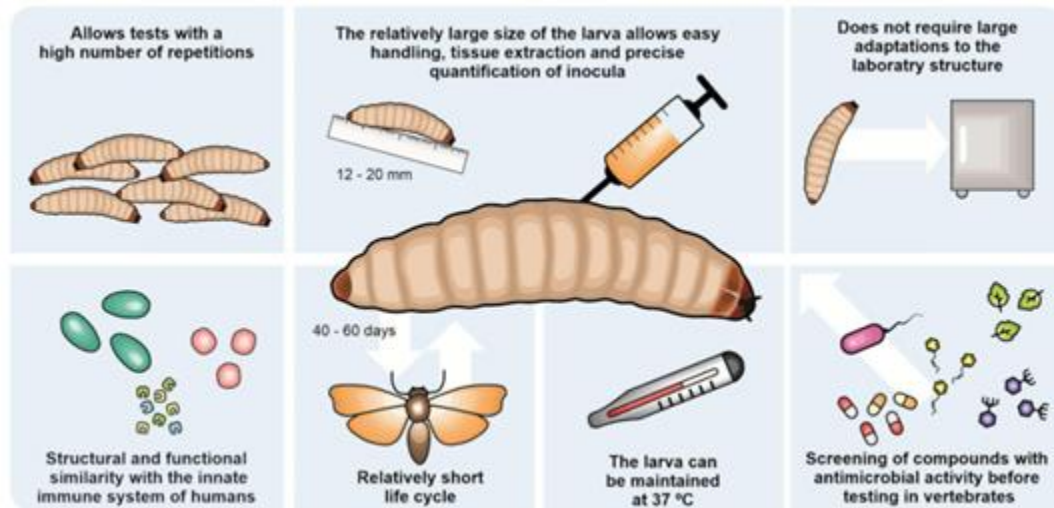


Figura 4 — Principais vantagens do uso de *G. mellonella* como modelo experimental de infecção.

As larvas apresentam tamanho relativamente grande, o que facilita o manuseio, a inoculação precisa e a extração de tecidos, além de permitir experimentos com alto número de repetições. O ciclo de vida curto, a possibilidade de manutenção a 37 °C e a ausência de necessidade de infraestrutura laboratorial complexa tornam o modelo acessível e reprodutível. Adicionalmente, *G. mellonella* apresenta similaridades estruturais e funcionais com a imunidade inata de mamíferos, sendo amplamente utilizada para triagem de compostos antimicrobianos e avaliação de virulência antes de testes em modelos vertebrados. Fonte: PEREIRA *et al.*, 2020

G. mellonella apresenta um sistema imune inato bem caracterizado, composto por respostas celulares e humorais que atuam de forma integrada na defesa contra microrganismos (Figura 5). A resposta celular é mediada por diferentes tipos de hemócitos, incluindo prohemócitos, plasmócitos, granulócitos, esferulócitos, oenocitoides e coagulócitos, os quais participam de mecanismos como fagocitose, nodulação e encapsulamento de patógenos (JUNQUEIRA, 2012). Paralelamente, a resposta humoral envolve a produção de peptídeos antimicrobianos, opsoninas e melanina, que contribuem para a neutralização e eliminação dos agentes infecciosos. A ativação da cascata da profenoloxidase, desencadeada pelo reconhecimento de componentes microbianos, como lipopolissacarídeos e peptidoglicano, resulta na formação de melanina, um processo central para a contenção da infecção (PEREIRA *et al.*, 2020).

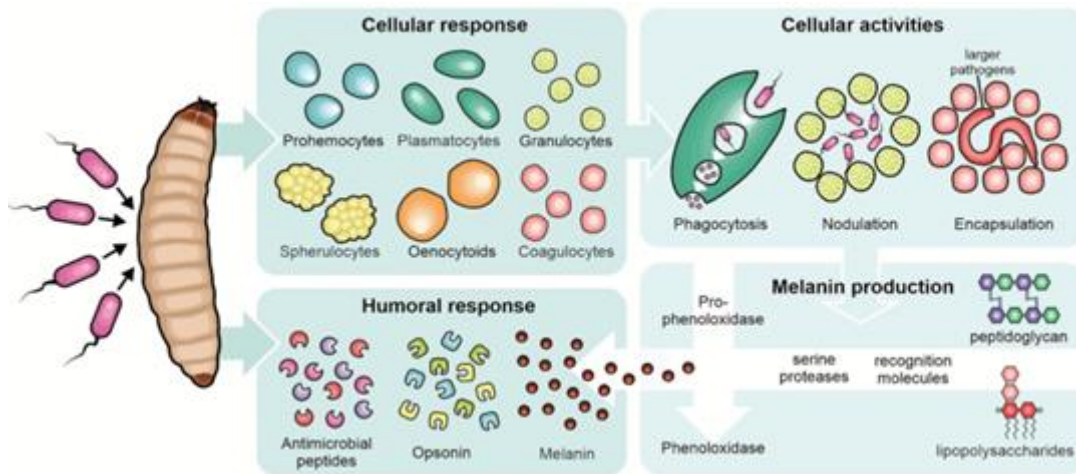


Figura 5 — Representação esquemática dos principais componentes da resposta imune inata de *Galleria mellonella* frente à infecção por microrganismos.

O sistema imune do inseto é composto por respostas celulares e humorais. A resposta celular envolve diferentes tipos de hemócitos, como pro-hemócitos, plasmócitos, granulócitos, esferulócitos, oenocitoides e coagulócitos, responsáveis por mecanismos como fagocitose, nodulação e encapsulamento de patógenos. A resposta humoral inclui a produção de peptídeos antimicrobianos, opsoninas e melanina. A ativação da cascata da profenoloxidase, mediada por proteases e moléculas de reconhecimento, resulta na produção de melanina, um processo fundamental para a contenção e eliminação de microrganismos invasores. Fonte: PEREIRA *et al.*, 2020

Nesse contexto, *G. mellonella* representa um sistema experimental particularmente adequado para avaliar, de forma integrada, o impacto de adaptações celulares bacterianas previamente caracterizadas *in vitro* sobre a sobrevivência e a virulência em um ambiente biológico complexo. Alterações estruturais da célula bacteriana, especialmente aquelas associadas à composição e organização da membrana, podem influenciar tanto a tolerância ao estresse oxidativo quanto a interação com os mecanismos efetores da imunidade inata do hospedeiro (WAND *et al.*, 2016). Dessa forma, o uso desse modelo permite investigar as consequências funcionais de modificações de membrana frente às pressões impostas durante o processo infeccioso, contribuindo para uma compreensão mais ampla da adaptação bacteriana em condições que mimetizam aspectos centrais da infecção (KAVANAGH; REEVES, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar o papel do gene codificador da enzima Cfa na proteção de lipídeos de membrana de *P. aeruginosa* contra estresse oxidativo.

2.2. Objetivos específicos:

- a. Obter mutante da linhagem *P. aeruginosa* nulo para gene *cfa*;
- b. Caracterizar o mutante nulo quanto ao crescimento em meio rico e em meio mínimo em diferentes fontes de C, a fim descartar qualquer defeito no crescimento aeróbio;
- c. Investigar a ocorrência de ciclopropanação de ácidos graxos monoinsaturados nos fosfolípídeos de membrana de *P. aeruginosa* por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), comparando as linhagens selvagem (WT) e mutante Δcfa ;
- d. Obter uma fusão de transcrição com o gene repórter *lacZ* para avaliar a expressão do gene *cfa* de *P. aeruginosa* durante diferentes fases do crescimento.
- e. Investigar o efeito da ausência de Cfa quanto a sensibilidade ao H₂O₂, t-BOOH e à terapia fotodinâmica;

3. METODOLOGIA

3.1. Organismos de estudo e condições de cultivo

Neste estudo, utilizou-se a linhagem *P. aeruginosa* UCBPP_PA14, um isolado clínico humano proveniente de infecção sanguínea em paciente queimado, reconhecido por sua capacidade de infectar hospedeiros filogeneticamente distintos e amplamente utilizado como modelo experimental de virulência bacteriana (RAHME *et al.*, 1995). Além da linhagem selvagem, foram utilizadas linhagens mutantes derivadas de PA14, obtidas por diferentes estratégias genéticas ao longo do trabalho conforme disposto na tabela 1. Outras linhagens usadas incluem lasR::MAR2xT7 (LIBERATI *et al.*, 2006), gentilmente cedida pelo grupo de pesquisa da profa. Regina L. Baldini, Δohr (Meireles, D.A.), $\Delta katA$ (Meireles, D.A.) e D12 (APIDIANAKIS *et al.*, 2005).

Devido às dificuldades encontradas para a obtenção de um mutante nulo gerado por deleção não polar por meio de clonagem tradicional, alguns ensaios foram conduzidos utilizando um mutante de inserção de transposon pertencente ao PA14NR Set, uma biblioteca não redundante de *P. aeruginosa* PA14, conforme descrita por Liberati *et al.* (2006). O mutante apresenta uma interrupção no gene *cfa*, gerada pela inserção do transposon MAR2xT7, inserido na posição genômica 6513777. Esta linhagem está catalogada sob a identificação de localização PAMr_nr_mas_07_3:B7 no banco de dados PATIMDB e foi cedida gentilmente pela Dra. Regina Lúcia Baldini (LIBERATI *et al.*, 2006). A fim de identificação, essa linhagem *cfa*::MAR2xT7 será identificada como DM30 ao longo do trabalho.

Além de *P. aeruginosa* utilizou-se também linhagens de *E. coli* para diferentes fins. Para a transferência dos plasmídeos suicidas para *P. aeruginosa*, foi utilizada a linhagem conjugativa S17-1. Também foi utilizada a cepa DH5 α , tanto para a estratégia de transformação quanto em ensaio fenotípico exploratório.

Os meios de cultura utilizados incluem LB (Lysogenic Broth) conforme Bertani (1952) e meio mínimo M9, conforme Miller (1972), suplementado com distintas fontes de carbono. A composição do meio LB foi de 10 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl e 5 g/L de extrato de levedura, enquanto o meio M9 continha 20 mM de NH₄Cl, 12 mM de Na₂HPO₄, 22 mM de KH₂PO₄, 8,6 mM de NaCl, 2 mM de MgSO₄ e 40 μ M de CaCl₂. Cada fonte de Carbono adicionada ao meio mínimo M9 teve sua concentração regulada para: glicose (2% ou 111 mM), citrato (40 mM), itaconato (40 mM), succinato (40 mM) e casaminoácido (10%). Antes de serem adicionados ao meio M9 as soluções de ácido itacônico e ácido succínico tiveram seus pHs ajustados para 6,8.

Para os procedimentos iniciais de transformação foram usadas placas de LB sólido contendo ampicilina (100 μ g/mL). Para procedimentos de conjugação foi utilizado LB sólido contendo gentamicina (300 μ g/mL) e ácido nalidíxico (20 μ g/mL). Também foi usado LB suplementado com tetraciclina (100 μ g/mL) para seleção de linhagens complementadas.

As larvas de *G. mellonella* foram mantidas em colônia no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) e criadas em incubadora tipo BOD a 27 °C, sob condições de ausência de luz, recebendo dieta artificial padronizada no laboratório, baseada em mel, glicerol, fubá, farinha de soja, leite em pó e levedura de cerveja e tendo como base dados disponíveis na literatura (MORELO; TRENTIN, 2016).

Linhagem	Descrição
DM30	Mutante da biblioteca de transposon (<i>cfa</i> ::MAR2xT7)
DM42	Mutante por deleção in-frame do gene <i>PA14_73140</i> (Δ <i>cfa</i>)
DM43	Linhagem complementada com o gene <i>cfa</i> íntegro, mantendo resistência à Tetraciclina (<i>\Delta</i> <i>cfa attB</i> :: <i>pcfa Tet^R</i>)
DM45	Linhagem de complementação após a retirada do marcador de resistência via sistema F ₁ p/FR (<i>\Delta</i> <i>cfa attB</i> :: <i>pcfa Tet^S</i>)

Tabela 1: Lista das principais linhagens de *P. aeruginosa* utilizadas ao longo do trabalho

Diferentes linhagens mutantes de *P. aeruginosa* obtidas e suas descrições

3.2. Investigação bioinformática de homólogos do gene *cfa* em *P. aeruginosa* PA14 e predição estrutura tridimensional de Cfa

Através das sequências obtidas através do NCBI e Pseudomonas genome DB foi possível a realização de análises comparativas entre proteínas similares e inferir funções baseadas em homologia através de programas como o MAFFT e o Jalview. Adicionalmente, a comparação estrutural entre a Cfa de *E. coli* (PDB: 6BQC), e a predição para a proteína de *P. aeruginosa* PA14 foi realizado por meio da ferramenta AlphaFold3.

3.3. Desenho dos oligonucleotídeos para deleção do gene *cfa*

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência genômica de *P. aeruginosa* UCBPP_PA14, obtida no *Pseudomonas Genome Database* através do programa PRIMER3 (KORESSAAR; REMM, 2007). Para a deleção do gene *cfa*, selecionaram-se regiões de aproximadamente 1 kb a montante e a jusante da região codificadora do gene. A fusão das regiões amplificadas gerou um fragmento no qual a porção central do gene, correspondente a 1.155, foi removida, mantendo a fase de leitura. Essa estratégia assegurou a obtenção de uma mutação limpa e não polar. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Exxtend e ressuspensos em Tris-HCl (10 Mm) pH 8,0 para obtenção de uma solução estoque de 100 µM. A solução de trabalho foi preparada a partir desta, com concentração final de 25 µM.

Oligo	Sequência
Cfa_del_L_EcoR	5'-ATGCGAATTCTACTCGGACCAGACCATACC-3'
Cfa_del_R_NdeI	5'-ATGCCATATGCAGTTGCAGGGACAGCAACTC-3'
New_Cfa_del_L_NdeI	5'-ATGCCATATGGACCTGTACGCCTGAACG-3'
New_Cfa_del_R_Hind	5'-ATGCAAGCTTAGCTTGGTCATCTGGTAGGC-3'
Cfa_del_L1	5'-tgcaactgGACCTGTACGCCTGAACG-3'
Cfa_del_R1	5'-agctcggtaccgaggAGCTTGGTCATCTGGTAGGC-3'
Cfa_del_L2	5'-caggtcgactctagagTACTCGGACCAGACCATACC-3'
Cfa_del_R2	5'-ggtcgcgCAGTTGCAGGGACAGCAACTC-3'

Tabela 2: Lista dos oligonucleotídeos desenhados para o processo de obtenção dos mutantes nulos

Os oligonucleotídeos utilizados na clonagem tradicional, baseada em digestão por enzimas de restrição, estão indicados com os sítios de restrição destacados em negrito. Já os oligonucleotídeos empregados na estratégia de Gibson Assembly apresentam as regiões correspondentes às caudas de homologia indicadas em letras minúsculas.

3.4. Desenho dos oligonucleotídeos para complementação do gene *cfa*

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência genômica de *P. aeruginosa* UCBPP_PA14, obtida no *Pseudomonas Genome Database*. Para a complementação do gene deletado, foi selecionada a região do gene de interesse, incluindo 500 pb a montante e 100 pb a jusante da região codificadora de *cfa*. A região foi amplificada por PCR, purificada e submetida à digestão enzimática com BamHI e HindIII (HOANG *et al.*, 2000). O vetor mini-CTX2 foi igualmente purificado e digerido com as mesmas enzimas, seguido da reação de ligação entre o fragmento amplificado e o vetor para obtenção do plasmídeo recombinante. O vetor mini-CTX2 permite a integração site-específica do gene de interesse no sítio *attB* do cromossomo de *P. aeruginosa*, assegurando a manutenção estável da construção em cópia única e sob controle de seu promotor nativo, minimizando efeitos de superexpressão (HOANG *et al.*, 2000). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Exxtend e ressuspensos em Tris-HCl (10 Mm) pH 8,0, formando uma solução estoque de 100 µM, da qual foi preparada uma solução de trabalho de 25 µM.

Oligo	Sequência
ctx2pcfa F	5'-AGTCGAATTCGCACGAAGCTGTCTCGGTAT-3'
ctx2cfa R_hindIII	5'-AGTCAAGCTTGCAGGACTTCGTGCAGACTA-3'

Tabela 3: Lista dos oligonucleotídeos desenhados para a complementação funcional dos mutantes nulos

Oligonucleotídeos utilizados na complementação com seus sítios de restrição destacados em negrito, EcoRI para ctx2pcfa F e HindIII para ctx2cfa R_hindIII .

3.5. Amplificação das regiões flanqueadoras do gene *cfa*

Inicialmente, a obtenção do mutante nulo do gene *cfa* foi planejada por meio de clonagem tradicional para a construção do plasmídeo suicida, seguida de deleção gênica mediada por recombinação homóloga no cromossomo de *P. aeruginosa*. Para isso, as regiões que flanqueiam o gene *cfa* no cromossomo de *P. aeruginosa* foram amplificadas por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos já citados anteriormente. A reação foi preparada com o kit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, contendo a enzima phusion DNA Polymerase (2 U/µL), sendo 0,3 µL adicionados à reação, 1× Phusion CG Buffer (contendo 7,5mM de MgCl₂), 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer, 5% de DMSO, DNA molde (10x) e água ultrapura estéril, em volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 98 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 98 °C por 15s, 60 °C por 15 s e 72 °C por 1 minuto.

3.6. Verificação da amplificação por eletroforese em gel de agarose

Após a PCR, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel foi preparado dissolvendo 0,5 g de agarose em 50 mL de tampão TAE 1× (preparado a partir de estoque 50× contendo 242 g de Tris, 57,1 mL de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0, ajustado para 1 L com água ultrapura), aquecendo a mistura em micro-ondas e vertendo-a na cuba com pente para formação dos poços. As amostras de PCR foram diluídas 1:6 em tampão de carregamento (40% sacarose e 0,25 µL de azul de bromofenol) e aplicadas nos poços. O gel foi coberto com TAE 1× e submetido à eletroforese a 90 V e 400 W por 60 minutos. Para visualização, o gel foi corado com brometo de etídio por 5 minutos e descorado em água destilada por 10 minutos antes de ser visualizado em fotodocumentador sob luz ultravioleta.

3.7. Purificação das amostras de PCR

As amostras de PCR foram purificadas utilizando o kit PCR Purification Kit (Cellco), conforme as instruções do fabricante. Inicialmente, 250 µL do tampão de ligação à sílica foram adicionados a 50 µL da amostra de DNA e misturados. Uma coluna de sílica foi posicionada em um microtubo de 2 mL, e 100 µL do tampão de ativação foram aplicados, seguidos de centrifugação a 10.000 g por 30 s. A amostra preparada foi então transferida para a coluna e centrifugada novamente nas mesmas condições, descartando-se o sobrenadante. A coluna foi lavada com 700 µL de tampão de lavagem, centrifugada a 10.000 g por 30 s, e submetida a uma segunda centrifugação de 2 minutos para remoção completa do tampão. Para eluição, 40 µL de tampão de eluição foram adicionados à coluna e centrifugados a 10.000 g por 1 minuto, recuperando-se o DNA purificado.

3.8. Digestão enzimática dos produtos de PCR

A digestão enzimática dos produtos de PCR foi realizada com base nos sítios de restrição presentes no vetor pEX18Ap (HOANG *et al.*, 1998). A reação foi preparada com 25 µL do produto de PCR, 5 µL de tampão Tango 1×, 0,5 µL de *Hind*III (10 U/µL) ou 1 µL de *Nde*I (10 U/µL) ou 0,5 µL de *Eco*RI (10 U/µL) e água ultrapura estéril para completar o volume final de 50 µL, sendo as enzimas utilizadas de acordo com os sítios de restrição de cada fragmento e vetor. As reações foram incubadas a 37 °C por 16 h, seguidas de inativação das enzimas por aquecimento a 65 °C por 15 min.

3.9. Ligação dos fragmentos ao vetor pEX18Ap

Após a purificação, os fragmentos de DNA digeridos e o vetor pEX18Ap foram ligados utilizando o kit T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific). A reação de ligação foi composta pelos fragmentos gerados pela digestão, o vetor pEX18Ap, tampão T4 DNA Ligase 1×, T4 DNA Ligase (1 U/μL) e água ultrapura estéril, em volume final de 20 μL. As reações foram incubadas inicialmente a 22 °C por 2 h e em seguida, mantidas a 4 °C overnight. No dia seguinte, a enzima foi inativada por incubação a 70 °C por 5 min.

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

Uma alíquota de 1 μL da reação de ligação entre os produtos de PCR e vetor pEX18Ap foi adicionada a 50 μL de *E. coli* DH5α eletrocompetente. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm e submetida a um pulso elétrico no MicroPulser Electroporator (Bio-Rad). Após a eletroporação, as células foram diluídas em 950 μL de meio LB e incubadas a 37 °C por 1 h sob agitação para recuperação. Posteriormente, as células foram plaqueadas em LB sólido contendo ampicilina (100 μg/mL) e incubadas overnight a 37 °C, sendo a formação de colônias indicativa de transformação bem-sucedida. Entretanto, apesar das múltiplas tentativas realizadas, as colônias obtidas apresentaram, após confirmação por PCR, apenas o perfil genotípico correspondente à linhagem selvagem, não sendo possível a obtenção do mutante nulo por essa abordagem. Em função dessas limitações experimentais, foi estabelecida uma colaboração visando à construção do plasmídeo contendo a deleção do gene *cfa*.

3.11. Construção do vetor de deleção pEX18Gm-Δ*cfa* por colaboração interinstitucional

O plasmídeo utilizado para a obtenção do mutante nulo do gene *PA14_73140* (*cfa*) foi previamente construído pelo pesquisador colaborador Nathan Rodrigues da Silva com os oligos previamente citados na tabela 1, construídos com auxílio da ferramenta NEBuilder Assembly. A construção utilizou a metodologia de Gibson Assembly para montar, no vetor suicida pEX18Gm, um cassete de deleção composto pelas regiões flanqueadoras (aproximadamente 1 kb cada) a montante e a jusante do gene alvo, gerando a construção pEX18Gm*cfa*_del (GIBSON *et al.*, 2009). Este desenho visou promover uma deleção *in-frame* de 1.155 pb, resultando na remoção dos 385 aminoácidos centrais da enzima Cfa. Após a

construção do plasmídeo, as etapas subsequentes de conjugação foram realizadas em nosso laboratório,

3.12. Conjugação e recombinação homóloga

A obtenção do mutante nulo foi buscada por meio de conjugação entre a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* e *E. coli* S17 portadora do plasmídeo pEX18Gm- Δcfa contendo os fragmentos destinados à deleção do gene *cfa*. A conjugação foi realizada em placas de meio LB, utilizando-se uma proporção maior de células de *E. coli* para favorecer a transferência plasmidial. Após o período de incubação, colônias foram selecionadas e analisadas quanto à ocorrência de eventos de recombinação homóloga, incluindo a integração do vetor ao cromossomo bacteriano (primeiro crossover) e a posterior excisão do plasmídeo por recombinação homóloga dupla (crossover duplo), utilizando-se o sistema de contra-seleção mediado pelo gene *sacB* em meio contendo sacarose. A linhagem mutante final Δcfa , denominada DM42 ao longo do trabalho, foi confirmada por PCR conforme descrito a seguir.

3.13. PCR de colônia para confirmação do mutante

Com auxílio de uma ponteira estéril, células de uma colônia isolada foram ressuspensas em 20 μ L de solução de extração (10 mM Tris-HCl, pH 8,0), aquecidas a 100 °C por 5 min para lise celular e centrifugada a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. 1 μ L do DNA extraído foi usado para preparar a reação de PCR (50 μ L) contendo água ultrapura, 0,2 mM de dNTPs, 5% de DMSO, oligonucleotídeos específicos, Taq DNA polimerase caseira e 1,5 mM MgCl₂ e . O programa de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 1 min. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, conforme descrito anteriormente.

3.14. Retirada do cassete de resistência a tetraciclina da linhagem DM43 originando a linhagem DM45

O cassete de resistência à tetraciclina (*tet*) e o módulo de integração (*int*), que estão flanqueados por sítios FRT (Flippase Recognition Target), foram removidos pela ação da recombinase FLP, fornecida pela transformação da linhagem DM43 com o plasmídeo pFLP2 (HOANG *et al.*, 1998). A excisão desses elementos originou a linhagem complementada Δcfa *attB::pcfa Tet^S*, denominada DM45 ao longo do trabalho, com sensibilidade à tetraciclina e um perfil de resistência a antibióticos idêntico ao da linhagem parental, para que não haja influência nos ensaios de sensibilidade, principalmente os relativos a antibióticos.

3.15. Curvas de crescimento em diferentes meios de cultura

As linhagens de *P. aeruginosa* foram cultivadas em diferentes meios, incluindo LB (Lysogenic Broth) conforme Bertani (1952) e meio mínimo M9, conforme Miller (1972), suplementado com distintas fontes de carbono. As culturas foram iniciadas a partir de pré-inóculos crescidos nos respectivos meios, diluídos para a DO_{600nm} de 0,05. As concentrações das fontes de carbono utilizadas em meio mínimo foram citadas previamente na seção “Organismos de estudo e condições de cultivo”. O crescimento foi monitorado em placas de 96 poços utilizando a leitora Biotek Synergy H1, com leituras de absorbância a 600 nm por 36 h, sob agitação de 240 rpm, permitindo a construção de curvas de crescimento detalhadas para cada condição experimental.

3.16. Cultivo bacteriano e preparo da biomassa para análises de ressonância magnética nuclear (RMN)

Para a obtenção de massa celular destinada às análises de RMN, as linhagens selvagens, DM30, DM42 e DM43 foram cultivadas em meio mínimo M9 suplementado com glicose. Culturas de 1 L foram incubadas em frascos Erlenmeyer sob agitação de 250 rpm, a 37 °C, por 36 h. As células foram recuperadas por centrifugação a 7500 rpm, por 15 min, e lavadas três vezes com água ultrapura. A biomassa obtida foi congelada e posteriormente liofilizada para as análises de extração lipídica.

3.17. Extração lipídica para RMN

A metodologia de extração lipídica para análises por RMN foi previamente padronizada com o objetivo de obter espectros com melhor qualidade espectral. Inicialmente, células de *P. aeruginosa* cultivadas em meio LB foram submetidas à extração utilizando diferentes quantidades de biomassa e proporções de solventes. Posteriormente, o meio LB foi substituído por meio M9 suplementado com glicose, condição que resultou em melhora da qualidade espectral e foi adotada nos ensaios subsequentes. Os ensaios foram realizados com 50 mg de biomassa, quantidade determinada adequada para a obtenção de espectros com boa resolução. Quanto aos solventes, foram avaliadas diferentes proporções de D₂O, clorofórmio (CHCl₃) e metanol (CD₃OD), sendo definida como condição ideal a proporção de 2:1 (v/v) de metanol (800 µL) em relação ao clorofórmio (400 µL), a qual foi utilizada em todos os experimentos apresentados nesta dissertação.

3.18. Caracterização da resposta bacteriana à geração fotoinduzida de ROS

Para avaliar a sensibilidade das linhagens à geração de espécies reativas induzidas por luz, foi realizado ensaio fotoquímico utilizando o fotossensibilizador (FS) Azul de Metileno (AM) e ou FS Rosa Bengala (RB). Todos os ensaios foram realizados em meio LB.

O AM foi adicionado em concentrações crescentes variando de 1,25 a 20 μM em placas de 96 poços. O RB foi adicionado em concentrações crescentes variando de 5 a 40 μM inicialmente em placas de 96 poços e posteriormente em frascos erlenmayer de 125 ml, com 20% de preenchimento do frasco pela cultura celular. Para cada condição experimental, culturas foram avaliadas na presença e ausência de luz branca, permitindo diferenciar o efeito fotoinduzido do composto em relação ao efeito do sensibilizador isolado. Como controle negativo, culturas foram expostas apenas à luz branca sem a adição de RB, e como controle de referência, culturas sem luz e sem sensibilizador também foram incluídas. Após a adição do sensibilizador, a turbidez das culturas foi monitorada em 600 nm ao longo do tempo para avaliar o efeito sobre o crescimento bacteriano. A atividade fototóxica foi quantificada comparando-se a DO_{600} das culturas tratadas com a dos controles não tratados, permitindo a determinação da redução relativa no crescimento causada pela combinação de rose bengal e luz branca. Os ensaios foram realizados em shaker orbital Innova® S44i, equipamento equipado com um sistema de iluminação LED integrado, fornecendo uma intensidade de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 150 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ diretamente na superfície das amostras.

3.19. Caracterização do mecanismo fotodinâmico envolvido na resposta de *P. aeruginosa* ao Rosa bengala

Para caracterização do efeito da azida sódica, foi realizado um ensaio preliminar utilizando a linhagem selvagem PA14, tratada com Azida Sódica (AS) nas concentrações de 1 mM, 0,5 mM e 0,25 mM, na ausência ou presença de rosa bengala a 10 μM , sob exposição à luz branca. Com base nesses resultados, a concentração de 0,2 mM de AS foi selecionada e empregada em ensaios subsequentes em frascos Erlenmeyer com as três linhagens bacterianas avaliadas, mantidas sob exposição à luz branca. A adição de AS teve como objetivo avaliar o tipo de mecanismo fotodinâmico envolvido, uma vez que esse composto atua como sequestrador de $^1\text{O}_2$, permitindo diferenciar reações do tipo II (mediadas por $^1\text{O}_2$) das reações do tipo I (mediadas por espécies radicalares).

3.20. Avaliação da sensibilidade ao Paraquat

A sensibilidade das linhagens PA14 selvagem, DM42 e DM43 ao estresse oxidativo induzido por paraquat foi inicialmente avaliada por curvas de crescimento realizadas em placas de 96 poços. As culturas foram expostas a concentrações crescentes de paraquat, variando de 1,5 mM a 10 mM, e o crescimento bacteriano foi monitorado por medidas de absorvância a 600 nm. Com base nesses ensaios preliminares, a concentração de 10 mM foi selecionada por apresentar diferenças no crescimento entre as linhagens. Curvas de crescimento adicionais foram conduzidas em frascos Erlenmeyer, com incubação por 8 h a 37 °C sob agitação de 250 rpm, permitindo a comparação do crescimento das linhagens em condições de maior volume e a validação dos resultados observados em placa.

3.21. Ensaio de sensibilidade a peróxidos por difusão em disco

A susceptibilidade das linhagens a diferentes peróxidos foi avaliada por meio do ensaio de difusão em disco. Para isso, culturas bacterianas em fase exponencial (3h) e estacionária (24h) foram cultivadas em meio LB líquido e, em seguida, 200 µL de cada suspensão foram semeados por espalhamento em placas de LB sólido. Após a secagem da superfície, discos de papel estéril foram impregnados com terc-butil hidroperóxido (t-BOOH, 0,2 M), cumeno hidroperóxido (CuOOH, 0,3 M) ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 1 M), sendo três discos do mesmo agente aplicados por placa. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h, e a sensibilidade bacteriana foi determinada pela formação de halos de inibição em torno dos discos. A linhagem Δohr foi utilizada como controle sensível para o t-BOOH e CuOOH enquanto a linhagem $\Delta katA$ foi utilizada como controle sensível para o H₂O₂.

3.22. Ensaio de sensibilidade a antibióticos por difusão em disco

A susceptibilidade das linhagens à ação de antibióticos que atuam na membrana celular foi avaliada pelo método de difusão em disco, utilizando colistina (polimixina E) e polimixina B. As culturas foram preparadas conforme descrito para o ensaio com peróxidos e aplicadas nas fases exponencial e estacionária. Discos industriais estéreis (6 mm) CECON, para a polimixina B (300 U.I), DME, para a colistina (COL 10) foram depositados sobre as placas contendo meio LB sólido. Após incubação a 37 °C por 16 h, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição, expressos em milímetros.

3.23. Ensaio de atividade de β -galactosidase

Para avaliar a atividade transcricional do gene *cfa*, uma região de aproximadamente 500 pb a montante do gene foi amplificada e clonada como uma fusão transcricional com o gene repórter *lacZ*. O fragmento do promotor foi inserido nos sítios de restrição *EcoRI* e *HindIII* do vetor integrativo mini-CTX-*lacZ* (BECHER; SCHWEIZER, 2000). A integração no sítio *attB* do cromossomo foi realizada tanto na linhagem selvagem de *P. aeruginosa* PA14 quanto na linhagem mutante *lasR::MAR2xT7*, de acordo com o método de transformação e integração sítio-específica descrito por Hoang *et al.* (2000). As linhagens resultantes foram denominadas PA14 wt *attB::pcfa-lacZ* e *lasR::MAR2xT7 attB::pcfa-lacZ*. As linhagens obtidas foram cultivadas em meio LB a 37 °C sob agitação, e alíquotas foram coletadas em diferentes tempos de crescimento para monitoramento da densidade celular e atividade de β -galactosidase. Para o ensaio, 500 μ L da cultura foram misturados com 500 μ L de tampão Z (40 mM Na₂HPO₄, 60 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 37 mM β -mercaptoetanol), seguido da adição de 25 μ L de SDS 0,1% e 50 μ L de clorofórmio para permeabilização celular. As amostras foram homogeneizadas por vortex e centrifugadas por 1 minuto a 3000 rpm. Em seguida, 200 μ L de ONPG (4 mg/mL) foram adicionados, as amostras foram misturadas e incubadas até o aparecimento de coloração amarela. A reação foi interrompida com 500 μ L de Na₂CO₃ 1 M e as amostras centrifugadas a 14.000 rpm por 2 min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 420 nm, e a atividade enzimática expressa em unidades Miller conforme a metodologia de Miller *et al.* (1972) seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{atividade} = \frac{\text{DO}_{420}}{\text{DO}_{600} \times \text{tempo (m)} \times \text{volume de cultura (mL)}} \times 1000$$

3.24. Avaliação do impacto do estresse osmótico causado por sacarose

O impacto do estresse osmótico sobre o crescimento das linhagens selvagem PA14, DM42 e DM43 foi avaliado por curvas de crescimento em placas de 96 poços. As culturas foram incubadas em meio suplementado com sacarose a 0,25 M e 0,5 M, a 37 °C, durante 16 h, com monitoramento do crescimento por absorbância a 600 nm.

3.25. Avaliação do impacto de diferentes temperaturas e pH no crescimento das linhagens

As curvas de crescimento das linhagens selvagem e DM30 foram realizadas em meio LB sob diferentes condições de temperatura e pH. Para avaliação do efeito da temperatura, as culturas foram incubadas a 25 °C e 42 °C. Para análise do efeito do pH, o meio LB foi ajustado para pH 6,0 ou 5,0 antes da inoculação, sem tamponamento. Os ensaios foram conduzidos em placas de 96 poços, com incubação por 16 horas com monitoramento do crescimento por absorbância a 600 nm.

3.26. Spot assay para avaliação de sensibilidade ao t-BOOH

Para avaliar a sensibilidade das linhagens a agentes oxidantes, culturas pré-inoculadas em LB foram diluídas para $DO_{600nm} = 0,1$ e crescidas em meio mínimo M9 suplementado com glicose por 24h. As células foram então diluídas para $DO_{600} = 0,5$ em M9+glicose e tratadas com o sensibilizador por 30 minutos em termomixer a 37 °C e 500 rpm. Foi utilizado t-BOOH nas concentrações finais de 0,5 mM e 1 mM e a linhagem Δohr foi utilizada como controle sensível. Após o tratamento, as células foram centrifugadas a 14.000 rpm por 2 minutos, lavadas com M9+glicose e preparadas para semeadura. As culturas foram então seriadamente diluídas até 10^{-6} , e 10 μ L de cada diluição foram aplicados em pontos marcados em placas de LB agar, permitindo avaliação da sobrevivência celular após o tratamento com os oxidantes.

3.27. Ensaio de virulência em *Galleria mellonella*

A virulência das linhagens PA14 selvagem, DM30 e D12 foi avaliada em larvas do último instar de *G. mellonella*. A linhagem D12 apresenta deleção no gene *kerV*, resultando em um fenótipo de virulência reduzida em diferentes modelos de infecção por invertebrados (APIDIANAKIS *et al*, 2005), sendo assim foi usada como controle experimental. Larvas saudáveis, com peso médio de 280–320 mg, foram mantidas à temperatura ambiente até o uso. Foram selecionadas larvas no último instar, com massa corporal variando entre 250 e 300 mg, garantindo uniformidade nos experimentos e consistência nos resultados de mortalidade. Para preparação do inóculo, culturas bacterianas foram cultivadas em LB até atingirem $DO_{600} = 3$, centrifugadas, lavadas duas vezes em $MgSO_4$ e ressuspensas em solução de $MgSO_4$ 10 mM para $DO_{600} = 1$. A densidade celular foi ajustada através de diluições seriadas até concentrações de 10^{-6} e 10^{-5} , ambas as concentrações foram injetadas nas larvas selecionadas para correlacionar a concentração de células com a dose letal 50% (DL50).

Cada larva recebeu 10 µL do inóculo por injeção no hemocélio, administrada no último proleg inferior direito, utilizando seringas A inoculação foi realizada utilizando seringas de insulina (modelo BD Ultra-Fine 100 UI) Agulha 8 x 0,3 mm de calibre de 30G. Grupos controle receberam apenas solução de MgSO₄ 10 mM. Para cada linhagem, 15 larvas foram utilizadas por réplica biológica, sendo realizados no total 4 ensaios em dois dias experimentais independentes. Após a inoculação, as larvas foram incubadas em placas de Petri limpas, em escuridão, à temperatura de 37 °C. A mortalidade foi registrada durante as primeiras 48 h de infecção, considerando-se mortes a ausência de movimento após estímulo tátil e melanização.

3.28. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.2. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão, conforme indicado nas legendas das figuras. Os testes estatísticos foram selecionados de acordo com o delineamento experimental e a natureza dos dados. Comparações entre múltiplos grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida de testes pós-hoc apropriados quando aplicável. Diferenças estatísticas realizadas nos ensaios de difusão em disco foram determinadas por T de student. As curvas de sobrevivência foram construídas pelo método de Kaplan–Meier e comparadas utilizando o teste de log-rank (Mantel–Cox). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.29. Ferramentas de apoio à escrita científica

Durante a elaboração deste trabalho, ferramentas de inteligência artificial foram utilizadas de forma pontual como apoio ao processo de organização de ideias, estruturação do texto e aprimoramento da clareza de trechos específicos. Ressalta-se que todo o conteúdo científico, a análise crítica e o referencial teórico apresentados são de autoria e responsabilidade dos autores, não tendo essas ferramentas sido utilizadas como fonte de produção intelectual ou autoria do trabalho.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados das análises pela busca de homólogos de Cfa e sobreposição das estruturas preditas.

Antes do desenvolvimento dos ensaios experimentais, foram realizadas análises bioinformáticas com o objetivo de investigar a possível presença e conservação funcional de uma ciclopropano sintase de ácidos graxos em *P. aeruginosa*. A ciclopropanação de ácidos

graxos de membrana é descrita em diferentes grupos bacterianos e tem sido associada à adaptação a condições de estresse e a alterações fisiológicas relevantes. No entanto, até o início deste trabalho, não havia estudos experimentais que caracterizassem diretamente essa enzima em *P. aeruginosa*.

Análises comparativas envolvendo espécies do gênero *Pseudomonas* indicaram que *P. putida* possui duas ciclopropano sintases anotadas, sendo a isoforma CfaB apontada como funcionalmente mais relevante (PINI *et al.*, 2009). A partir dessa observação, foram realizadas buscas em bancos de dados genômicos, incluindo o NCBI e o *Pseudomonas Genome Database*, que permitiram a identificação, no genoma da linhagem PA14, do gene *PA14_73140*, anotado como proteína hipotética e apresentando similaridade com ciclopropano sintases descritas em outras bactérias. Esse gene foi, portanto, considerado um candidato putativo a codificar a ciclopropano sintase de ácidos graxos em *P. aeruginosa* PA14.

<i>cfaB_PP_5365</i>	1	MVLLRGNILQMNYSDPVTFEILGVVANYGQEGCFMLAQLPPALQSLHLFP	49
<i>cfa_PA14_73140</i>	1	-----MI AQLPSELLSLQLP	15
<i>cfa_6BQC Escherichia</i>	1	-----NGSSSCEEVSVPPDDNW-----YRIANELLS	26
<i>cfaB_PP_5365</i>	50	LRLKLWDGNHFDLGPSPQVTILVKEPQLISQLTHPSMDQLGTA FVEG	96
<i>cfa_PA14_73140</i>	16	LRIRIGDAQAFDLGPDQVMTVIRDPSLLEITHPSLDALGKAYVEK	62
<i>cfa_6BQC Escherichia</i>	27	---RAGIA----INGSAFADIRVKNPDDFFKRVLQEGSLGLGESYMDGWW	88
<i>cfaB_PP_5365</i>	97	---KLELEGDIGEARVCDLSEALLADEDETPPRVS HDKTDAKAI	141
<i>cfa_PA14_73140</i>	63	---RLDIEGPIISQVIGIGDALSEALGEPDGGAPPVRESHDKDTDAEAI	107
<i>cfa_6BQC Escherichia</i>	69	ECDRLDMFFSKVLRAGLENQLPHHFKDTRLIAGARLFNLQSKKRAWIVG	117
<i>cfaB_PP_5365</i>	142	SYHYDVSNAFYQLWLDQDMAYSCAYFREPDNTLDQAQQDKFDHLCKLR	190
<i>cfa_PA14_73140</i>	108	HYHYDLSNDFYQLWLDPEMVYSCAYFETGKEDLATAQLAKLRHLCKLR	156
<i>cfa_6BQC Escherichia</i>	118	KEHYDLGNDLFSRMLDPFMQYSCAYWKDADN-LESAQQAKLKMICEKLQ	165
<i>cfaB_PP_5365</i>	191	LDAGDYLLDVGCGWGLARFAAREYGAKEVFGITLSKEQLKGRKRVQAE	239
<i>cfa_PA14_73140</i>	157	LQPGKLLDVGCGWGLARLAAREFGVEVTGITLSKEQLALGRKRVKAE	205
<i>cfa_6BQC Escherichia</i>	166	LKPGMRVLDIGCGWGLAHYMASNYDVSVVGVTISAEQQKMAQER--CE	212
<i>cfaB_PP_5365</i>	240	GLADKVDLQILDYRDLPDGRFDKVVSVGMFEHVGHANLALYCKLFGA	288
<i>cfa_PA14_73140</i>	206	GLEDRVTLKLLDYRDLPRDGRFDKVVSVGMFEHVGHANLGLYFQQLYDA	254
<i>cfa_6BQC Escherichia</i>	213	GLD--VTILLQDYRDL--NDQFDRIVSVGMFEHVGPKNYDTYFAVVDRN	257
<i>cfaB_PP_5365</i>	289	VREGGLVMNHGITAKHVDGRPVGRGAGEFIDRYVFPHGELPHLSMISAS	337
<i>cfa_PA14_73140</i>	255	VRPGLVMNHGITSRYPDGRPVGKGAGDFIDRYVFPHGELPHLSLAVAR	303
<i>cfa_6BQC Escherichia</i>	258	LKPEGIFLLHTIGSKKTD-----LNVDPWINKYIFPNGLPSVRQI-AQ	300
<i>cfaB_PP_5365</i>	338	ICEAGLEVVDVESLRLHYAKTLHHWSENLENQLHKAAALVPEKTLRIWR	386
<i>cfa_PA14_73140</i>	304	MSEAGLEVVDVESLRLHYARTLDFWSANLEARLKEAARLVPEETLRIWR	352
<i>cfa_6BQC Escherichia</i>	301	SSEPHFVME DWHNFGADYDTLMAWYERFLAAWPEIADNYSERFKRMFT	349
<i>cfaB_PP_5365</i>	387	LYLAGCAYAFQKGWINLHQILAVKPYADGHHDLPTWREDLYR	428
<i>cfa_PA14_73140</i>	353	LYLAGCAYGFKRGWINLHQILAIRPHEDGSHELPWSRRDLYA	394
<i>cfa_6BQC Escherichia</i>	350	YLNACAGAFRARDIQLWQVVF SRGVENGLR-----VAR	383

Figura 6 — Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos.

Em disposição o alinhamento de *cfaB* de *P. putida*, *cfa* de *P. aeruginosa* PA14 e *cfa* de *E. coli*, em destaque de acordo com seu percentual de identidade.

A caracterização inicial desse gene foi conduzida por meio de análises *in silico* baseadas em homologia de seqüência e estrutura. O alinhamento das seqüências de aminoácidos

realizado através dos programas MAFPT e Jalview revelou conservação entre a proteína codificada por PA14_73140 e ciclopropano sintases previamente caracterizadas em *Pseudomonas spp.* e em *E. coli*, sugerindo a preservação de regiões estruturalmente e funcionalmente relevantes. Adicionalmente, a comparação estrutural entre a Cfa de *E. coli* (PDB: 6BQC), e o modelo predito para a proteína de *P. aeruginosa* PA14 por meio da ferramenta AlphaFold evidenciou uma arquitetura tridimensional conservada, com organização semelhante dos domínios N-terminal e C-terminal.

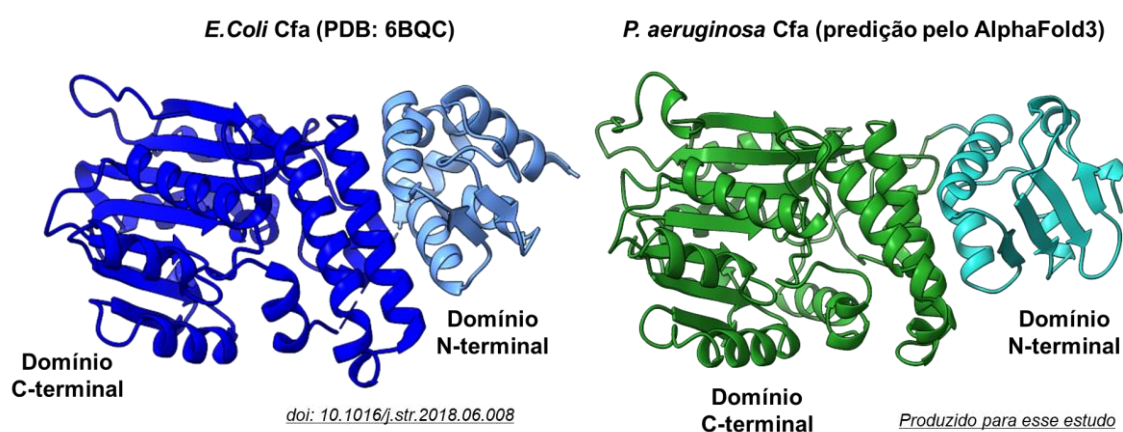


Figura 7 — Predição de estruturas de *E. coli* e *P. aeruginosa* através do AlphaFold3.

A análise comparativa das estruturas das proteínas Cfa de *E. coli* e *P. aeruginosa* revela uma notável similaridade, sugerindo que ambas possam compartilhar funções biológicas semelhantes.

Em conjunto, esses resultados obtidos previamente à caracterização experimental, indicaram que *P. aeruginosa* PA14 apresentava um gene candidato a ciclopropano sintase de ácidos graxos, estruturalmente conservado em relação a enzimas já descritas. Essas evidências forneceram a base teórica para a construção das linhagens mutantes e para a investigação experimental do papel do gene *cfa* na fisiologia celular e na resposta a diferentes condições de estresse.

4.2. Análise por eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das linhagens de *P. aeruginosa* utilizadas neste estudo.

A confirmação genotípica das linhagens obtidas durante a construção do mutante nulo para o gene *cfa* em *P. aeruginosa* PA14 foi realizada por PCR utilizando oligonucleotídeos que flanqueiam o locus cromossômico original do gene.

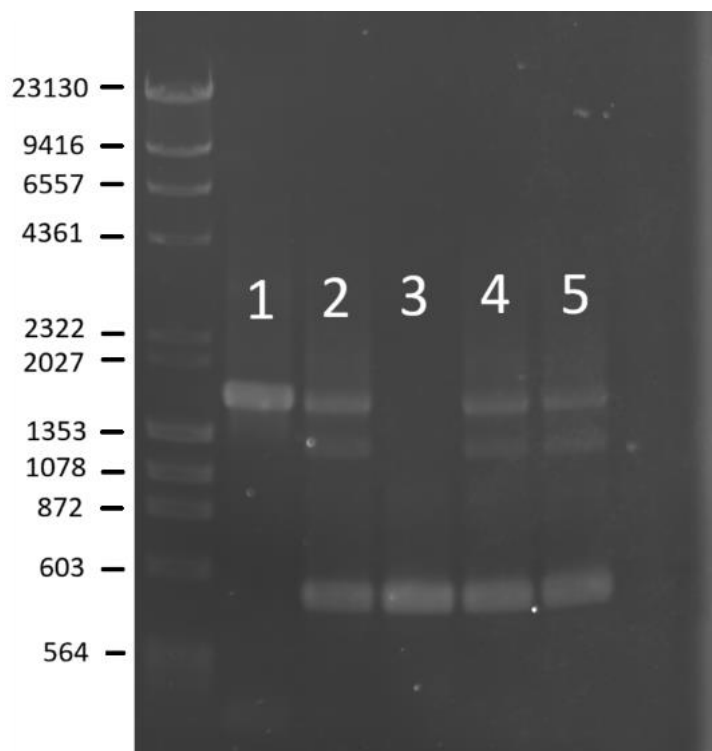


Figura 8 — Análise por PCR da região cromossômica do gene *cfa* em *P. aeruginosa* PA14.

A amplificação foi realizada utilizando oligonucleotídeos flanqueando o locus original do gene *cfa*. Produtos da PCR que correspondem a: 1) PA14 selvagem, apresentando fragmento correspondente ao gene íntegro de 1612pb de; 2) transconjugante obtido após a primeira etapa recombinação, exibindo produtos compatíveis com os alelos selvagem e mutante; 3) mutante nulo DM42, apresentando fragmento menor decorrente da deleção interna do gene; 4) linhagem complementada DM43; 5) linhagem complementada DM45, ambas apresentando o mesmo padrão observado para o mutante, uma vez que a complementação do gene *cfa* foi realizada por integração no sítio *attB* via sistema mini-CTX.

A linhagem selvagem PA14 apresentou um fragmento compatível com o tamanho esperado para o gene *cfa* íntegro, com 1612 pb, enquanto a linhagem referente à primeira recombinação exibiu dois produtos de amplificação, correspondentes aos alelos selvagem e deletado, caracterizando um evento de recombinação simples. A linhagem mutante DM42 apresentou exclusivamente um fragmento de menor tamanho, consistente com a deleção interna de aproximadamente 1.125 pb do gene *cfa*, confirmando a ocorrência de recombinação homóloga dupla e a obtenção de um mutante nulo limpo. As linhagens complementadas DM43 e DM45 exibiram o mesmo padrão de amplificação observado para o mutante DM42, uma vez que a complementação do gene *cfa* foi realizada por integração site-specific no sítio *attB* do cromossomo por meio do sistema mini-CTX, não revertendo a deleção presente no locus cromossômico original. Esses resultados confirmam a correta construção do mutante nulo e das linhagens complementadas utilizadas neste estudo.

4.3. Curvas de crescimento

O crescimento das linhagens *P. aeruginosa* selvagem (WT), DM42 e DM43 foi avaliado em meio rico (LB) e em meios mínimos (M9) suplementados com diferentes fontes de carbono, a fim de verificar se a ausência do gene *cfb* afeta o crescimento microbiológico basal.

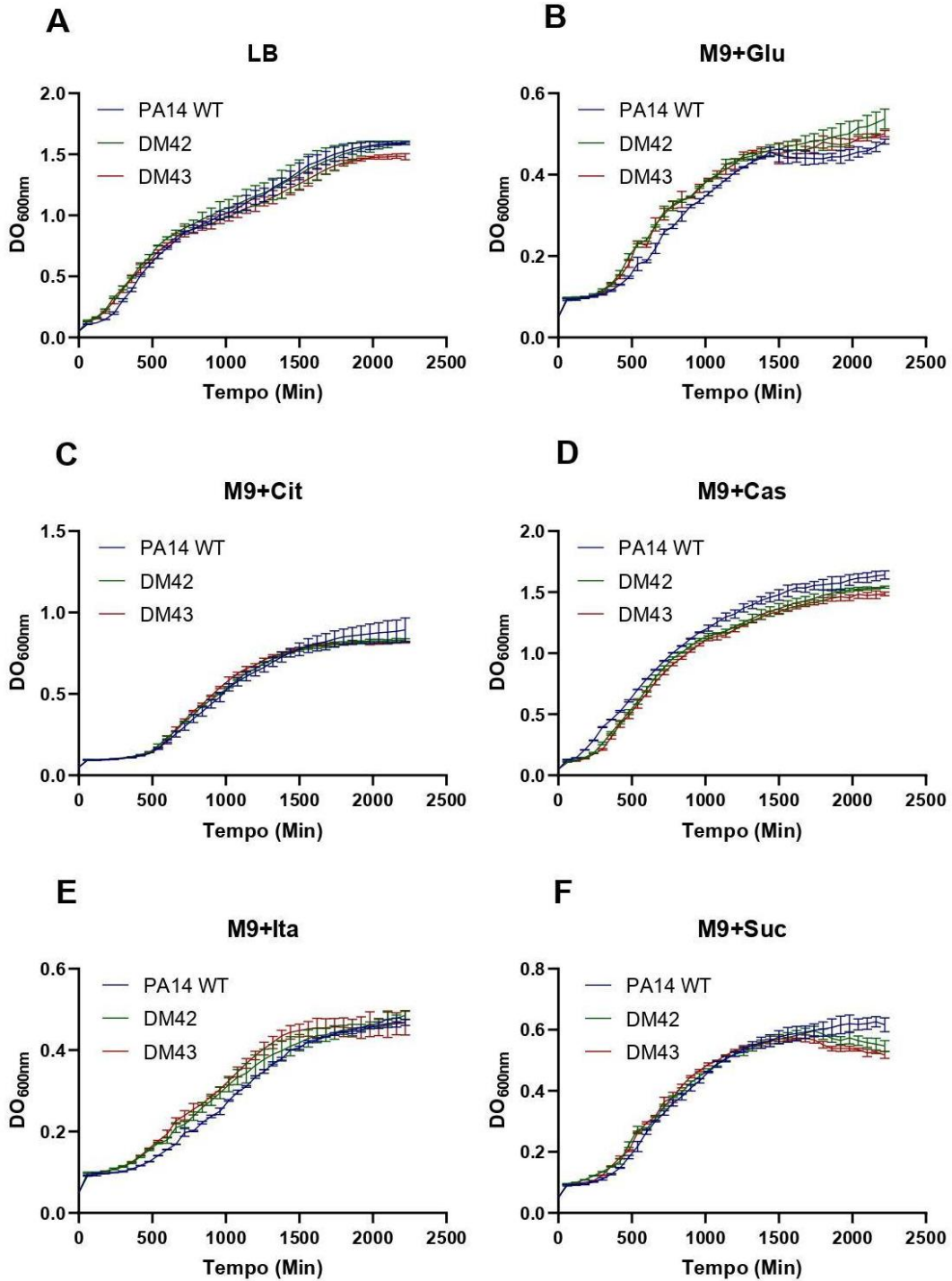


Figura 9 — Curvas de crescimento das linhagens *P. aeruginosa* PA14 WT, DM42 e DM43 em diferentes meios de cultura.

As linhagens foram cultivadas em meio rico LB em A, e em meio mínimo M9 suplementado com glicose em B, citrato em C, casaminoácidos em D, itaconato em E ou succinato em F. O crescimento bacteriano em placas de 96 poços foi monitorado por medidas de absorbância a 600 nm ao longo do tempo. Os dados representam a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata.

Em meio LB (Figura 9A), as três linhagens apresentaram curvas de crescimento semelhantes ao longo do tempo, com fases exponencial e estacionária bem definidas e valores finais de DO₆₀₀ comparáveis entre WT, DM42 e DM43. Não foram observadas diferenças relevantes na taxa de crescimento ou na densidade celular máxima atingida.

Resultados semelhantes foram observados nos meios mínimos M9 suplementados com glicose (Figura 9B), citrato (Figura 9C), casaminoácidos (Figura 9D), itaconato (Figura 9E) e succinato (Figura 9F). Em todas as condições avaliadas, as curvas de crescimento das três linhagens se sobrepuseram amplamente, apresentando perfis cinéticos semelhantes e valores finais de DO₆₀₀ comparáveis. Pequenas variações pontuais foram observadas entre as linhagens em alguns tempos específicos, porém sem impacto consistente na cinética geral de crescimento.

De forma geral, os dados indicam que a deleção do gene *cfa* não compromete o crescimento bacteriano da linhagem em meio rico nem em meios mínimos contendo diferentes fontes de carbono. Além disso, a linhagem complementada DM43 apresentou perfil de crescimento semelhante ao da linhagem selvagem em todas as condições testadas.

4.4. Avaliação de ausência de ciclopropanação por ensaios de RMN

As análises por RMN foram empregadas com o objetivo principal de avaliar a presença ou ausência de ciclopropanação de ácidos graxos nas linhagens estudadas. Inicialmente os resultados foram obtidos com a linhagem mutante DM30 em comparação com a linhagem selvagem (Figura 10). Os espectros de RMN dos extratos brutos do material liofilizado revelaram deslocamentos químicos típicos dos ácidos graxos que compõem a membrana celular de *P. aeruginosa*. O deslocamento químico correspondente aos prótons olefínicos de ácidos graxos insaturados, em $\delta \approx 5,33$ ppm, mostrou-se mais pronunciado na linhagem mutante DM30 quando comparado à linhagem selvagem. Ao outro lado, a linhagem selvagem mostrou os sinais típicos de ciclopropanos.

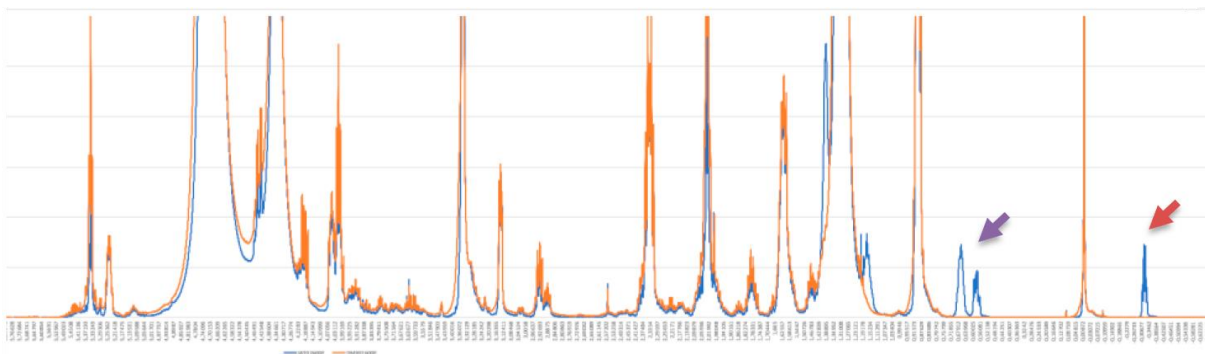


Figura 10 — Espectros de RMN de ^1H obtidos a partir de extratos lipídicos das linhagens *P. aeruginosa* PA14 selvagem (WT) e da mutante DM30.

O espectro azul se refere à linhagem selvagem e o espectro laranja se refere a linhagem DM30. A sobreposição dos espectros completos de RMN de ^1H das linhagens WT e DM30, evidencia diferenças no perfil espectral entre as duas condições. Seta roxa indica sinais característicos de prótons do anel ciclopropano em $\delta \approx 0,55$ e $0,64$ ppm (configuração *trans*) e seta vermelha em em $\delta \approx -0,32$ ppm

A análise diferencial por RMN de ^1H demonstrou que o mutante DM30 não apresenta os sinais característicos de prótons do anel ciclopropano observados na linhagem parental isogênica do tipo selvagem (Figura 11). Esses sinais, detectados no WT em $\delta \approx -0,32$ ppm (configuração *cis*) e em $\delta \approx 0,55$ e $0,64$ ppm (configuração *trans*), estão ausentes no espectro da linhagem mutante.

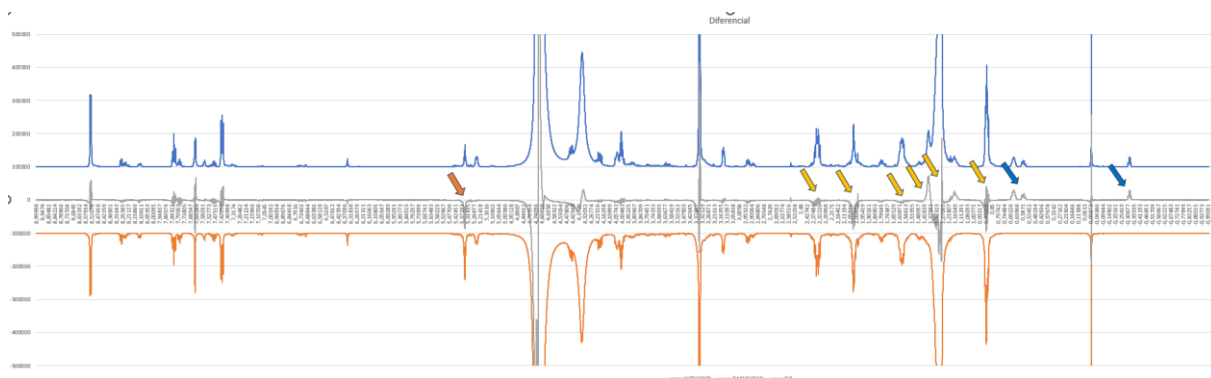


Figura 11 — Espectro diferencial de RMN de ^1H entre as linhagens WT e DM30 em cinza, no qual são observados sinais característicos que permitem a distinção entre as linhagens.

O espectro azul se refere à linhagem selvagem, o espectro laranja se refere à DM30 e o espectro diferencial entre as linhagens em cinza. As setas azuis indicam os sinais atribuídos aos prótons do anel ciclopropano, em $\delta \approx -0,32$ ppm (configuração *cis*) e em $\delta \approx 0,55$ e $0,64$ ppm (configuração *trans*), detectados exclusivamente na linhagem selvagem. As setas amarelas destacam os sinais correspondentes aos prótons metilênicos das cadeias alifáticas ($\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$), enquanto a seta laranja indica o sinal referente aos prótons olefínicos (C_nH_{2n}), em $\delta \approx 5,33$ ppm, o qual se apresenta mais intenso no espectro da linhagem mutante.

Após obtermos a linhagem DM42 e DM43 também foi realizada sua extração lipídica e posterior preparação para análises espectroscópicas (Figura 12). Os dados obtidos corroboram

com as informações previamente evidenciadas, com a linhagem DM42 apresentando ausência de sinal em $\delta \approx -0,32$ ppm (configuração cis) e em $\delta \approx 0,55$ e $0,64$ ppm (configuração trans). A linhagem complementada DM43 exibe sinal característico da linhagem selvagem, retornando a apresentar esses sinais previamente citados.

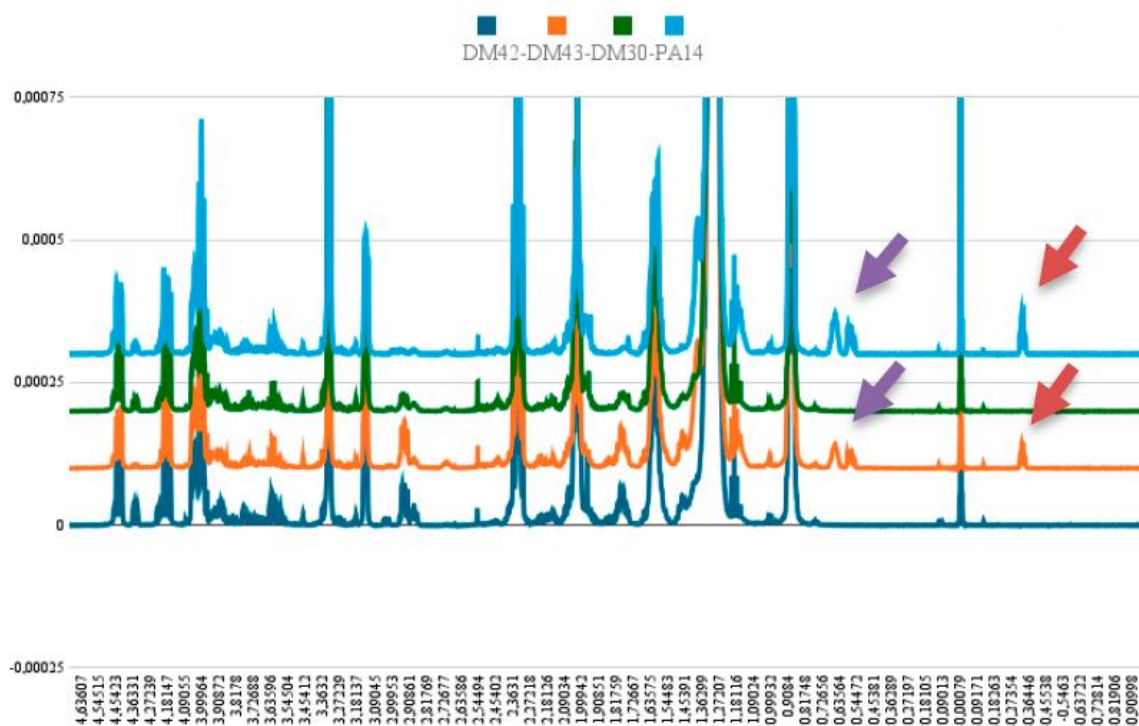


Figura 12 — Espectros de RMN de ^1H obtidos a partir de extratos lipídicos das linhagens *P. aeruginosa* PA14 selvagem, DM30, DM42 e DM43.

O espectro se refere à linhagem selvagem, o verde à DM30, o laranja à DM42 e o azul petróleo à linhagem DM42. Os espectros corroboram com os perfis observados em análises anteriores e reforçam a ausência de sinais característicos de ciclopropanação nas linhagens mutantes, tanto DM30 quanto DM42. Seta roxa indica sinais característicos de prótons do anel ciclopropano em $\delta \approx 0,55$ e $0,64$ ppm (configuração trans) e seta vermelha em em $\delta \approx -0,32$ ppm

Em conjunto, esses dados corroboram o papel do produto do gene *cfa* na ciclopropanação de ácidos graxos insaturados na membrana de *P. aeruginosa* e que as linhagens mutantes DM30 e DM42 apresentam inativação funcional do gene *cfa*.

4.5. Avaliação de atividade transcricional do promotor de *cfa* através de sistema repórter *lacZ*

Análises previamente descritas na literatura forneceram a base conceitual para a investigação experimental do gene *cfa* em *P. aeruginosa*. Estudos de anotação funcional e de

busca por domínios conservados indicam que *cfa* codifica uma metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina, envolvida na ciclopropanação de ácidos graxos insaturados da membrana. Análises bioinformáticas da região promotora de *cfa*, descritas para linhagens de referência de *P. aeruginosa*, também apontam a presença de sequências compatíveis com sítios de ligação do regulador OxyR, sugerindo uma possível relação entre a expressão desse gene e respostas ao estresse oxidativo (EZEDURU *et al.*, 2024). Com base nessas informações, foi empregada uma fusão do promotor de *cfa* ao gene repórter *lacZ*, permitindo o monitoramento da atividade transcricional de *cfa* ao longo do crescimento bacteriano por meio do ensaio de β -galactosidase.

A atividade transcricional do promotor do gene *cfa* (*pcfa*) foi avaliada por meio de ensaio de β -galactosidase utilizando sua fusão com o gene repórter *lacZ* (*pcfa-lacZ*) e integrada ao cromossomo das linhagens selvagem e *lasR::MAR2T7*. Esse sistema repórter permite inferir indiretamente a atividade do promotor de *cfa* a partir da produção da enzima β -galactosidase.

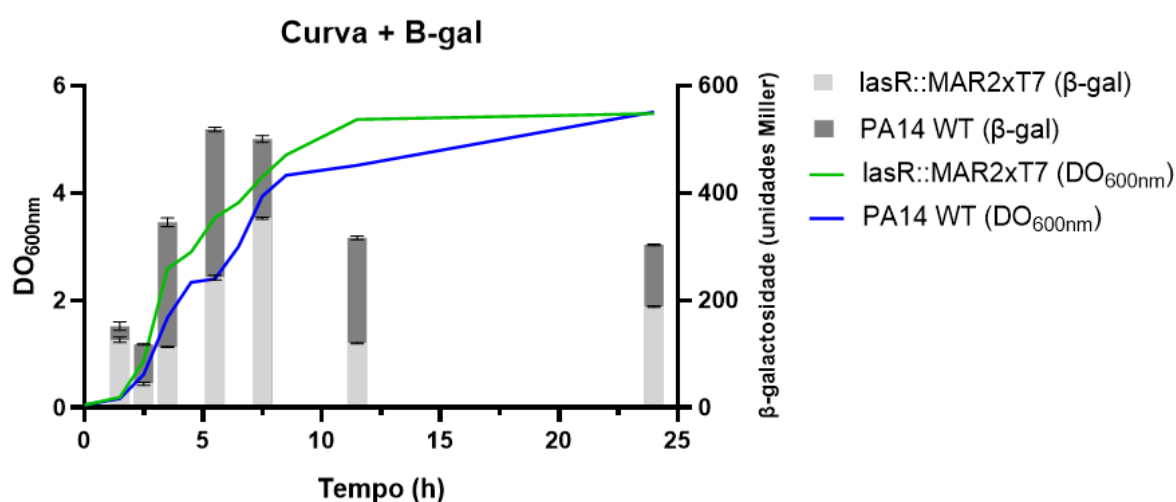


Figura 13 — Atividade do promotor do gene *cfa* avaliada por ensaio de β -galactosidase ao longo do crescimento de *P. aeruginosa* PA14.

As curvas representam o crescimento bacteriano (DO_{600 nm}) das linhagens PA14 selvagem (azul) e $\Delta lasR$ (verde), enquanto as barras indicam a atividade de β -galactosidase (unidades Miller) decorrente da fusão *pcfa-lacZ* integrada ao cromossomo. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Ao longo do crescimento bacteriano, observou-se um aumento progressivo da atividade de β -galactosidase em ambas as linhagens, com maior indução associada às fases mais tardias do crescimento, próximas à transição para a fase estacionária. Esse padrão sugere que a atividade do promotor de *cfa* é modulada de forma dependente do estado fisiológico da célula.

No entanto, apesar desse comportamento semelhante ao longo do tempo, a linhagem selvagem apresentou níveis consistentemente mais elevados de atividade de β -galactosidase quando comparada à linhagem $\Delta lasR$ em todos os pontos analisados. Mesmo nos momentos de maior indução, a atividade do promotor *pcfA* na linhagem $\Delta lasR$ permaneceu inferior à observada na linhagem selvagem, indicando que a ausência do regulador LasR resulta em redução da atividade transcricional do gene *cfa*. Em conjunto, esses resultados indicam que LasR exerce um papel positivo na regulação da expressão de *cfa*, contribuindo para a plena ativação de seu promotor, especialmente em estágios mais avançados do crescimento bacteriano.

4.6. Avaliação de sensibilidade a peróxidos por difusão em disco

Inicialmente a susceptibilidade das linhagens de *P. aeruginosa* aos diferentes peróxidos foi avaliada por meio do ensaio de difusão em disco, utilizando culturas obtidas nas fases exponencial (3 h) (Figura 14) e estacionária (24 h) de crescimento (Figura 15). As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C, permitindo a formação dos halos de inibição.

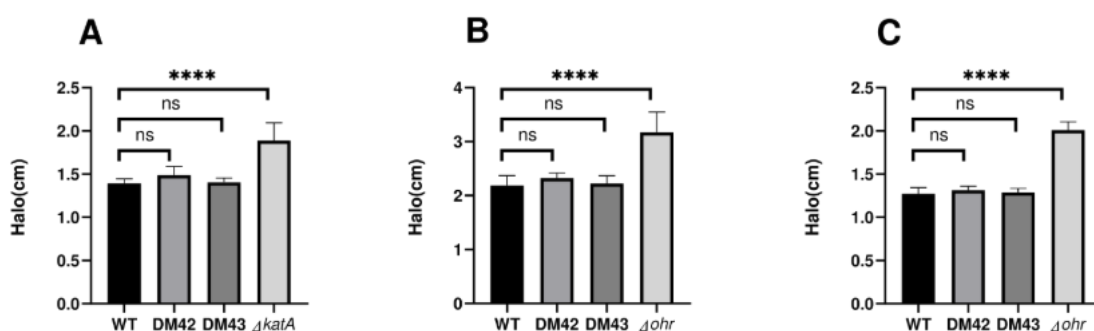


Figura 14 — Sensibilidade ao estresse oxidativo em *P. aeruginosa* na fase exponencial de crescimento.

O diâmetro dos halos de inibição em cm foi determinado para as linhagens selvagem, DM42, DM43 e linhagens controle sensíveis. Em A, exposição ao H₂O₂, [1 M], com a linhagem $\Delta katA$ como controle sensível ao peróxido inorgânico. Em B, exposição ao t-BOOH, [0,2 M]. Em C, exposição ao CuOOH, [0,3 M]. Para os peróxidos orgânicos, a linhagem Δohr foi utilizada como controle sensível. Os dados representam média \pm desvio padrão de três ensaios independentes com três discos para cada linhagem em cada ensaio.. Diferenças estatísticas foram determinadas por T de student, sendo **** $p < 0,0001$ e *ns*, indicando ausência de diferença significativa.

Nos ensaios realizados após 3 h de crescimento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no diâmetro dos halos de inibição entre as linhagens selvagem (WT), DM42 e DM43, independentemente do agente oxidante avaliado (Fig. 14). Esses resultados indicam que, durante a fase exponencial de crescimento, a ausência de

ciclopropanação não altera de forma detectável a sensibilidade das células ao estresse oxidativo induzido.

Em contraste, as linhagens controle sensíveis apresentaram aumento significativo nos halos de inibição. Na presença de peróxido de hidrogênio, a linhagem $\Delta katA$ exibiu halos significativamente maiores quando comparada às demais linhagens ($p < 0,0001$), confirmando sua maior suscetibilidade ao peróxido inorgânico (LEE *et al.*, 2005). De maneira semelhante, a linhagem Δohr apresentou halos significativamente aumentados após tratamento com os peróxidos orgânicos t-BOOH e CuOOH ($p < 0,0001$), validando seu papel como controle sensível a esse tipo de estresse oxidativo (OCHSNER; HASSETT; VASIL, 2001).

Nos ensaios realizados após 24h de crescimento, correspondente à fase estacionária, foram observadas diferenças no perfil de sensibilidade entre as linhagens avaliadas (Figura 15). Na presença de H_2O_2 , [1 M], não houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens PA14 selvagem, DM42 e DM43, enquanto a linhagem $\Delta katA$ apresentou halos de inibição significativamente maiores ($p < 0,0001$), confirmando sua maior sensibilidade ao peróxido inorgânico (Figura 15A).

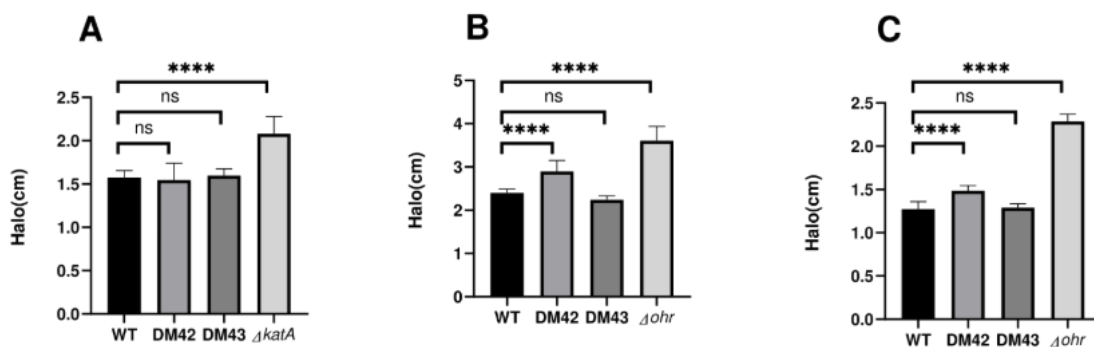


Figura 15 — Sensibilidade ao estresse oxidativo em *P. aeruginosa* na fase estacionária de crescimento.

O diâmetro dos halos de inibição (cm) foi determinado para as linhagens selvagem, DM42, DM43 e linhagens controle sensíveis após 16h de incubação. Em A, exposição ao H_2O_2 , [1 M], com a linhagem $\Delta katA$ como controle sensível ao peróxido inorgânico. Em B, exposição ao t-BOOH, [0,2 M]. Em C, exposição ao CuOOH, [0,3 M]. Para os peróxidos orgânicos, a linhagem Δohr foi utilizada como controle sensível. Os dados representam média \pm desvio padrão de três ensaios independentes com três discos para cada linhagem em cada ensaio. Diferenças estatísticas foram determinadas por T de student, sendo **** $p < 0,0001$ e ns indicando ausência de diferença significativa.

Em contraste, após exposição ao peróxido orgânico t-BOOH [0,2 M], a linhagem DM42 apresentou halos de inibição significativamente maiores em comparação à linhagem selvagem (****, $p < 0,0001$), indicando aumento de sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por

hidroperóxido orgânico. A linhagem DM43 exibiu valores semelhantes aos de WT, sugerindo que a complementação do gene *cfa* restaura o fenótipo de resistência observado na linhagem selvagem. Como esperado, a linhagem Δohr apresentou halos significativamente aumentados em relação às demais linhagens (**** $p < 0,0001$) (Figura 15B).

Resultado semelhante foi observado após tratamento com CuOOH, [0,3 M], no qual a linhagem DM42 novamente apresentou maior sensibilidade em relação à WT (****, $p < 0,0001$), enquanto a linhagem complementada DM43 manteve perfil comparável ao da linhagem selvagem. A linhagem Δohr apresentou o maior halo de inibição, confirmando sua alta suscetibilidade aos hidroperóxidos orgânicos (Figura 15C).

Em conjunto, esses dados indicam que a ausência de ciclopropanação de ácidos graxos impacta a tolerância ao estresse oxidativo induzido por hidroperóxidos orgânicos de forma dependente da fase de crescimento, tornando-se evidente apenas nas células expostas aos hidroperóxidos orgânicos na fase estacionária de crescimento.

4.7. Avaliação da sensibilidade ao t-BOOH por ensaio de microdiluição

A sensibilidade das linhagens selvagem, DM42 e DM43 ao t-BOOH foi avaliada por meio de ensaio de microdiluição, com o objetivo de estabelecer o impacto desse agente oxidante sobre o crescimento bacteriano. As culturas em meio LB foram expostas a concentrações crescentes de t-BOOH, variando de 0 a 1 mM, e o crescimento foi monitorado por medidas de absorbância a 600 nm.

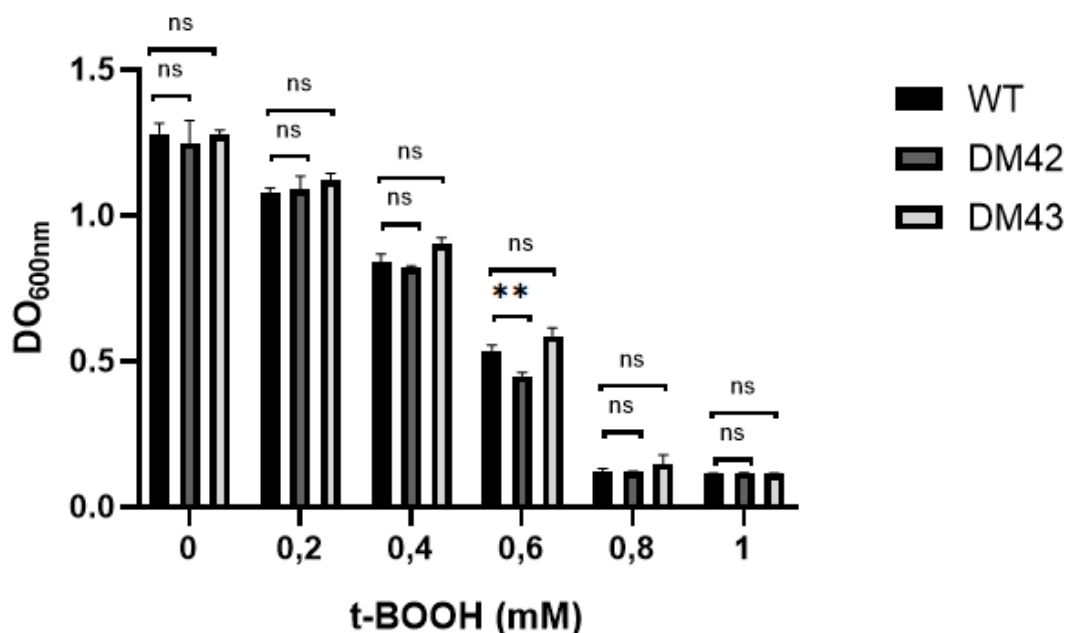


Figura 16 — Teste de sensibilidade ao terc-butil hidroperóxido (t-BOOH) por microdiluição.

As linhagens *P. aeruginosa* PA14 WT, DM42 e DM43 foram expostas a concentrações crescentes de t-BOOH (0 a 1 mM), e o crescimento bacteriano foi avaliado por medidas de absorvância a DO₆₀₀ após 16 h de incubação sob agitação em placas de 96 poços à 37 °C. O gráfico apresentado é representativo de três experimentos independentes realizados em dias distintos. Os valores correspondem à média ± desvio padrão.

Observou-se uma redução progressiva do crescimento bacteriano em todas as linhagens à medida que a concentração de t-BOOH aumentou. No entanto, a linhagem DM42 apresentou uma diminuição mais acentuada da DO₆₀₀ em comparação à linhagem selvagem, especialmente na concentração de 0,6 mM de t-BOOH, indicando maior suscetibilidade ao estresse oxidativo induzido por esse peróxido orgânico.

A linhagem DM43 exibiu um perfil de crescimento mais semelhante ao da linhagem selvagem ao longo da faixa de concentrações avaliadas, sugerindo a recuperação parcial ou total da tolerância ao t-BOOH. Em concentrações mais elevadas ($\geq 0,8$ mM), o crescimento foi fortemente inibido em todas as linhagens, indicando um efeito deletério generalizado do t-BOOH nessas condições.

Esses resultados demonstram que o t-BOOH afeta de forma diferencial as linhagens avaliadas e indicam uma maior sensibilidade da linhagem DM42 ao estresse oxidativo promovido por hidroperóxidos orgânicos.

4.8. Avaliação qualitativa de susceptibilidade ao t-BOOH por *spot assay*

A sensibilidade das linhagens selvagem (PA14 WT), Δohr e DM42 ao peróxido orgânico t-BOOH foi avaliada por meio de ensaio de *spot assay* utilizando culturas em fase estacionária, em 24h de cultivo. As suspensões celulares foram submetidas a diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} e plaqueadas em meio LB na ausência ou presença do agente oxidante.

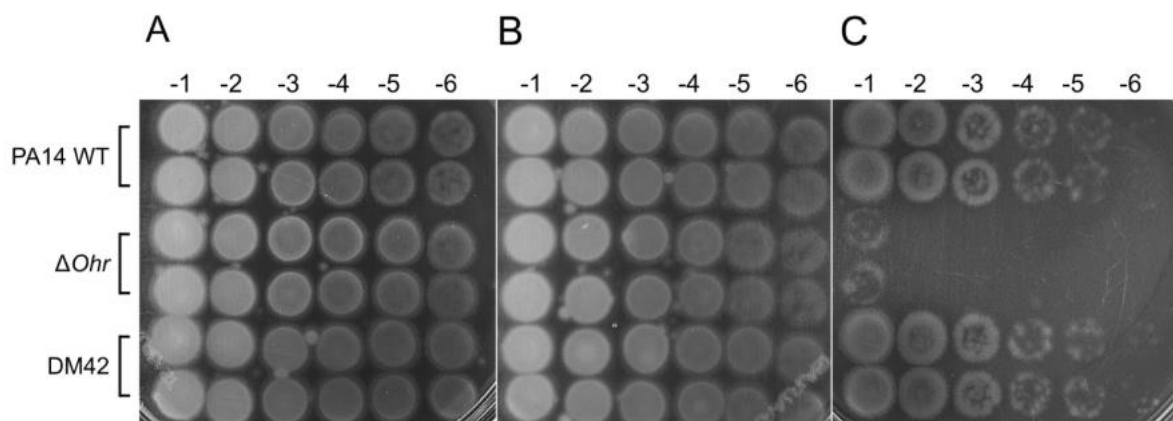


Figura 17 — Avaliação da sensibilidade das linhagens *P. aeruginosa* selvagem (PA14 WT), Δohr e DM42 ao hidroperóxido orgânico t-BOOH por ensaio de *spot assay*.

Culturas em fase estacionária foram submetidas a diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) e plaqueadas em meio LB na ausência de agente oxidante em A, ou na presença de t-BOOH nas concentrações de 0,2 mM em B e 0,5 mM em C. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h, e o crescimento bacteriano foi avaliado pela formação de colônias. A linhagem Δohr foi utilizada como controle positivo de sensibilidade a hidroperóxidos orgânicos.

Na condição controle, sem adição de t-BOOH (Figura 17A), as três linhagens apresentaram crescimento semelhante ao longo de todas as diluições testadas, evidenciando viabilidade e capacidade de formação de colônias comparáveis entre PA14 WT, Δohr e DM42 em ausência de estresse oxidativo.

Na presença de t-BOOH a 0,2 mM (Figura 17B), não foram observadas diferenças visíveis no padrão de crescimento entre as linhagens selvagem e DM42 em comparação à condição controle, mesmo nas maiores diluições. A linhagem Δohr também não apresentou redução evidente de crescimento nessa concentração, indicando que, nas condições avaliadas, o tratamento não foi suficiente para comprometer de forma acentuada a sobrevivência celular.

Quando expostas à 0,5 mM de t-BOOH (Figura 17C), observou-se redução significativa do crescimento da linhagem Δohr , caracterizada por diminuição acentuada da formação de colônias, especialmente nas diluições mais altas. Em contraste, as linhagens selvagem e DM42 mantiveram padrões de crescimento semelhantes entre si, sem diferenças visíveis relevantes.

4.9. Caracterização da resposta bacteriana à geração fotoinduzida de ROS

Inicialmente foi realizada uma etapa preliminar utilizando o fotossensibilizador azul de metileno, com o objetivo de verificar a adequação das condições experimentais, em especial da fonte de luz disponível no sistema de incubação. Inicialmente, as linhagens PA14 selvagem (WT) e a mutante DM30 foram expostas a diferentes concentrações de azul de metileno, na presença e ausência de luz, com a avaliação do crescimento celular após 24 h de incubação. Conforme observado na Figura 18, não foram detectadas diferenças significativas nos valores de DO₆₀₀ entre as condições com e sem luz, tanto para a linhagem selvagem quanto para a mutante, ao longo da faixa de concentrações testadas.

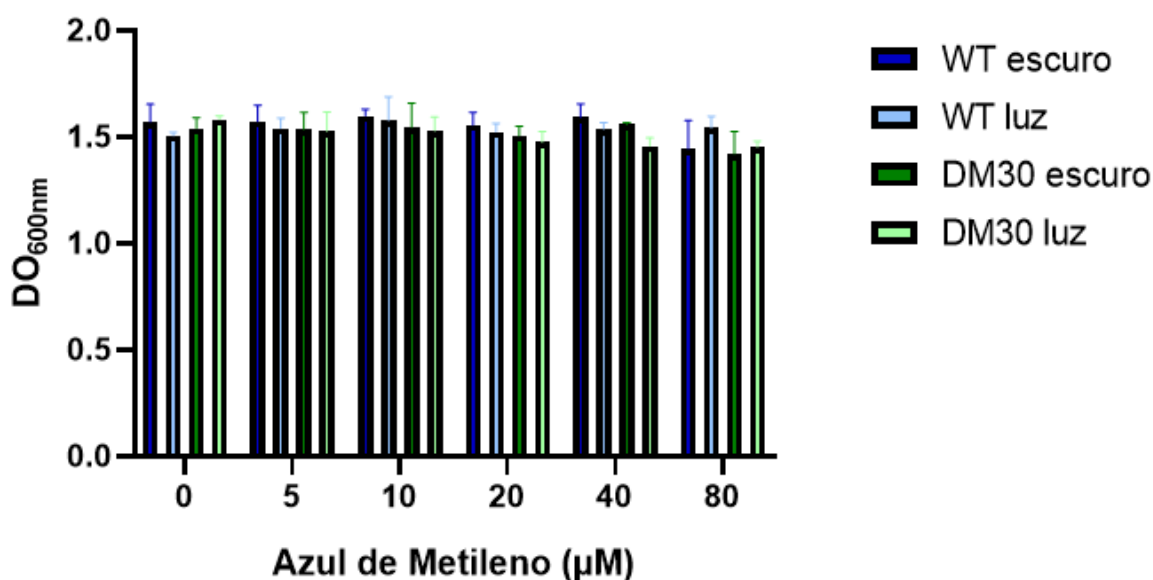


Figura 18 — Avaliação do efeito do azul de metileno sob exposição à luz em *P. aeruginosa*.

Valores de DO₆₀₀ de PA14 selvagem (WT) e da linhagem mutante DM30, incubadas por 24h na presença de diferentes concentrações de azul de metileno, sob condições de luz ou escuro. Os dados representam a média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças significativas entre as condições com e sem luz entre as linhagens avaliadas.

O mesmo protocolo experimental foi aplicado à linhagem controle *E. coli* DH5α, visando descartar a possibilidade de um efeito específico relacionado às linhagens de *P. aeruginosa*. No entanto, de forma semelhante ao observado para *P. aeruginosa*, não foram identificadas diferenças no crescimento celular da DH5α entre as condições de presença e ausência de luz após 24 h de incubação (Figura 19).

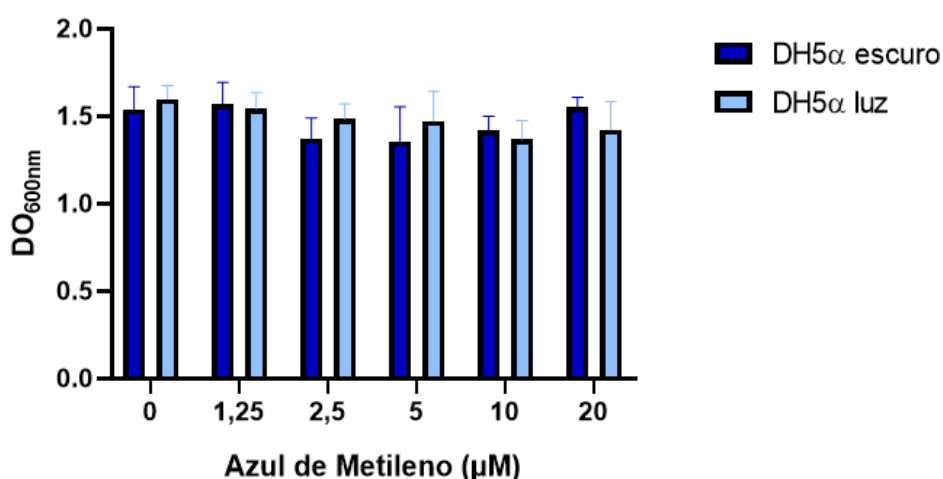


Figura 19 — Avaliação do efeito do azul de metileno sob exposição à luz em *E. coli*.

Valores de DO₆₀₀ da linhagem DH5α, após 24h de incubação na presença de diferentes concentrações de azul de metileno, sob condições de ausência e presença de luz. Os dados representam a média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças significativas no crescimento entre as condições com e sem luz na linhagem avaliada.

Na tentativa de analisar se os resultados obtidos se refletiriam também em linhagens gram positivas também realizamos o mesmo teste com a linhagem *Bacillus subtilis* (Figura 20), que apresentou a ausência de diferença entre as condições de luz e escuro, assim como as linhagens anteriores.

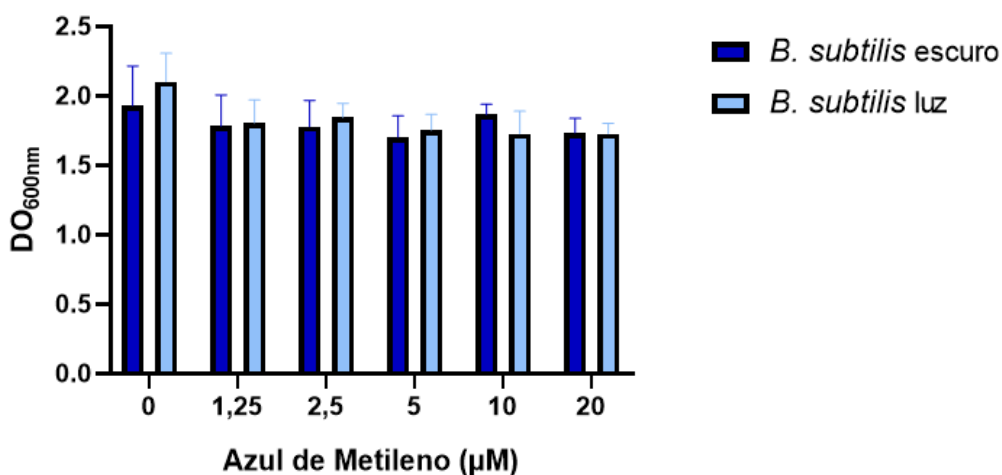


Figura 20 — Avaliação do efeito do azul de metileno sob exposição à luz em *B. subtilis*.

Valores de DO₆₀₀ da linhagem *B. subtilis*, incubadas por 24h na presença de diferentes concentrações de azul de metileno, na ausência e presença de luz. Não foram observadas diferenças significativas entre as condições com e sem luz para nenhuma das linhagens avaliadas.

Esses resultados indicam que, nas condições experimentais empregadas, a fonte de luz utilizada no shaker não foi suficiente para promover a ativação fotodinâmica do azul de metileno, independentemente da espécie bacteriana avaliada. Dessa forma, optou-se por prosseguir os ensaios de terapia fotodinâmica utilizando o fotossensibilizador rosa bengala, com o qual diferenças reprodutíveis associadas à exposição à luz puderam ser observadas em experimentos subsequentes.

Para a definição da concentração de rosa bengala (RB) a ser utilizada nos ensaios de terapia fotodinâmica, foi realizado inicialmente um ensaio exploratório baseado no crescimento bacteriano ao final das curvas obtidas em erlenmeyers, analisando-se a densidade óptica na última hora de incubação. As linhagens selvagem e mutante DM30 foram expostas a diferentes concentrações de RB (0–40 μM), mantidas sob condições de luz ou no escuro.

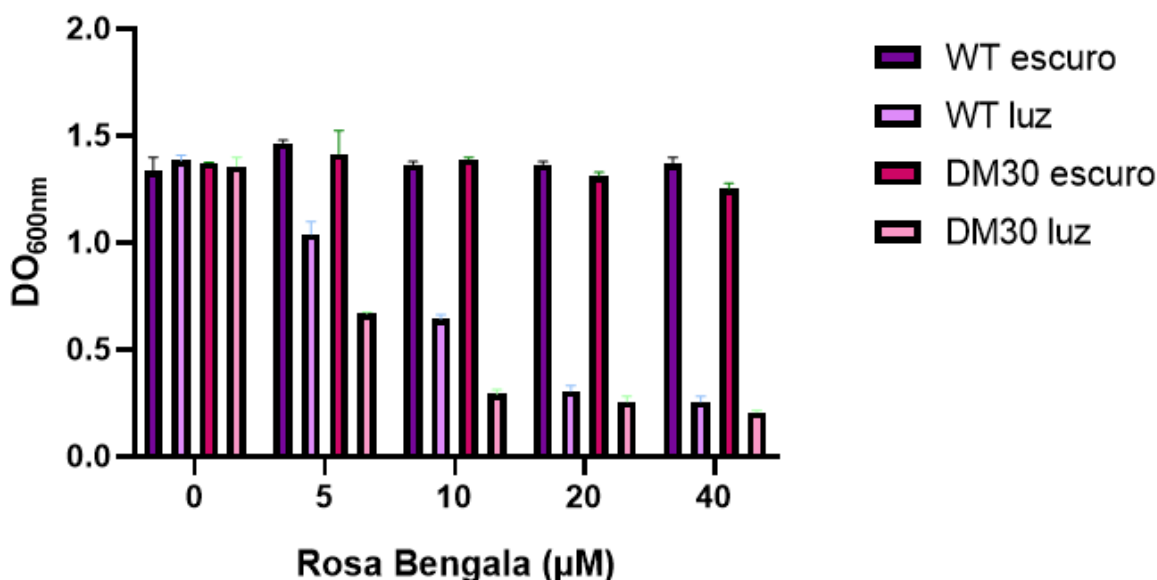


Figura 21 — Avaliação do crescimento de *P. aeruginosa* em diferentes concentrações de rosa bengala sob condições de ausência e presença de luz.

As linhagens selvagem (WT) e mutante DM30 foram cultivadas em erlenmeyers contendo concentrações crescentes de rosa bengala (0–40 μM). Os valores apresentados correspondem à DO_{600} obtida após 6 horas de incubação das linhagens em meio LB contendo o fotossensibilizador. As condições no escuro representam o efeito do corante na ausência de ativação luminosa, enquanto as condições sob luz indicam a ativação fotodinâmica da rosa bengala. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimentos realizados em duplicatas de réplicas técnicas.

Observou-se que, na ausência de iluminação, ambas as linhagens apresentaram valores de DO_{600} semelhantes entre as diferentes concentrações de RB, indicando que o composto, isoladamente, não exerceu efeito significativo sobre o crescimento bacteriano. Em contraste,

sob exposição à luz, foi evidenciada uma redução dependente da concentração na densidade óptica final. Esse efeito foi mais pronunciado na linhagem DM30 quando comparada à selvagem, com reduções mais acentuadas de crescimento nas concentrações intermediárias e mais elevadas.

Esse efeito foi mais pronunciado a partir da concentração de 10 μM , especialmente na linhagem DM30, que apresentou redução mais acentuada da densidade óptica em comparação à linhagem selvagem. Em concentrações mais elevadas (20 e 40 μM), ambas as linhagens exibiram crescimento severamente comprometido sob luz. Com base nesses resultados, a concentração de 10 μM de rosa bengala foi selecionada para os ensaios subsequentes de curva de crescimento em erlenmeyers entre a linhagem com mutação por deleção limpa e a linhagem complementada. A Figura 21 apresenta as curvas de crescimento das linhagens selvagem, DM42 e DM43, cultivadas em duplicatas na presença de 10 μM de rosa bengala sob condições de escuro e luz, ao longo de 8 horas de crescimento em dois dias independentes.

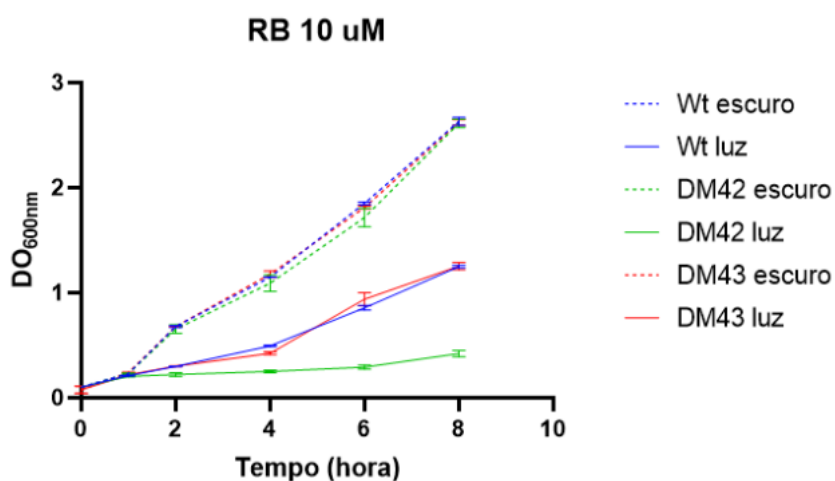


Figura 22 — Curvas de crescimento das linhagens selvagem, DM42 e DM43 na presença de 10 μM de rosa bengala sob condições de ausência e presença de luz.

As culturas foram acompanhadas por 8 horas, com determinação da densidade óptica a 600 nm. Na condição escuro, as linhagens apresentaram crescimento semelhante, enquanto sob exposição à luz observou-se redução significativa do crescimento, especialmente na linhagem DM42, que apresentou maior sensibilidade ao tratamento fotodinâmico.

Em condição de escuro, todas as linhagens apresentaram crescimento progressivo ao longo do tempo, com perfis semelhantes entre si, indicando que o rosa bengala, na concentração utilizada, não exerceu efeito inibitório significativo na ausência de ativação luminosa. As curvas

obtidas para WT, DM42 e DM43 nessa condição exibiram aumento contínuo da densidade óptica, compatível com crescimento bacteriano ativo.

Em contraste, sob exposição à luz, observou-se uma redução acentuada no crescimento de todas as linhagens quando comparadas às respectivas condições de escuro, evidenciando o efeito fotodinâmico da rosa bengala. A linhagem WT e a linhagem complementada DM43 apresentaram crescimento parcial ao longo do tempo, porém com valores de densidade óptica substancialmente inferiores aos observados no escuro.

A linhagem DM42, por sua vez, mostrou-se mais sensível à condição de luz na presença da rosa bengala, apresentando crescimento severamente comprometido durante todo o período avaliado, com baixos valores de densidade óptica mesmo após 8 horas de incubação. Esse perfil sugere uma maior susceptibilidade da linhagem deficiente na ciclopropanação de seus ácidos graxos de membrana aos danos induzidos pela terapia fotodinâmica mediada por rosa bengala.

4.10. Caracterização do mecanismo fotodinâmico envolvido na resposta de *P. aeruginosa* ao FS Rosa bengala

Com o objetivo de avaliar o efeito da RB sob condições de terapia fotodinâmica e considerando a necessidade de minimizar interferências adicionais no crescimento bacteriano, foi realizado inicialmente um ensaio exploratório utilizando azida sódica (AS) na linhagem selvagem. Esse ensaio teve como finalidade determinar uma concentração de AS que apresentasse impacto mínimo sobre o crescimento celular, permitindo sua utilização em experimentos subsequentes sem comprometer a viabilidade da cultura.

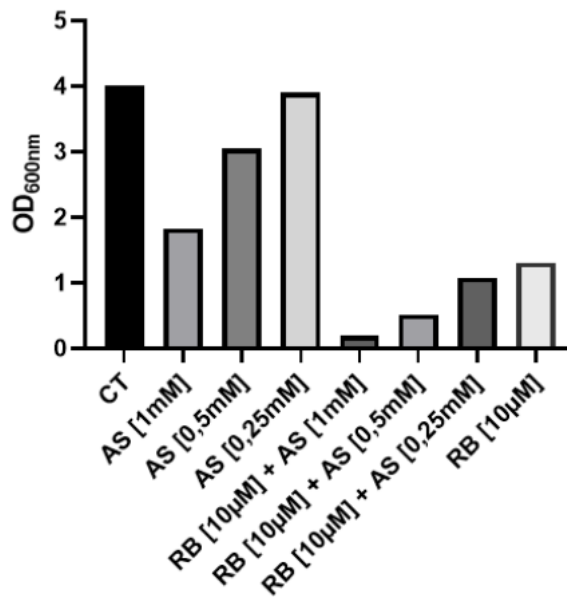


Figura 23 — Ensaio exploratório para determinação da concentração de azida sódica (AS) a ser utilizada em experimentos de terapia fotodinâmica com rosa bengala (RB).

A linhagem *P. aeruginosa* PA14 selvagem foi cultivada por 8 horas sob diferentes condições: controle (CT), azida sódica isoladamente (1 mM, 0,5 mM e 0,25 mM), rose bengal (10 µM) isoladamente e combinações de rose bengal com diferentes concentrações de azida sódica. O crescimento bacteriano foi avaliado por densidade óptica a 600 nm.

Conforme observado, concentrações mais elevadas de AS promoveram redução significativa do crescimento bacteriano após 8 horas de incubação, tanto isoladamente quanto em combinação com RB. Em contraste, a concentração de 0,25 mM de AS apresentou efeito mínimo sobre a densidade óptica da cultura quando comparada ao controle não tratado, mantendo valores de DO₆₀₀ semelhantes aos observados na condição controle. Dessa forma, essa concentração foi selecionada para os experimentos subsequentes, por permitir a avaliação dos efeitos do RB sem interferência significativa do inibidor respiratório sobre o crescimento bacteriano.

Além disso, a associação de RB (10 µM) com AS em diferentes concentrações evidenciou uma redução adicional do crescimento em relação ao tratamento com RB isoladamente, especialmente nas concentrações mais elevadas de AS, indicando um efeito potencialmente cumulativo dessas condições sobre a viabilidade celular. No entanto, considerando o objetivo de preservar o crescimento basal da cultura, optou-se pela utilização da menor concentração eficaz de AS nos ensaios seguintes.

Após a definição da concentração de azida sódica com impacto mínimo sobre o crescimento bacteriano, foi avaliado o crescimento das linhagens WT, DM42 e DM43 na

presença de Rosa Bengala (10 μM) associado à azida sódica (0,25 mM), sob condições de luz e escuro (Figura 24). Os ensaios foram realizados em duplicatas e em dois dias independentes.

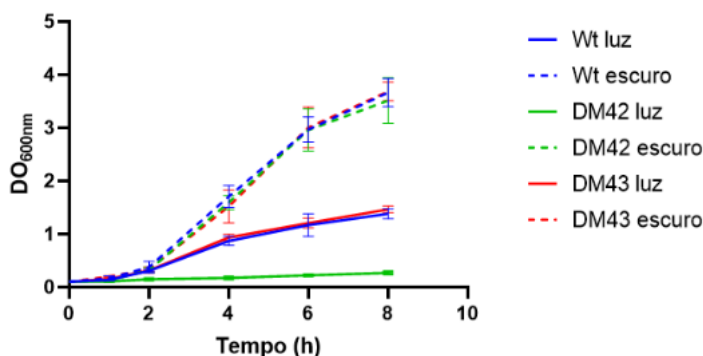


Figura 24 — Curvas de crescimento das linhagens selvagem, DM42 e DM43 na presença de Rosa Bengala (10 μM) associado à azida sódica (0,25 mM).

As culturas foram incubadas por até 8 horas, com monitoramento da densidade óptica a 600 nm. Linhas tracejadas representam condições no escuro e linhas contínuas representam condições sob exposição à luz.

Na ausência de luz, todas as linhagens apresentaram curvas de crescimento semelhantes, indicando que a combinação de RB e AS, por si só, não compromete a viabilidade celular. Em contraste, sob exposição à luz, observou-se redução do crescimento em WT e DM43, enquanto a linhagem DM42 apresentou inibição acentuada do crescimento ao longo de todo o período analisado.

4.11. Ensaio de sensibilidade ao Paraquat

Após ensaios iniciais exploratórios, com o objetivo de determinar uma faixa de concentração biologicamente relevante capaz de impactar o crescimento bacteriano sem promover inibição completa, a concentração de 10 mM foi escolhida para os ensaios subsequentes em frascos Erlenmeyer, por representar a condição na qual a diferença de sensibilidade entre as linhagens foi mais claramente detectável. Os ensaios a seguir foram realizados já na linhagem mutante limpa e complementada, que já tinham sido obtidas nessa fase experimental. O efeito do estresse oxidativo induzido por paraquat foi avaliado por meio de curvas de crescimento das linhagens selvagem, DM42 e DM43, expostas à concentração de 10 mM do composto.

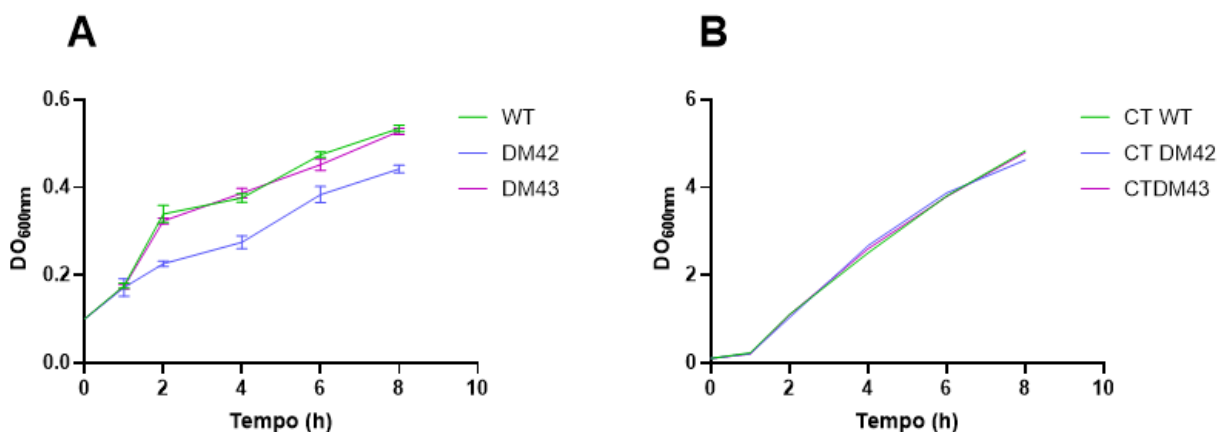


Figura 25 — Curvas de crescimento sob tratamento com paraquat.

Em A, curvas de crescimento das linhagens selvagem, DM42 e DM43 expostas a 10 mM de paraquat, monitoradas por medidas de absorbância a 600 nm ao longo do tempo. Em B, comparação entre as curvas de crescimento das linhagens controle (sem paraquat) e tratadas com 10 mM de paraquat, cultivadas simultaneamente sob as mesmas condições experimentais. Na ausência do tratamento, todas as linhagens apresentaram crescimento robusto, atingindo valores de DO₆₀₀ superiores a 4 após 8 h de incubação. Os dados representam a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata.

Na Figura 25A, observou-se que o tratamento com paraquat comprometeu o crescimento de todas as linhagens ao longo do tempo, quando comparado aos valores tipicamente observados em condições não tratadas. Entretanto, a linhagem DM42 apresentou redução mais acentuada no crescimento em relação à linhagem selvagem, exibindo valores de DO₆₀₀ consistentemente inferiores durante todo o período avaliado. Em contraste, a linhagem complementada DM43 apresentou perfil de crescimento semelhante ao da linhagem WT, sugerindo que a reintrodução do gene *cfa* foi suficiente para restaurar a tolerância ao estresse imposto pelo paraquat.

Para melhor contextualizar esse efeito, a Figura 25B apresenta, para cada linhagem, a comparação direta entre as condições tratada e controle (sem paraquat), cultivadas simultaneamente sob os mesmos parâmetros experimentais. Observa-se que, na ausência de paraquat, todas as linhagens exibiram crescimento robusto, atingindo valores de DO₆₀₀ superiores a 4 após 8 h de incubação. A comparação evidencia que o paraquat exerce forte impacto inibitório sobre o crescimento bacteriano, sendo esse efeito mais pronunciado na linhagem DM42, enquanto as linhagens WT e DM43 mantiveram maior capacidade de crescimento relativo ao controle.

4.12. Ensaio de sensibilidade à antibióticos por ensaio de difusão em disco

A sensibilidade das linhagens à colistina foi avaliada por ensaio de difusão em disco em diferentes fases do crescimento celular. Após 3 h de cultivo, correspondentes à fase exponencial (Figura 26A), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre a linhagem selvagem WT, DM42 e DM45. De forma semelhante, após 24 h de cultivo, quando as células se encontravam em fase estacionária (Figura 26B), os halos de inibição obtidos para as três linhagens permaneceram comparáveis, sem diferenças estatisticamente significativas.

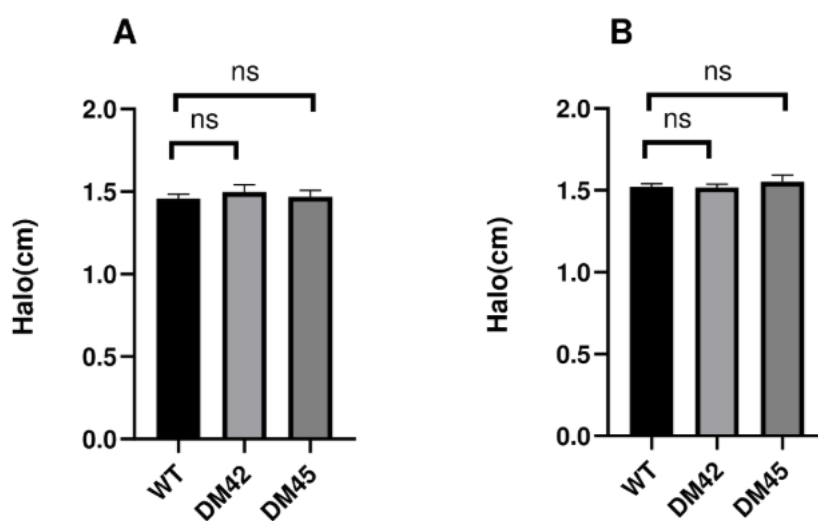


Figura 26 — Ensaio de difusão em disco com colistina em *P. aeruginosa*.

Em A os halos de inibição foram avaliados após 3 h de cultivo, correspondente à fase exponencial, e em B após 24 h de cultivo, correspondente à fase estacionária. Foram analisadas as linhagens selvagem WT, DM42 e DM45. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de n equivalente a 9 halos para cada fase. As comparações estatísticas não indicaram diferenças significativas entre as linhagens.

Esses resultados indicam que a ausência da ciclopropanação de ácidos graxos na linhagem DM42, bem como sua complementação genética na linhagem DM45, não afeta notavelmente a susceptibilidade à colistina nas condições avaliadas, independentemente da fase de crescimento bacteriano.

A susceptibilidade das linhagens à polimixina B foi realizada de forma semelhante. Após 3 h de cultivo (Figura 27A) os diâmetros dos halos de inibição observados para WT, DM42 e DM45 foram semelhantes, não sendo detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens (ns).

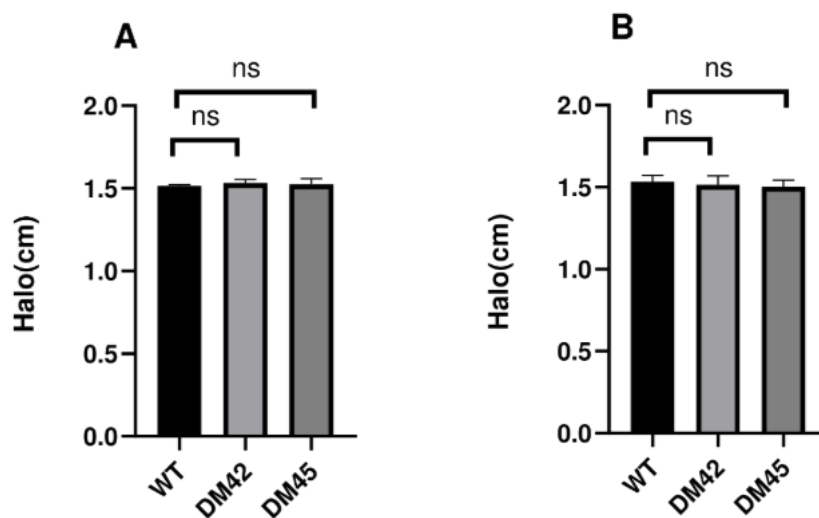


Figura 27 — Ensaio de difusão em disco com polimixina B em *P. aeruginosa*.

Em A os halos de inibição foram avaliados após 3 h de cultivo, correspondente à fase exponencial, e em B após 24 h de cultivo, correspondente à fase estacionária. Foram analisadas as linhagens WT, DM42 e DM45. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de n equivalente a 9 halos para cada fase. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em nenhum dos tempos analisados (ns).

Do mesmo modo, após 24 h de cultivo (Figura 27B), os halos de inibição permaneceram semelhantes entre as três linhagens, novamente sem diferenças estatisticamente significativas. Esses dados indicam que a ausência do gene *cfb*, bem como sua complementação, não interfere de maneira detectável a susceptibilidade à polimixina B, independentemente da fase de crescimento bacteriano analisada.

4.13. Avaliação de susceptibilidade a estresse osmótico causado por sacarose

Para avaliar a contribuição da ciclopropanação de ácidos graxos na tolerância ao estresse osmótico, foram realizadas curvas de crescimento das linhagens em meio LB suplementado com sacarose em diferentes concentrações.

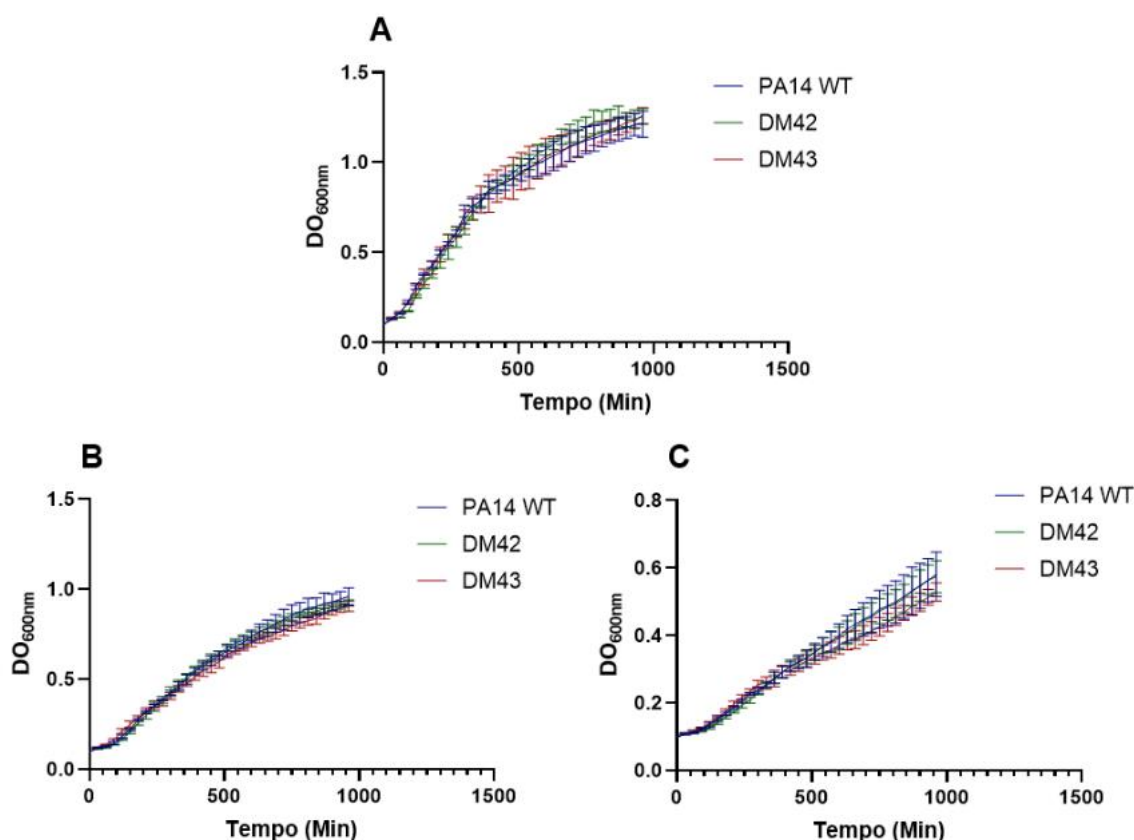


Figura 28 — Avaliação da susceptibilidade ao estresse osmótico induzido por sacarose em *P. aeruginosa*.

Curvas de crescimento das linhagens selvagem, DM42 e DM43 foram monitoradas por densidade óptica a 600 nm ao longo do tempo. Em A, crescimento em meio LB sem suplementação de sacarose (condição controle). Em B, crescimento em meio LB suplementado com 0,25 M de sacarose. Em C, crescimento em meio LB suplementado com 0,5 M de sacarose. Os dados representam a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata.

Em condições controle, na ausência de sacarose (Figura 28A), as três linhagens apresentaram perfis de crescimento muito semelhantes ao longo do tempo, sem diferenças evidentes nas fases exponencial e estacionária.

Na presença de estresse osmótico moderado, induzido por 0,25 M de sacarose (Figura 28B), observou-se uma redução geral na taxa de crescimento e na densidade óptica final em comparação ao controle, efeito esperado para todas as linhagens. Ainda assim, os perfis de crescimento permaneceram semelhantes entre WT, DM42 e DM43, não sendo observadas diferenças marcantes associadas à ausência ou complementação de *cfa*.

Quando expostas a uma condição de estresse osmótico mais severo, com 0,5 M de sacarose (Figura 28C), as três linhagens apresentaram crescimento substancialmente mais limitado, com valores de DO_{600} significativamente inferiores aos observados nas demais

condições. Apesar da intensificação do estresse, os perfis de crescimento entre as linhagens permaneceram comparáveis ao longo do experimento, indicando que a ausência de ciclopropanação de ácidos graxos não confere maior sensibilidade ao estresse osmótico imposto por altas concentrações de sacarose nas condições avaliadas.

4.14. Impacto de diferentes temperaturas e pH no crescimento celular

Com o objetivo de avaliar se a ausência do gene *cfpA* afeta o crescimento de *P. aeruginosa* sob diferentes condições térmicas e diferentes pH, curvas de crescimento da linhagem selvagem e de DM30 foram determinadas a 25 °C e 42 °C (Figura 29) e em pH 7,2, 6 e 5 (Figura 30).

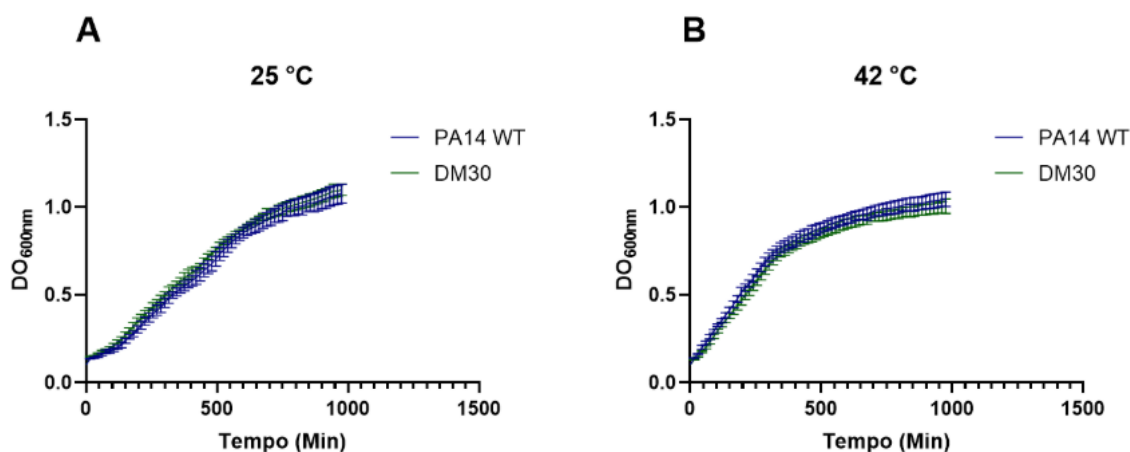


Figura 29 — Curvas de crescimento das linhagens PA14 selvagem e DM30, cultivadas em diferentes temperaturas.

Em A as culturas incubadas em 25°C e em B em 42°C. Os dados representam a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Não foram observadas diferenças significativas no perfil de crescimento entre a linhagem selvagem e o mutante DM30 em nenhuma das condições avaliadas.

Em relação ao pH, em todas as condições testadas, as duas linhagens apresentaram perfis de crescimento semelhantes, com fases exponencial e estacionária ocorrendo de forma similar. A redução do pH do meio não resultou em alterações significativas na taxa de crescimento, no tempo de adaptação ou na densidade celular final quando comparadas às linhagens selvagem e DM30.

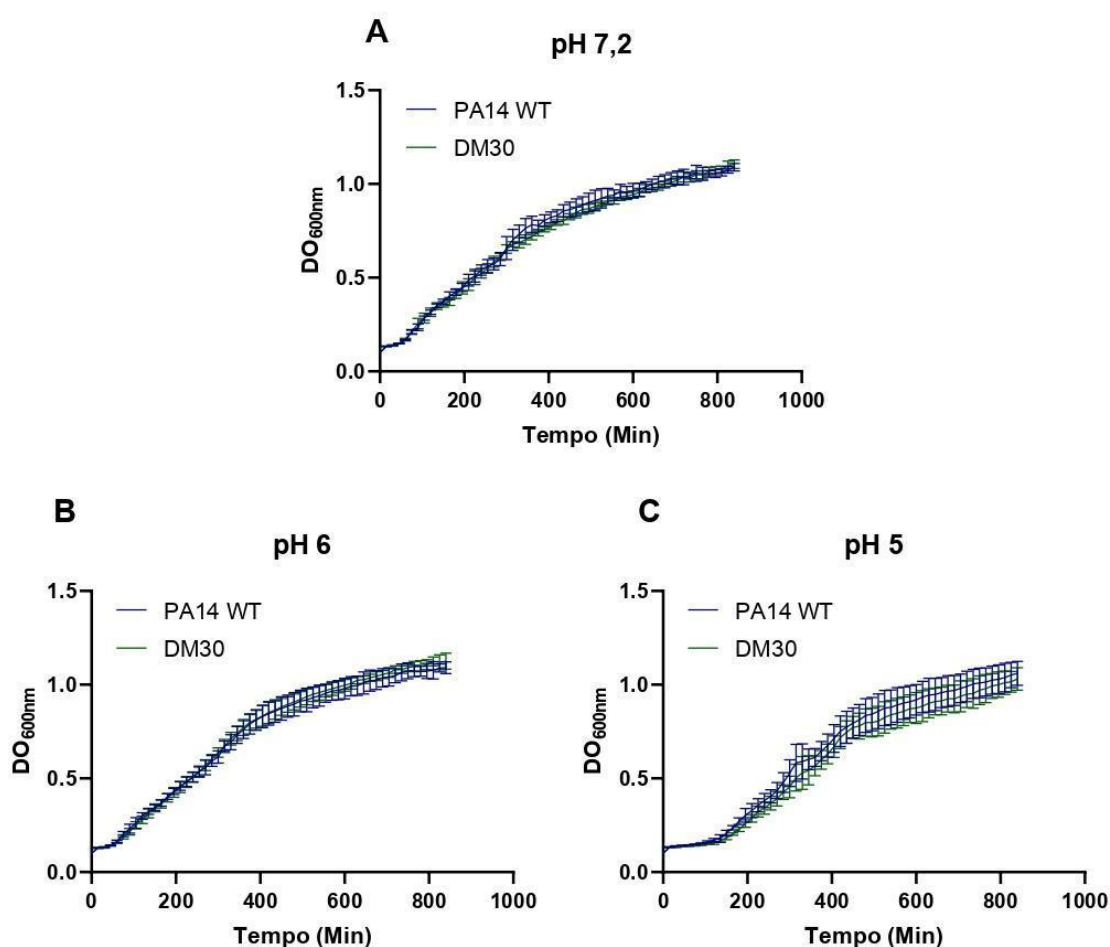


Figura 30 — Curvas de crescimento das linhagens PA14 selvagem e DM30 cultivadas sob diferentes condições de pH sem tamponamento.

As culturas foram incubadas em pH 7,2 em A, correspondente ao pH padrão do meio LB, pH 6 em B e pH 5 em C, com o crescimento celular monitorado ao longo do tempo. Os dados representam a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Não foram observadas diferenças significativas no perfil de crescimento entre as linhagens nas condições avaliadas.

Esses resultados indicam que a deleção do gene *cfa* não compromete o crescimento basal de *P. aeruginosa* em meio LB, mesmo sob condições de pH ácido moderado, sugerindo que possíveis fenótipos associados à ausência dessa enzima não estão relacionados a defeitos globais de crescimento nessas condições.

4.15. Avaliação de virulência por ensaios de infecção em *G. mellonella*

A sobrevivência de larvas de *G. mellonella* após infecção com diferentes linhagens bacterianas foi avaliada por meio de curvas de Kaplan–Meier, utilizando dois níveis de inóculo bacteriano (Figura 31).

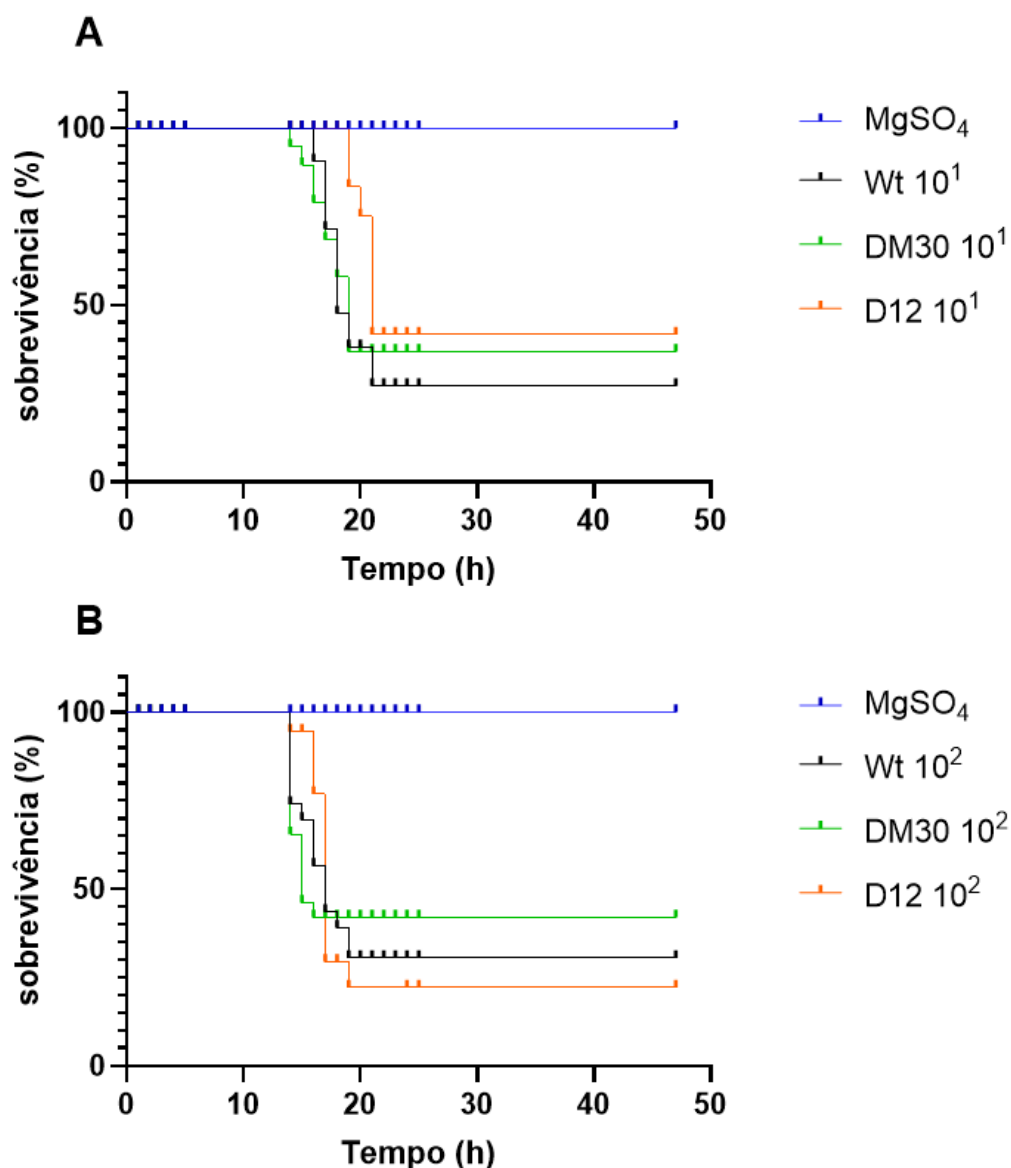


Figura 31 — Curvas de sobrevivência de *G. mellonella* após infecção com diferentes linhagens bacterianas.

As larvas foram inoculadas com suspensões bacterianas correspondentes às diluições 10^{-6} em A, equivalente a aproximadamente 10^1 unidades bacterianas por larva, ou 10^{-5} em B, equivalente a aproximadamente 10^2 unidades bacterianas por larva. A sobrevivência das larvas ($n=15$ por grupo) foi monitorada ao longo do tempo e expressa como porcentagem de sobrevivência. O grupo controle foi inoculado com MgSO₄. As curvas foram construídas pelo método de Kaplan–Meier e comparadas pelo teste de log-rank. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$).

Na condição correspondente à diluição 10^{-6} , equivalente a aproximadamente 10^1 unidades bacterianas por larva (Figura 31A), observou-se redução significativa da sobrevivência das larvas infectadas em comparação ao grupo controle inoculado com MgSO₄, o qual manteve 100% de sobrevivência ao longo de todo o período experimental. As linhagens

WT, DM30 e D12 apresentaram perfis de mortalidade semelhantes, não sendo observadas diferenças significativas entre elas.

De forma semelhante, na condição correspondente à diluição 10^{-5} , equivalente a aproximadamente 10^2 unidades bacterianas por larva (Figura 31B), todas as linhagens bacterianas promoveram redução significativa da sobrevivência das larvas em relação ao controle. Embora tenha sido observada uma tendência de maior mortalidade em comparação à condição de menor inóculo, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens avaliadas, indicando que o aumento da carga bacteriana afeta a sobrevivência das larvas de maneira comparável entre os diferentes genótipos testados.

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado que a ciclopropanação de ácidos graxos constitui um mecanismo conservado de adaptação bacteriana frente a condições ambientais adversas (CRONAN; LUK, 2022). Em diferentes espécies, como *E. coli*, *S. enterica* e *H. pylori* a ausência da enzima Cfa está associada a alterações na composição lipídica da membrana, aumento da permeabilidade e maior sensibilidade a estresses químicos e oxidativos (HORI *et al.*, 2025; JIANG *et al.*, 2019; CHEN; GÄNZLE, 2016; KIM *et al.*, 2005). Esses trabalhos sugerem que os ácidos graxos contendo ciclopropanação atuam como elementos estabilizadores da membrana, contribuindo para a manutenção da integridade celular. Apesar do papel de Cfa em *E. coli* já estar sendo estudado e documentado por décadas, a contribuição específica de Cfa para a resposta ao estresse oxidativo em *P. aeruginosa* permanecia até o início do presente estudo como uma lacuna do conhecimento e, mesmo após recente publicação científica acerca do tema, ainda permanece pouco explorada (EZEDURU *et al.*, 2024; GOLDFINE, 1972; ZALKIN; LAW; GOLDFINE, 1963).

Em *P. putida* foram identificados dois sistemas de Cfa, denominados CfaA e CfaB, sendo o gene *cfaB* particularmente relevante durante a fase estacionária de crescimento. Mutantes deficientes em *cfaB* apresentam maior sensibilidade a solventes orgânicos, embora não exibam alterações significativas na tolerância ao choque ácido, em contraste com o observado em espécies como *E. coli* e *S. enterica* (PINI *et al.*, 2009; MUÑOZ-ROJAS *et al.*, 2006). Análises comparativas de genomas realizadas nesse trabalho indicam que *P. aeruginosa* possui um ortólogo de *cfaB* de *P. putida*, correspondente ao gene PA14_73140, anotado como codificador putativo de Cfa. No entanto, apesar da ampla caracterização fisiológica e adaptativa de *P. aeruginosa*, as funções atribuídas a essa enzima nessa espécie permaneciam, até

recentemente, pouco exploradas. Diante desse cenário, este trabalho foi concebido a partir da hipótese de que a Cfa de *P. aeruginosa* desempenharia papéis funcionais análogos aos descritos em outras bactérias, especialmente no contexto de adaptação a condições de estresse. Análises *in silico* baseadas em homologia de sequência e predição estrutural reforçaram essa hipótese, evidenciando a elevada conservação com ciclopropano sintases descritas em outras bactérias, incluindo *E. coli*, bem como similaridade estrutural entre o modelo predito para PA14_73140 por AlphaFold3 e estruturas cristalográficas disponíveis de *E. coli*. (Figura 6 e Figura 7) Em conjunto, essas evidências, obtidas antes da disponibilização de dados experimentais na literatura para essa espécie, forneceram a base conceitual para a construção das linhagens mutantes e para a investigação experimental do papel de cfa na fisiologia celular e na resposta ao estresse oxidativo em *P. aeruginosa*. Assim, este estudo propôs a investigação sistemática da função do gene PA14_73140 por meio da construção de um mutante nulo, com o objetivo de aprofundar a compreensão do papel da Cfa na fisiologia e adaptação dessa espécie. Nesse contexto, os resultados obtidos no presente estudo permitem discutir os efeitos atribuídos à Cfa em *P. aeruginosa* e as possíveis particularidades desta espécie.

A estratégia inicial deste trabalho era a construção de um plasmídeo contendo as regiões flanqueadoras de *cfa* por clonagem tradicional. Essa abordagem foi escolhida por permitir a construção de um mutante limpo não polar, sem a inserção de sequências exógenas no genoma bacteriano e sem afetar a expressão de genes adjacentes, possibilitando análises funcionais mais precisas. Apesar das tentativas realizadas, essa estratégia não resultou, dentro do período experimental disponível, na obtenção de uma linhagem mutante nula adequada para os ensaios funcionais, conforme já detalhado na metodologia. Diante dessas limitações e da necessidade de dar continuidade às análises propostas, optou-se pela utilização de uma linhagem mutante previamente disponível em uma biblioteca de mutantes nulos gerados por inserção de transposon (LIBERATI *et al.*, 2006). Essa linhagem *cfa::MAR2xT7*, denominada DM30 ao longo do trabalho, foi cedida pela Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) e estabelecida uma colaboração. O plasmídeo utilizado para a obtenção do mutante nulo do gene *cfa* foi previamente construído pelo pesquisador colaborador Nathan Rodrigues da Silva. A construção utilizou a metodologia de Gibson Assembly. Após a construção do plasmídeo, as etapas subsequentes de conjugação com posterior evento de recombinação homóloga e seleção dos transconjugantes foram realizadas em nosso laboratório. A linhagem mutante final Δcfa foi obtida e denominada DM42 ao longo deste trabalho.

A confirmação da atividade de Cfa, através da detecção de anéis de ciclopropano nos ácidos graxos que compõem os lipídeos de membrana de *P. aeruginosa* foi um passo fundamental para nosso estudo, uma vez que essa modificação lipídica constitui a base estrutural sobre a qual se apoiam os fenótipos fisiológicos associados ao gene *cfa*. Entre as abordagens analíticas disponíveis para a caracterização de modificações em lipídios, a espectrometria de massas é amplamente utilizada devido à sua alta sensibilidade e capacidade de identificação molecular (RUSTAM; REID, 2018). No entanto, neste estudo, a RMN destacou-se como uma alternativa robusta para detecção de ácidos graxos que apresentam ciclopropanação. O cultivo microbiano com possibilidade de escalonamento da quantidade de biomassa que pode ser obtida, se adequa à técnica, uma vez que sua sensibilidade relativamente menor exige volumes amostrais maiores. (ELTEMUR *et al.*, 2023; LOLLI *et al.*, 2018; EMWAS, 2015). Neste estudo, a extração dos lipídeos foi realizada a partir de 50 mg de biomassa seca. No entanto, nossos resultados indicam que essa quantidade pode ser reduzida em pelo menos cinco vezes, sem comprometimento da sensibilidade analítica, uma vez que a detecção dos prótons associados aos carbonos do anel ciclopropano permanece preservada.

A formação do anel ciclopropano em ácidos graxos, resultante da modificação química de ligações duplas insaturadas, gera sinais espectrais de RMN de ^1H altamente característicos, que funcionam como uma assinatura para a distinção entre lipídios modificados e não modificados (ELTEMUR *et al.*, 2023). A principal particularidade da técnica de RMN para essa análise é a detecção de sinais em uma região de campo muito alto, tipicamente entre -0.30 e -0.35 ppm, uma zona do espectro que é virtualmente livre de interferências de outros sinais de ácidos graxos comuns. Essa posição altamente blindada dos prótons do ciclopropano é explicada pela anisotropia das ligações C–C ou por correntes de anel do tipo aromático inerentes à estrutura de três membros (LOLLI *et al.*, 2018). Para ácidos graxos com configuração *cis* (comuns em bactérias), o próton metileno-*cis* ressoa especificamente entre -0.33 e -0.35 ppm. Este sinal frequentemente aparece como um quarteto devido ao acoplamento com o próton metileno-*trans*, que por sua vez ressoa entre 0.55 e 0.60 ppm, e com os dois prótons metino do anel, localizados em torno de 0.67 a 0.68 ppm. Em contrapartida, os ácidos graxos insaturados não modificados apresentam prótons com deslocamentos químicos característicos em torno de 5.33 ppm (ELTEMUR *et al.*, 2023; KNOTHE, 2006; GLICKMAN; COX; JACOBS JR., 2000).

A técnica de RMN permitiu distinguir de forma clara os espectros emitidos pela linhagem selvagem, mutantes DM30 e DM42 e linhagem complementada DM43 (Figura 10, Figura 11 e Figura 12). Na linhagem selvagem e complementada, os sinais em 5.33 ppm

diminuem, enquanto os sinais em campo negativo (como -0.32 ppm) tornam-se evidentes. Já nas linhagens DM30 e DM42 há ausência de sinais entre -0.33 e -0.35 ppm, característico do proton metileno-cis, e também ausência de sinais entre 0.55 e 0.68 , característico de proton metileno-trans. Dessa forma podemos inferir que nas linhagens DM42 e DM30 houve a ausência de ciclopropanação detectada enquanto a linhagem DM43 voltou a exibir fenótipo da linhagem selvagem. Assim, a escolha da RMN neste trabalho possibilitou a obtenção de uma confirmação estrutural direta da presença de ciclopropanação de ácidos graxos, fornecendo uma evidência clara da atividade funcional da Cfa nas linhagens analisadas. Esses achados confirmam que a interrupção da transcrição de *cfa* resulta na perda total da modificação lipídica catalisada por essa enzima, indicando que o gene *PA14_73140* codifica, de fato, a única Cfa funcional em *P. aeruginosa* PA14. Corroborando esta interpretação, um estudo recente focado na cepa PAO1 e publicado ao longo de nossas pesquisas, caracterizou o gene ortólogo (*PA5546*), demonstrando que sua deleção abole completamente a produção de Cfa, sem a compensação por qualquer outra via redundante. Desse modo, este trabalho estabeleceu que o genoma de *P. aeruginosa* codifica uma única enzima Cfa, que atua como um homodímero estável e é essencial para a remodelagem da membrana tanto na transição para a fase estacionária quanto em resposta ao estresse oxidativo regulado por OxyR (EZEDURU *et al.*, 2024). Os espectros de RMN obtidos a partir das linhagens DM30 e DM42 não apresentaram os sinais característicos de ciclopropanação observados nos extratos da linhagem selvagem. Esse resultado permite inferir que ambas as estratégias empregadas para a interrupção da produção da enzima foram bem-sucedidas e que as duas linhagens mutantes devem apresentar fenótipos altamente similares entre si. Esses dados fornecem uma base estrutural para a interpretação dos fenótipos observados nos ensaios subsequentes de estresse oxidativo. Adicionalmente, é importante destacar que as mutações no gene *cfa* não resultaram em efeitos diferenciais no crescimento bacteriano quando comparadas à linhagem selvagem mesmo em diferentes condições de cultivo, sem diferenças significativas na fase logarítmica e estacionária (Figura 9). Esse comportamento está de acordo com o que pode ser observado na literatura, de forma que a inativação de *cfa* em diferentes espécies bacterianas não compromete o crescimento basal, mas afeta principalmente a composição lipídica da membrana e a resposta a condições de estresse ambiental (KIM *et al.* 2005; CHANG; CRONAN, 1999; GROGAN; CRONAN, 1997). Dessa forma, os resultados obtidos indicam que a ausência de ciclopropanação observada por RMN está associada especificamente à perda da função da ciclopropano sintase, e não a um prejuízo global no metabolismo ou na viabilidade celular de *P. aeruginosa*.

Estudos de lipidômica demonstraram que a ausência de sinalização por quorum sensing, como observado em mutantes nulos para *lasI/R*, resulta em alterações significativas na composição da membrana, incluindo uma taxa de ciclopropanação inferior à metade da observada na linhagem selvagem e a redução do comprimento médio das cadeias de ácidos graxos durante a entrada na fase estacionária (DAVENPORT; GRIFFIN; WELCH, 2015). Evidências adicionais indicam também que a regulação da ciclopropanação está integrada a redes de resposta ao estresse oxidativo. Um estudo recente demonstrou que o gene *cfa* (PA5546) faz parte do regulon de OxyR, sendo sua atividade promotora induzida aproximadamente cinco vezes após exposição ao paraquat, efeito que é abolido em linhagens deficientes em *oxyR* (EZEDURU *et al.*, 2024). Nossos resultados demonstraram que, na linhagem *lasR::MAR2xT7*, a atividade promotora de *cfa* permaneceu consistentemente inferior à observada na linhagem selvagem, indicando que o regulador LasR exerce influência sobre a expressão de *cfa* (Figura 13). O sistema Las, composto pela sintase LasI e pelo regulador cognato LasR, constitui um dos principais níveis hierárquicos do quorum sensing em *P. aeruginosa*, atuando como um regulador global capaz de modular a expressão gênica em resposta à densidade celular e a diferentes sinais fisiológicos. Estudos transcriptômicos demonstram que os regulons controlados por sistemas de QS formam uma rede contínua e interligada, na qual muitos genes são regulados de forma direta ou indireta, reforçando o papel do quorum sensing como um integrador de processos adaptativos celulares (LIN; CHENG, 2019; SCHUSTER; GREENBERG, 2006). Estudos em outras bactérias Gram-negativas demonstram que a expressão de *cfa* é modulada por múltiplos reguladores globais e por condições fisiológicas associadas ao estresse e estado de crescimento (ORI *et al.*, 2025; JIANG *et al.*, 2019; CHEN; GÄNZLE, 2016; KIM *et al.*, 2005). Assim, nesse contexto do estado da arte sobre a regulação de *cfa*, nosso trabalho acrescenta evidências adicionais ao conhecimento existente ao demonstrar que os níveis de Cfa são regulados em nível transcricional por meio de mecanismos de percepção de quorum em *P. aeruginosa*. A suscetibilidade das linhagens ao estresse oxidativo foi inicialmente avaliada por meio de ensaios de difusão em disco utilizando diferentes peróxidos, incluindo *tert*-butil hidroperóxido (t-BOOH) e cumeno hidroperóxido (CuOOH), dois hidroperóxidos artificiais e de natureza orgânica e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), de natureza inorgânica. Esse ensaio permitiu uma triagem inicial do impacto da ausência da enzima Cfa sobre a tolerância a diferentes agentes oxidantes.

A ausência de diferenças significativas entre as linhagens selvagem, DM42 e DM43 após 3 h de incubação está de acordo com o caráter temporal da regulação de *cfa* (Figura 14).

A indução deste gene ocorre predominantemente na transição para a fase estacionária ou em resposta a desafios específicos, de modo que, durante a fase exponencial, os níveis de ácidos graxos que apresentam ciclopropanação na linhagem selvagem tendem a ser mínimos. A análise temporal feita por RMN mostrou que os sinais dos prótons do anel de ciclopropano eram muito inferiores aos observados com os espectros obtidos a partir das 24 horas (dados não apresentados). Assim, a semelhança observada entre as linhagens nesse período inicial de crescimento reforça o conjunto de evidências que sugerem que a ciclopropanação atua como um mecanismo adaptativo associado à manutenção da viabilidade e à persistência bacteriana frente a estresses em estágios avançados do ciclo celular (CHIANG; SCHELLHORN, 2012; STORZ; IMLAY, 1999). A sensibilidade observada apenas nas linhagens controle *ΔkatA* e *Δohr* confirmou a eficiência do ensaio e reforça o papel central dessas enzimas na detoxificação direta dos hidroperóxidos testados (HEO *et al.*, 2010; OCHSNER; HASSETT; VASIL, 2001).

Em contraste, após 24 h de incubação, tornaram-se evidentes as diferenças na sobrevivência das linhagens especificamente frente aos hidroperóxidos orgânicos t-BOOH e CuOOH (Figura 15). A maior sensibilidade observada na linhagem *Δcfa* a esses agentes, quando comparada à resposta frente a peróxidos inorgânicos como o H₂O₂, pode ser interpretada pelas propriedades químicas desses oxidantes e interação com o envelope celular (DA CRUZ NIZER *et al.*, 2021). Enquanto o H₂O₂ é uma molécula polar, cuja toxicidade é majoritariamente atenuada por defesas citoplasmáticas como as catalases KatA e KatB e periplasmáticas como a superóxido dismutase SodC os hidroperóxidos orgânicos apresentam acentuado caráter lipofílico. Essa característica favorece seu acúmulo no interior hidrofóbico da bicamada lipídica, onde interagem diretamente com as cadeias acil (DA CRUZ NIZER *et al.*, 2021; POGER; MARK, 2015). Contudo, ainda é preciso considerar que o aumento da susceptibilidade observada nas culturas de 24 horas pode ser atribuído a modificações na permeabilidade à membrana ou no acúmulo destas moléculas na membrana citoplasmática.

Diferentemente PUFAs encontrados abundantemente em membranas de eucariotos, que possuem hidrogênios bis-álílicos altamente suscetíveis à abstração radicalar e à propagação de reações em cadeia, os MUFAs apresentam uma resistência intrínseca superior a esse processo de propagação clássica (MURPHY *et al.*, 2022; DA CRUZ NIZER *et al.*, 2021). Contudo, essa resistência não implica imunidade; as ligações duplas dos MUFAs permanecem como alvos para o ataque oxidativo direto por espécies eletrofílicas e radicais lipofílicos (POGER; MARK, 2015; LUSHCHAK, 2001). Nesse contexto, a enzima Cfa confere uma proteção estratégica ao

converter pós-sinteticamente essas insaturações em anéis ciclopropanos. Sendo assim, Δcfa mantém as duplas ligações expostas, resultando em um envelope celular quimicamente instável e vulnerável a agentes oxidantes hidrofóbicos que conseguem contornar as barreiras polares do citoplasma (DA CRUZ NIZER *et al.*, 2021; POGER; MARK, 2015).

Com base nas diferenças observadas no ensaio de difusão em disco frente ao t-BOOH, foi avaliada por meio de ensaio de microdiluição como abordagem quantitativa para avaliar o impacto da ausência do gene *cfa* na tolerância ao estresse oxidativo (Figura 16). Os resultados demonstraram que a linhagem DM42 apresentou redução mais acentuada da densidade óptica em comparação à linhagem selvagem, particularmente na concentração intermediária de 0,6 mM de t-BOOH, indicando maior suscetibilidade ao estresse oxidativo induzido por hidroperóxidos orgânicos. Esses achados são consistentes com estudos que atribuem aos ácidos graxos ciclopropanos um papel estabilizador da bicamada lipídica (HORI *et al.*, 2025; CHEN; GÄNZLE, 2016; POGER; MARK, 2015). Esses dados reforçam os achados do ensaio de difusão em disco, sustentando a hipótese de que a enzima Cfa desempenha um papel relevante na proteção da membrana celular de *P. aeruginosa* frente a peróxidos orgânicos.

Embora os ensaios de difusão em disco e do ensaio de microdiluição tenham indicado maior susceptibilidade da linhagem DM42 ao t-BOOH, o *spot assay*, em contraste, não revelou diferenças visíveis entre as linhagens (Figura 17). Este fato pode sugerir que o tempo de contato das células com o t-BOOH de 30 minutos, antes de serem lavadas previamente à inoculação em placas LB, pode ter sido insuficiente para reproduzir o fenótipo de sensibilidade e mecanismos de reparo e adaptação podem ser suficientes para permitir a recuperação das células mutantes quando a exposição ao agente oxidante não é contínua. Desse modo, enquanto os ensaios realizados previamente evidenciaram alterações associadas ao crescimento e à tolerância ao estresse após um longo período de tempo em contato com o agente indutor de estresse, o *spot assay* refletiu predominantemente a capacidade de sobrevivência celular após breve contato com o t-BOOH (PARANOS; POURNARAS; MELETIADIS, 2024; WEENK, 2003).

Em conjunto, esses dados indicam que a enzima Cfa parece desempenhar um papel relevante na proteção das células de *P. aeruginosa* ao estresse oxidativo induzido por hidroperóxidos orgânicos, atuando principalmente na limitação de danos subletais e na manutenção do crescimento sob exposição prolongada a agentes oxidantes orgânicos. As diferenças observadas entre os ensaios se complementam refletindo a complexidade das

respostas bacterianas ao estresse oxidativo e a natureza multifacetada dos mecanismos de adaptação celular. Apesar disso, embora a maior sensibilidade do mutante DM42 ao t-BOOH aponte para um comprometimento da proteção lipídica, não foram obtidas evidências bioquímicas diretas que confirmem esse processo. Nesse sentido, a distinção entre um possível papel da Cfa na blindagem química contra a oxidação ou na manutenção da permeabilidade da membrana exigiria a aplicação de abordagens específicas, como o ensaio de oxidação ferro-xilenol laranja (FOX), que permite a quantificação direta de hidroperóxidos lipídicos (BANERJEE *et al.*, 2003). Esse ensaio se configura como uma perspectiva crucial para o aprofundamento futuro dessas questões levantadas.

Considerando que diferentes fontes de estresse oxidativo podem gerar espécies reativas com propriedades físico-químicas distintas e alvos celulares variados, expandimos nossas análises para ensaios baseados em terapia fotodinâmica (PDT) a qual permite a geração de ROS de forma dependente da combinação entre luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular (GILABERTE *et al.*, 2021). Após a absorção de luz em comprimento de onda apropriado, o FS é promovido a um estado excitado e, subsequentemente, a um estado triplete de vida longa, a partir do qual podem ocorrer reações fotoquímicas do Tipo I, envolvendo transferência de elétrons ou prótons e formação de radicais livres, ou do Tipo II, caracterizadas pela geração de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (ROA-TORT *et al.*, 2024). Diferentemente da adição exógena de peróxidos, a PDT promove a geração localizada e transitória de ROS, cuja natureza e reatividade dependem das propriedades físico-químicas do fotossensibilizador e do microambiente celular em que ele se acumula (SABINO *et al.*, 2022; CIEPLIK *et al.*, 2018). Em sistemas bacterianos, essa característica torna a terapia particularmente eficaz na investigação de danos ao envelope celular; FSs com afinidade por regiões hidrofóbicas ou que se ligam eletrostaticamente à célula tendem a direcionar a produção de ROS para a bicamada lipídica e proteínas de membrana (SABINO *et al.*, 2022). Exemplos clássicos de FS incluem o azul de metileno, que se associa eletrostaticamente à célula devido à sua natureza catiônica, e o rosa bengala, um composto aniônico com propriedades hidrofóbicas que influenciam sua localização e eficácia fotodinâmica (SEBRÃO *et al.*, 2017; ROSSONI *et al.*, 2010). As ROS produzidas resultam em peroxidação lipídica, degradação proteica e perda da integridade estrutural, culminando na ruptura da parede celular e morte microbiana (GILABERTE *et al.*, 2021)

Nossas investigações iniciais foram conduzidas utilizando o fotossensibilizador AM sob exposição à luz branca (Figura 18). Contudo, não foram observadas diferenças significativas na viabilidade das linhagens avaliadas entre os grupos tratados e os controles sem luz. Esse padrão de ausência de resposta diferencial persistiu mesmo frente às linhagens *E. coli* DH5 α (Figura 19) e *B. subtilis* (Figura 20), ensaios empregados para descartar variações específicas de linhagem. A literatura aponta que a eficácia do AM é estritamente dependente da correspondência espectral, com seu pico de absorção máximo situado no espectro vermelho (aproximadamente 660–664 nm). Embora as especificações técnicas do agitador Eppendorf Innova® S44i, o utilizado nos ensaios, indicam que o sistema de iluminação LED opera na faixa de luz visível "Daylight" (400–700 nm) ele concentra sua maior irradiância em comprimentos de onda mais curtos (azul e verde), com uma queda significativa de intensidade na região acima de 650 nm necessária para a ativação eficiente do AM. Já o RB, que apresenta um intenso pico de absorção no verde (540–550 nm), aproveitou de forma mais eficiente o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (150 PAR) fornecido pela plataforma, que atinge até 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PIKSA *et al.*, 2023; SEBRÃO *et al.*, 2017). Estudos presentes na literatura reforçam essa problemática, trabalhos como o de Sebrão *et al.* (2017) demonstraram que o AM falhou em reduzir significativamente a viabilidade bacteriana sob certas intensidades de laser, enquanto o RB obteve resultados superiores sob as mesmas condições. Em contraste, a eficácia do AM é reportada com sucesso apenas sob parâmetros otimizados, como no estudo de Songsantiphap *et al.* (2022), que alcançou a morte de bactérias gram-negativas utilizando altas fluências de luz vermelha, doses consideravelmente superiores às tipicamente fornecidas por bancos de LED instaladas em shakers convencionais. Dessa forma, os resultados consistentes obtidos com o RB fizeram com que esse PS fosse escolhido para os ensaios subsequentes.

A concentração de RB utilizada nos ensaios de terapia fotodinâmica foi definida com base em análises exploratórias do crescimento bacteriano sob diferentes concentrações do FS, na presença ou ausência de luz (Figura 21). Na ausência de iluminação, nenhuma das concentrações testadas afetou significativamente o crescimento das linhagens, indicando que RB não apresenta toxicidade relevante sem ativação luminosa. Esse comportamento é ideal para um FS, garantindo que o efeito deletério seja estritamente mediado por processos fotoquímicos e não por toxicidade intrínseca do corante. Em contraste, sob exposição à luz, observou-se uma redução dependente da concentração na densidade óptica, evidenciando o efeito fotodinâmico do composto. A partir de 10 μM , esse efeito tornou-se suficientemente para revelar diferenças entre as linhagens, enquanto concentrações mais elevadas resultaram em inibição severa do

crescimento de ambos os genótipos, limitando a distinção fenotípica. Assim, a concentração de 10 μM foi selecionada por representar uma condição capaz de evidenciar alterações associadas à resposta ao estresse oxidativo.

Os ensaios de curva de crescimento realizados com 10 μM de RB corroboraram essa interpretação (Figura 22). Na ausência de iluminação, todas as linhagens exibiram perfis de crescimento semelhantes, enquanto, por outro lado, sob exposição à luz observou-se uma redução acentuada do crescimento em todas as linhagens. Nesse contexto, a linhagem *Acfa* apresentou crescimento severamente comprometido ao longo de todo o período avaliado, enquanto a linhagem selvagem e a linhagem complementada mantiveram crescimento residual, indicando maior susceptibilidade da linhagem deficiente em ciclopropanação aos danos oxidativos induzidos pela terapia fotodinâmica.

Visto que o RB possui um alto rendimento de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), sua eficácia é classicamente associada ao mecanismo do Tipo II (SEBRÃO *et al.*, 2017). Para investigar se a vulnerabilidade da linhagem *Acfa* está vinculada especificamente a essa espécie reativa, foram realizados também com a adição de AS, um sequestrador seletivo de oxigênio singlete (VARGAS; LEÓN, 2024). A persistência ou atenuação do fenótipo diferencial na presença deste scavenger permitiu inferir a contribuição relativa do $^1\text{O}_2$.

Inicialmente foi necessária a definição de uma concentração de azida sódica que não compromettesse significativamente o crescimento bacteriano (Figura 23). Ensaios iniciais indicaram que concentrações mais elevadas de AS promoveram redução acentuada do crescimento, tanto isoladamente quanto em combinação com RB, refletindo seu conhecido efeito inibitório sobre a respiração celular (HARTL *et al.*, 2023). Observou-se ainda que a associação entre RB e AS, especialmente em concentrações mais elevadas do inibidor, resultou em redução adicional do crescimento em comparação ao tratamento com RB isoladamente, sugerindo um efeito cumulativo dessas condições sobre a fisiologia celular. Como as menores concentrações apresentaram menos impacto sobre a densidade óptica final, a concentração de 0,25 mM de AS foi escolhida para dar prosseguimento aos ensaios de curva na presença simultânea de RB em 10 μM e AS em 0,25 mM (Figura 24).

Foi observado no ensaio de curva de crescimento que, na ausência de iluminação, todas as linhagens apresentaram perfis de crescimento semelhantes, indicando que a combinação de RB e AS não compromete a viabilidade celular. Já na presença de luz observou-se redução do

crescimento em todas as linhagens. Contudo, a linhagem *Δcfa* apresentou inibição do crescimento acentuado, superior à apresentada pelas demais linhagens e persistente longo de todo o período avaliado. A manutenção desse fenótipo sugere que a maior sensibilidade de *Δcfa* na presença de RB sob efeito de luz não depende exclusivamente do oxigênio singlete, tradicionalmente associado a reações do Tipo II na terapia fotodinâmica, mas indicam que outras espécies reativas de oxigênio, possivelmente geradas por transferência de elétrons (reações do Tipo I), ou ainda efeitos combinados de estresse oxidativo, possam contribuir para o dano celular observado (FIEGLER-RUDOL *et al.*, 2025). De modo geral, a maior suscetibilidade de *Δcfa* reforça a hipótese de que a ciclopropanação de ácidos graxos de membrana desempenha um papel importante, porém de proteção indireta, contra ROS geradas localmente (SABINO *et al.*, 2022). De acordo com Sabino *et al.* (2022), o principal motivo de morte durante a PDT não se refere à perda da integridade da membrana mas sim a carbonilação irreversível e degradação dose dependente de proteínas vitais. Sendo assim, a ausência de anéis ciclopropanos pode deixar a membrana celular mais suscetível aos danos que ligações duplas e deixar o proteoma celular exposto ao ataque de ROS, o que pode acarretar em um colapso acelerado do metabolismo celular.

Considerando que os ensaios baseados em PDT indicaram a predominância de reações do Tipo I, avaliamos o impacto do radical ânion superóxido ($O^{\bullet-}$) sobre as linhagens estudadas. Com esse objetivo utilizamos o paraquat, indutor clássico de $O^{\bullet-}$ de forma contínua e independente de luz (MARTINS *et al.*, 2020). Com base em ensaios exploratórios iniciais, a concentração de 10 mM foi empregada nos ensaios subsequentes de curva de crescimento (Figura 25). Nessas condições o paraquat comprometeu o crescimento de todas as linhagens, possivelmente em razão da inativação de proteínas e danos oxidativos generalizados causados pelo $O^{\bullet-}$ gerado, algo já observado na literatura (DA CRUZ NIZER *et al.*, 2021; HARE *et al.*, 2011). Porém DM42 apresentou redução mais acentuada e consistente da densidade óptica ao longo do tempo em comparação à linhagem selvagem. A vulnerabilidade da linhagem mutante reforça que, a ausência da ciclopropanação parece comprometer ajustes adaptativos normalmente ativados em resposta ao estresse oxidativo, como a modulação da permeabilidade do envelope celular frente ao acúmulo de espécies reativas, como o $O^{\bullet-}$ (MARTINS *et al.*, 2020). Como consequência, o $O^{\bullet-}$ tende a se propagar de forma mais eficiente para compartimentos intracelulares, intensificando danos a alvos citoplasmáticos, incluindo a carbonilação de proteínas e a perda progressiva de atividades enzimáticas essenciais, conforme

citado anteriormente (SABINO *et al.*, 2022). Uma perspectiva futura para o aprofundamento deste estudo será a investigação das modificações nos lipídeos em culturas tratadas com paraquat através da RMN. Esses experimentos permitirão analisar se a ciclopropanação atua como uma blindagem química estável ou se a estrutura do anel é modificada ou degradada pelo tratamento com RB na presença de luz ou diretamente pelo radical ânion superóxido.

Diante da evidência de que a ausência de ciclopropanação compromete a resposta de *P. aeruginosa* a diferentes fontes de estresse oxidativo, tanto químico quanto fotoinduzido, investigamos se essa vulnerabilidade se estenderia a outros desafios que têm a membrana bacteriana como principal alvo. Nesse contexto, foram realizados ensaios de difusão em disco com dois antibióticos, cujo alvo celular, é a membrana plasmática e são eficazes contra bactérias gram negativas, a colistina (polimixina E) e a polimixina B (HAN *et al.*, 2018; SRINIVAS; RIVARD, 2017). As polimixinas são peptídeos catiônicos que interagem eletrostaticamente com componentes aniônicos da membrana externa, particularmente o lipopolissacarídeo, promovendo desorganização da bicamada, aumento da permeabilidade e, em concentrações suficientes, lise celular (DA SILVA, 2018; HAN *et al.*, 2018). Considerando que a ciclopropanação influencia propriedades físico-químicas da membrana, se hipotetizou que sua ausência poderia alterar a resposta bacteriana a agentes antimicrobianos dependentes da integridade do envelope. Dessa forma, a avaliação da sensibilidade às polimixinas em diferentes fases de crescimento buscou detectar possíveis efeitos associados à ausência da ciclopropanação.

Em ambas as condições realizadas para o ensaio de difusão em disco com a colistina e a polimixina B (fase exponencial e estacionária), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre a linhagem selvagem e a linhagem DM42, independentemente do antibiótico avaliado (Figura 26 e Figura 27). Esse resultado indica que, nas condições experimentais empregadas, a ausência de ciclopropanação dos ácidos graxos não alterou de forma detectável a suscetibilidade de *P. aeruginosa* às polimixinas testadas, sugerindo que o papel de Cfa na manutenção da integridade da membrana possa estar mais diretamente relacionado à tolerância ao estresse oxidativo do que à resistência basal a antibióticos que atuam por desorganização do envelope celular. Entretanto, é fundamental considerar que a formação de ácidos graxos ciclopropanos promove a ordenação das cadeias acil na bicamada lipídica, o que aumenta a rigidez estrutural e a estabilidade química da membrana interna sem comprometer significativamente sua fluidez e permeabilidade (CRONAN; LUK, 2022). A ausência de diferenças de sensibilidade às polimixinas observada

neste trabalho pode ser explicada pelo fato de que esses antibióticos atuam majoritariamente na membrana externa, por meio da interação eletrostática com o LPS. Ainda que haja evidências de que uma fração de fosfolipídeos ciclopropanados possa ser transportada da membrana interna para a face interna da membrana externa, esse processo parece não ser suficiente para alterar de maneira mensurável a ação das polimixinas nas condições avaliadas (HORI *et al.*, 2025). Outros antibióticos cuja eficácia dependa da difusão passiva através da bicamada lipídica podem ser mais sensíveis a alterações da membrana interna decorrentes da ciclopropanação (JIANG *et al.*, 2019; HAN *et al.*, 2018). Em outros patógenos, como *H. pylori* e *S. enterica*, a deleção do gene *cfa* está associada ao aumento da permeabilidade da membrana e à maior suscetibilidade a antibióticos como ampicilina e claritromicina (KARLINSEY *et al.*, 2022; JIANG *et al.*, 2019). Desse modo, os dados aqui obtidos nesse trabalho não excluem um papel da ciclopropanação na modulação da sensibilidade a antibióticos, mas indicam que esse efeito pode ser dependente da classe do fármaco e do compartimento do envelope celular que constitui seu principal alvo, reforçando a necessidade de ensaios adicionais com antibióticos com diferentes mecanismos de entrada e ação.

Embora o foco central deste trabalho fosse compreender a contribuição da ciclopropanação dos lipídios de membrana durante o estresse oxidativo, os relatos de que esta modificação pós-sintética afeta a tolerância a outros tipos de estresse em diversos microrganismos motivaram a ampliação do escopo. Para avaliar alterações globais na estabilidade do envelope celular e na homeostase bacteriana, foram realizados ensaios de crescimento celular sob estresse osmótico induzido por sacarose, variações de pH em meios não tamponados e diferentes temperaturas (HORI *et al.*, 2025; JIANG *et al.*, 2019; POGGER; MARK, 2015; KANEDA, 1991).

Não foram observadas diferenças significativas no perfil de crescimento entre as linhagens selvagem e DM30 nos parâmetros avaliados (Figura 28, Figura 29 e Figura 30). Esses resultados indicam que a ausência de ciclopropanação não compromete a tolerância a estresses físico-químicos gerais nas condições testadas, sugerindo que o papel da Cfa não está relacionado a ajustes basais da homeostase celular. Ressalta-se, entretanto, que os ensaios não foram exaustivamente dissecados pela falta de tempo. Por exemplo, os ensaios para avaliar o crescimento em pH ácido foram conduzidos em meio não tamponado, o que permite variações dinâmicas de pH ao longo do crescimento e pode atenuar a detecção de efeitos sutis associados à adaptação celular. Em conjunto, esses dados reforçam que os fenótipos observados neste

trabalho estão associados a desafios que envolvem dano oxidativo e à geração de espécies reativas que interagem diretamente com a bicamada lipídica.

Tendo em vista que a ciclopropanação pode afetar a virulência de outros microrganismos (KARLINSEY et al., 2022; JIANG et al., 2019; GLICKMAN; COX; JACOBS JR., 2000). Para explorar essa possibilidade foram realizados ensaios iniciais de virulência no modelo *in vivo* de *G. mellonella*, larva que tem sido amplamente adotada como um modelo de infecção robusto, econômico, livre de restrições éticas e que apresenta notável semelhança funcional entre seus hemócitos e os fagócitos de mamífero (Figura 31) (MÉNARD *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2020). Estudos identificaram a presença de proteínas homólogas aos componentes do complexo NADPH oxidase humano (como p47, p67 e gp91phox) nos hemócitos da larva. No entanto, é importante ressaltar que, embora o surto oxidativo seja um mecanismo imunitário central documentado neste modelo, a caracterização molecular exata da maquinaria responsável pela produção de ROS ainda carece de evidências definitivas em comparação ao sistema humano (BISMUTH *et al.*, 2021; TSAI; LOH; PROFT, 2016).

Os ensaios de infecção em *G. mellonella* evidenciaram a virulência de *P. aeruginosa*, uma vez que todas as linhagens bacterianas promoveram redução da sobrevivência das larvas em relação ao grupo controle, tanto no menor quanto no maior inóculo testado. O aumento da carga bacteriana intensificou a mortalidade, conforme esperado, porém esse efeito ocorreu de forma semelhante entre as linhagens avaliadas. Não foram observadas diferenças notáveis entre as curvas de sobrevivência entre as linhagens selvagem e DM30, indicando que a ausência de ciclopropanação de ácidos graxos não impacta de maneira detectável a virulência global de *P. aeruginosa* nesse modelo. Esses resultados sugerem que o papel da Cfa pode estar associado à respostas específicas a desafios oxidativos ou ainda que a linhagem mutante possa possuir mecanismos compensatórios para lidar com o estresse oxidativo imposto pelas células de defesa da larva. Em certos casos, genes essenciais para resistir a estresses específicos *in vitro* mostraram-se dispensáveis para a virulência global *in vivo*, possivelmente porque a bactéria altera seu perfil de expressão gênica ao interagir com o hospedeiro (MÉNARD *et al.*, 2021). Sendo assim, mais ensaios são necessários para elucidar de forma mais abrangente o papel da ciclopropanação de ácidos graxos na virulência de *P. aeruginosa*.

6. CONCLUSÃO

- A estratégia de deleção por troca alélica promoveu com sucesso a remoção da região cromossômica contendo o gene *cfa*, conforme confirmado por análises de PCR.

- A análise por RMN confirmou de forma inequívoca a presença de ciclopropanação de ácidos graxos, por meio da detecção dos sinais característicos dos prótons do anel de ciclopropano.
- A extração utilizando metanol e clorofórmio na proporção 2:1 (v/v) mostrou-se a condição ideal para a preservação e detecção desses sinais espectrais, consolidando-se como metodologia robusta para esse tipo de análise em *P. aeruginosa*.
- Os resultados demonstram de forma conclusiva que *P. aeruginosa* PA14 possui um único gene funcional responsável pela ciclopropanação de ácidos graxos, confirmando *cfa* como a ciclopropano sintase ativa nessa linhagem.
- A expressão de *cfa* é modulada pela densidade celular, sendo parcialmente controlada transcricionalmente pelo regulador LasR, um dos principais componentes do sistema de quorum sensing
- Os perfis de crescimento foram semelhantes entre as linhagens selvagem e Δcfa em meio rico e em meio mínimo com diferentes fontes de carbono, indicando que a ausência de ciclopropanação não compromete a cinética de crescimento nas condições testadas.
- A sensibilidade de Δcfa ao estresse oxidativo induzido por hidroperóxidos orgânicos, indica que a ciclopropanação contribui para a tolerância a agentes oxidantes hidrofóbicos.
- O Azul de Metileno não induziu diferenças fenotípicas detectáveis entre as linhagens, indicando baixa eficiência fotodinâmica nas condições experimentais avaliadas.
- O Rosa Bengala promoveu inibição do crescimento dependente de luz, com maior sensibilidade da linhagem Δcfa ; a persistência desse fenótipo na presença de azida sódica indica predominância de reações fotodinâmicas do tipo I.
- O paraquat reproduziu o padrão de sensibilidade observado na terapia fotodinâmica, com efeito mais pronunciado na linhagem Δcfa , sustentando que espécies radiculares, particularmente o radical ânion superóxido, são os principais mediadores do maior dano oxidativo observado na linhagem com ausência de ciclopropanação.
- Não foram observadas diferenças significativas na sensibilidade às polimixinas entre as linhagens selvagem e Δcfa , sugerindo que a ciclopropanação não influencia de forma detectável a suscetibilidade à antibióticos que atuam diretamente sobre a membrana externa.

- A ausência de ciclopropanação não alterou o crescimento bacteriano sob estresse osmótico, variações de pH ou temperatura, indicando que a função da enzima Cfa não está associada à manutenção global da homeostase celular.
- Nas condições avaliadas, não foram observadas diferenças significativas de virulência entre as linhagens selvagem e *Δcfa*, indicativo de que a ciclopropanação não impacta na virulência nesse modelo experimental, embora estudos adicionais sejam necessários.
- Em conjunto, os resultados indicam que a ciclopropanação de ácidos graxos desempenha um papel relevante na tolerância ao estresse oxidativo em *P. aeruginosa*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. *et al.* Modifications in membrane fatty acid composition of Salmonella Typhimurium in response to growth conditions and their effect on heat resistance. International Journal of Food Microbiology, v. 123, n. 3, p. 212–219, 2008

ANDRÉS, C. M. C. *et al.* Chemistry of hydrogen peroxide formation and elimination in mammalian cells, and its role in various pathologies. Stresses, v. 2, p. 256–274, 2022.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2014, p. 360438, 2014.

BAEHNER, R. L. *et al.* The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in phagocytosis-associated oxidative metabolic reactions. Journal of Clinical Investigation, v. 56, n. 3, p. 571–576, 1975.

BAKER, L. Y. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* responds to exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by modifying phospholipid composition, membrane permeability, and phenotypes associated with virulence. BMC Microbiology, v. 18, n. 1, p. 117, 2018.

BANERJEE, D. *et al.* Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine. Clinica Chimica Acta, v. 337, n. 1–2, p. 147–152, 2003

BECHER, A.; SCHWEIZER, H. P. Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal lacZ and lux gene fusions. BioTechniques, v. 29, n. 5, p. 948–950, 952, 2000.

BENAMARA, H. *et al.* Characterization of membrane lipidome changes in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm growth on glass wool. PLoS One, v. 9, n. 9, e108478, 2014.

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

BIANCO, C. M.; FRÖHLICH, K. S.; VANDERPOOL, C. K. Bacterial cyclopropane fatty acid synthase mRNA is targeted by activating and repressing small RNAs. Journal of Bacteriology, v. 201, n. 19, e00461-19, 2019.

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, p. 640112, 2021.

CECARINI, V. *et al.* Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research, v. 1773, n. 2, p. 93–104, 2007.

ÇETINER, U. *et al.* Tension-activated channels in the mechanism of osmotic fitness in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of General Physiology, v. 149, n. 5, p. 595–609, 2017.

CHANG, Y. Y.; CRONAN, J. E. Jr. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology, v. 33, n. 2, p. 249–259, 1999.

CHAO, J.; WOLFAARDT, G. M.; ARTS, M. T. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures. Canadian Journal of Microbiology, v. 56, n. 12, p. 1028–1039, 2010.

CHEN, Y. Y.; GÄNZLE, M. G. Influence of cyclopropane fatty acids on heat, high pressure, acid and oxidative resistance in *Escherichia coli*. International Journal of Food Microbiology, v. 222, p. 16–22, 2016.

CHIANG, S. M.; SCHELLHORN, H. E. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 525, n. 2, p. 161–169, 2012.

CIEPLIK, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 44, n. 5, p. 571–589, 2018.

CIOFU, O. *et al.* Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 6, p. 2276–2282, 2005.

COSTERTON, J. W. *et al.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

CRONAN, J. E.; LUK, T. Advances in the structural biology, mechanism, and physiology of cyclopropane fatty acid modifications of bacterial membranes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 86, n. 2, p. e00013-22, 2022.

CRONE, S. *et al.* The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*, v. 128, n. 3, p. 220–231, 2020.

DA CRUZ NIZER, W. S. *et al.* Oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens*, v. 10, n. 9, p. 1187, 2021.

DA SILVA, G. J.. Resistência à colistina e sua disseminação: implicações em saúde pública. *Revista Portuguesa de Farmacoterapia*, v. 10, n. 1, p. 47–52, 2018.

DAVENPORT, P. W.; GRIFFIN, J. L.; WELCH, M. Quorum sensing is accompanied by global metabolic changes in the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, v. 197, n. 12, p. 2072–2082, 2015.

DAVIES, J. C. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatric Respiratory Reviews*, v. 3, n. 2, p. 128–134, 2002.

DAVIES, O. L. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. Acesso em: 13 de janeiro. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

DOLEIDEN, F. H. *et al.* Reactivity of cholesterol and some fatty acids toward singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, v. 20, n. 6, p. 519–521, 1974.

DRISCOLL, J. A.; BRODY, S. L.; KOLLEF, M. H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, v. 67, p. 351–368, 2007.

DUBOVSKIY, I. M. *et al.* Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 148, n. 1, p. 1–5, 2008.

DURÁN, O. *et al.* Pyoverdine as an important virulence factor in *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance. In: *The global antimicrobial resistance epidemic: innovative approaches and cutting-edge solutions*. Londres: IntechOpen, 2022.

ELFADADNY, A. *et al.* Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1374466, 2024.

ELTEMUR, D. *et al.* Improved detection and quantification of cyclopropane fatty acids via homonuclear decoupling double irradiation NMR methods. *ACS Omega*, v. 8, n. 44, p. 41835–41843, 2023.

EMWAS, A. H. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods in Molecular Biology*, v. 1277, p. 161–193, 2015.

EZEDURU, V. *et al.* Defining the functional properties of cyclopropane fatty acid synthase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 300, n. 9, p. 107618, 2024.

FARLEY, K. R. *et al.* Small RNAs positively and negatively control transcription elongation through modulation of Rho utilization site accessibility. *mBio*, v. 16, n. 12, e02921-25, 2025

FIEGLER-RUDOL, J. *et al.* Evaluating the efficacy of Rose Bengal as a photosensitizer in antimicrobial photodynamic therapy against *Candida albicans*: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, p. 5034, 2025.

FOULKES, D. M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU as a therapeutic target in the treatment of bacterial infections. *Microorganisms*, v. 7, n. 12, p. 707, 2019.

FRÖHLICH, K. S. *et al.* A small RNA activates CFA synthase by isoform-specific mRNA stabilization. *EMBO Journal*, v. 32, n. 22, p. 2963–2979, 2013.

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, 2013.

GHORBAL, S. K. *et al.* Changes in membrane fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* in response to UV-C radiations. *Current Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 112–117, 2013.

GHSSEIN, G.; EZZEDDINE, Z. A review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology*, v. 11, p. 1711, 2022.

GILABERTE, Y. *et al.* Editorial: Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Paradigm in the Fight Against Infections. *Frontiers in Medicine*, v. 8, 788888, 2021.

GLICKMAN, M. S.; COX, J. S.; JACOBS, W. R. Jr. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Cell*, v. 5, n. 4, p. 717–727, 2000.

GROGAN, D. W.; CRONAN, J. E. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, n. 4, p. 429–441, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 3, n. 5, p. 436–450, 2004.

HAN, M. L. *et al.* Alterations of metabolic and lipid profiles in polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 6, e02656-17, 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, 2011.

HARTL, S. L. *et al.* How azide ion/hydrazoic acid passes through biological membranes: an experimental and computational study. *Protein Journal*, v. 42, p. 229–238, 2023.

HAUSER, A. R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 9, p. 654–665, 2009.

HENTZER, M.; GIVSKOV, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 9, p. 1300–1307, 2003.

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, 2010.

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, 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, 2000.

HOIBY, N. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, n. 4, p. 322–332, 2010.

HORI, K. *et al.* Regulation of membrane protein activity by cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* lipid environment. *Communications Biology*, v. 8, p. 1852, 2025.

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, 2013.

JIANG, X. *et al.* The cyclopropane fatty acid synthase mediates antibiotic resistance and gastric colonization of *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, v. 201, n. 20, e00374-19, 2019.

JIMENEZ, P. N. *et al.* The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 76, n. 1, p. 46–65, 2012.

JUAN, C. A. *et al.* The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 9, p. 4642, 2021.

JUNQUEIRA, J. C. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence*, v. 3, n. 6, p. 474–476, 2012.

KANEDA, T.. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews*, v. 55, n. 2, p. 288–302, 1991.

KARLINSEY, J. E. *et al.* Cyclopropane fatty acids are important for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. *Infection and Immunity*, v. 90, n. 1, e00479-21, 2022.

KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 28, n. 1, p. 101–112, 2004.

KESSLER, E. *et al.* Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 46, p. 30225–30231, 1998.

KIM, B. H. *et al.* The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, v. 151, n. 1, p. 209–218, 2005.

KIM, S. *et al.* Role of *Pseudomonas aeruginosa* DesB in adaptation to osmotic stress. *Journal of Food Protection*, v. 82, n. 8, p. 1278–1282, 2019.

KNOTHE, G. NMR characterization of dihydrosterculic acid and its methyl ester. *Lipids*, v. 41, n. 4, p. 393–396, 2006

KORESSAAR, T.; REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, v. 23, n. 10, p. 1289–1291, 2007.

LAMONT, I. L. *et al.* Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 10, p. 7072–7077, 2002.

LEE, D. G. *et al.* Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 103, n. 13, p. 5085–5090, 2006.

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, 2005.

LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, v. 6, n. 1, p. 26–41, 2015.

LETIZIA, M.; DIGGLE, S. P.; WHITELEY, M. *Pseudomonas aeruginosa*: ecology, evolution, pathogenesis and antimicrobial susceptibility. *Nat Rev Microbiol*, v. 23, p. 701–717, 2025.

LIAO, C. *et. al.* Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, p. 926758, 2022.

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

LIN, J.; CHENG, J. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship to biofilm development. In: *ACS Symposium Series*. Washington, DC: American Chemical Society, 2019. p. 1–16.

LIN, J.; HUANG, S.; ZHANG, Q. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 3, p. 325–331, 2002.

LOLLI, V. *et al.* Determination of cyclopropane fatty acids in food of animal origin by ¹H NMR. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v. 2018, art. 8034042, 2018

LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, v. 66, n. 5, p. 476–489, 2001.

MAITI, A.; KUMAR, A.; DASCHAKRABORTY, S. How do cyclopropane fatty acids protect the cell membrane of *Escherichia coli* in cold shock? *Journal of Physical Chemistry B*, v. 127, n. 7, p. 1607–1617, 2023

MARTINS, D. *et al.* Sublethal paraquat confers multidrug tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* by inducing superoxide dismutase activity and lowering envelope permeability. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 576708, 2020.

MASHIMA, R.; OKUYAMA, T. The role of lipoxygenases in pathophysiology: new insights and future perspectives. *Redox Biology*, v. 6, p. 297–310, 2015.

MASLOVSKA, O.; KOMPLIKEYCH, S.; HNATUSH, S. Oxidative stress and protection against it in bacteria. *Studia Biologica*, v. 17, n. 2, p. 153–172, 2023.

MÉNARD, G. *et al.* *Galleria mellonella* as a suitable model of bacterial infection: past, present and future. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 2021.

MEYER, J. M. *et al.* Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, v. 64, n. 2, p. 518–523, 1996.

MEYERSTEIN, D. Re-examining Fenton and Fenton-like reactions. *Nature Reviews Chemistry*, v. 5, p. 595–597, 2021.

MICHALSKA, M.; WOLF, P. *Pseudomonas* exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 2015.

MILLER, J. H. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.

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, p. 39, 2017.

MORELLO, E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase LoxA contributes to lung infection by altering the host immune lipid signaling. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, art. 1826, 2019.

MUÑOZ-ROJAS, J. *et al.* Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 1, p. 472–477, 2006.

MURRAY, C. J L *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, v. 399, n. 10325, p. 629–655, fev. 2022.

MURPHY, M. P. *et al.* Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, v. 4, p. 651–662, 2022.

NG, S. C. W. *et al.* Free radical chain reactions and polyunsaturated fatty acids in brain lipids. *ACS Omega*, v. 7, n. 29, p. 25337–25345, 2022.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 4, p. 593–656, 2003.

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, 2001.

PALLERONI, N. J. The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 6, p. 1377–1383, 2010.

PARANOS, P.; POURNARAS, S.; MELETIADIS, J. A single-layer spot assay for easy, fast, and high-throughput quantitation of phages against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 62, e00743-24, 2024.

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, ftaa056, 2020.

PIKSA, M. *et al.* The role of the light source in antimicrobial photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, v. 52, p. 1697–1722, 2023.

PINI, C. V. *et al.* Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Microbial Biotechnology*, v. 2, n. 2, p. 253–261, 2009.

PINI, C. V. *et al.* Regulation of the cyclopropane synthase *cfaB* gene in *Pseudomonas putida* KT2440. *FEMS Microbiology Letters*, v. 321, n. 2, p. 107-114, 2011

POGER, D.; MARK, A. E. A ring to rule them all: the effect of cyclopropane fatty acids on the fluidity of lipid bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 119, n. 17, p. 5487–5495, 2015.

RAHME, L. G. *et al.* Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science, New York*, v. 268, n. 5219, p. 1899–1902, 1995.

ROA-TORT, K. *et al.* In vitro antimicrobial photodynamic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) inhibition using a green light source. *Pharmaceutics*, v. 16, p. 518, 2024.

ROSSONI, R. D. *et al.* Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae. *Lasers in Medical Science*, v. 25, n. 4, p. 581–586, 2010.

RUSTAM, Y. H.; REID, G. E. Analytical challenges and recent advances in mass spectrometry based lipidomics. *Analytical Chemistry*, v. 90, n. 1, p. 374–397, 2018.

SABINO, C. P. *et al.* The Biochemical Mechanisms of Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 99, n. 2, p. 742–750, 2022.

SCHUSTER, M.; GREENBERG, E. P. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 296, n. 2–3, p. 73–81, 2006.

SEBRÃO, C. C. N. *et al.* Comparison of the efficiency of Rose Bengal and Methylene Blue as photosensitizers in photodynamic therapy techniques for *Enterococcus faecalis* inactivation. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 35, n. 1, p. 18–23, 2017.

SHABALA, L.; ROSS, T. Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H⁺ and enhanced ability to extrude H⁺. *Research in Microbiology*, v. 159, n. 6, p. 458–461, 2008.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, n. 5, a000414, 2010.

SLAWSON, V.; STEIN, R. A. Comparative autoxidative susceptibility of fatty esters with 0–6 methylene-interrupted double bonds. *Lipids*, v. 5, p. 713–717, 1970.

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin resistance in Gram-negative pathogens. *Current Infectious Disease Reports*, v. 19, n. 11, 2017. DOI: 10.1007/s11908-017-0596-3.

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

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

STOVER, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, v. 406, n. 6799, p. 959–964, 2000.

TSAI, C. J.; LOH, J. M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016.

VARGAS, F. R.; LEÓN, M. D. Unraveling the mechanisms of light-induced hemolysis by first transition metal phthalocyanines. *Archives of Advances in Biosciences*, v. 15, e45066, 2024.

WAND, M. E. *et al.* Use of the *Galleria mellonella* infection model to study the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Virulence*, Austin, v. 7, n. 3, p. 210–213, 2016.

WANG, A. Y.; CRONAN, J. E. Jr. The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS (KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. *Molecular Microbiology*, v. 11, n. 6, p. 1009–1017, 1994.

WEENK, G. H. Microbiological assessment of culture media: comparison and statistical evaluation of methods. In: *PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY*. Amsterdam: Elsevier, 2003. p. 1–23.

WEIMANN, A. *et al.* Evolution and host-specific adaptation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, v. 385, eadi0908, 2024.

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

WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*, v. 12, n. 2, p. 182–191, 2009.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annual Review of Biochemistry*, v. 85, n. 1, p. 765–792, 2016.

ZHANG, Y. M.; ROCK, C. O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 222–233, 2008

ZHU, K. *et al.* Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, v. 60, n. 2, p. 260–273, 2006.