



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANE STÉFANO SIMIONATO

**SEQUENCIAMENTO E MONTAGEM *DE NOVO* DO GENOMA
TOTAL DE *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV E ANÁLISE
DA EXPRESSÃO GÊNICA TEMPORAL E DIFERENCIAL NA
PRESENÇA DE COBRE**

ANE STÉFANO SIMIONATO

**SEQUENCIAMENTO E MONTAGEM *DE NOVO* DO GENOMA
TOTAL DE *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV E ANÁLISE
DA EXPRESSÃO GÊNICA TEMPORAL E DIFERENCIAL NA
PRESENÇA DE COBRE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Simionato, Ane Stéfano.

Sequenciamento e montagem de novo do genoma total de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV e análise da expressão gênica temporal e diferencial na presença de cobre / Ane Stéfano Simionato. - Londrina, 2020.
86 f.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Sequenciamento de Nova Geração - Tese. 2. RT-qPCR - Tese. 3. Fenazina - Tese. 4. Fluopsina C - Tese. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

ANE STÉFANO SIMIONATO

**SEQUENCIAMENTO E MONTAGEM *DE NOVO* DO GENOMA
TOTAL DE *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV E ANÁLISE
DA EXPRESSÃO GÊNICA TEMPORAL E DIFERENCIAL NA
PRESENÇA DE COBRE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcos Pileggi
Universidade Estadual de Ponta Grossa –
UEPG

Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo
Universidade de São Paulo – USP

Londrina, 06 de novembro de 2020.

Dedico este trabalho aos primeiros pesquisadores formidáveis que conheci, meus pais: Eliane e Luis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar, dar forças nos momentos difíceis e por permitir que vivesse mais essa experiência.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade, pela oportunidade de poder fazer parte da família LEM desde a minha graduação, incentivando e permitindo me desenvolver como pesquisadora científica. Obrigada por me mostrar o mundo da microbiologia, pelos diversos aprendizados, experiências e oportunidades que me moldaram e me tornaram uma pesquisadora melhor.

À técnica de laboratório Marta de Almeida, pela pronta disponibilidade em ajudar nas mais diversas etapas deste projeto, pela companhia nas viagens e por todo apoio desde que entrei no laboratório.

À Prof. Dra. Bárbara Gionco Cano, pelas orientações que foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho, pelos conselhos e exemplos que sempre me guiaram, e vão continuar me guiando, tanto na vida profissional como pessoal. Obrigada por tudo, sempre!

A todos do Laboratório de Ecologia Microbiana que passaram ao longo destes 10 anos, que de forma direta e indireta me ajudaram e apoiaram em todos os momentos, desde os experimentos madrugada adentro aos momentos de descontração. Seria impossível citar o nome de todos, mas saibam que sou extremamente grata a cada um de vocês que passaram pela minha vida, vocês foram fundamentais. “Uma vez LEM, sempre LEM!”

Aos meus colegas de doutorado/laboratório e amigos André Barazetti e Janaína Emiliano, que desde o início desta jornada estiveram do meu lado, me ajudando, incentivando e dando forças para chegar até o fim. Muito obrigada!

Ao meu amigo-irmão Miguel Octavio Pèrez Navarro, que desde o começo estive ao meu lado desenvolvendo as ideias mais malucas em busca de compreender o metabolismo da LV, purificar e identificar a Fluopsina C. Que jornada incrível! Obrigada pelos conselhos, puxões de orelha e momentos de diversão!

Aos amigos que o LEM trouxe para a vida: Alejandra, Erika, Fernando, Igor, Stheace, Matheus e Vanessa, que tornaram esses quatro anos mais leves e divertidos!

A todos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismo - UEL, principalmente às Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta e Prof. Dra. Lucy Megumi Yamauchi por abrirem as portas do laboratório e pelas importantes contribuições para que este trabalho se realizasse, e ao Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares e à técnica Ms. Jussevania Pereira Santos pelos ensinamentos e auxílios durante a execução dos experimentos de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza pelas importantes sugestões e ajudas nas análises de bioinformática.

À Dra. Mariangela Hungria e ao técnico Dr. Renan Augusto Ribeiro pela ajuda na execução em todas as etapas do sequenciamento genético.

Aos meus amigos Carol Polano, Caroline Santos, Flávio e Viviana Celly que mesmo de longe, e graças à tecnologia, estiveram próximos me incentivando e comemorando comigo cada etapa.

A minha família londrinense: Carol Conchon, Carolina Higashi, Luiza, Maria Thereza e Milton, por estarem como sempre ao meu lado, prontos a ajudar e comemorar!

Ao meus pais, Eliane e Luis Simionato, que vibraram comigo a cada conquista e que jamais me deixaram desistir do meu sonho de ser cientista. Obrigada por todo amor, compreensão, apoio e por manterem meus pés no chão! Devo tudo a vocês!

Aos professores e coordenadores do programa de pós-graduação em microbiologia da Universidade Estadual de Londrina por ajudarem e fornecerem condições para a realização deste estudo.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto “Antibiótico produzido por *Pseudomonas aeruginosa* Cepa LV: ensaio clínico e obtenção do produto contra bactérias multiresistentes *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*” (Chamada AMR MCTIC/Processo 439754/2018-6) do qual esta tese faz parte e a CAPES pela concessão de bolsa (CAPES, Código Financeiro 01) por tornarem este estudo possível.

E muito obrigada a todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram nas pesquisas e experimentos realizados neste projeto.

“O conhecimento é o olho do desejo e
pode se tornar o piloto da alma.”

Will Durant

SIMIONATO, A.S. **Sequenciamento e montagem *de novo* do genoma total de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV e análise da expressão gênica temporal e diferencial na presença de cobre.** 2020. 85 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é amplamente dispersa na natureza, devido principalmente à sua alta capacidade adaptativa. Dentre as diversas estratégias de adaptação está a produção de metabólitos bioativos que podem inibir o crescimento ou metabolismo de outros microrganismos. *P. aeruginosa* cepa LV produz diversos compostos bioativos, entre eles um composto organometálico, identificado como Fluopsina C, produzido somente na presença de cobre, que apresenta alto potencial biotecnológico. Entretanto, poucos são os relatos sobre esta molécula, não havendo informações relacionadas à sua biossíntese e rota metabólica. O objetivo deste trabalho foi realizar o sequenciamento completo do genoma de *P. aeruginosa* cepa LV e realizar a análise da expressão temporal dos genes diferencialmente expressos pela presença/ausência de cobre, afim de melhor compreender a biossíntese da Fluopsina C. Para isso, a cepa foi cultivada em ágar nutriente *overnight* e após a extração do DNA total do microrganismo foi realizado o sequenciamento pela plataforma Illumina MiSeq e o genoma foi montado pela estratégia *de novo*, filtrado, trimado e anotado. O genoma de *P. aeruginosa* cepa LV é constituído por 6.468.334 pb e, possui 14 grupos de genes putativos responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários, 7 genes de resistência e 3 arranjos CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Regularly Short Palindromic Repeats). A análise da expressão temporal foi realizada por PCR em tempo real e com pontos de análise em 24 horas, 4 e 7 dias. Foram estudados nove genes hiperexpressos na presença de cobre, divididos em três classes: transportadores de metais, reguladores de expressão e biossíntese de fenazina e proteínas hipotéticas. Os resultados obtidos validam as hipóteses geradas em trabalhos anteriores com relação a eliminação do cobre através de efluxo e transportadores ATPases. Além disso, sugerimos uma nova hipótese com relação a via de biossíntese da Fluopsina C, relacionando a produção de compostos fenazínicos ao precursor da molécula, a tioformina.

Palavras-chave: sequenciamento de nova geração; RT-qPCR; CLAE; fluopsina C.

SIMIONATO, A.S. **Sequencing and *de novo* assembly of the total genome of *Pseudomonas aeruginosa* strain LV and analysis of temporal and differential gene expression in the presence of copper.** 2020. 85 p. Thesis (PhD in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is widespread, due to its high adaptive capacity. Among the several adaptation strategies, the production of bioactive metabolites can inhibit microbial growth or metabolic pathways. *P. aeruginosa* LV strain produces several bioactive compounds, including an organometallic compound, Fluopsin C, that is produced only in the presence of copper and shows high biotechnological potential. However, there are few reports in the literature about this molecule, including its biosynthesis and metabolic route. The objective of this study was to sequence the complete genome of *P. aeruginosa* strain LV and to perform the analysis of the temporal expression of genes differentially expressed by the presence/ absence of copper, in order to understand the Fluopsin C biosynthesis. For this, the strain was grown on nutrient agar overnight and after extracting the total DNA the sequencing was performed using Illumina MiSeq platform, and then the genome was assembled using the De Novo strategy, filtered, trimmed, and annotated. The final assembly of the genome was 6,468,334 bp, where 14 groups of putative genes responsible for the biosynthesis of secondary metabolites, 7 antimicrobial resistance genes, and 3 CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Regularly Short Palindromic Repeats) arrangements were located. Temporal expression analysis was performed by real-time PCR and with analysis points in 24 hours, 4, and 7 days. Nine overexpressed genes were studied in the presence of copper, divided into 3 classes: metal transporters, gene expression regulators and, phenazine biosynthesis and hypothetical proteins. The results obtained validate the hypotheses generated in previous studies regarding the elimination of copper through efflux and ATPase transporters. Also, we suggest a new hypothesis regarding the biosynthesis pathway of Fluopsin C, relating the production of phenazine compounds to the precursor of the molecule, thioformin.

Keywords: next generation sequencing; RT-qPCR; HPLC; fluopsin C.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Comparação de plataformas mais utilizadas de Sequenciamento de Nova Geração	40
---	----

ARTIGO II

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo	77
---	----

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana do sobrenadante de cultura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa LV cultivada na ausência (CN) e presença de cloreto de cobre (CN+Cu), por um período de 10 dias (240 h) de cultivo, frente a <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i>	78
---	----

Tabela 3 – Categorias funcionais dos genes flanqueantes aos genes diferencialmente expressos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa LV cultivada em caldo nutriente suplementado com 0,01% cloreto de cobre, para os quatro bancos de dados analisados e seus respectivos.....	79
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Sistema redox de Cobre (II) e produção de radicais hidroxil.....26
- Figura 2** – Modelo de homeostase de Cobre via interação de CopZ1, CopZ2 e CueR no citoplasma de *P. aeruginosa*27
- Figura 3** – Modelo do sistema de tolerância ao Cobre em *Pseudomonas aeruginosa*30
- Figura 4** – Estrutura molecular da Fluopsina C32
- Figura 5** – Relação integrada dos genes hipereexpressos quando há um aumento de cobre no meio de cultivo e as possíveis hipóteses de sua expulsão: eliminação ativa e biorremediação34
- Figura 6** – Linha do tempo do desenvolvimento de pesquisas com *Pseudomonas aeruginosa* Cepa LV35
- Figura 7** – Metodologia de sequenciamento através da reação base-específica desenvolvida por Frederick Sanger, denominada de Sequenciamento Sanger.....37
- Figura 8** – Metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação de fragmentos de DNA *in vitro*39
- Figura 9** – Semelhanças e diferenças entre as diferentes plataformas de Sequenciamento de Nova Geração42
- Figura 10** – Mecanismo dos diferentes agentes fluorescentes em reação de PCR em tempo real.....45
- Figura 11** – Fases da amplificação de DNA na reação de PCR em tempo real46
-
- ### ARTIGO II
- Figura 1** – Cinética de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV em caldo nutriente, em ausência (CN) e na presença de 0,01% cloreto de cobre (CN+Cu)80
- Figura 2** – Cinética de produção de Fluopsina C por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV em caldo nutriente suplementado com 0,01% de cloreto de cobre a 28 °C por um período de 10 dias (240 h).....81

Figura 3 – Expressão temporal de genes diferencialmente expressos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa LV cultivada em caldo nutriente suplementado com 0,01% cloreto de cobre	82
Figura 4 – Representação esquemática, desenhada em escala, dos agrupamentos de regiões flanqueantes dos genes diferencialmente expressos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa LV cultivada em caldo nutriente suplementado com 0,01% cloreto de cobre	83
Figura 5 – Modelo representativo do sistema de tolerância ao excesso de cloreto de cobre e da relação dos genes hiperexpressos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Ágar Nutriente
bp	Pares de bases
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Caldo Nutriente
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Regularly Short Palindromic Repeats
Ct	Cycle threshold
D.O.	Densidade Óptica
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FD	Fração diclorometano
LV	Lesão Velha
mAu	Mili Absorção
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
PCA	Fenazina Ácido Carboxílica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QS	Quorum Sensing
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real associada a Transcriptase Reversa
rpm	rotações por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível
Xcc	<i>Xanthomonas citri</i> pv. Citri

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	20
3.1.1	HISTÓRIA.....	20
3.1.2	CARACTERÍSTICAS GERAIS	21
3.2	ESTRATÉGIAS ADAPTATIVAS À PRESENÇA DE METAIS PESADOS EM P. AERUGINOSA.....	23
3.2.1	ADAPTAÇÃO À ALTAS CONCENTRAÇÕES DE COBRE	25
3.3	PSEUDOMONAS AERUGINOSA CEPA LV.....	30
3.4	BIOLOGIA MOLECULAR.....	35
3.4.1	HISTÓRIA.....	35
3.4.2	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.....	39
3.4.3	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	44
	REFERÊNCIAS	47
	ARTIGO I	57
	ARTIGO II	64
	CONCLUSÃO	86

1 1. INTRODUÇÃO

2 *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa extremamente
3 versátil, capaz de se adaptar às mais diversas condições ambientais, estando
4 presentes em praticamente todos os ecossistemas, desde água e solo até animais e
5 plantas (MADIGAN et al., 2010).

6 A sobrevivência de *P. aeruginosa* em ambientes tão diversificados requer um
7 arsenal de mecanismos de adaptação, como por exemplo: *quorum sensing* (QS),
8 *switch* entre móvel-séssil, formação de biofilme, mecanismo de resistência aos
9 antimicrobianos, persistência adaptativa para radiação, sistema CRISPR-Cas,
10 sequestro e formação de complexos com metais, redução de toxicidade de
11 compostos, entre outros (TEITZEL et al., 2006; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

12 Dentre as diversas estratégias de adaptação e defesa, está a produção de
13 compostos com atividade antimicrobiana derivados, principalmente, do metabolismo
14 secundário (MADIGAN et al, 2010; NAVARRO et al., 2019a). Estes metabólitos são
15 produzidos durante a fase estacionária e não são essenciais ao crescimento e
16 reprodução do microrganismo; são moléculas complexas e sua síntese depende
17 quase que exclusivamente das condições de crescimento, tanto natural quanto *in*
18 *vitro* (MADIGAN et al., 2010; SIMIONATO et al., 2017).

19 No Laboratório de Ecologia Microbiana, há 17 anos está-se estudando a
20 atividade antibiótica de compostos produzidos por bactérias. Em 2004, um grande
21 número de bactérias Gram-negativas foi isolado em busca do controle biológico do
22 Cancro Cítrico (*Xanthomonas citri* pv *citri* - *Xcc*). Uma cepa selvagem de *P.*
23 *aeruginosa*, denominada LV, isolada de uma lesão velha em folha de laranja
24 causada por *Xcc* foi selecionada devido ao seu potencial na produção de
25 antimicrobianos (RAMPAZO, 2004).

26 Esta cepa foi isolada para estudos de produção, fracionamento e purificação
27 dos extratos e obtenção das moléculas bioativas (DE OLIVEIRA et al., 2011). Em um
28 dos estudos foi avaliada a atividade antimicrobiana da fração purificada do
29 sobrenadante de cultura da cepa LV, denominada F3d, contra isolados clínicos. Os
30 resultados mostraram que dos 70 isolados, produtores da enzima *Klebsiella*
31 *pneumoniae* carbapenemase (KPC), apenas 13 foram resistentes à fração. Além
32 disso, três isolados de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) e dois

1 isolados de *Enterococcus* Resistente à Vancomicina (VRE) foram sensíveis à fração
2 (KERBAUY et al., 2016).

3 Após novos processos cromatográficos para a purificação da fração F3d, foi
4 isolada uma molécula organometálica com potente atividade antimicrobiana,
5 identificada como Fluopsina C, produzida exclusivamente na presença de cobre em
6 meio de cultivo. Esta molécula foi utilizada para tratar camundongos Swiss albino
7 com bacteremia por *K. pneumoniae* multirresistentes, apresentando resultados
8 positivos para o controle da infecção (NAVARRO et al., 2019b).

9 Apesar de seu potencial biotecnológico, esta molécula apresenta baixo
10 rendimento de produção em fermentação. Visando a otimização de sua produção,
11 foram realizadas análises pela metodologia de superfície de resposta, no qual foi
12 verificada que a partir da concentração de 15 µg/mL de Fluopsina C no meio de
13 cultivo havia a inibição do crescimento da cepa LV (BEDOYA et al., 2019).

14 Embora a Fluopsina C já tenha sido descrita na literatura, a via metabólica e
15 os detalhes de sua biossíntese ainda não foram elucidados (MA et al., 2013;
16 SHIRAHATA et al., 1970). Sendo assim, iniciou-se o estudo da expressão gênica
17 diferencial, utilizando a abordagem de RNAseq, da cepa LV cultivada em ausência e
18 presença de CuCl₂ (GIONCO et al., 2017). Neste trabalho foi possível observar que
19 o excesso de cobre no meio de cultivo promove a hiperexpressão de nove genes
20 com prováveis funções relacionadas à eliminação do metal por vias distintas.

21 Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar o sequenciamento completo
22 do genoma de *P. aeruginosa* cepa LV e realizar a análise da expressão temporal
23 dos genes diferencialmente expressos na presença de cobre, a fim de melhor
24 compreender as vias utilizadas na remediação de altas concentrações de CuCl₂ e
25 que possam estar envolvidos na biossíntese de Fluopsina C.

26

27

28

29

30

1 2. OBJETIVOS

2

3 2.1. OBJETIVO GERAL

4

5 Sequenciar o genoma de *P. aeruginosa* cepa LV e realizar a análise de
6 expressão temporal dos genes diferencialmente expressos na presença de cobre, a
7 fim de melhor compreender a biossíntese de Fluopsina C.

8 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9

- 10 1. Sequenciar o genoma completo utilizando Sequenciamento de Nova Geração
- 11 (NGS) pela plataforma Illumina MiSeq;
- 12 2. Realizar a montagem *de novo* e caracterizar o genoma estrutural da cepa LV;
- 13 3. Realizar a curva de crescimento bacteriano e de atividade antimicrobiana dos
- 14 sobrenadantes nas condições de ausência/presença de cloreto de cobre;
- 15 4. Quantificar a produção de Fluopsina C através da análise por Cromatografia
- 16 Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- 17 5. Avaliar a expressão temporal de genes diferencialmente expressos que
- 18 possam estar envolvidos com a produção de Fluopsina C por PCR em tempo
- 19 real.

20

21

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

3.1.1 HISTÓRIA

O gênero *Pseudomonas* é um dos gêneros bacterianos mais antigos já descritos. Em 1850, Charles Sédillot, médico francês, observou uma coloração azul esverdeada em feridas cirúrgicas, mas somente 10 anos depois este pigmento foi extraído e associado a um organismo em forma de bastonete por Fordos e Lucke (ALHAZMI, 2015; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). Entretanto, este microrganismo foi isolado apenas em 1882, pelo farmacêutico francês Carle Gessard, em secreções esverdeadas nas bandagens de ferimentos de soldados de guerra, e assim *Pseudomonas aeruginosa* foi relatada pela primeira vez para a comunidade científica em um artigo com o título de “*On the Blue and Green Coloration of Bandages*” (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).

O termo *Pseudomonas* somente foi empregado em 1982 pelo botânico alemão Walter Migula, que derivado do grego, “pseudo” significa *falso* e “mona” significa *unidade*, para designar a semelhança dessas células tanto de tamanho quanto de motilidade com as células nanoflageladas chamadas de Monas (D’AGATA, 2014). Em sua publicação ele descreve este microrganismo como “Células com órgãos polares de motilidade. A formação de esporos acontece em algumas espécies, mas é rara”. Alguns anos depois foi demonstrado que estes esporos na verdade eram grânulos de armazenamento de materiais (PALLERONI, 2010). Até 1984, mais de 100 espécies foram incluídas no gênero *Pseudomonas*, muitas delas isoladas de plantas (PITT; SIMPSON, 2006).

Já o termo *aeruginosa* foi dado alguns anos antes por Schoroeter ao gênero *Bacterium*, devido a cor das colônias que em determinados meios de cultivo possuíam cor semelhante ao cobre enferrujado. Migula, então, transferiu essas espécies para o novo gênero que ele havia descrito (PALLERONI, 2010). O termo *aeruginosa* deriva do latim e significa “ferrugem de cobre” ou “verdete” (D’AGATA, 2014).

Com o desenvolvimento das diversas técnicas de biologia molecular, foi possível compreender melhor este gênero tão diversificado, ocasionando uma melhor caracterização do grupo e reclassificação de algumas espécies para novos

1 gêneros, como *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Ralstonia* e entre outras (MOORE;
2 FLAWS, 2011). Há mais de 200 espécies de *Pseudomonas* descritas na literatura,
3 sendo a maioria proveniente de plantas e animais (ALEXANDER; LEVETT;
4 TURENNE, 2014).

5 3.1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS

6 *P. aeruginosa* se caracteriza como bacilos Gram-negativos ligeiramente
7 encurvados com tamanho entre 1 e 5 μm , móveis por um flagelo polar e não
8 esporulados. São aeróbios facultativos e apresentam a capacidade de utilizar
9 diversas substâncias como fonte de carbono (MADIGAN et al., 2010). Conseguem
10 se adaptar a condições não toleradas por outros microrganismos, como, por
11 exemplo, locais com altas concentrações de sais, metais, antissépticos e antibióticos
12 (WU et al., 2014).

13 Possuem uma capacidade limitada para metabolização de açúcares, não
14 fermentam lactose, por exemplo, mas conseguem oxidar glicose e xilose. Para a
15 metabolização destes carboidratos utilizam a via Entner-Doudoroff de forma cíclica
16 como variante da via glicolítica para metabolização de carboidratos (DADDAOUA;
17 KRELL; RAMOS, 2009).

18 O gênero *Pseudomonas* é conhecido também por ser predominante
19 desnitrificante, realizando seu crescimento pela respiração anaeróbia de nitrato
20 (NO_3^-) ou nitrito (NO_2^-) aos produtos gasosos óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O)
21 e nitrogênio (N_2) (MANDIGAN et al., 2010). Isto ocorre principalmente em bactérias
22 presentes no solo, facilitando a utilização de fertilizantes nitrogenados e a produção
23 de N_2O , um dos principais gases do efeito estufa.

24 Este gênero tem como temperatura ótima de crescimento de 37 °C, mas
25 cresce bem entre 25 e 37 °C e possuem a habilidade de crescer à 42 °C.
26 Dependendo do local onde foram isoladas e do meio de cultivo utilizado, as colônias
27 podem apresentar três tipos morfológicos mais comuns: isolados de solo ou água
28 apresentam colônias pequenas e ásperas, isolados clínicos podem apresentar
29 colônias grandes e elevadas com bordas planas e irregulares, e isolados clínicos de
30 secreções respiratórias e do trato urinário podem apresentar característica mucoides
31 (WU et al., 2014).

1 Com relação ao seu material genético, *P. aeruginosa* possui um genoma
2 circular relativamente grande, em torno de 5,5 a 7 Mb, e com alta porcentagem de
3 G-C, entre 65 a 67%. Devido ao tamanho de seu genoma, possui uma alta
4 versatilidade nutricional, uma vez que essa espécie codifica muitas enzimas para
5 distintas vias metabólicas, que auxilia o microrganismo a se adaptar aos mais
6 diversos ambientes (WU et al., 2014). Além disso, possuem um genoma acessório
7 com elementos genéticos altamente variáveis que permitem caracterizar as cepas
8 de *P. aeruginosa* que possuem adaptações específicas de nicho. Esses elementos
9 incluem fatores de virulência, de resistência e que codificam vias catabólicas
10 específicos permitindo sua persistência em ambientes hostis (D'AGATA, 2014).

11 Esta espécie também é conhecida pela produção de vários compostos
12 bioativos, que lhe conferem vantagens na competição com outros microrganismos,
13 na resistência intrínseca a compostos antimicrobianos, na comunicação intracelular
14 e na formação de biofilme. Dentre os compostos produzidos se destacam os
15 pertencentes a família dos sideróforos, fenazinas, pirroles e indolinonas (NAVARRO
16 et al., 2019a).

17 Dentre os sideróforos se destaca a categoria das pioverdinas, com mais de
18 100 compostos descritos, que possuem a capacidade de adquirir ferro em ambientes
19 de baixa concentração (CEZARD; FARVACQUES; SONNET, 2014). A fenazina-1-
20 ácido carboxílica, da família das fenazinas, com atividade antimicrobiana e
21 precursora das demais fenazinas (PIERSON III; PIERSON, 2010; PUOPOLO et al.,
22 2013; SIMIONATO et al., 2017); fenazina-1-carboxiamida, com atividade
23 antimicrobiana e de provável indução de resistência (SHANMUGAIAH;
24 MATHIVANAN; VARGHESE, 2010; ZHANG et al., 2015); e a piocianina, uma das
25 primeiras fenazinas identificadas devido a sua coloração azul, com alta capacidade
26 redox e pode atuar também como fator de virulência (HO SUI et al., 2012; BARAKAT
27 et al., 2013; RANE et al., 2008).

28 Na família dos pirroles, se destaca o composto pirrolnitrina, um halo-
29 metabólito de pirrol com atividade antifúngica frente a fitopatógenos, como *Botrytis*
30 *cinerea* e *Penicillium expansum* (BARKAI-GOLAN, 2001; SMILANICK; DENIS-
31 ARRUE, 1992; TAKEDA et al., 1990), e atividade nematicida e repelente frente ao
32 *Caenorhabditis elegans* (NANDI et al., 2015). Entretanto, devido a sua instabilidade
33 e conseqüente perda de atividade quando exposta à luz, os estudos com a molécula

1 pura em campo não foram promissores (CORRAN; KNAUF-BEITER; ZEUN, 2008).
2 Já as moléculas pertencentes à família das indolinonas possuem potencial
3 biotecnológico farmacêutico, uma vez que estes compostos podem atuar na inibição
4 do crescimento e da proliferação celular anormal, sendo assim utilizados para o
5 desenvolvimento de antitumorais (BENICIO et al., 2018; PRAKASH; RAJA, 2012).

6 Devido a todas essas características, esta espécie vem sendo alvo de
7 estudos de desenvolvimento de produtos agronômicos e farmacêuticos para o
8 controle de patógenos. Na agricultura, com a utilização de altas concentrações de
9 adubos, fertilizantes e antimicrobianos ocorre o acúmulo de metais pesados no solo
10 e na cadeia trófica. *P. aeruginosa* atua como biorremediador nessas áreas
11 (PIOTROWSKA-SEGET; CYCON; KOZDRÓJ, 2005), além de produzir diversos
12 compostos com atividade antimicrobiana frente a diversos fitopatógenos, indutores
13 de resistência e promotores de crescimento (NAVARRO et al., 2019a). Já na área
14 médica, há estudos com relação a atividade antimicrobiana frente a microrganismos
15 multirresistentes e atividade antitumoral dos bioativos produzidos por *P. aeruginosa*
16 (CARDOZO et al., 2013; KERBAUY et al., 2016; MA et al., 2013).

17 Apesar de possuir potencial biotecnológico, algumas cepas são consideradas
18 patógenos humanos oportunistas de destaque, associados principalmente a diversos
19 fatores de resistência a antimicrobianos, como perda de permeabilidade, formação
20 de biofilme e produção de enzimas capazes de degradar compostos antimicrobianos
21 (TEITZEL et al., 2006).

22

23 3.2 ESTRATÉGIAS ADAPTATIVAS À PRESENÇA DE METAIS PESADOS EM *P. AERUGINOSA*

24 Os metais pesados são micronutrientes necessários aos microrganismos para
25 a manutenção de diversas funções celulares, atuando como cofatores para
26 metaloproteínas e enzimas (TCHOUNWOU et al., 2012). Cobalto (Co), Cobre (Cu),
27 Cromo (Cr), Níquel (Ni) e Zinco (Zn), apesar de suas relevâncias metabólicas, em
28 altas concentrações, acima de 1 mM se tornam tóxicos para as células, uma vez que
29 podem inibir o crescimento das mesmas (SEILER; BERENDONK, 2012; VOICA et
30 al., 2016).

1 Geralmente, a toxicidade em microrganismos é devido a afinidade química
2 dos metais com macromoléculas e grupamentos tiols, mas dependendo da
3 solubilidade dos íons em condições fisiológicas (SEILER; BERENDONK, 2012). O
4 acúmulo de metais pesados pode resultar em alterações conformacionais de ácidos
5 nucleicos e polipeptídios, perturbação na fosforilação oxidativa e no equilíbrio
6 osmótico, podendo levar à morte celular (TCHOUNWOU et al., 2012; VOICA et al.,
7 2016; NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019).

8 Os metais pesados não podem ser biodegradados, mas transformados pelos
9 microrganismos em formas menos tóxicas ou estado de oxidação que os tornem
10 menos biodisponíveis, diferentemente de outros compostos tóxicos (VOICA et al.,
11 2016).

12 Desta forma, os microrganismos desenvolveram mecanismos que os tornam
13 tolerantes a altas concentrações de metais pesados. Os principais mecanismos
14 podem ser divididos em três grandes grupos fisiológicos (SEILER; BERENDONK,
15 2012):

- 16 1. Formação de complexos ou sequestro de metais tóxicos;
- 17 2. Detoxificação através da redução intracelular de íons;
- 18 3. Sistemas de efluxos de íons metálicos.

19 O primeiro contato do microrganismo com os metais pesados se dá através
20 da parede e/ou membrana celular. Através de gradientes quimiosmóticos através da
21 membrana e de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) pode ocorrer a
22 captação de forma rápida, inespecífica e sem gasto energético (NANDA; KUMAR;
23 SHARMA, 2019; SEILER; BERENDONK, 2012).

24 A ligação de cátions metálicos com moléculas carregadas negativamente é
25 uma das interações que pode ocorrer nas células. Além disso o grupo amino pode
26 quelar e adsorver espécies metálicas aniônicas através de interações eletrostáticas
27 ou ligações de hidrogênio. Neste sentido, bactérias Gram-negativas acumulam
28 menos íons metálicos do que Gram-positivas (NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019).

29 Para proteger os componentes celulares essenciais, os microrganismos
30 podem também alterar a composição de suas membranas celulares a fim de que a

1 permeabilidade do metal seja restrita, através, por exemplo, da alteração da
2 produção porinas (NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019; VOICA et al., 2016).

3 Uma vez dentro das células, os íons metálicos seguem por diversas rotas
4 metabólicas, como detoxificação enzimática ou biorremediação, dependendo de qual
5 seja o metal pesado.

6 A tolerância ampla da população microbiana aos metais é aumentada pelas
7 células persistentes. Essas células medeiam os mecanismos de tolerância
8 dependentes do tempo de exposição aos íons metálicos através da regulação dos
9 genes de resistência e de resposta a estresses metabólicos (SEILER;
10 BERENDONK, 2012). Esses mecanismos podem ser determinados genes
11 cromossomais, que medeiam mecanismos mais complexos, ou plasmidiais, que
12 geralmente codificam mecanismos mais simples e de forma mais rápida, como
13 sistemas de efluxo, por exemplo (NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019). Normalmente,
14 essas respostas são transitórias e quando o microrganismo se adapta às
15 concentrações de metais pesados no ambiente, a expressão dos genes que
16 codificam respostas relacionadas à tolerância retorna ao nível basal (VOICA et al.,
17 2016).

18 3.2.1 ADAPTAÇÃO À ALTAS CONCENTRAÇÕES DE COBRE

19 O Cu é um micronutriente essencial para atividade de algumas enzimas que
20 atuam na fosforilação oxidativa (citocromo oxidase), homeostase de ferro
21 (ceruloplasmina e hefestina), produção de pigmentos (tirosinase e lacase) e
22 detoxificação (superóxido dismutase) (LADOMERSKY; PETRIS, 2016).

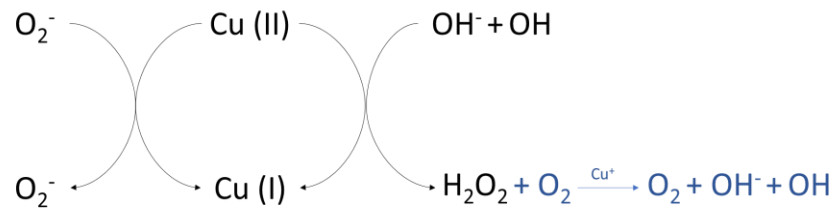
23 Esse metal possui a capacidade de realizar uma ciclagem redox entre Cu (II),
24 forma cúprica oxidada, e Cu (I), forma cuprosa reduzida. Essa atividade redox pode
25 ser um risco potencial para a vida dos diversos organismos. Em condições aeróbias,
26 o cobre pode catalisar a produção de radicais hidroxil através das reações de Fenton
27 e Haber-Weiss (Figura 1) (TEITZEL et al., 2006).

28

29

30

1 **Figura 1.** Sistema redox de Cobre (II) e produção de radicais hidroxil. A reação de
 2 Fenton está representada em preto e reação Haber-Weiss em azul.



5 Fonte: Adaptado de TEITZEL et al., 2006.

6 Além da formação de espécies reativas de oxigênio, que ocasionam estresse
 7 metabólico para as células, as altas concentrações de cobre podem ocasionar
 8 ligações incorretas de dissulfeto no periplasma e quebra de ligações de centro Fe-S.
 9 Sendo assim, os microrganismos tendem a ativar mecanismos de homeostase em
 10 busca de aumentar a tolerância ao metal e evitar a presença de cobre livre
 (ARGÜELLO; RAIMUNDA; PADILLA-BENAVIDES, 2013).

11 Em *P. aeruginosa*, o cobre pode entrar no periplasma através da porina OprC,
 12 pertencente à família Opr. Sendo assim, um dos mecanismos de tolerância ao cobre
 13 é reprimir a expressão dessas porinas, o que foi observado em concentrações acima
 14 de 1µM do metal em meios de cultivo (YONEYAMA; NAKAE, 1996).

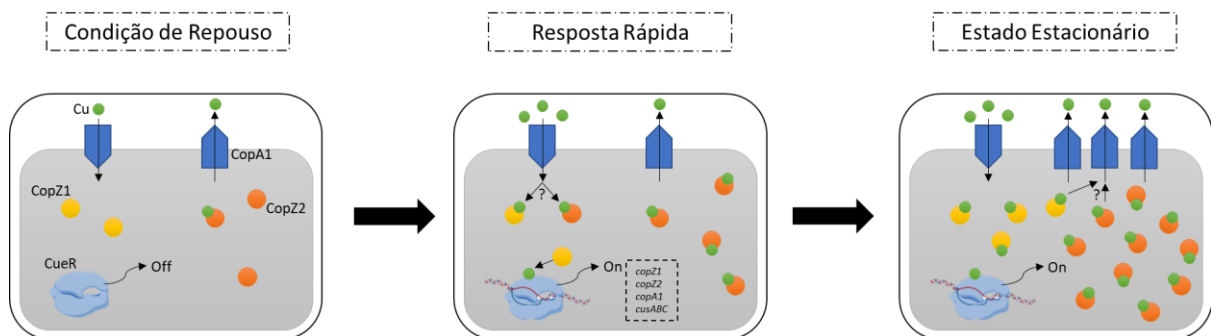
15 Uma vez no periplasma, as oxidases multicobre (MOCs) participam do
 16 sistema de regulação da homeostase do metal, atuando na oxidação dos íons
 17 tóxicos para subsequente transporte. A enzima PcoA, encontrada em *P. aeruginosa*,
 18 pertence à família dos MOCs e acredita-se que participe da oxidação do Cu⁺¹, sua
 19 forma mais tóxica, em Cu⁺², forma menos tóxica para o microrganismo. Não há na
 20 literatura muitas informações com relação a enzima PcoA, mas sabe-se que possui
 21 similaridade a enzima CueO presente em *E. coli*, que catalisa a reação de oxidação
 22 do cobre e contribui para a o aumento da tolerância do microrganismo ao metal
 23 (STOLLE; HOU; BRÜSER, 2016; TEITZEL et al., 2006).

24 Após a oxidação, o Cu⁺² é transportado para o citoplasma. Esse transportador
 25 ainda não descrito, provavelmente uma cuprochaperona, transporta o metal do
 26 periplasma para o citoplasma através de porinas de membrana citoplasmática
 27 denominada CcoA (QUINTANA; NOVOA-APONTE; ARGÜELLO, 2017; PARMAR et
 28 al., 2018).

1 Uma vez no citoplasma, o cobre é então complexado por duas chaperonas de
 2 cobre, denominadas CopZ1 e CopZ2. CopZ1 transporta Cu^{+2} para o sensor CueR,
 3 regulador transcricional, por interação proteína-proteína, influenciando diretamente
 4 no controle transcricional do CueR, enquanto CopZ2, mais abundante, serve como
 5 pool de armazenamento de Cu, fornecendo uma resposta rápida de homeostase em
 6 condições de altas concentrações do metal (NOVOA-APONTE; RAMÍREZ;
 7 ARGÜELLO, 2019). Com a ativação do sensor CueR há o aumento da expressão de
 8 CopZ1 e CopZ2 e a ativação de outros mecanismos de tolerância a cobre, como
 9 CopA (efluxo de cobre ATPase), sistema de efluxo MexPQ-OmpE entre outros
 10 (Figura 2) (SOLIOZ, 2018).

11

12 **Figura 2.** Modelo de homeostase de cobre via interação de CopZ1, CopZ2 e CueR
 13 no citoplasma de *P. aeruginosa*. CopZ1 transporta Cu^{+2} para o sensor CueR,
 14 regulador transcricional, influenciando diretamente em seu controle transcricional.
 15 Enquanto CopZ2, mais abundante, serve como pool de armazenamento de Cu,
 16 fornecendo uma resposta rápida de homeostase em condições de altas
 17 concentrações.



18

19 Fonte: NOVOA-APONTE; RAMÍREZ; ARGÜELLO, 2019.

20

21 Com a ativação dos demais mecanismos de tolerância, o efluxo de cobre
 22 pode seguir por três caminhos: através de duas porinas do tipo $\text{P}_{1\text{B}}$ ATPase (CopA1
 23 e CopA2) ou através de sistema de efluxo de multidrogas (MexPQ-OmpE). O cobre
 24 carregado pelas chaperonas passa através da CopA1, que é expresso em resposta
 25 ao estresse gerado pela presença do metal, é possivelmente ancorado à proteína
 26 PA2807 (não caracterizada) e exportado para fora da célula através da porina de
 27 membrana externa PcoB (QUINTANA; NOVOA-APONTE; ARGÜELLO, 2017).

28

29 Quando transportado através do CopA2 são encaminhadas para o citocromo
 C, atuando como cofator metálico para o transporte de elétrons na respiração

1 oxidativa. Este comportamento não é induzido por altas concentrações de cobre
2 extracelular, uma vez que a CopA2 pertence ao subgrupo de ATPases que são
3 expressas em associação com subunidades do citocromo oxidase
4 (GONZÁLEZ-GUERRERO et al., 2010; QUINTANA; NOVOA-APONTE; ARGÜELLO,
5 2017).

6 Devido à associação com resistência a antimicrobianos, a utilização de
7 sistemas de efluxo de multidrogas (RND) no mecanismo de tolerância ao cobre se
8 torna relevante. Este sistema de efluxo tem como base a abertura de um canal que
9 atravessa as membranas citoplasmática e externa da bactéria permitindo a remoção
10 de moléculas para o exterior da célula (NEVES et al., 2011). *P. aeruginosa* possui 13
11 transportadores RND, sendo que um deles é ligado ao efluxo de metal pesado,
12 denominado MexPQ-OmpE, que é ativado pelo CueR em resposta a presença de
13 cobre (QUINTANA; NOVOA-APONTE; ARGÜELLO, 2017; STROEBEL et al., 2007).

14 Outra maneira de remediar a toxicidade do cobre é através da produção e
15 liberação de sideróforos no meio extracelular, que são produzidos em situações em
16 que há baixas concentrações de ferro com o objetivo de se ligar ao Fe^{+3} do ambiente
17 e disponibilizar para os organismos (KHAN; SINGH; SRIVASTAVA, 2018).
18 Entretanto, alguns sideróforos possuem a capacidade de se ligar a outros metais.
19 Como exemplo podemos destacar a pioverdina (PVD) e piochelina (PCH) que
20 possuem a capacidade de se ligarem fracamente ao cobre (BRANDEL et al., 2012).

21 Em *P. aeruginosa* adaptada ao cobre foi possível observar que a presença do
22 metal, em concentração de 10 μM , estimulou a biossíntese de PVD e reprimiu a
23 síntese de PCH (BRAUD et al., 2009; TEITZEL et al., 2006). O transportador de
24 membrana externa de PVD, denominado FpvA, possui especificidade altamente
25 seletiva para Fe^{3+} e quando há a presença de PVD- Cu^{+2} houve baixas taxas de
26 captação celular (BRAUD et al., 2010). Além disso, em situações de estresse por
27 íons cúpricos onde há aumento da expressão de genes relacionados com a
28 biossíntese de PVD não há o aumento da expressão de FpvA. Sendo assim, a
29 ligação do Cu^{+2} com PVD em meio extracelular diminui a concentração de metal
30 livre, altera a difusão e conseqüentemente a toxicidade (BRAUD et al., 2010).

31 O gênero *Pseudomonas* também produz um outro sideróforo pouco
32 conhecido, N-metil ácido tioform-hidroxâmico, e quem tem um papel importante na

1 ligação e transporte de Fe para as células não só de bactérias, mas de fungos e
2 algumas algas. Também conhecido como tioformina, esta molécula possui 3 átomos
3 eletronegativos (S, N e O) que atuam como ligantes de vários íons metálicos além
4 do ferro (CHIMIÁK; PRZYCHODZEN; RACHON, 2002; KAKKAR; DUA; GAHLOT,
5 2007).

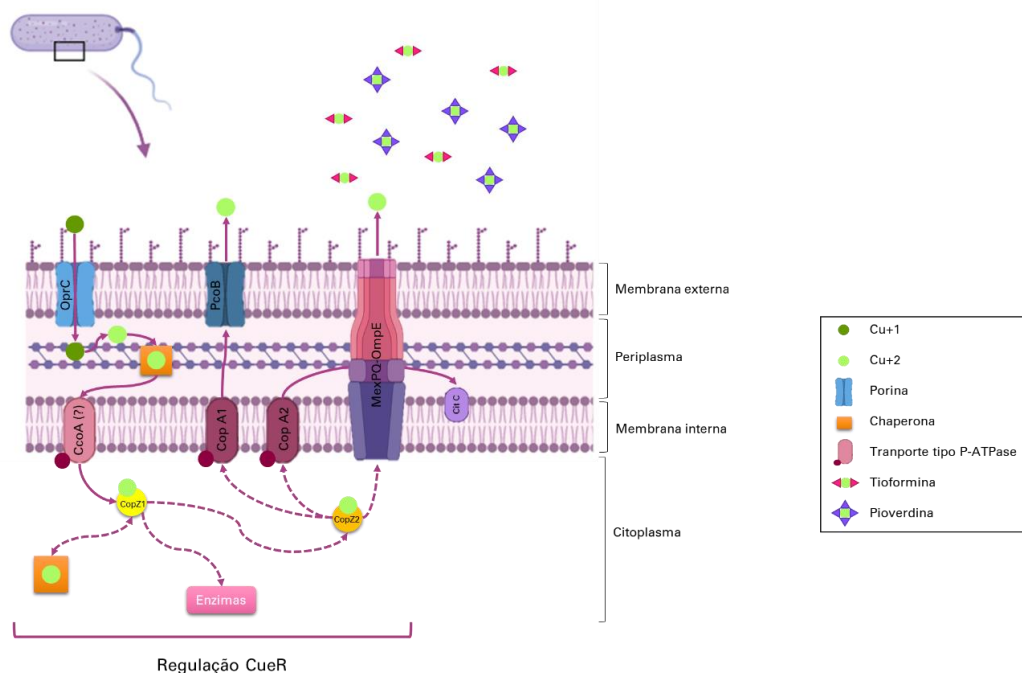
6 Em adição à diminuição da toxicidade dos metais para as células, algumas
7 associações garantiram propriedade antimicrobianas frente a bactérias e fungos,
8 como com Fe⁺³ (Fluopsina F), Cu⁺² (Fluopsina C) e Ni⁺² (Fluopsina N) (SHIRAHATA
9 et al., 1970; BELL; FRIEDMAN; LEONG, 1979; CHIMIÁK; PRZYCHODZEN;
10 RACHON, 2002).

11 Os mecanismos de tolerância são ativados e gerenciados por sistemas de
12 *quorum sensing* (QS). Este sistema funciona como um circuito de comunicação para
13 a regulação do arranjo das atividades fisiológicas, uma vez que algumas atividades
14 são metabolicamente custosas para a célula e requerem o envolvimento da
15 comunidade microbiana (MILLER; BASSLER, 2001; GROSS et al., 2013;
16 MORADALI; GHODS; REHM, 2017). A ativação do sistema QS se dá através de
17 moléculas autoindutoras, as pertencentes à classe das acetil-homoserina lactonas
18 (AHLs) são as mais comuns (PAPENFORT; BASSLER, 2016).

19 Em *P. aeruginosa*, há três sistemas bem estudados de autoindução por AHLs:
20 dois pelo sistema LuxI/LuxR-*type* (sistema *las*, RhII/RhIR) e um pelo sistema não-
21 LuxI/LuxR-*type* (sistema *Pseudomonas* Quinolone Signal - PQS). Resumidamente, o
22 sistema *las* aciona uma cascata de ativação de QS através do regulador
23 transcricional LasR que complexa com *N*-(-3-oxododecanoil)-*L*-homoserina lactona
24 (3OC₁₂-HSL), ativando a regulação de genes que incluem a síntese do gene *lasI*,
25 que leva à autoindução. O complexo LasR-autoindutor também ativa a expressão
26 dos genes *rhIR* e *rhII* que codificam uma segunda via de ativação de QS por
27 proteínas RhIR, que, ao se ligar a *N*-butiril-*L*-homoserina lactona (C₄-HSL), regulam
28 os genes da sua via. Esta segunda via, por sua vez, ativa os genes *pqsR* e
29 *pqsABCDH*, que codificam o sistema PQS (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona). Esta
30 cascata de ativação se torna um *looping*, pois a RhIR realiza *downregulation* dos
31 genes *pqsR* e *pqsABCDH*, garantindo a proporção correta de 3OC₁₂-HSL para C₄-
32 HSL, determinando a ativação do PQS (FILIATRAULT et al., 2005; PAPENFORT;
33 BASSLER, 2016).

1 Estes complexos ativam a expressão de múltiplos genes, como aqueles que
 2 codificam elastase, proteases, endotoxina A, piocianina, sideróforos, e entre outros
 3 (BREDENBRUCH et al., 2006; RUTHERFORD; BASSLER, 2012). Um dos principais
 4 sistemas ativados pelo mecanismo Las e Rhl é o Cuer, que na presença de íons de
 5 cobre ativa a expressão de 11 genes de forma direta e mais 30 genes de forma
 6 indireta. Dentre estes genes ativados se encontram *pcoA* e *pcoB* (transportadores
 7 de Cu^{+2}), *copR* (regulador de resposta de dois componentes), *ptrA* (regulação
 8 negativa da secreção de proteínas), *PA2807* (Cupredoxina), *PA3320* (chaperona de
 9 cobre), *PA3412* (proteína hipotética), *PA3515* a *PA3519* (provável sistema de
 10 liases), *PA3520* (Superfamília de domínios associados a metais pesados - HDM),
 11 *PA3920* (sistema RDN-Mex), *PA4141* (regulação de sistema QS), e entre outros
 12 (THADEN; LORY; GARDNER, 2010).

13 **Figura 3.** Modelo do sistema de tolerância ao cobre em *Pseudomonas aeruginosa*: o
 14 cobre em sua forma mais tóxica para a célula (Cu^{+1}) entra no periplasma celular
 15 através de porinas do tipo OprC, onde com o auxílio do sistema oxidase multicobre é
 16 reduzido em Cu^{+2} , sua forma menos tóxica, e atravessa para citoplasma com auxílio
 17 de transportadores tipo P-ATPase (*CcoA*). Através das chaperonas (*CopZ1* e
 18 *CopZ2*), Cu^{+2} se liga ao regulador transcricional *CueR* que ativa 11 genes de forma
 19 direta e 30 genes de forma indireta; tais genes atuam na homeostase celular frente a
 20 metais pesados. A partir de então, o Cu^{+2} pode passar para o periplasma através de
 21 transportadores tipo P-ATPase (*CopA2*) e participar como cofator metálico de
 22 citocromo na respiração oxidativa; ser eliminado através de sistemas de efluxo
 23 (*MexPQ-OmpE*) e porinas (*PCoB*), ou ser capturado por sideróforos no meio
 24 extracelular (*Pioverdina* e *Tioformina*).



1 3.3 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV

2 Em 2004, no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de
3 Londrina, um grande número de microrganismos que coexistem com bactérias
4 Gram-negativas patogênicas foram isoladas e caracterizadas quanto a sua
5 capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de *X. citri* pv. *citri* (*Xcc* 306) (RAMPAZO,
6 2004). Dentre os microrganismos antagonistas, uma cepa, denominada LV, foi
7 isolada de uma lesão velha de *Xcc* em folhas de laranja em um pomar da região de
8 Astorga-PR com alto índice da doença e com altas concentrações de cobre para o
9 controle da doença. Esta cepa, tolerante a cobre, demonstrou ter potencial em
10 controlar *Xcc* 306 *in vitro* e em aplicações *in vivo* em plantas de laranja (RAMPAZO,
11 2004).

12 Após diversos testes para definição do melhor meio de cultivo para esta cepa,
13 foram realizados estudos de extração e fracionamento dos compostos provenientes
14 do sobrenadante livre de células. De Oliveira e colaboradores (2011), obtiveram a
15 fração F3 com maior atividade antimicrobiana frente a *Xcc* 306. Outros estudos
16 demonstraram atividade desta fração frente *X. axonopodis* em mudas de eucaliptos
17 (LOPES et al., 2012) e *X. arboricola* pv. *pruni* em plantas de pêssego (SILVA
18 VASCONCELLOS et al., 2014).

19 Após novas purificações da fração F3, obteve-se a fração F3d e após novos
20 processos de purificação obteve-se um composto com alto teor de pureza com
21 atividade antimicrobiana, denominado composto organometálico (DE OLIVEIRA et
22 al., 2016). Em teste de disco difusão frente a *Xcc* 306, o composto apresentou 67
23 mm de zona de inibição com 30 µg/disco contra 32 mm de inibição da fração F3d
24 com 100 µg/disco, indicando que este composto poderia ser um potencial
25 controlador de *Xcc* em campo.

26 Devido às atividades apresentadas com as bactérias do gênero
27 *Xanthomonas*, a fração F3d foi testada frente a 70 isolados clínicos portadores do
28 gene *bla*KPC (66 *K. pneumoniae*, 3 *Enterobacter aerogenes*, 3 *Enterobacter cloacae*,
29 1 *Citrobacter freundii*), 3 isolados de MRSA, e 2 VRE (*Enterococcus faecium* e
30 *Enterococcus faecalis*). Os resultados do antibiograma mostraram que dos 70
31 isolados produtores da carbapenemase KPC apenas 13 foram resistentes a fração
32 F3d, já os isolados MRSA e VRE foram sensíveis às concentrações testadas (250 e

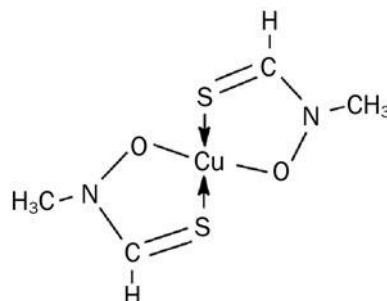
1 500 µg/disco) pela técnica de disco difusão (KERBAUY et al., 2016). Além disso,
 2 esta fração na concentração de 15,6 µg/mL reduziu em 80% biofilme de
 3 *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina em superfície de poliestireno
 4 (AMICHI, 2015).

5 Após alterações nas metodologias de purificação dos compostos, a fração
 6 F3d passou a ser denominada F4a. Nesta fração, além do composto organometálico
 7 há a presença de duas moléculas da família das fenazinas (fenazina carboxílica e
 8 carboxiamida) e uma molécula da família das indolinonas (PISTORI et al., 2018). Em
 9 alguns casos, a combinação destas quatro substâncias apresentou maior controle
 10 em determinados fitopatógenos, como *Pectobacterium carotovorum* subsp.
 11 *carotovorum* em tomates (MUNHOZ et al., 2017), *Sclerotinia sclerotiorum*, causador
 12 do mofo branco (EMILIANO, 2016), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijão
 13 (NIEKAWA, 2019); *Phakopsora pachyrhizi* causador da Ferrugem asiática
 14 (BARAZETTI et al., 2019) e até indução de resistência em plantas de laranja contra
 15 *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causador do Greening (PISTORI et al., 2018).

16 Dentre as quatro principais moléculas que fazem parte da F4a, uma delas
 17 apresentou uma alta atividade antibiótica frente aos mais diversos microrganismos e
 18 foi identificada como Fluopsina C, pertencente ao grupo dos metaloantibióticos, a
 19 qual é unicamente produzida na presença do cobre no meio de cultura (NAVARRO
 20 et al., 2019b).

21

22 **Figura 4.** Estrutura molecular da Fluopsina C.



23

24 Fonte: Próprio autor.

25

1 A Fluopsina C foi testada *in vitro* para isolados clínicos multiresistentes de
2 *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus*, e
3 apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) menor que 2 µg/mL (NAVARRO et
4 al., 2019b). Sua eficácia frente a bacteremia por isolados clínicos multirresistentes
5 foi demonstrada em camundongos e novos testes *in vivo* em coelhos e porcos serão
6 realizados, de acordo com as normas da ANVISA. A mesma molécula também foi
7 capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans* (MOREIRA et al., manuscrito em
8 preparação) e *Trypanosoma cruzi* (CONTRERAS et al., manuscrito em preparação).

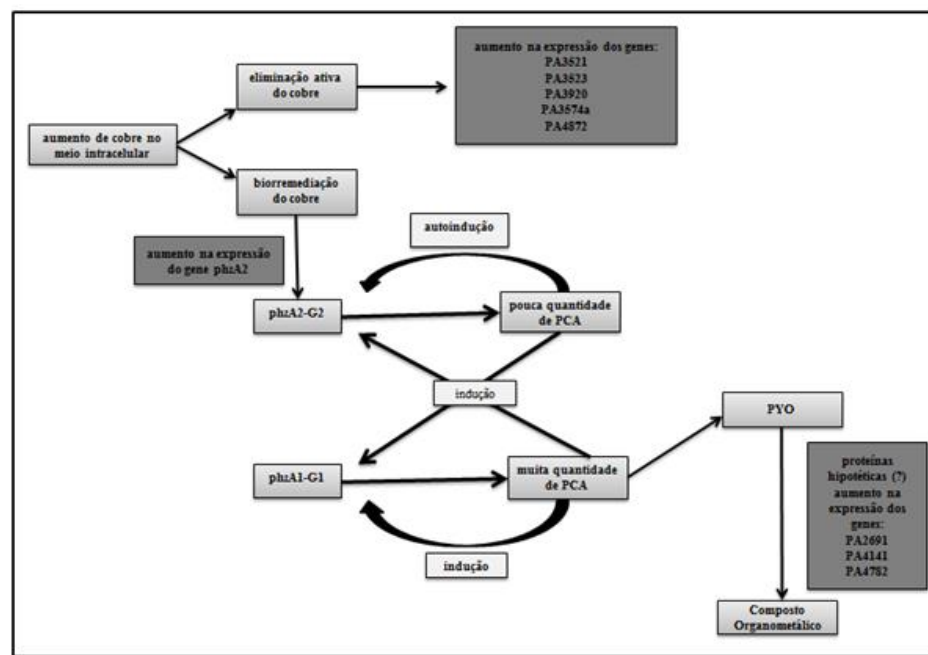
9 Apesar de ter sido identificada há 50 anos e possuir atividade antimicrobiana
10 abrangente, os detalhes da biossíntese da Fluopsina C, assim como seu mecanismo
11 de ação, ainda não foram completamente elucidados.

12 Recentemente, o possível mecanismo de ação desta molécula começou a ser
13 esclarecido. Em microscopia eletrônica de varredura e de transmissão com bactérias
14 Gram-positivas e Gram-negativas, após 15 minutos de tratamento, a Fluopsina C
15 demonstrou afetar a membrana citoplasmática destes microrganismos. Através de
16 microscopia de fluorescência, as bactérias estudadas apresentaram alteração da
17 permeabilização de suas membranas citoplasmáticas após contato com a molécula.
18 Pelas técnicas de microscopia eletrônica e de fluorescência com cepas bacterianas
19 mutantes apresentando septo divisional marcado, foi possível definir a membrana
20 como o alvo principal do composto nos isolados analisados (NAVARRO et al., 2020).

21 Uma das preocupações com a utilização de produtos derivados do
22 metabolismo microbiano é que, apesar de possuírem um alto potencial para serem
23 utilizados nos mais diferentes setores biotecnológicos, apresentam baixo rendimento
24 de produção em situação de fermentação. Em estudos realizados por Bedoya e
25 colaboradores (2018) para a otimização das condições de cultivo verificou-se que é
26 possível o aumento da produção de outros compostos presentes no metabolismo
27 secundário da cepa LV. Entretanto, não houve melhora na produção de Fluopsina C
28 por essa metodologia, uma vez que a concentração de 15 µg/mL foi capaz de inibir o
29 crescimento da cepa LV, produtora do composto. Esse resultado indica que a
30 concentração obtida ($11,11 \pm 1,05$ mg/L) é provavelmente a máxima possível no
31 sistema (BEDOYA et al., 2019).

1 Apesar do grande potencial da Fluopsina C, sua via metabólica e os detalhes
 2 de sua síntese também não foram totalmente esclarecidos. Em um estudo de
 3 expressão gênica diferencial, utilizando a abordagem de RNAseq, da cepa LV
 4 cultivada em ausência e em presença de CuCl_2 , foi possível observar que o excesso
 5 de cobre no meio de cultivo promoveu a hiperexpressão de nove genes com
 6 prováveis funções relacionadas à eliminação do metal através de vias distintas
 7 (Figura 5). Além disso, quatro genes apresentaram baixa expressão na presença de
 8 cobre com relação ao cultivo na ausência do metal, tendo suas funções relacionadas
 9 aos transportadores ABC e amidase (GIONCO et al., 2017).

10 **Figura 5.** Relação integrada dos genes hiperexpressos quando há um aumento de
 11 cobre no meio de cultivo e as possíveis hipóteses de sua expulsão: eliminação ativa
 12 e biorremediação.



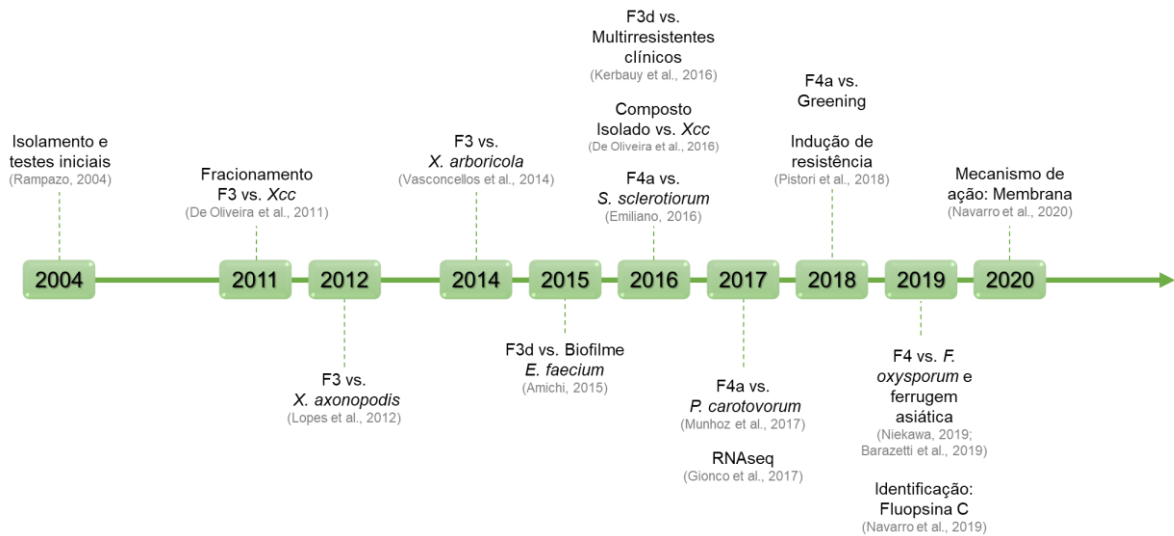
13

14 Fonte: GIONCO, 2016.

15

16 Visando compreender as possíveis vias metabólicas para biossíntese de
 17 Fluopsina C e assim auxiliar nas estratégias para o aumento de sua produção, neste
 18 trabalho realizamos o sequenciamento do genoma completo da cepa LV e utilizamos
 19 os dados gerados por Gionco e col. (2017) para a realização da análise temporal
 20 dos genes diferencialmente expressos durante a produção de Fluopsina C, por PCR
 21 em tempo real (Figura 6).

1 **Figura 6.** Linha do tempo do desenvolvimento de pesquisas com *Pseudomonas*
 2 *aeruginosa* Cepa LV.



3

4 Fonte: Próprio autor.

5

6 3.4 BIOLOGIA MOLECULAR

7

3.4.1 HISTÓRIA

8

9 A história da biologia molecular começa em 1868 com o bioquímico suíço
 10 Johann Friedrich Miescher; ao estudar a composição química de leucócitos isolou
 11 uma substância branca e floculante que acreditava ser proveniente do núcleo
 12 celular. Miescher constatou que a substância possuía alta concentração de fósforo e
 13 enxofre, e que provavelmente estava envolvido em uma importante função biológica,
 14 e mais tarde deu o nome de nucleína. Desta forma, Miescher desenvolveu o primeiro
 15 protocolo para isolar o material genético de uma célula (DAHM, 2008).

16

17 Após alguns anos da sua descoberta, através de estudos de amostras de
 18 espermatozoide de salmão, Miescher conseguiu definir os principais elementos da
 19 nucleína, que eram carbono, oxigênio, nitrogênio, hidrogênio e fósforo, propondo as
 20 possíveis fórmulas moleculares $C_{22}H_{32}N_6P_2O_{16}$ e $C_{29}H_{49}N_9P_3O_{22}$ (DAHM, 2008).
 21 Essas descobertas motivaram diversos cientistas a realizarem pesquisas em busca
 22 da sua estrutura e atividade biológica. Em 1889, um aluno de Miescher, Richard
 23 Altmann, ao isolar o material nuclear de forma mais pura confirmou sua natureza
 ácida e o renomeou como ácido nucleico, denominação utilizada até hoje (DAHM,
 2008; ANDRADE; CALDEIRA, 2009).

1 Em 1903, os bioquímicos Phoebus Aaron Levene e Walter Jacobs
2 descobriram a presença de um açúcar, uma pentose denominada ribose, e
3 constataram que nem todos os ácidos nucleicos a possuíam. Alguns continham um
4 açúcar com um átomo de oxigênio à menos, denominado então desoxirribose.
5 Sendo assim, havia dois ácidos nucléicos: ribonucleico e o desoxirribonucleico
6 (DAHM, 2008; HARGITTAI, 2009). No mesmo ano, o fisiologista alemão Albrecht
7 Kossel identificou os compostos nitrogenados dos ácidos nucleicos, as purinas e
8 pirimidinas, recebendo o prêmio Nobel de fisiologia em 1910 (KOSSEL, 1910).

9 Nos anos de 1950, a pesquisa com ácidos nucleicos avança com a
10 descoberta da proporção das bases nitrogenadas pelo bioquímico Erwin Chargaff;
11 da função do DNA em carregar informações genéticas por Alfred Hersey e Marta
12 Chase; e pela elucidação da estrutura de dupla-hélice do DNA por Rosalind Franklin,
13 Maurice Wilkins, James Watson e Francis Crick (DAHM, 2005).

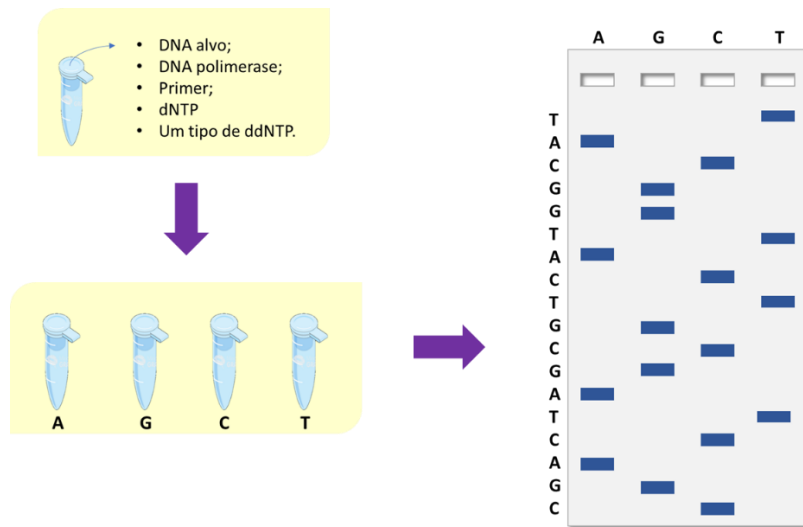
14 Já na década de 1960, houve avanços importantes com relação a
15 identificação das polimerases por Arthur Kornberg; RNA mensageiro por Sydney
16 Brenner, François Jacob e Matthew Meselson; o códon - “código da vida” por
17 Marshall Nirenberg e Har Gobind Khorana; nucleases de restrição por Daniel
18 Nathans e Hamilton Smith; e a realização do primeiro sequenciamento de RNA
19 transportador por Robert Holley (DAHM, 2005; MADIGAN et al., 2010).

20 Essas descobertas foram de extrema importância para o desenvolvimento das
21 técnicas de sequenciamento de DNA. Em 1977, duas técnicas foram desenvolvidas
22 e possibilitaram o sequenciamento genético, uma por Alan Maxam e Walter Gilbert e
23 outra por Frederick Sanger. Ambas as técnicas utilizam como princípio reduzir o
24 DNA à quatro grupos de fragmentos marcados. A produção de cada um desses
25 grupos se deve a uma reação base-específica, onde o comprimento de cada
26 fragmento corresponde a posição de uma base nitrogenada. Através da separação
27 de cada grupo lado a lado por eletroforese é possível observar uma escada de
28 bandas na qual a sequência pode ser lida diretamente (Figura 7) (NELSON; COX,
29 2013; PORTIN, 2014).

30

31

- 1 **Figura 7.** Metodologia de sequenciamento através da reação base-específica
 2 desenvolvida por Frederick Sanger, denominada de Sequenciamento Sanger.



- 3
 4 Fonte: próprio autor.

5

6 O método de Sanger é a técnica mais disseminada e ainda utilizada nos dias
 7 de hoje. Este método requer a síntese enzimática de uma cadeia complementar de
 8 DNA à cadeia que está sendo analisada, usando um iniciador marcado
 9 radiotivamente e didesoxinucleotídeos, que interrompem a síntese de DNA
 10 (NELSON; COX, 2013). Esta metodologia revolucionou a biologia molecular,
 11 impulsionando o desenvolvimento de novas tecnologias como amplificação de
 12 segmentos de DNA (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) e de sequenciamento de
 13 nova geração (NGS – *New Generation Sequencing*) e o sequenciamento em larga
 14 escala (HGS – *High Throughput Sequencing*).

15 Frederick Sanger e seus colaboradores foram os primeiros a sequenciar o
 16 DNA de um bacteriófago, phi-X174, com aproximadamente 5.375 nucleotídeos
 17 (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). O primeiro genoma bacteriano a ser
 18 sequenciado foi de *Haemophilus influenzae* com 1.830.137 pares de bases, em
 19 1995, por Fleischmann e colaboradores. E em 1996, foi completado o
 20 sequenciamento do fungo leveduriforme *Sacharomyces cerevisiae* com genoma de
 21 12.2 Megabase (Mb) com 6.275 genes organizados em 16 cromossomos. Esta
 22 pesquisa foi desenvolvida através da colaboração entre mais de 70 grupos de
 23 pesquisa internacionais desde 1985 (JOHNSTON, 1996).

1 Mediante aos avanços do sequenciamento e sua automatização, o número de
2 genomas sequenciados foi aumentando gerando uma enorme base dados. A junção
3 de diversas áreas, como estatística, ciência da computação e biologia molecular,
4 possibilitou a criação da bioinformática. Este novo campo proporcionou a realização
5 de estudos de simulação de estrutura das moléculas e processos metabólicos; inferir
6 sobre prováveis funções gênicas; estudos evolutivos, entre outros. Com o auxílio da
7 bioinformática novos estudos começaram a ser desenvolvidos, como o estudo
8 utilizando omicas: genômica, transcriptoma, proteômica e metabolômica
9 (KANEHISA; BORK, 2003; KUMAR; DUDLEY, 2007; TRAMMELL; BRENNER,
10 2013).

11 Outra grande revolução na história da biologia molecular foi o
12 desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em 1983 pelo
13 bioquímico americano Kary Mullis (DAHM, 2005). Basicamente, esta técnica consiste
14 na amplificação de fragmentos de DNA *in vitro* de forma precisa e rápida. Para a
15 realização da PCR são necessários 4 principais componentes: amostra de DNA com
16 o segmento a ser amplificado, par de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos,
17 desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) e DNA-polimerase. A mistura de reação é
18 aquecida rapidamente para a separação da dupla fita de DNA e resfriada para que
19 os oligonucleotídeos iniciadores se liguem nas regiões específicas nas fitas abertas.
20 Em seguida, o segmento é replicado seletivamente pela DNA-polimerase, utilizando
21 os dNTPs. Este ciclo de aquecimento, resfriamento e replicação é repetido entre 25
22 a 40 vezes em um determinado tempo. O fragmento de DNA sintetizado em um
23 dado ciclo da PCR serve como substrato para a formação de novos fragmentos no
24 ciclo seguinte (Figura 8) (NELSON; COX, 2013).

25 Essa técnica permitiu o desenvolvimento de diversas áreas, como ciência
26 forense, farmacêutica, diagnóstico de doenças infecciosas, identificação de
27 organismos, entre outras.

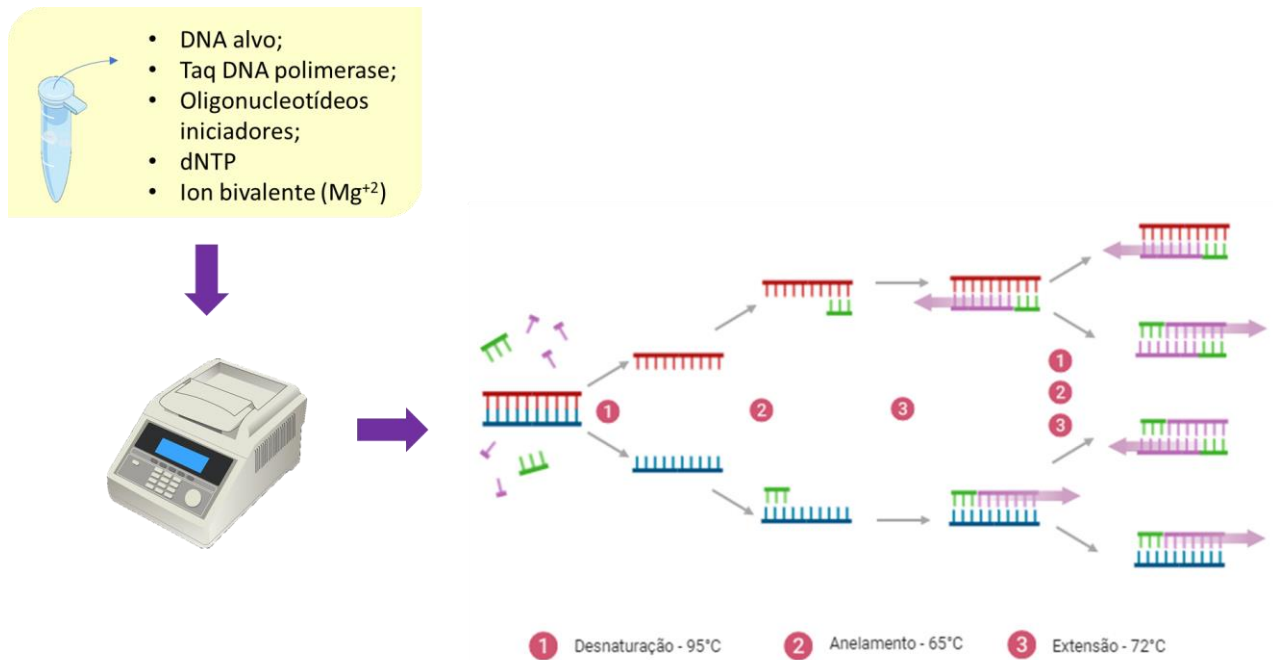
28

29

30

31

1 **Figura 8.** Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação de fragmentos
 2 de DNA *in vitro*. Onde, em verde estão representados os Oligonucleotídeos
 3 iniciadores e em lilás as bases nitrogenadas que serão adicionadas a fita.



4

5 Adaptado de "Polymerase Chain Reaction (PCR)", por BioRender.com (2020). Acesso em:
 6 <https://app.biorender.com/biorender-templates>

7

8 3.4.2 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

9 Com o advento da automação das técnicas de sequenciamento, a
 10 metodologia de Sanger passou por vários aprimoramentos. A primeira modificação
 11 realizada foi a troca dos reagentes radioativos de marcação dos ddNTPs por
 12 fluoróforos, sendo cada base indicada por uma cor diferente, o que possibilitou que a
 13 reação acontecesse em um único tubo. Isto viabilizou o uso da eletroforese capilar,
 14 técnica em que os fragmentos gerados durante a reação passam por capilares e a
 15 fluorescência é registrada por detectores eletrônicos (HELLER, 2001; KARGER;
 16 GUTTMAN, 2009).

17 A metodologia de Sanger é um processo de alto custo e demanda muito
 18 tempo para o sequenciamento de genomas, metagenomas e transcriptomas, uma
 19 vez que o equipamento consegue processar aproximadamente 300-800
 20 nucleotídeos por reação (FAKRUDDIN; CHOWDHURY, 2012; ZHANG et al., 2011).

21 Para atender essa demanda, foram desenvolvidas em 2005 técnicas que
 22 possuem a capacidade de sequenciar milhões de pequenos fragmentos de DNA

1 paralelamente, gerando um grande conjunto de dados com custo e tempo reduzido,
 2 conhecidas como Sequenciamento de Nova Geração (NGS) ou de Segunda
 3 Geração (NGUYEN et al., 2018).

4 O NGS pode ser aplicado para quatro tipos de análises: Sequenciamento de
 5 Genoma Completo (*Whole Genome Sequencing* - WGS); Sequenciamento de
 6 Exoma (Exome-Seq); Sequenciamento de RNA (RNA-Seq); e Sequenciamento de
 7 Metilação (Methyl-Seq). Existem diversas plataformas de sequenciamento no
 8 mercado, mas apesar de possuírem metodologias diferentes, todas seguem o
 9 mesmo fluxo de trabalho (Tabela 1) (VOELKERDING; DAMES; DURTSCHI, 2009).

10

11 **Tabela 1.** Comparação de plataformas mais utilizadas de NGS.

	Roche 454 (Qiagen)	Illumina (Solexa)	SOLID4 (Life Technologies)	HeliScope (Helicos)	Ion Torrent (Life Technologies)	PacBio (Pacific Technologies)
Metodologia de Sequenciamento	Pirosequenciamento	Síntese	Ligação	Síntese	Síntese	Síntese
Metodologia de Amplificação	PCR de emulsão	PCR em fase solida	PCR de emulsão	Modelo de molécula única	PCR de emulsão	Modelo de molécula única em tempo real
Comprimento de leitura (pb)	600-800	2 x 101	50	25-35	100-400	Em média 964
Vantagens	Maior comprimento de leitura; Pequenos arquivos de dados.	Alto throughput	Dados de alta qualidade	Big data entre síntese de molécula única	Baixo custo; Muito rápido.	Maior comprimento de leitura que Roche 454; Rápido.
Desvantagens	Menos dados; Homopolímero.	Montagem de leitura curta	Leituras curtas; Longo prazo	Pequenas leituras; Maior taxa de erro bruto	Menos dados; Leitura pequena	Erros indel aleatórios

12

13 Fonte: HODZIC et al., 2017; NGUYEN et al., 2018;

14

15 Para a realização do sequenciamento por NGS é necessário primeiramente
 16 construir uma biblioteca de fragmentos de tamanhos adequados para cada tipo de
 17 análise. Essa fragmentação pode ocorrer através de digestão enzimática, quebra
 18 mecânica ou por PCR. Após a fragmentação, são adicionados adaptadores às
 19 extremidades de cada fragmento e, no caso de possuir várias amostras em uma
 20 mesma corrida, adiciona-se marcadores para a identificação de cada uma delas
 21 (NELSON; COX, 2013; VAN DIJK et al., 2014).

22 O segundo passo é a amplificação dos fragmentos, onde serão geradas
 23 várias cópias, formando clusters para posterior sequenciamento. Essa amplificação
 24 pode ocorrer por PCR em ponte ou emulsão em uma superfície sólida, que varia
 25 dependendo da plataforma utilizada. Os fragmentos de DNA são hibridados através
 26 dos adaptadores em sua extremidade aos adaptadores fixados na superfície,

1 ligando-se covalentemente e assim iniciando a amplificação (NELSON; COX, 2013;
2 VAN DIJK et al., 2014).

3 A leitura do sequenciamento também pode variar conforme a metodologia
4 empregada. Uma das plataformas mais utilizadas, Illumina (Solexa), realiza o
5 sequenciamento baseado em síntese (SBS), onde nucleotídeos contendo
6 marcadores fluorescentes com uma região bloqueadora removível são adicionados
7 de maneira complementar ao fragmento molde. A leitura é realizada através da
8 captação de fluorescência em cada ciclo do sequenciamento, identificando cada
9 nucleotídeo adicionado. Já a plataforma Roche 454 (Qiagen) utiliza a metodologia
10 de pirosequenciamento, onde há a liberação de um pirofosfato a cada nucleotídeo
11 incorporado que será convertido em ATP pela ação da enzima ATP sulfurilase. O
12 ATP que foi gerado será utilizado na conversão da luciferina em oxiluciferina
13 gerando uma luz que será captada pelo detector a cada ciclo (ESCALANTE et al.,
14 2014) (Figura 9).

15 A fase final consiste na análise dos dados obtidos, onde as leituras dos
16 fragmentos, denominadas de *reads*, serão alinhadas e posteriormente montadas
17 através de um genoma de referência ou pela metodologia *de novo*. Nesta etapa são
18 necessários programas avançados de bioinformática, que auxiliam tanto na
19 montagem como em anotações e análises comparativas de genoma
20 (VOELKERDING; DAMES; DURTSCHI, 2009; ZHANG et al., 2011).

21

22

23

24

25

26

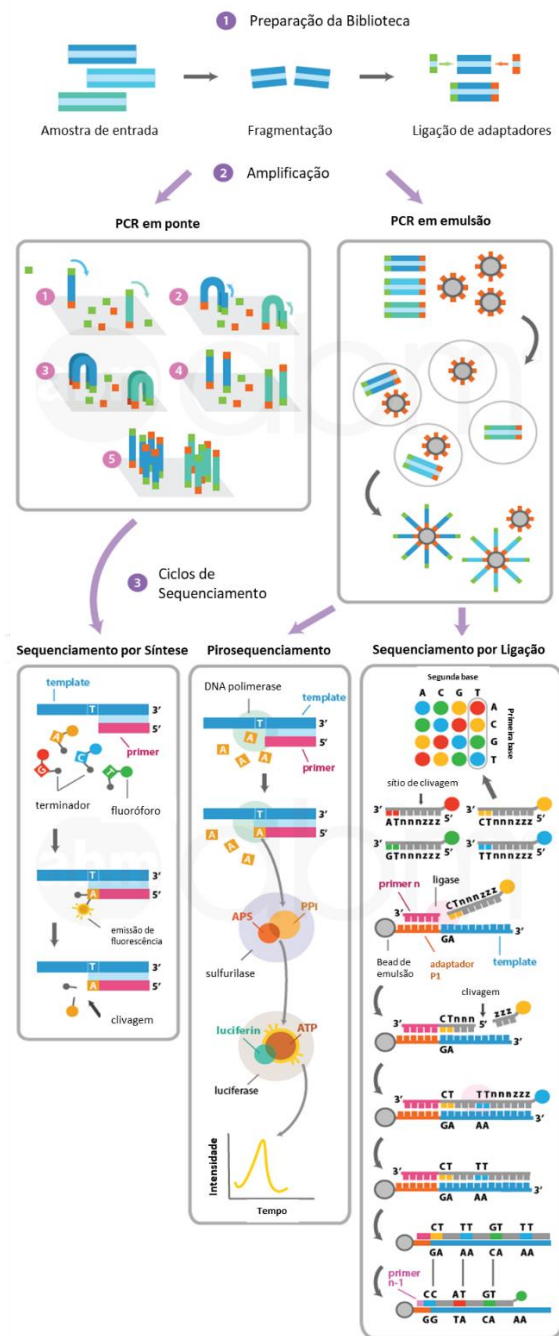
27

28

29

30

- 1 **Figura 9.** Características das diferentes plataformas de Sequenciamento de Nova
 2 Geração. O esquema ilustra as semelhanças existentes na preparação da biblioteca
 3 e as diferenças entre as ampliações e ciclos de sequenciamento.



4

5

Fonte: ABM, 2020.

6

7

8 Uma das desvantagens com relação as plataformas de sequenciamento de
 9 segunda geração é a formação de leituras *shorts-reads*. A fragmentação do genoma
 10 gera leituras de tamanho menores que 500 pb, o que dificulta a posterior montagem,
 principalmente de genomas complexos, e que pode ocasionar erros. Para solucionar

1 este problema, em 2009, foi desenvolvido uma plataforma para sequenciamento de
2 leituras longas (*long-reads*).

3 A plataforma mais conhecida da terceira geração é a PacBio (Pacific
4 Biosciences®) que utiliza o sequenciamento de molécula única em tempo real (*Single*
5 *Molecule Real-Time*, SMRT). Diferente das técnicas anteriores, para a preparação
6 da biblioteca de DNA não é necessária à amplificação do material genético por PCR,
7 pois após a fragmentação, ambas extremidades dos fragmentos são unidas,
8 gerando uma única fita circular que será replicada automaticamente (XIAO; ZHOU,
9 2020). Nesta metodologia, uma fita de DNA molde é capturada em um poço
10 denominado Zero-Mode Waveguides (ZMWs) que possui na parte inferior múltiplos
11 lasers de detecção de fluorescência. Nucleotídeos marcados com fluorescência são
12 adicionados ao DNA molde por uma DNA polimerase, quando ligados ao sítio ativo
13 desta enzima emitem fluorescência e posteriormente liberando o fluoróforo. Deste
14 modo, o pulso de fluorescência é registrado somente quando o nucleotídeo correto
15 está ligado ao sítio ativo (EID et al., 2009).

16 Apesar de possuir um maior tamanho de leitura e realizar de forma rápida, o
17 sequenciamento SMRT, possui taxas de erros de leituras superior as plataformas de
18 *short-reads*, sendo recomendado a utilização de plataformas de segunda geração
19 para correção de erros (PEARMAN; FREED; SILANDER, 2020). Além disso, o custo
20 do equipamento e da construção de bibliotecas é elevado em comparação com as
21 demais plataformas.

22 Outra plataforma de terceira geração difundida no mercado é a Nanopore
23 (Oxford Nanopore Technologies®) que utiliza o sistema de sequenciamento em
24 nanoporos imobilizados em uma membrana elétrica resistente. Durante o
25 sequenciamento, a fita dupla de DNA se move através do nanoporo gerando uma
26 variação do potencial elétrico na membrana de acordo com cada nucleotídeo, sendo
27 então identificada (XIAO; ZHOU, 2020). A detecção das bases é feita em grupos
28 sobreponíveis de tamanho fixo, a sequência é lida de 5 em 5 bases (SCHATZ,
29 2017).

30 O diferencial desta plataforma consiste na facilidade do preparo da amostra,
31 em seu tamanho portátil e baixo custo, que permite realizar análises em campo de
32 forma rápida e eficiente. Além disso, permitem a detecção de centenas de kilobases

1 em uma leitura contínua, realizando leituras ultralongas chegando a tamanhos acima
2 de 300 kb (MIDHA; WU; CHIU, 2019).

3 3.4.3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

4 Com os avanços no desenvolvimento e emprego das técnicas de PCR, surge
5 a segunda geração desta metodologia, a PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR).
6 Nesta técnica é possível detectar as amplificações do material genético enquanto
7 ocorre a reação, a cada ciclo, diferente da PCR convencional onde a visualização do
8 resultado só é possível ao final do experimento. Dessa forma, é possível estimar o
9 número de genes ou transcritos em relação a uma situação controle (FRÖDER,
10 2008; SMITH; OSBORN, 2009).

11 A detecção da amplificação ocorre devido a presença de agentes
12 fluorescentes na reação. A intensidade de fluorescência é diretamente proporcionais
13 aos produtos amplificados, os amplicons, do DNA ou RNA alvo. Dentre os tipos de
14 agentes se destacam: os intercalantes de DNA de fita dupla e os oligonucleotídeos
15 de sequência específica (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004; SMITH; OSBORN,
16 2009; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

17 O SYBR[®] Green é um dos fluoróforos intercalantes de DNA mais utilizado,
18 principalmente pelo seu baixo custo. Este agente se liga ao sulco menor de DNA de
19 fita dupla, mudando sua conformação e emitindo maior fluorescência em
20 comparação ao fluoróforo não ligado, sendo assim detectado pelo equipamento
21 (Figura 10a) (LIFE TECHNOLOGIES, 2015). Uma desvantagem desse agente é sua
22 inespecificidade, uma vez que ele pode se ligar a contaminantes que podem estar
23 presentes na amostra e a oligonucleotídeos dimerizados (NOVAIS; PIRES-ALVES;
24 SILVA, 2004).

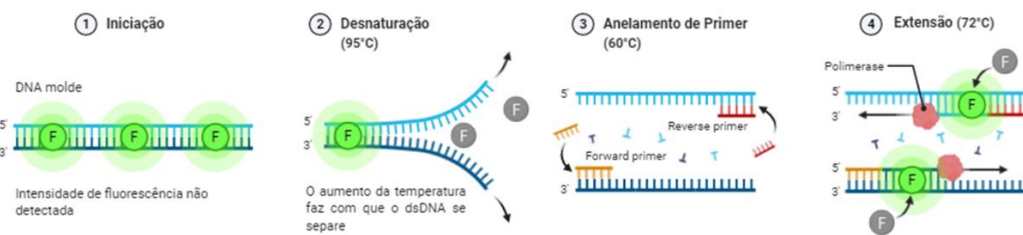
25 Já os oligonucleotídeos de sequência específica, também conhecidos por
26 sondas, são desenhados especificamente para o alvo de interesse, o que torna o
27 custo mais alto com relação ao SYBR[®] Green. A Sonda TaqMan[®], comercializada
28 pela Thermo Fischer[®], é uma das sondas mais conhecidas. Nesta sonda, associada
29 a extremidade 5' do oligonucleotídeo está um agente fluorescente, denominado de
30 Reporter, e na extremidade 3' está uma molécula que inibe a fluorescência do
31 Reporter através de troca de energia, denominada Quecher. A sonda se liga a fita
32 simples de DNA e quando a DNA polimerase se aproxima ocorre a quebra da sonda,
33 liberando a molécula Reporter que, uma vez distante do Quecher, emite a

1 fluorescência que será detectada (Figura 10b) (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA,
2 2004; LIFE TECHNOLOGIES, 2015).

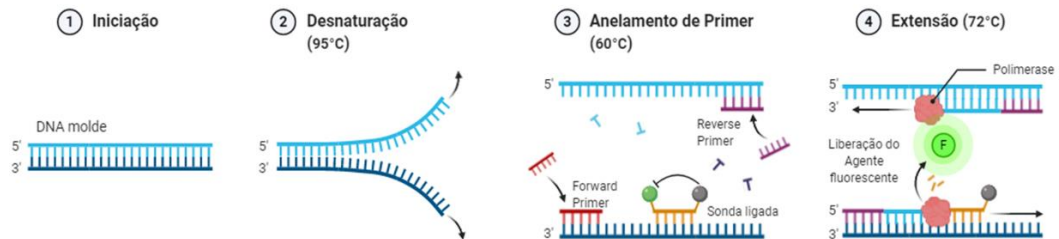
3

4 **Figura 10.** Mecanismo dos diferentes agentes fluorescentes em reação de PCR em
5 tempo real. A: Intercalante de DNA fita dupla; B: Oligonucleotídeo de sequência
6 específica.

(A) Intercalante de DNA fita dupla



(B) Oligonucleotídeo de sequência específica



7

8 Adaptado de "Fluorescent Dye-Based Real Time PCR" e "Fluorescent Probe-Based Real Time PCR", por
9 BioRender.com (2020). Acesso em: <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

10

11 A quantificação é determinada durante a fase exponencial da amplificação
12 quando os números de amplicons são diretamente proporcionais ao número inicial
13 de sequências-alvo presente na amostra. Na fase logarítmica linear há o aumento
14 exponencial do sinal de fluorescência emitido até que o sinal se torne constante
15 devido a limitação dos componentes da reação (Figura 11) (VANGUILDER; VRANA;
16 FREEMAN, 2008).

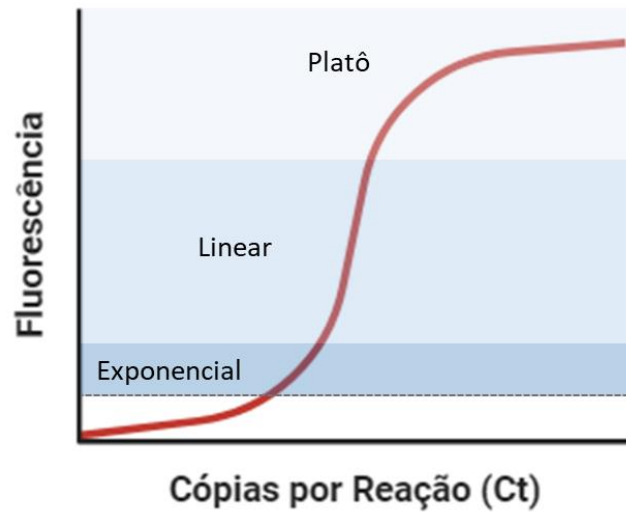
17

18 A qPCR é um método de rápida execução, robusto e sensível, se tornando
19 uma ferramenta importante para diagnósticos de patógenos em amostras biológicas.
20 Além disso, pode ser utilizado para rastrear alterações genéticas em escalas
21 temporais e espaciais e, condições ambientais ou experimentais variáveis (KLEIN,
22 2002; SMITH; OSBORN, 2009).

22

23

1 **Figura 11.** Fases da amplificação de DNA na reação de PCR em tempo real.



2
3 Adaptado de: VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008

4

5 Associada ao processo de transcrição reversa em ensaios de RT-qPCR, a
6 qPCR oferece uma ferramenta importante para estudos de quantificação de
7 expressão gênica em comparação com variações de fatores bióticos e abióticos,
8 respondendo a perguntas com relação a atividade e processos biológicos (BUSTIN
9 et al., 2005; SMITH; OSBORN, 2009; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

1 REFERÊNCIAS

2

3 ABM. Next Generation Sequencing (NGS) An Introduction. Canadá: Applied
4 Biological Materials, 2020. Disponível em:
5 [https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/next_generation_sequencing_i](https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/next_generation_sequencing_introduction.php)
6 [ntroduction.php](https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/next_generation_sequencing_introduction.php) , Acesso em: 27 julho 2020.

7 ALEXANDER, D. C.; LEVETT, P. N.; TURENNE, C. Y. **Molecular Taxonomy**. [s.l.]
8 Elsevier Ltd, 2014. v. 1–3

9 ALHAZMI, A. Pseudomonas aeruginosa – Pathogenesis and Pathogenic
10 Mechanisms. **International Journal of Biology**, v. 7, n. 2, 2015.

11 AMICHI, D. **Atividade antibiótica de metabólito secundário produzido por**
12 **Pseudomonas aeruginosa em células planctônicas e biofilme de Entericoccus**
13 **faecium**. 2015, Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual de
14 Londrina, Londrina, 2015.

15 ANDRADE, M. A. B. S.; CALDEIRA, A. M. A. O modelo de DNA e a biologia
16 molecular: inserção histórica para o ensino de biologia. **Filosofia e História da**
17 **Biologia**, São Paulo, v. 4, p. 139-166, 2009.

18 ARGÜELLO, J. M.; RAIMUNDA, D.; PADILLA-BENAVIDES, T. Mechanisms of
19 copper homeostasis in bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**,
20 v. 3, p. 1-14, 2013.

21 BARAKAT, R. et al. Unsuspected pyocyanin effect in yeast under anaerobiosis.
22 **MicrobiologyOpen**, v. 3, p. 1-14, 2013.

23 BARAZETTI, A. R. et al. Evaluation of Bioproducts and Mycorrhizal Inoculation in
24 Asian Soybean Rust Control, Nutrient Leaf Contents and Yield Under Field
25 Conditions. **Sustainability in Plant and Crop Protection**. 1ed. Cham: Springer
26 International Publishing, 2019. p. 193-204.

27 BEDOYA, J. C. et al. Enhanced production of target bioactive metabolites produced
28 by Pseudomonas aeruginosa LV strain. **Biocatalysis and Agricultural**
29 **Biotechnology**, v. 17, n. December 2018, p. 545–556, 2019.

30 BELL, S. J.; FRIEDMAN, S. A.; LEONG, J. Antibiotic action of N-
31 methylthioformohydroxamate metal complexes. **Antimicrobial Agents and**
32 **Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 384–391, 1979.

33 BRANDEL, J. et al. Pyochelin, a siderophore of Pseudomonas aeruginosa:
34 Physicochemical characterization of the iron(iii), copper(ii) and zinc(ii) complexes.
35 **Dalton Transactions**, v. 41, n. 9, p. 2820–2834, 2012.

36 BRAUD, A. et al. The Pseudomonas aeruginosa pyochelin-iron uptake pathway and
37 its metal specificity. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 11, p. 3517–3525, 2009.

38 BRAUD, A. et al. Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the
39 extracellular medium reduces toxic metal accumulation in Pseudomonas aeruginosa

- 1 and increases bacterial metal tolerance. **Environmental Microbiology Reports**,
2 v. 2, n. 3, p. 419–425, 2010.
- 3 BREDENBRUCH, F. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS)
4 has an iron-chelating activity. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 1318–
5 1329, 2006.
- 6 BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. **Journal of**
7 **Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597–601, 2005.
- 8 CARDOZO, V. F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by
9 a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
10 strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 1–8,
11 2013.
- 12 CEZARD, C.; FARVACQUES, N.; SONNET, P. Chemistry and Biology of
13 Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. **Current Medicinal Chemistry**,
14 v. 22, n. 2, p. 165–186, 2014.
- 15 CHIMIAK, A.; PRZYCHODZEN, W.; RACHON, J. The thiohydroxamate system.
16 **Heteroatom Chemistry**, v. 13, 2002.
- 17 CHIN-A-WOENG, T. F. C. et al. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing
18 *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium*
19 *oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n.
20 11, p. 1069–1077, 1998.
- 21 CORRAN, A.; KNAUF-BEITER, G.; ZEUN, R. (2008) Fungicides acting on signal
22 transduction. In: KRÄMER, W.; SCHIRMER, U. (eds) **Modern crop protection**
23 **compounds**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. p 561–580.
24
- 25 D'AGATA, E. *Pseudomonas aeruginosa* and Other *Pseudomonas* Species. **Mandell,**
26 **Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**, v. 2, p.
27 2518–2531, 2014.
- 28 DADDAOUA, A.; KRELL, T.; RAMOS, J. L. Regulation of glucose metabolism in
29 *Pseudomonas*. The phosphorylative branch and Entner-Doudoroff enzymes are
30 regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. **Journal of**
31 **Biological Chemistry**, v. 284, n. 32, p. 21360–21368, 2009.
- 32 DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. **Developmental Biology**, v.
33 278, n. 2, p. 274–288, 2005.
- 34 DAHM, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid
35 research. **Human Genetics**, v. 122, n. 6, p. 565–581, 2008.
- 36 DE OLIVEIRA, A. G. et al. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular
37 compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv.
38 *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, n. 2, p. 125–131, 2011.
- 39 DE OLIVEIRA, A. G. et al. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas*
40 *aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in**

- 1 **Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–12, 2016.
- 2 EID, J. et al. Real-Time DNA sequencing from single polymerase molecules.
3 **Science**, v. 323, p. 133-138, 2009
- 4 EMILIANO, J. **Componentes do metabolismo secundário bacteriano com**
5 **potencial inibitório sobre *Sclerotinia sclerotiorum***. 2016, Dissertação (Mestrado
6 em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Biologia Evolutiva) – Universidade
7 Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.
- 8 ESCALANTE, A. E. et al. The study of biodiversity in the era of massive sequencing.
9 **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 85, n. 4, p. 1249–1264, 2014.
- 10 FAKRUDDIN, M.; CHOWDHURY, A. Pyrosequencing-an alternative to traditional
11 Sanger sequencing. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 8,
12 n. 1, p. 14–20, 2012.
- 13 FILIATRAULT, M. J. et al. Effect of Anaerobiosis and Nitrate on Gene Expression in.
14 **Society**, v. 73, n. 6, p. 3764–3772, 2005.
- 15 FRÖDER, H. **Desenvolvimento de métodos para a quantificação direta de**
16 ***Salmonella* sp. por PCR-tempo real e por transcriptase reversa- PCR-tempo**
17 **real**. 2008, Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências
18 Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- 19 GIONCO, B. ***Pseudomonas aeruginosa* Cepa LV produtora de um antibiótico**
20 **organometálico**: Análise do transcriptoma na presença de cobre e a atividade
21 antibacteriana em isolados de *Acintobacter baumannii* multirresistentes. 2016, Tese
22 (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.
- 23 GIONCO, B. et al. New insights about antibiotic production by *Pseudomonas*
24 *aeruginosa*: A gene expression analysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. Sep, 2017.
- 25 GONZÁLEZ-GUERRERO, M. Distinct functional roles of homologous Cu⁺ efflux
26 ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 78, p. 1246-
27 1258, 2010.
- 28 GROSS, J. et al. Universal soldier: *Pseudomonas aeruginosa* - an opportunistic
29 generalist. **Frontiers in Biology**, v. 8, n. 4, p. 387–394, 2013.
- 30 HARGITTAI, I. The tetranucleotide hypothesis: A centennial. **Structural Chemistry**,
31 v. 20, n. 5, p. 753–756, 2009.
- 32 HELLER, C. Principles of DNA separation with capillary electrophoresis.
33 **Electrophoresis**, v. 22, n. 4, p. 629–643, 2001.
- 34 HO SUI, SJ. et al. Raloxifene attenuates *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin
35 production and virulence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p.
36 246–251, 2012.
- 37 HODZIC, J. et al. Overview of Next-generation Sequencing Platforms Used in
38 Published Draft Plant Genomes in Light of Genotypization of Immortelle Plant

- 1 (Helichrysum Arenarium). **Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)**,
2 v. 71, n. 4, p. 288–292, 2017.
- 3 JOHNSTON, M. Genome sequencing: The complete code for a eukaryotic cell The
4 complete sequencing of the genome of a simple eukaryotic organism — the budding
5 yeast *Saccharomyces cerevisiae* — is a milestone for biology, and sets the stage for
6 a complete understanding of . **Current Biology**, v. 6, n. 5, p. 500–503, 1996.
- 7 KAKKAR, R.; DUA, A.; GAHLOT, P. Metal ion complexes of thioformin: A density
8 functional study. **Polyhedron**, v. 26, n. 18, p. 5301–5308, 2007.
- 9 KANEHISA, M.; BORK, P. Bioinformatics in the post-sequence era. **Nature**
10 **Genetics**, v. 33, n. 3S, p. 305–310, 2003.
- 11 KARGER; B. L.; GUTTMAN, A. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis.
12 **Electrophoresis**, v. 30, p. S196-S202, 2009.
- 13 KELLENBERGER, E. The evolution of molecular biology. **EMBO reports**, v. 5, p.
14 546-549, 2004.
- 15 KERBAUY, G. et al. Effect of a Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas*
16 *aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K.*
17 *pneumoniae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 389–397,
18 2016.
- 19 KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron
20 chelator – Siderophore: A review. **Microbiological Research**, v. 212–213, n. August
21 2017, p. 103–111, 2018.
- 22 KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: Applications and
23 limitations. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 6, p. 257–260, 2002.
- 24 KOSSEL, A. Nobel Lecture. Suíça: Nobel Prize, 1910. Disponível em:
25 <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1910/kosssel/lecture/> . Acesso em: 27
26 Julho 2020.
- 27 KUMAR, S.; DUDLEY, J. Bioinformatics software for biologists in the genomics era.
28 **Bioinformatics**, v. 23, n. 14, p. 1713–1717, 2007.
- 29 LADOMERSKY, E.; PETRIS, M. J. Copper tolerance and virulence in bacteria.
30 **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 957–964, 2016.
- 31 LIFE TECHNOLOGIES. Realtime PCR handbook. **Realtime PCR handbook**, p. 1–
32 68, 2015.
- 33 LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant
34 *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally
35 encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p.
36 582–610, 2009.
- 37 LOPES, L. P. et al. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against
38 *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. **Tropical**

- 1 **Plant Pathology**, v. 37, n. 4, p. 233–238, 2012.
- 2 MA, L. S. et al. Fluopsin C induces oncosis of human breast adenocarcinoma cells.
3 **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 8, p. 1093–1100, 2013.
- 4 MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. In: **Microbiologia do Brock**. 12. ed.
5 Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 1032.
- 6 MIDHA, M. K.; WU, M.; CHIU, K. Long-read sequencing in deciphering human
7 genetics to a greater depth. **Human Genetics**, v. 138, p. 1201-1215, 2019.
- 8 MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of**
9 **Microbiology**, v. 55, p. 165–199, 2001.
- 10 MOORE, N. M.; FLAWS, M. L. Introduction : *Pseudomonas aeruginosa*. **American**
11 **Society for Clinical Laboratory Science**, v. 24, n1, 2011.
- 12 MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle:
13 A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and**
14 **Infection Microbiology**, v. 7, n. FEB, 2017.
- 15 MUNHOZ, L. D. et al. Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular
16 bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Cogent**
17 **Food & Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2017.
- 18 NANDA, M.; KUMAR, V.; SHARMA, D. K. Multimetal tolerance mechanisms in
19 bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to
20 'clean-up' heavy metal contaminants from water. **Aquatic Toxicology**, v. 212, n.
21 January, p. 1–10, 2019.
- 22 NANDI, M. et al. Pyrrolnitrin and Hydrogen Cyanide Production by *Pseudomonas*
23 *chlororaphis* Strain PA23 Exhibits Nematicidal and Repellent Activity
24 against *Caenorhabditis elegans*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.
- 25 NAVARRO, M. O. P. et al. Bioactive Compounds Produced by Biocontrol Agents
26 Driving Plant Health. In: **Microbiome in Plant Health and Disease**. [s.l: s.n.]. p.
27 337–374, 2019a.
- 28 NAVARRO, M. O. P. et al. Fluopsin c for treating multidrug-resistant infections: In
29 vitro activity against clinically important strains and in vivo efficacy against
30 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10,
31 n. OCT, p. 1–12, 2019b.
- 32 NAVARRO, M. O. P. et al. Determining the Targets of Fluopsin C Action on Gram-
33 Negative and Gram-Positive Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p.
34 1–11, 2020.
- 35 NELSON, D. L.; COX M. M. Tecnologia da Informação com Base no DNA. In:
36 **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p.
37 313-355.
- 38 NEVES, P. R. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: An endemic

- 1 problem in Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n.
2 4, p. 409–420, 2011.
- 3 NGUYEN, H. T. et al. The applications of massive parallel sequencing (next-
4 generation sequencing) in research and molecular diagnosis of human genetic
5 diseases. **Vietnam Journal of Science Technology and Engineering**, v. 60, p. 30-
6 43, 2018.
- 7 NIEKAWA, E. T. G. **Revestimento de sementes de feijão com bioativos**
8 **microbianos para o controle de Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli**. 2019,
9 Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina,
10 Londrina, 2019.
- 11 NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista**
12 **Biociência e Desenvolvimento**, p. 10-13, 2004.
- 13 NOVOA-APONTE, L.; RAMÍREZ, D.; ARGÜELLO, J. M. The interplay of the
14 metalloensor CueR with two distinct CopZ chaperones defines copper homeostasis
15 in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 13, p.
16 4934–4945, 2019.
- 17 PALLERONI, N. J. The pseudomonas story. **Environmental Microbiology**, v. 12, n.
18 6, p. 1377–1383, 2010.
- 19 PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal-response systems in
20 Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 576–588,
21 2016.
- 22 PARMAR, J.H. An important role for periplasmic storage in *Pseudomonas*
23 *aeruginosa* copper homeostasis revealed by a combined experimental and
24 computational modeling study. **Molecular Microbiology**, v. 110, p. 357–369, 2018.
- 25 PEARMAN, W. S.; FREED, N. E.; SILANDER, O. K. Testing the advantages and
26 disadvantages of short- and long-read eukaryotic metagenomics using simulated
27 reads. **BMC Bioinformatics**, v. 21, p. 1-15, 2020.
- 28 PIERSON III, L.S.; PIERSON, E.A. Metabolism and function of bacteria in the
29 environment and biotechnological processes. **Applied Microbiology**
30 **Biotechnology**, 2010.
- 31 PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CYCOŃ, M.; KOZDRÓJ, J. Metal-tolerant bacteria
32 occurring in heavily polluted soil and mine spoil. **Applied Soil Ecology**, v. 28, n. 3, p.
33 237–246, 2005.
- 34 PISTORI, J. F. et al. Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas*
35 *aeruginosa* as an alternative to control Huanglongbing in *Citrus sinensis* cv. Valencia.
36 **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 4, p. 289–296, 2018.
- 37 PITT, T.L.; SIMPSON, A.J. *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. In: **Principles and**
38 **Practice of Clinical Bacteriology**. 2. ed. Londres: John Wiley & Sons, 2006. p. 427-
39 443.

- 1 PORTIN, P. The birth and development of the DNA theory of inheritance: sixty years
2 since the discovery of the structure of DNA. **Journal of Genetics**, v. 93, p. 293-302,
3 2014.
- 4 PRAKASH, C. R.; RAJA, S. Indolinones as promising scaffold as kinase inhibitors: a
5 review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, 2012.
- 6 PUOPOLO G. et al. Insights on the susceptibility of plant pathogenic fungi to
7 phenazine-1-carboxylic acid and its chemical derivatives. **Natural Product**
8 **Research**, v. 27, p. 956–966, 2013.
- 9 QUINTANA, J.; NOVOA-APONTE, L.; ARGÜELLO, J. M. Copper homeostasis
10 networks in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological**
11 **Chemistry**, v. 292, n. 38, p. 15691–15704, 2017.
- 12 RAMPAZO, L. G. L. **Avaliação de agentes biológicos e seus produtos na**
13 **incidência de lesões foliares do cancro cítrico**. 2004, Dissertação (Mestrado em
14 Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.
- 15 RANE, M.R. et al. Exploring antagonistic metabolites of established biocontrol agente
16 of marine origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 665-675,
17 2008.
- 18 RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: Its role in
19 virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor Perspectives in**
20 **Medicine**, v. 2, n. 11, p. 1–26, 2012.
- 21 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-
22 terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**
23 **United States of America**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- 24 SCHATZ, M. C. Nanopore sequencing neets epigenetics. **Nature methods**, v. 14, n.
25 4, p. 347-348, 2017.
- 26 SEILER, C.; BERENDONK, T. U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic
27 resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture.
28 **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. DEC, p. 1–10, 2012.
- 29 SHANMUGAIAH et al. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of
30 phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium,
31 *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p.
32 703-711, 2010.
- 33 SHIRAHATA, K. et al. The structures os Fluopsins C and F. **The Journal of**
34 **Antibiotics**, v. 23, n. 11, p. 546–550, 1970.
- 35 SILBY, M. W. et al. *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. **FEMS**
36 **Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. 652–680, 2011.
- 37 SILVA VASCONCELLOS, F. C. DA et al. Evaluation of antibiotic activity produced by
38 *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. pruni.
39 **Agricultural Sciences**, v. 05, n. 01, p. 71–76, 2014.

- 1 SIMIONATO, A. S. et al. The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial
2 growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain.
3 **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–9, 2017.
- 4 SMILANICK, J. L. ; DENIS-ARRUE, R. Control of green mold of lemons with
5 *Pseudomonas* species. **Plant Disease**, v. 76, n. 5, 1992.
- 6 SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-
7 PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67,
8 n. 1, p. 6–20, 2009.
- 9 SOLIOZ, M. **Copper and Bacteria**. Switzerland: Springer Nature, 2018.
- 10 STOLLE, P.; HOU, B.; BRÜSER, T. The Tat substrate CueO is transported in an
11 incomplete folding state. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 26, p. 13520–
12 13528, 2016.
- 13 STROEBEL, D. et al. Oligomeric behavior of the RND transporters CusA and AcrB in
14 micellar solution of detergent. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v.
15 1768, n. 6, p. 1567–1573, 2007.
- 16 TAKEDA, F. et al. Pyrrolnitrin delays postharvest fruit rot in strawberries.
17 **HortScience**, v. 25, n. 3, 1990.
- 18 THADEN, J. T.; LORY, S.; GARDNER, T. S. Quorum-Sensing regulation of copper
19 toxicity system in *Pseudomonas aeruginosa*. **American Society for Microbiology**,
20 p. 2557-2568, 2010
- 21 TCHOUNWOU, P. B. et al. Molecular, clinical and environmental toxicology Volume
22 3: Environmental Toxicology. **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**,
23 v. 101, p. 133–164, 2012.
- 24 TEITZEL, G. M. et al. Survival and growth in the presence of elevated copper:
25 Transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of**
26 **Bacteriology**, v. 188, n. 20, p. 7242–7256, 2006.
- 27 TRAMMELL, S. A. J.; BRENNER, C. Targeted, LCMS-based metabolomics for
28 quantitative measurement of NAD⁺ metabolites. **Computational and Structural**
29 **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 5, p. e201301012, 2013.
- 30 VAN DIJK, E. L. et al. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends**
31 **in Genetics**, v. 30, p. 418-426, 2014.
- 32 VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of
33 quantitative PCR for gene expression analysis. **BioTechniques**, v. 44, n. 5, p. 619–
34 626, 2008.
- 35 VOELKERDING, K. V.; DAMES, S. A.; DURTSCHI, J. D. Next-generation
36 sequencing:from basic research to diagnostics. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p.
37 641–658, 2009.
- 38 VOICA, D. M. et al. Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea.

- 1 **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 14, p. 1–9, 2016.
- 2 XIAO, T.; ZHOU, W. The third generation sequencing: the advanced approach to
3 genetic diseases. **Translational Pediatrics**, v. 9, n. 2, p. 163-173, 2020.
- 4 WU, W. et al. **Pseudomonas aeruginosa**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2014. v. 2–3
- 5 YONEYAMA, H.; NAKAE, T. Protein C (OprC) of the outer membrane of
6 *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. **Microbiology**, v.
7 142, n. 8, p. 2137–2144, 1996.
- 8 ZHANG, J. et al. The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of**
9 **Genetics and Genomics**, v. 38, n. 3, p. 95–109, 2011.
- 10 ZHANG, Y. et al. Control effect and possible mechanism of the natural compound
11 phenazine-1-carboxamide against *Botrytis cinerea*. **PLoS One**, v. 10, p. 1-17, 2015.

APRESENTAÇÃO

1

2

3 O presente trabalho foi dividido em dois artigos já finalizados. O artigo I intitulado
4 “Whole genome sequence of bioactives-producing *Pseudomonas aeruginosa* LV
5 strain” está no modelo da revista Microbiology Resource Announcements. O artigo II
6 denominado: “Análise da expressão temporal de genes diferencialmente expressos
7 de *Pseudomonas aeruginosa* Cepa LV pela presença de cobre” está no modelo da
8 revista Frontiers in Genetics.

ARTIGO I

1 Whole genome sequence of bioactives-producing *Pseudomonas aeruginosa* LV strain

2

3 Ane Stéfano Simionato^a, Bárbara Gionco Cano^a, Miguel Octavio Pérez Navarro^a, Eliandro

4 Reis Tavares^a, Renan Augusto Ribeiro^b, Mariangela Hungria^b, Lucy Megumi Yamauchi^a,

5 Sueli Fumie Yamada-Ogatta^a, Galdino Andrade^{a#}

6

7 ^aDepartment of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná,

8 Brazil

9 ^b Soil Biotechnonology Laboratory, Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brazil

10

11 Running Head: Complete genome *Pseudomonas aeruginosa* LV strain

12

13 #Address correspondence to Galdino Andrade, andradeg@uel.br

14 Ane Stéfano Simionato and Bárbara Gionco Cano contributed equally to this work.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 Abstract

27 *Pseudomonas aeruginosa* is known for a high adaptive capacity due to the ability to
28 synthesize several compounds that give advantages to compete with other microorganisms in
29 the environment. The LV strain synthesizes bioactive compounds, mainly by the secondary
30 metabolism, with antitumor and antimicrobial activity against microbial pathogens of humans
31 and plants.

32

33 The extraordinary metabolic and physiologic versatility of microbial species of *Pseudomonas*
34 genera allows to live with a high population in the most diverse environments, including
35 interactions with plants, animal and human. The plasticity of *Pseudomonas* makes them an
36 important agent to use in biotechnological applications (1, 2). *P. aeruginosa* strains can
37 produce a variety of polymers and secondary metabolites, which are widely used in
38 agriculture and medicine (3-10). Herein, we report the draft genome sequence of *P.*
39 *aeruginosa* LV strain, who was isolated from an old citrus canker lesion on orange leaves (*C.*
40 *sinencis* cv. Valence), in Astorga, Brazil [23130 29.1100 S; 5139'47.2000 W] (11). *P.*
41 *aeruginosa* LV strain was grown overnight at 28°C in Nutrient Agar and one colony was used
42 for DNA extraction. The DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Germany) was used for
43 genomic DNA extraction according to the manufacturer's standard protocols. The LV strain
44 genome was sequenced on the MiSeq platform at Embrapa Soja in Londrina, Brazil. The
45 library was assembled using the Nextera XT DNA Library Prep kit (Illumina, USA), and
46 performed according to the manufacturer's specifications. Paired-end reads obtained by
47 shotgun sequencing was 3,378,198 sequences and allowed a genome coverage of 150-fold. A
48 *de novo* genome assembly was constructed with SPAdes 3.11.1 (12) after filtering and
49 trimming with CLC Genomics Workbench 20.0.4 (<https://digitalinsights.qiagen.com>) reads to
50 a quality score of > 20. The assembly was 72 contigs, a total length of 6,468,334 bp, N50 of

51 221,502 bp, L50 of 9 and the total GC content was 66.4%. The genome was analyzed on the
52 Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST) version 2.0 server
53 (<http://rast.nmpdr.org>) (13). The RAST annotation was used for subsequent analyzes, but the
54 public genome is annotated with the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
55 (14). The annotation identified 6,015 DNA coding sequences (CDSs) were identified in
56 RAST, with 52% classified in 3,094 subsystems. The major categories were Amino acids and
57 derivatives (23,3%), Carbohydrates (15,2%) and Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups,
58 Pigments (11,9%). Secondary metabolite biosynthesis genes were identified by using
59 antiSMASH version 4.1 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) (15), where sixteen
60 putative gene clusters responsible for secondary metabolite biosynthesis were identified.
61 Among them, we can highlight the genes related to the expression of the type betalactone
62 (thanamycin), bacteriocin, thiopeptide, non-ribosomal peptide synthetase cluster (pyochelin,
63 pyoverdinin, and rhizomide), and phenazine (pyocyanine and steptophenazine). The acquired
64 antibiotic resistance genes were identified using ResFinder 3.2
65 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (16), and they were related to the resistance to
66 quinolones (crpP), beta-lactam (*bla*_{OXA-396}, *bla*_{OXA-486}, and *bla*_{PAO}), aminoglycoside (aph(3')-
67 IIb), phenicol (catB7) and fosfomycin (fosA). With CRISPRfinder ([https://crispr.i2bc.paris-
68 saclay.fr/](https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/)) (17) we found three clustered regularly interspaced short palindromic repeat
69 (CRISPR) arrays. The genome of *P. aeruginosa* LV strain may help to understand and
70 explore the metabolic pathway in search of potential bioactive compounds.

71

72 Data availability. This Whole Genome Shotgun project has been deposited in

73 DDBJ/ENA/GenBank under the accession no. CP058323

74 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP058323>) (BioProject no. PRJNA45013575 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA450135>], BioSample no. SAMN08930812

76 [\[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN08930812\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN08930812), SRA no. SRR13065837
77 [\[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA450135\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA450135)). The version described in this paper is the
78 first version.

79

80 **Acknowledgments**

81 We acknowledge the financial support from the Coordination for the Improvement of Higher
82 Education Personnel (CAPES, Financial Code 01) and the Brazilian National Council of
83 Scientific and Technological Development (CNPq – AMR MCTIC/Process: 439754/2018-6).
84 A.S.S. and E.R.T. were funded by a post-graduate scholarship from CAPES. L.M.Y., S.F.Y-
85 O, and G.A. were funded by a research fellowship from CNPq.

86

87 **References**

- 88 1. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. 2011. *Pseudomonas*
89 genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35:652–680.
- 90 2. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. 2018. The current status on the taxonomy
91 of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infect Genet Evol* 57:106–116.
- 92 3. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A
93 paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7.
- 94 4. Cardozo VF, Oliveira AG, Nishio EK, Perugini MRE, Andrade CGTJ, Silveira WD,
95 Durán N, Andrade G, Kobayashi RKT, Nakazato G. 2013. Antibacterial activity of
96 extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-
97 resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*
98 12:1–8.
- 99 5. Kerbauy G, C.P. Vivan A, C. Simões G, S. Simionato A, Pelisson M, C. Vespero E, F.
100 Costa S, G.T. de J. Andrade C, M. Barbieri D, C.P. Mello J, T. Morey A, M. Yamauchi

- 101 L, F. Yamada-Ogatta S, G. de Oliveira A, Andrade G. 2016. Effect of a
102 Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae*
103 Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Curr Pharm Biotechnol* 17:389–397.
- 104 6. Navarro MOP, Simionato AS, Pérez JCB, Barazetti AR, Emiliano J, Niekawa ETG,
105 Andreato MF de L, Modolon F, Dealis ML, Araújo EJ de A, Carlos TM, Scarpelim OJ,
106 da Silva DB, Chryssafidis AL, Bruheim P, Andrade G. 2019. Fluopsin c for treating
107 multidrug-resistant infections: In vitro activity against clinically important strains and
108 in vivo efficacy against carbapenemase-producing *klebsiella pneumoniae*. *Front*
109 *Microbiol* 10:1–12.
- 110 7. de Oliveira AG, Murate LS, Spago FR, Lopes L de P, Beranger JP de O, Martin JABS,
111 Nogueira MA, Mello JCP de, Andrade CGT de J, Andrade G. 2011. Evaluation of the
112 antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain
113 against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biol Control* 56:125–131.
- 114 8. De Oliveira AG, Spago FR, Simionato AS, Navarro MOP, Da Silva CS, Barazetti AR,
115 Cely MVT, Tischer CA, San Martin JAB, De Jesus Andrade CGT, Novello CR, Mello
116 JCP, Andrade G. 2016. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas*
117 *aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front Microbiol* 7:1–
118 12.
- 119 9. Simionato AS, Navarro MOP, de Jesus MLA, Barazetti AR, da Silva CS, Simões GC,
120 Balbi-Peña MI, de Mello JCP, Panagio LA, de Almeida RSC, Andrade G, de Oliveira
121 AG. 2017. The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis*
122 *cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Front Microbiol* 8:1–9.
- 123 10. Benicio LM, Simionato AS, Novello CR, Guimarães JR, Felicidade I, de Oliveira AG,
124 de Mello JCP, Mantovani MS, Chryssafidis AL, Andrade G, de Syllos Colus IM, de
125 Oliveira MT. 2018. RNAm expression profile of cancer marker genes in HepG2 cells

- 126 treated with different concentrations of a new indolin-3-one from *Pseudomonas*
127 *aeruginosa*. *Sci Rep* 8:1–9.
- 128 11. Rampazo, LGL. 2004. Master dissertations. University of California, Londrina, Brazil.
- 129 12. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM,
130 Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin A V., Sirotkin A V., Vyahhi N, Tesler
131 G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and
132 its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477.
- 133 13. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S,
134 Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED
135 and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology
136 (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:206–214.
- 137 14. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L,
138 Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI prokaryotic genome
139 annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 44:6614–6624.
- 140 15. Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Brucoleri R, Lee SY, Fischbach MA,
141 Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH. 2015. AntiSMASH 3.0-
142 A comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters.
143 *Nucleic Acids Res* 43:W237–W243.
- 144 16. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup
145 FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J*
146 *Antimicrob Chemother* 67:2640–2644.
- 147 17. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. 2007. CRISPRFinder: A web tool to identify
148 clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35:52–57.

ARTIGO II

Análise da expressão temporal de genes diferencialmente expressos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV em presença de cobre

1 **Ane Stéfano Simionato¹, Galdino Andrade^{1*}**

2 ¹Laboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual
3 de Londrina, Londrina, CEP 86057-970, Brasil.

4 *** Correspondente:**

5 Galdino Andrade

6 andradeg@uel.br

7 **Palavras chaves: Antimicrobiano, Fluopsina C, PCR Tempo Real, CLAE.**

8 **Resumo**

9 Presente nos mais diversos ambientes, *Pseudomonas aeruginosa* possui a capacidade de
10 colonizar diversos ambientes. Na presença de altas concentrações de metais tóxicos este
11 microrganismo ativa diversos sistemas em busca da remediação destes compostos e da
12 homeostase celular. Na presença de cobre, a cepa LV de *P. aeruginosa* produz uma substância
13 organometálica para diminuir a toxicidade do metal. Esta substância, denominada Fluopsina
14 C, apresenta potente atividade antimicrobiana contra diferentes espécies microbianas.
15 Entretanto, poucos são os relatos sobre esta substância, não havendo informações relacionadas
16 à sua biossíntese. Em um estudo prévio utilizando a abordagem de RNAseq foi possível
17 observar que o excesso de cobre no meio de cultivo da cepa LV promove a hiperexpressão de
18 nove genes com prováveis funções relacionadas à eliminação desse metal por vias distintas. O
19 objetivo deste estudo foi analisar a expressão temporal dos genes diferencialmente expressos
20 em presença de cobre visando uma melhor compreensão das vias metabólicas ativadas por
21 essa cepa na presença desse metal e que possam estar envolvidos na biossíntese de Fluopsina
22 C. Para isto, a cepa LV foi cultivada em presença e ausência de CuCl₂ em três tempos de
23 cultivo (24h, quatro e sete dias), sendo o monitoramento da expressão dos genes realizado por
24 PCR em tempo real. Os resultados indicam que a eliminação desse metal está relacionada à
25 hiperexpressão de sistemas de transportes de metais pesados através de bombas de efluxo e
26 transportadores do tipo P-ATPase. Além disso, o presente estudo propõe uma nova hipótese
27 para a via biossintética do composto Fluopsina C. Deste modo, além de auxiliar na elucidação
28 da biossíntese da Fluopsina C, os estudos genéticos de *P. aeruginosa* cepa LV podem gerar
29 ferramentas importantes para melhorar a produção do composto em larga escala, tornando
30 viável a sua comercialização.

31

32 **1 Introdução**

33 Os metais pesados são micronutrientes essenciais para muitos processos biológicos
34 relacionados ao crescimento dos microrganismos, mas em determinadas concentrações podem
35 se tornar tóxicos (Schalk and Cunrath, 2016). O cobre, em altas concentrações, pode quebrar
36 ligações de centro Fe-S e participar das reações de Fenton, produzindo espécies reativas de
37 oxigênio (Teitzel et al., 2006; Quintana et al., 2017). Nestas condições, os microrganismos

38 tendem a ativar mecanismos de homeostase visando aumentar a tolerância a esse metal, como:
39 exportação transmembrana, sequestro por proteínas, oxidação, dentre outros (Rademacher and
40 Masepohl, 2012; Ladomersky and Petris, 2016).

41 Devido ao seu arsenal de mecanismos de adaptação, *Pseudomonas aeruginosa* é
42 extremamente versátil e ubíqua (Teitzel et al., 2006). Na presença de metais pesados, este
43 microrganismo consegue sobreviver utilizando alguns mecanismos para diminuir a toxicidade
44 e/ou eliminar o metal, destacando-se a utilização do sistema de *quorum sensing*,
45 biorremediação, bombas de efluxos e produção de sideróforos e de outros compostos
46 bioativos (Teitzel et al., 2006; Schalk and Cunrath, 2016; Quintana et al., 2017).

47 Em estudos realizados pelo Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de
48 Londrina, foi isolada e identificada uma cepa de *P. aeruginosa* com grande potencial
49 biotecnológico (Rampazo, 2004). Esta cepa, denominada LV, foi isolada de folha de laranja
50 proveniente de um pomar onde concentrações elevadas de cobre eram utilizadas para o
51 controle de *Xanthomonas citri* pv *citri* (Xcc). Em condições de cultivo *in vitro* e na presença
52 de cobre, esta bactéria produz em seu metabolismo secundário uma molécula com alta
53 atividade antimicrobiana frente a diversos patógenos humanos (Amichi, 2015; Kerbauy et al.,
54 2016; Navarro et al., 2019) e fitopatógenos (De Oliveira et al., 2016), além de apresentar
55 atividade antiparasitária (dados ainda não publicados) e antitumorais (Benicio et al., 2018).

56 O metabólito antimicrobiano foi identificado como Fluopsina C (Navarro et al., 2019), um
57 metaloantibiótico produzido apenas na presença de uma fonte de cobre, como cloreto ou
58 sulfato de cobre, provavelmente como forma de remediação deste metal. Este metabólito é
59 formado por duas moléculas de tioforminas, um sideróforo, ligadas por uma molécula de
60 cobre ao centro. Apesar de ter sido identificada pela primeira vez em 1970 (Shirahata et al.,
61 1970), não há relatos na literatura sobre a via de biossíntese deste metabólito.

62 Com objetivo de começar a elucidar a biossíntese da Fluopsina C, Gionco e colaboradores
63 (2017), através da estratégia de RNAseq, observaram que o excesso de CuCl_2 no meio de
64 cultivo de *P. aeruginosa* cepa LV promovia um aumento significativo da expressão de nove
65 genes com prováveis funções relacionadas a eliminação do metal através de vias distintas.
66 Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão temporal desses genes
67 diferencialmente expressos durante o crescimento em presença de cobre, visando
68 compreender as vias utilizadas por *P. aeruginosa* cepa LV para a remediação de altas
69 concentrações de CuCl_2 e que possam estar envolvidos na biossíntese de Fluopsina C.

70 **2 Material e Métodos**

71 **2.1 Cepas bacterianas**

72 A cepa antagonista *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV, bactéria selvagem) foi isolada no
73 município de Astorga, Paraná, Brasil (Rampazo, 2004) e seu genoma está depositado no
74 GenBank sob o número CP058323 (BioProject PRJNA450135, BioSample SAMN08930812).

75 Para os testes de monitoramento da atividade antimicrobiana foi utilizado o fitopatógeno
76 *Xanthomonas citri* pv. *citri* cepa 306 (Xcc 306), depositado no GenBank sob o número
77 GCF_000007165.1 e cedido gentilmente pelo Professor Dr. Rui Perreira Leite, Instituto
78 Agrônômico Do Paraná (IAPAR).

79 Ambas as cepas estão estocadas em solução de 40% de glicerol em nitrogênio líquido,
80 fazendo parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia Microbiana da
81 Universidade Estadual de Londrina.

82 **2.2 Curva de crescimento microbiana**

83 Para determinar os tempos de coleta para a avaliação da expressão gênica foi realizada a curva
84 de crescimento da cepa LV na presença e ausência de cobre. Para isso, foram inoculados
85 0,01% de *P. aeruginosa* cepa LV [$DO_{590nm} = 0,09$, que corresponde a aproximadamente 10^8
86 unidades formadoras de colônias (UFC/mL)] em 62,5 mL Caldo Nutriente (CN) e 62,5 mL
87 CN com adição de 0,1% de $CuCl_2$ (CN+Cu) em Erlenmeyer de 125 mL, sendo um
88 Erlenmeyer para cada ponto de coleta. Os meios inoculados foram incubados em shaker
89 horizontal à 28 °C, com 150 rpm, por 10 dias, tempo total utilizado para a produção de
90 compostos antimicrobianos (de Oliveira et al., 2016).

91 Em diferentes tempos de incubação (12, 24, 36, 48h, e posteriormente a cada 24h até o 10º
92 dia) alíquotas foram retiradas para contagem de UFC em Ágar Nutriente (AN) para os
93 cultivos em CN e AN com adição de 0,1% de $CuCl_2$ (AN+Cu) para os cultivos de CN+Cu,
94 incubados a 28 °C por 24h. A contagem foi realizada a partir das placas com 3 a 300 colônias,
95 sendo essa expressa em \log_{10} UFC/mL.

96 **2.3 Curva de produção de metabólitos microbianos**

97 **2.3.1 Avaliação de atividade antimicrobiana**

98 Para determinar a curva de produção dos compostos bioativos, a atividade antimicrobiana foi
99 monitorada por ensaios de poço difusão em ágar (Valgas et al., 2007). Assim, células de *Xcc*
100 306 (10^8 UFC/mL) em fase de crescimento exponencial ($DO_{590nm} = 0,1$), foram inoculadas
101 por *Pour plate* em ágar nutriente (AN). Após inoculação, poços de 10 mm foram feitos no
102 ágar e 150 μ L de sobrenadante, previamente filtrado (membrana 0,22 μ m) de cada tempo de
103 coleta foram aplicados. As placas foram incubadas a 28 °C por 24h e a atividade
104 antimicrobiana foi determinada através da mensuração das zonas de inibição (mm).

105 **2.3.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

106 Para realizar a quantificação da Fluopsina C durante o metabolismo bacteriano, foram
107 realizadas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento
108 Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, EUA) com detector UV-VIS, com as amostras
109 coletadas.

110 **2.3.2.1 Curva de Calibração**

111 A preparação da amostra Standard foi realizada conforme metodologia de produção e
112 purificação de Fluopsina C produzida por *P. aeruginosa* cepa LV descrita por Navarro e
113 colaboradores (2019).

114 A curva de calibração foi realizada segundo metodologia de Bedoya e colaboradores (2019),
115 com modificações. Uma diluição seriada de Fluopsina C em solução de acetonitrila 10% em
116 água foi preparada (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/L) e filtradas em membranas de 0,22 μ m
117 (Macherey-Naguel, 15 mm de diâmetro) e analisada pela técnica de CLAE. Como fase
118 estacionária foi utilizada coluna de fase reversa C18 (Zorbax SB-C18 9.4 x 250 mm – 5 μ m,
119 Agilent, EUA) e, como fase móvel (A) água ultra pura com 0,1% de ácido acético e (B)

120 acetonitrila com fluxo de 2 mL/min sob condição de gradiente: 0-2 min, 1-15% B; 2-22 min,
121 15-83% B. A coluna foi estabilizada por 3 min após as corridas (até 27 min). A detecção de
122 Fluopsina C foi realizada em $\lambda = 250$. Foram injetados 50 μ L de cada amostra e duas análises
123 foram realizadas para cada ponto de calibração e as curvas obtiveram $R^2 > 0.99$.

124 **2.3.2.2 Quantificação de Fluopsina C**

125 Os sobrenadantes livres de células dos diferentes tempos de cultivo utilizados na curva de
126 atividade antimicrobiana foram concentrados para a redução de 95% do volume inicial. O
127 sobrenadante concentrado foi utilizado para extração dos compostos bioativos através da
128 técnica de partição líquido-líquido com diclorometano, na proporção de [1:2] de sobrenadante
129 concentrado e solvente orgânico. Para cada amostra, este procedimento foi repetido 3 vezes,
130 obtendo-se assim a fase diclorometano (FD).

131 Os extratos de FD obtidos foram concentrados em Evaporador Rotativo Büchi R-215 a 45 °C.
132 Em seguida, as amostras foram ressuspendidas em solução acetonitrila 10% em água e
133 filtradas em membranas de 0,22 μ m (Macherey-Naguel, 15 mm de diâmetro) e uma alíquota
134 de 50 μ L de cada amostra foi analisada em CLAE conforme metodologia descrita acima
135 (2.3.2.1).

136 **2.4 Contexto genético dos genes analisados**

137 Para avaliar a organização estrutural dos genes analisados neste estudo, os elementos
138 genéticos que os flanqueiam foram investigados usando o software CLC Genomics
139 Workbench 20.0 (CLC bio; Katrinebjerg, DEN).

140 Após o alinhamento dos genes de interesse com o genoma de *P. aeruginosa* cepa LV, foi
141 realizada a curadoria manual dos resultados obtidos em um banco de dados de anotação
142 gerado pelo Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST) versão 2.0
143 (<http://rast.nmpdr.org>) para garantir uma identificação precisa dos genes a jusantes e a
144 montantes.

145 Em seguida, foi realizada também análises nos bancos de dados do BLASTx
146 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), INTERPRO (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), UNIPROT
147 (<https://www.uniprot.org/blast/>) e PFAM (<https://pfam.xfam.org/>).

148 **2.5 Análise da expressão temporal de genes diferencialmente expressos**

149 **2.5.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores**

150 Os genes analisados nesse estudo (*PA2691*, *PA3521*, *PA3523*, *PA3574a*, *PA3920*, *PA4141*,
151 *PA4782*, *PA4878*, *phzA2*) foram identificados como hiperexpressos (Fold Change >1,5 e p-
152 value <0,001) na presença de CuCl₂ por Gionco e colaboradores (2017). Como normalizador
153 foi utilizado o iniciador PA16S, específico para o gene 16S rDNA do gênero *Pseudomonas*.

154 As sequências nucleotídicas dos genes foram selecionadas através do banco de dados do
155 GenBank, utilizando a *P. aeruginosa* PA01 como referência. Os oligonucleotídeos iniciadores
156 para cada gene foram definidos utilizando OligoAnalyzer Tool 3.1 (Integrated DNA
157 Technologies, USA - <http://www.idtdna.com>) (Tabela 1) e sintetizado por Integrated DNA
158 Technologies.

159 **2.5.2 Padronização dos iniciadores**

160 As condições de amplificação para cada par de iniciadores foram previamente padronizadas
161 em PCR convencional a partir dos parâmetros: concentração de iniciador e temperatura de
162 hibridação.

163 Para a extração do DNA, a cepa LV foi incubada conforme descrito acima por 24h e
164 centrifugadas à 9000 rpm por 15 min à 4°C. O sedimento celular foi lavado duas vezes com
165 solução salina 0,85% (v:v) e a extração do DNA realizada através do DNeasy Mini Kit
166 (Qiagen, Holanda). A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (Synergy
167 HT, BioTek, USA) e a qualidade do material genético extraído foi determinada por meio de
168 eletroforese em gel de agarose 1%.

169 A PCR foi realizada em equipamento Veriti (Applied Biosystems, EUA) com as seguintes
170 condições de ciclagem: fase inicial a 95°C por 10 min e 95°C por 2 min, seguidas de 35 ciclos
171 de 95°C por 30 segundos, temperatura de hibridação ajustado para cada primer por 30
172 segundos, de acordo com a recomendação do fabricante, e extensão final de 72°C por 30
173 segundos. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1%.

174 **2.5.3 Extração do RNA total**

175 *P. aeruginosa* cepa LV foi incubado de acordo com as condições previamente descritas (2.3)
176 por 24h, 96h e 168h. As culturas foram centrifugadas à 9000 rpm por 15 min à 4°C e então os
177 pellets foram lavados duas vezes com solução salina 0,85% (v:v).

178 O gênero *Pseudomonas* produz diversos compostos fluorescentes e sacarídeos em seu
179 metabolismo que podem permanecer nas amostras e atrapalhar nas leituras da análise de RT-
180 qPCR. Para evitar possíveis interferências destes compostos, o RNA foi extraído/purificado
181 em 4 etapas: (1) extração utilizando TRIzol®, (2) purificação através do RNeasy Mini Kit
182 (Qiagen, Holanda), (3) tratamento com RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA) e (4) re-
183 purificação pelo RNeasy Mini Kit (Qiagen, Holanda).

184 Em seguida, a quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro (Synergy HT,
185 BioTek, USA) e a qualidade do material extraído determinada por eletroforese em gel de
186 agarose.

187 **2.5.4 Análise da expressão temporal dos genes selecionados**

188 A análise dos transcritos foi realizada em um equipamento Rotor-Gene Q 5-Plex (Qiagen,
189 Alemanha) utilizando 200 ng de RNA total, 1 µM de cada par de iniciadores e kit QuantiNova
190 SYBR Green RT PCR (Qiagen, Brasil), com volume final de reação de 20 µL de acordo com
191 as recomendações do fabricante. O gene que codifica 16S rRNA foi utilizado como
192 normalizador. Os ciclos de amplificação foram: fase inicial a 50°C por 10 min e 95°C por 2
193 min, seguidas de 40 ciclos de 95°C por 30 s, hibridação à 65°C (exceto primer PA3521,
194 temperatura de 55°C) por 30 s e extensão final de 72°C por 30 s. Após a amplificação, os
195 valores de Ct (*Cycle threshold*) foram normalizados e analisados pelo software REST2009
196 para determinação dos níveis de expressão, utilizando o cultivo em ausência de cobre como
197 referência.

198 **3 Resultados**

199 **3.1 Curva de crescimento microbiana**

200 Entre os tempos 0 e 12h não se observou crescimento tanto no cultivo em CN como em
 201 CN+Cu, correspondendo a fase lag. No intervalo de 12 e 48h foi possível observar um
 202 crescimento celular exponencial, onde a UFC passa de 4,30 log₁₀ UFC/mL para 10,35 log₁₀
 203 UFC/mL para o cultivo em CN e de 4,00 log₁₀ UFC/mL para 9,88 Log UFC/mL para o
 204 cultivo em CN+Cu. Após 48h de cultivo foi possível observar o declínio do crescimento
 205 celular em ambas as situações, chegando até 4,00 log₁₀ UFC/mL para CN e 5,77 log₁₀
 206 UFC/mL para CN+Cu, indicando a fase de declínio ou morte (Figura 1).

207 **3.2 Curva de produção de Fluopsina C**

208 **3.2.1 Avaliação de atividade antimicrobiana**

209 Através da metodologia de poço difusão, foi possível observar que somente a partir de 72h de
 210 cultivo houve uma pequena atividade antimicrobiana frente a *Xcc* 306, com 15 mm de zona de
 211 inibição com pequenas colônias de cultivo dentro do halo, indicando o começo da produção e
 212 uma baixa concentração de bioativos. Por sua vez, com 96h é possível observar uma região de
 213 inibição limpa com 20 mm. A partir do sexto dia (144h) atinge-se a maior zona de inibição
 214 com 30 mm e, com sete dias de cultivo (168h) esse halo diminuiu, passando a ter 22,5 mm
 215 (Tabela 2), e aumentando, nas 24h seguintes, para 26 mm. Esse padrão também pôde ser
 216 observado frente a outros microrganismos (dados não publicados).

217 **3.2.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

218 O tempo de retenção da Fluopsina C foi em 14,4 min em 250 mAu. Na ausência de CuCl₂ não
 219 houve o pico do composto em 14,4 min, comprovando assim a importância da presença do
 220 metal para a biossíntese da Fluopsina C (Figura 2).

221 Após a análise de todos os pontos de coleta da fermentação com CuCl₂, notou-se que a
 222 visualização da Fluopsina C deu-se a partir do quarto dia (72h) de produção, com
 223 concentração de 1,29 mg/L, atingindo um valor máximo em 5 dias (120h) com 7,07 mg/L,
 224 havendo uma queda no sétimo dia (168h) para 2,06 mg/L, o que corrobora com os resultados
 225 obtidos na atividade antimicrobiana.

226

227 **3.3 Contexto genético dos genes analisados**

228 Os resultados obtidos com relação a localização dos genes (frame, sentido e posição) estão
 229 representados graficamente na figura 4 e os dados obtidos nos bancos de dados com relação
 230 ao nome e descrição da função estão apresentados na tabela 3.

231 Podemos observar que os genes diferencialmente expressos estão dispersos no genoma e
 232 alguns possuem sua funcionalidade interligadas aos seus flaqueadores, como por exemplo, o
 233 gene *phzA2* que pertence ao operon *phz2* que é composto pelos genes que codifica um regulador
 234 negativo da biossíntese de fenazina (*qscR*) e outro gene envolvido na produção de fenazinas
 235 (*phzB2*). Além desse cluster, podemos também observar a clusterização de genes que estão
 236 envolvidos na expressão de sistemas de efluxo tipo MexPQ-OmpE (*PA3520-PA3523*) e com a
 237 atividade de fosfohidrolase c-di-GMP (*PA4781-PA4783*).

238 **3.4 Análise da expressão temporal dos genes selecionados**

239 O efeito do cobre sobre a expressão dos genes foi analisado pela quantificação de transcritos
 240 em 24, 96 e 168h de cultivo, utilizando meios de fermentação com e sem CuCl_2 (Figura 3),
 241 para a análise diferencial.

242 Houve um aumento significativo na expressão de seis genes nas primeiras 24h: *PA3574a*,
 243 *PA3920*, *PA3523*, *PA4878*, *phzA2* e *PA4141*. O gene *PA3574a*, responsável pela expressão de
 244 chaperonas de cobre CopZ, apresentou o maior valor de expressão, sendo aproximadamente
 245 173 vezes mais expresso na presença de cobre em relação ao cultivo em ausência do metal
 246 (referência). Outros dois importantes genes são *PA3523* (sistema RND de efluxo) e *PA4878*
 247 (regulador transcricional), sendo 53,8 e 51,2 mais expressos com relação ao cultivo de
 248 referência, respectivamente.

249 Após 96h de cultivo, 8 genes apresentaram aumento na indução de expressão significativa e
 250 somente um gene (*phzA2*) teve expressão indiferente em relação ao controle. O gene com
 251 maior expressão foi o *PA3523*, que codifica para o sistema de efluxo RND, apresentando
 252 aumento de aproximadamente 17 vezes em relação ao cultivo sem cobre. O gene *PA3521*,
 253 uma proteína hipotética, não apresentou índices de expressão nas primeiras 24h de cultivo,
 254 aparecendo a partir do segundo ponto de coleta e com a segunda maior expressão (9,84
 255 vezes).

256 No sétimo dia de cultivo (168h), 7 genes apresentaram aumento de expressão significativa
 257 (*PA3574a*, *PA4782*, *PA2691*, *PA3523*, *PA4878*, *PA3521* e *PA4141*) e um gene teve a
 258 expressão reprimida (*PA3920*). Os genes *PA3574a* e *PA4782* apresentaram os maiores valores
 259 de expressão, sendo 140,07 e 31,56 vezes mais expressos com relação ao controle,
 260 respectivamente.

261 **4 Discussão**

262 Para sobreviverem na presença de metais pesados em altas concentrações, as bactérias
 263 mobilizam os íons livres do composto de diversas maneiras, como pela expressão de sistemas
 264 de efluxo e transportadores metálicos, além da ativação de genes ligados a expressão e
 265 biossíntese de compostos (Teitzel et al., 2006; Quintana et al., 2017). *P. aeruginosa* cepa LV
 266 possivelmente reduz a toxicidade do CuCl_2 presente no meio de cultivo conjugando o metal
 267 com duas moléculas do sideróforo tioformina, formando o composto Fluopsina C.

268 A Fluopsina C, nestas condições de cultivo, começa a ser produzida entre 72 a 96h, e
 269 analisando em conjunto com a curva de crescimento, indica ser produto do metabolismo
 270 secundário da bactéria. Em sua curva de produção, nota-se uma queda do composto no sétimo
 271 dia seguido de um aumento do produto no oitavo dia. Em testes de otimização da produção
 272 deste composto, realizado por Bedoya e colaboradores (2018), foi relatado que a concentração
 273 inibitória mínima da Fluopsina C em relação a cepa produtora é de 15 $\mu\text{g/mL}$, sendo assim,
 274 quando atingida essa concentração no meio há a diminuição da densidade celular e da
 275 produção do metalocomposto.

276 O aumento da produção e liberação da Fluopsina C pela bactéria ao meio extracelular pode
 277 ocasionar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e gerar um estresse metabólico
 278 (Ma et al., 2013). As bactérias produtoras de antibióticos são resistentes naturalmente ao
 279 próprio composto que produzem (Opal and Pop-Vicas, 2015), sendo assim, acreditamos que
 280 a queda da produção e o consequente aumento podem estar envolvidos com a seleção de
 281 microrganismo mais resistentes ao antibiótico até o alcance posterior de um platô da
 282 produção.

283 Devido esses fatores, selecionamos os três tempos de coleta de amostras para realizar a
 284 análise da expressão gênica temporal, o primeiro na fase exponencial de crescimento (24h),
 285 um segundo ponto onde o composto começa a ser detectável em CLAE e antecede o pico
 286 máximo de produção (96h) e o terceiro onde inicia-se o declínio da produção, que antecede
 287 posterior aumento (168h). Os nove genes estudados neste trabalho, que apresentaram
 288 expressão aumentada quando esta cepa foi cultivada em presença de cobre, previamente
 289 identificados (Gionco et al., 2017), pertencem a quatro classes de acordo com suas prováveis
 290 funções: transportadores de metais (*PA3920*, *PA3523* e *PA3574a*, *PA3521*), reguladores
 291 transcricionais (*PA4878*), biossíntese de fenazina (*phzA2*) e proteínas hipotéticas (*PA2691*,
 292 *PA4141* e *PA4782*) (Figura 4).

293 Entre os transportadores de metais, os genes *PA3574a* e *PA3920* são responsáveis pela
 294 expressão da CopZ e CopA, respectivamente. A CopZ é uma chaperona de metal e a CopA
 295 um transportador de metal tipo-P ATPase (Ladomersky and Petris, 2016; Quintana et al.,
 296 2017; Novoa-Aponte et al., 2019). Segundo Solioz (2018), a CopZ cria um complexo com o
 297 cobre citoplasmático o que induz a expressão da CopA, que transporta o metal para o meio
 298 extracitoplasmático. Em 24 horas de cultivo, o gene *PA3574a* apresentou um nível de
 299 expressão 173 vezes maior que o controle, provavelmente por ser uma das primeiras
 300 estratégias para a extrusão do cobre intracelular. No quarto dia, onde já se detecta a presença
 301 da Fluopsina C, observou-se uma diminuição da expressão desses dois genes (*PA3574a* e
 302 *PA3920*), possivelmente pela diminuição de íons de cobre livre.

303 O gene *PA3523* codifica a proteína transmembrana MexP e o *PA3521* a porina de membrana
 304 externa ompE, e pertencem ao mesmo operon. Essas proteínas fazem parte do sistema de
 305 efluxo MexPQ-ompE que atravessa as membranas interna e externa do microrganismo
 306 permitindo a eliminação ativa do cobre (Neves et al., 2011; Rademacher and Masepohl, 2012;
 307 Quintana et al., 2017). Após 24 h de cultivo o gene *PA3523* apresenta-se aproximadamente 53
 308 vezes mais expresso em relação ao controle. Entretanto, nesse mesmo período não foi
 309 detectada a expressão do gene *PA3521*. No quarto dia, início da biossíntese do composto
 310 organometálico, ambos genes apresentam aumento nos níveis de expressão. Uma possível
 311 explicação para o fato é o sistema de efluxo MexPQ-ompE estar relacionado a extrusão da
 312 Fluopsina C para o meio extracelular.

313 O regulador transcricional BrlR, codificado pelo gene *PA4878*, está relacionado com a
 314 expressão de diversos genes, como os envolvidos em transporte do tipo ABC, modificações
 315 no LPS e composição da membrana (Poudyal and Sauer, 2018). Liao e colaboradores (2013)
 316 descreveram que este regulador também está envolvido na ativação de genes que codificam
 317 sistemas de efluxo multidrogas do tipo Mex. Na análise de expressão temporal, o gene
 318 *PA4878* apresenta maior expressão nas primeiras 24 h e no quarto dia de cultivo. Esses
 319 índices de aumento de expressão coincidem com os encontrados para os genes codificantes do
 320 sistema de efluxo MexPQ-ompE (*Pa3521* e *Pa3523*), possivelmente por esse ser o regulador
 321 envolvido em sua transcrição.

322 Com relação ao gene *phzA2*, relacionado as vias biossintéticas, de acordo com Sun e
 323 colaboradores (2019), *P. aeruginosa* é o único membro da família Pseudomoniaceae em que
 324 já foi descrito dois operons, *phz1* e *phz2*, responsáveis pela biossíntese de fenazinas. Cada
 325 operon é constituído por sete genes (*phzA* – *phzG*) que são necessários para síntese das
 326 diversas fenazinas encontradas na espécie. Os genes *phzA1* e *phzA2* foram descritos por
 327 Chincholkar e Thomashow (2013) como responsáveis pela conversão do ácido corísmico em
 328 fenazina-1-carboxílica (PCA), composto precursor das outras fenazinas sintetizadas pelo
 329 microrganismo. Esses dois genes regulam a síntese da PCA, o que evita o acúmulo desse

330 composto no citoplasma, bem como a produção de ERO intracelularmente (Sun et al., 2019).
 331 Nos estudos realizados por Gionco e colaboradores (2017), a expressão diferencial do gene
 332 *phzA2* foi relacionada à produção do composto antimicrobiano, sugerindo que parte da
 333 concentração intracelular de cobre seja biorremediada através da rota metabólica das
 334 fenazinas, sendo a piocianina convertida no composto organometálico. Entretanto, como o
 335 gene *phzA2* apresentou maiores níveis de expressão nas primeiras 24 horas, e não no quarto
 336 dia, onde há a produção do composto, nós sugerimos que a produção de fenazinas não está
 337 diretamente ligada à produção do Fluopsina C, mas que a PCA possa ser uma molécula
 338 precursora para a formação do sideróforo tioformina, que posteriormente ao se ligar intra ou
 339 extracelularmente à molécula de cobre, forma a Fluopsina C.

340 Sobre os genes codificadores de proteínas hipotéticas (*PA2691*, *PA4141* e *PA4782*) ainda não
 341 há muita informação. Nelson e colaboradores (2019) descreveram que possivelmente o gene
 342 *PA2691* codifica a proteína NADH:quinona oxireductase do tipo II (NDH-2), presente em
 343 diversas espécies microbianas na fase estacionária. Isso justifica o gene não apresentar
 344 expressão diferencial significativa nas primeiras 24 horas de cultivo, já que o microrganismo
 345 ainda se apresenta na fase exponencial de crescimento. Além disso, Blaza e colaboradores
 346 (2017) observaram que a proteína NDH-2 pode ajudar nas desordens metabólicas celulares,
 347 aliviando o acúmulo de NADH e diminuindo a produção de ERO intracelular. Essa
 348 informação corrobora com o aumento dos níveis de expressão desse gene nos dias
 349 subsequentes de análise, já que a formação da Fluopsina C pode ocasionar estresse metabólico
 350 na célula microbiana e ERO (Ma et al., 2013).

351 O gene *PA4141* provavelmente está envolvido com o sistemas de *quorum sensing* regulados
 352 pelos ativadores transcricionais *las* e *rhl*, que estão relacionados com a expressão diversos
 353 metabólitos, como ramnolípídios, elastases, proteases, fosfolipases, lipases, endotoxinas e
 354 homeostase das fenazinas (Rasmussen et al., 2005; Duan and Surette, 2007; Higgins et al.,
 355 2018). Mesmo apresentando expressão aumentada com relação ao controle em todos os
 356 tempos analisados, o seu índice de expressão diminui conforme com o passar do tempo.
 357 Paralelamente, o gene *phzA2* está mais expresso nas primeiras 24h, mas depois se torna
 358 indiferente em relação ao controle. Esse fato pode sugerir que o gene *PA4141* regule de
 359 alguma forma a produção das fenazinas na espécie, uma vez que o operon relacionado a
 360 síntese desse composto está intimamente ligado a uma regulação por *quorum sensing*.

361 Por fim, o gene *PA4782*, também descrito como uma proteína hipotética, pode estar
 362 relacionado com a codificação de uma proteína com atividade de fosfohidrolase e estar
 363 envolvido na sinalização celular relacionada a biofilmes, mais especificamente no mensageiro
 364 c-di-GMP (McPhee et al., 2006). Wang e colaboradores (2018) descreveram que o sistema de
 365 regulação BrlR (*PA4878*) é responsivo a sinalização c-di-GMP, apesar de ser desconhecido o
 366 mecanismo de interação. É possível observar que nos primeiros dias, o gene *PA4878*
 367 apresenta maiores níveis de expressão e o gene *PA4782* está menos expresso. Já no sétimo dia
 368 de cultivo, o gene *PA4782* está hiperexpresso em relação ao gene *PA4878*, indicando um
 369 possível sistema de regulação entre ambos.

370 5 Conclusão

371 Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com as hipóteses geradas em trabalhos
 372 anteriores, que relacionam a eliminação do metal à hiperexpressão de sistemas de transportes
 373 de metais pesados, através de bombas de efluxo e transportadores do tipo P-ATPase. Além
 374 disso, este estudo sugere que *P. aeruginosa* cepa LV possa utilizar a fenazina ácido
 375 carboxílico como precursora da molécula tioformina, que ao se ligar ao Cu^{+2} origina o

376 compostos com atividade antimicrobiana Fluopsina C. Deste modo, novos estudos deverão
 377 ser realizados para melhor compreender como estes genes podem estar relacionados com a
 378 síntese de Tioformina e da Fluopsina C.

379 **6 Conflito de interesse**

380 Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de qualquer relação comercial
 381 ou financeira que possa ser interpretada como um potencial conflito de interesse.

382 **7 Financiamento**

383 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código 01) e
 384 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (AMR MCTIC
 385 2018 - 439754/2018-6).

386 **8 Agradecimentos**

387 Os autores são gratos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
 388 (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por
 389 tornarem este estudo possível mediante a concessão de bolsas de PIBIC, MSc., PhD e
 390 produtividade. Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório de Biologia Molecular de
 391 Microrganismo – NIP 5 UEL/FINEP pelo auxílio nos experimentos de biologia molecular.

392 **Referências**

- 393 Amichi, D. (2015). Atividade antibiótica de metabólito secundário produzido por
 394 *Pseudomonas aeruginosa* em células planctônicas e biofilme de *Enterococcus faecium*.
- 395 Bedoya, J. C., Dealis, M. L., Silva, C. S., Niekawa, E. T. G., Navarro, M. O. P., Simionato, A.
 396 S., et al. (2019). Enhanced production of target bioactive metabolites produced by
 397 *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17, 545–556.
 398 doi:10.1016/j.bcab.2018.12.024.
- 399 Benicio, L. M., Simionato, A. S., Novello, C. R., Guimarães, J. R., Felicidade, I., de Oliveira,
 400 A. G., et al. (2018). RNAm expression profile of cancer marker gene in HepG2 cells
 401 treated with different concentrations of a new indolin-3-one from *Pseudomonas*
 402 *aeruginosa*. *Sci. Rep.* 8, 1-9. doi:10.1038/s41598-018-30893-w.
- 403 Blaza, J. N., Bridges, H. R., Aragão, D., Dunn, E. A., Heikal, A., Cook, G. M., et al. (2017).
 404 The mechanism of catalysis by type-II NADH:quinone oxidoreductases. *Sci. Rep.* 7, 1–
 405 11. doi:10.1038/srep40165.
- 406 Chincholkar, S., and Thomashow, L. (2013). *Microbial Phenazines*. doi:10.1007/978-3-642-
 407 40573-0.
- 408 De Oliveira, A. G., Spago, F. R., Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., Da Silva, C. S.,
 409 Barazetti, A. R., et al. (2016). Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas*
 410 *aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front. Microbiol.* 7, 1–
 411 12. doi:10.3389/fmicb.2016.00113.
- 412 Duan, K., Surette, M. G. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 Las and
 413 Rhl quorum-sensing systems. *J. Bacteriol.* 189, 4827-4836. doi:10.1128/JB.00043-07.

- 414 Gionco, B., Tavares, E. R., de Oliveira, A. G., Yamada-Ogatta, S. F., do Carmo, A. O.,
415 Pereira, U. de P., et al. (2017). New insights about antibiotic production by *Pseudomonas*
416 *aeruginosa*: A gene expression analysis. *Front. Chem.* 5. doi:10.3389/fchem.2017.00066.
- 417 Higgins, S., Heeb, S., Rampioni, G., Fletcher, M. P., Williams, P., and Cámara, M. (2018).
418 Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in
419 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 1–13.
420 doi:10.3389/fcimb.2018.00252.
- 421 Kerbauy, G., C.P. Vivan, A., C. Simões, G., S. Simionato, A., Pelisson, M., C. Vespero, E., et
422 al. (2016). Effect of a Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas aeruginosa* on
423 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Curr. Pharm.*
424 *Biotechnol.* 17, 389–397. doi:10.2174/138920101704160215171649.
- 425 Ladomersky, E., and Petris, M. J. (2016). Copper tolerance and virulence in bacteria.
426 *Metallomics* 7, 957–964. doi:10.1039/c4mt00327f.
- 427 Liao, J., Schurr, M. J., and Sauera, K. (2013). The *merR*-like regulator *brlR* confers biofilm
428 tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J.*
429 *Bacteriol.* 195, 3352–3363. doi:10.1128/JB.00318-13.
- 430 Ma, L. S., Jiang, C. Y., Cui, M., Lu, R., Liu, S. S., Zheng, B. B., et al. (2013). Fluopsin C
431 induces oncosis of human breast adenocarcinoma cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 1093–
432 1100. doi:10.1038/aps.2013.44.
- 433 McPhee, J. B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M. D., et al.
434 (2006). Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory
435 systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188,
436 3995–4006. doi:10.1128/JB.00053-06.
- 437 Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., Pérez, J. C. B., Barazetti, A. R., Emiliano, J., Niekawa,
438 E. T. G., et al. (2019). Fluopsin c for treating multidrug-resistant infections: In vitro
439 activity against clinically important strains and in vivo efficacy against carbapenemase-
440 producing *klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 10, 1–12.
441 doi:10.3389/fmicb.2019.02431.
- 442 Nelson, C. E., Huang, W., Brewer, L. K., Nguyen, A. T., Kane, M. A., Wilks, A., et al.
443 (2019). Proteomic Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* Iron Starvation Response
444 Reveals PrrF Small Regulatory RNA-Dependent Iron Regulation of Twitching Motility,
445 Amino Acid Metabolism, and Zinc Homeostasis Proteins. *J. Bacteriol.* 201, 1–23.
446 doi:10.1128/JB.00754-18.
- 447 Neves, P. R., Mamizuka, E. M., Levy, C. E., and Lincopan, N. (2011). Multidrug-resistant
448 *pseudomonas aeruginosa*: An endemic problem in Brazil. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 47,
449 409–420. doi:10.1590/S1676-24442011000400004.
- 450 Novoa-Aponte, L., Ramírez, D., and Argüello, J. M. (2019). The interplay of the
451 metallosensor CueR with two distinct CopZ chaperones defines copper homeostasis in
452 *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 294, 4934–4945.
453 doi:10.1074/jbc.RA118.006316.
- 454 Opal, S.M., Pop-Vicas, A. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria.

- 455 In: Benett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J. (Eds.), *Principles and Practice of Infectious*
456 *Diseases*, 8th ed. Mandell Douglas and Bennett's, Philadelphia, pp. 235-251.
- 457 Poudyal, B., and Sauer, K. (2018). The ABC of Biofilm Drug Tolerance : the MerR-Like
458 Regulator Contributing to the Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to
459 Tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, 1–19. doi:10.1128/AAC.01981-17.
- 460 Quintana, J., Novoa-Aponte, L., and Argüello, J. M. (2017). Copper homeostasis networks in
461 the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 292, 15691–15704.
462 doi:10.1074/jbc.M117.804492.
- 463 Rademacher, C., and Masepohl, B. (2012). Copper-responsive gene regulation in bacteria.
464 *Microbiol. (United Kingdom)* 158, 2451–2464. doi:10.1099/mic.0.058487-0.
- 465 Rampazo, L. G. L. (2004). Avaliação de agentes biológicos e seus produtos na incidência de
466 lesões foliares do cancro cítrico.
- 467 Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Køte, M.,
468 et al. (2005). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic
469 system, the QSI selector. *J. Bacteriol.* 187, 1799–1814. doi:10.1128/JB.187.5.1799-
470 1814.2005.
- 471 Schalk, I. J., and Cunrath, O. (2016). An overview of the biological metal uptake pathways in
472 *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 18, 3227–3246. doi:10.1111/1462-
473 2920.13525.
- 474 Shirahata, K., Deguchi, T., Hayashi, T., Matsubara, I., and Suzuki, T. (1970). The structures
475 os Fluopsins C and F. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 23, 546–550.
- 476 Solioz, M. (2018). *Copper and Bacteria*. Switzerland: Springer Nature doi:10.1007/978-3-
477 319-94439-5.
- 478 Sun, L., Chi, X., Feng, Z., Wang, K., Kai, L., Zhang, K., et al. (2019). *phz1* contributes much
479 more to phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis than *phz2* in *Pseudomonas aeruginosa*
480 *rpoS* mutant. *J. Basic Microbiol.* 59, 914–923. doi:10.1002/jobm.201900165.
- 481 Teitzel, G. M., Geddie, A., De Long, S. K., Kirisits, M. J., Whiteley, M., and Parsek, M. R.
482 (2006). Survival and growth in the presence of elevated copper: Transcriptional profiling
483 of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 7242–7256.
484 doi:10.1128/JB.00837-06.
- 485 Valgas, C., de Souza, S. M., Smânia, E. F. A., and Smânia, A. (2007). Screening methods to
486 determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian J. Microbiol.* 38, 369-380.
487 doi: 10.1590/S1517-83822007000200034.
- 488 Wang, F., He, Q., Yin, J., Xu, S., Hu, W., and Gu, L. (2018). BrIR from *Pseudomonas*
489 *aeruginosa* is a receptor for both cyclic di-GMP and pyocyanin. *Nat. Commun.* 9.
490 doi:10.1038/s41467-018-05004-y.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo.

Gene	Sequência do Oligonucleotídeo iniciador (5' – 3')	No. Acesso	Descrição	Tamanho do amplicon (pb)
<i>PA16S</i>	F: GGGTGCAAGCGTTAATC R: AATTCCACCACCCTCTAC	HM067869.1	<i>Pseudomonas</i> 16S rRNA	618
<i>PA2691</i>	F: CGAGCCGATTCCCTACA R: GCCATTGATCTCGGTCTTG	NP_251381.1	Proteína Hipotética	142
<i>PA3521</i>	F: TCCTGAACCCGGTGATT R: CCGGTCGTAGAGGATCAA	NP_252211.1	Proteína hipotética	107
<i>PA3523</i>	F: TCACCGACGAGTCCTATG R: CTGACCTTGGCGAACAG	NP_252213.1	Proteína de fusão de membrana – Sistema resistência-nodulação-divisão (RND)	142
<i>PA3574a</i>	F: CATGACCTGCGGCCACT R: GGCGCCAAGATCCACCT	YP_008719768.1	Chaperona de Cobre - CopZ	88
<i>PA3920</i>	F: GAACAGGCCGGCTACAA R: ATCACCCACCAGCGTTC	NP_252609.1	Transportador de Metal Tipo-P ATPase	95
<i>PA4141</i>	F: CATTGAAGTCACCTGCGTTTC R: CCCATTTCCCGCCGATT	NP_252830.1	Proteína hipotética	98
<i>PA4782</i>	F: CGAAGATGAAAGCGCTGGT R: AACTCCTTGATCGGCGACT	NP_253470.1	Proteína hipotética	107
<i>PA4878</i>	F: CATCGACCGCCTGAAAC R: AGGGTTCCGGTCGAGTTC	NP_253565.1	Regulador transcricional	135
<i>phzA2</i>	F: ACAGCCTGTTCGTCGAG R: TTGTGCCACTCCAGTC	NP_250590.1	Biossíntese de fenazina - Proteína PhzA	139

Tabela 2. Atividade antimicrobiana, determinada através da técnica de poço-difusão, do sobrenadante de cultura de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV cultivada na ausência (CN) e presença de cloreto de cobre (CN+Cu), por um período de 10 dias (240 h) de cultivo, frente a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Tempo de cultivo (horas)	Halos de inibição (mm)	
	CN	CN+Cu
12	-	-
24	-	-
36	-	-
48	-	-
72	-	15*
96	-	20
120	-	29,5
144	-	30
168	-	22,5
192	-	26
216	-	26
240	-	25

* Zona de crescimento levando em consideração a presença de colônias mutantes (halo fantasma).

Tabela 3. Categorias funcionais dos genes flanqueantes aos genes diferencialmente expressos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV cultivada em caldo nutriente suplementado com 0,01% cloreto de cobre, para os quatro bancos de dados analisados e seus respectivos acessos.

Gene	Posição em relação ao Gene Hiperexpresso	BLAST		INTERPRO		UNIPROT		PFAM	
		Acesso	Descrição	Acesso	Descrição	Acesso	Descrição	Acesso	Descrição
PA2689	A montante ao PA2691	WP_023091221.1	ferric enterobactin esterase PfeE	IPR000801	Putative esterase	Q9I0F2	Uncharacterized protein	PF00756	Putative esterase
PA2692	A jusante PA2691	WP_003090553.1	Rrf2 family transcriptional regulator	IPR000944	Transcription regulator Rrf2-type	Q9I0F0	Probable transcriptional regulator	PF02082	Iron-dependent Transcriptional regulator
PA3520	A montante ao PA3521	WP_003092060.1	heavy-metal-associated domain-containing protein multidrug efflux RND transporter permease subunit Mex	IPR006121	Heavy metal-associated domain, HMA	Q9HY89	HMA domain-containing protein	PF00403	Heavy-metal-associated domain
PA3522	A jusante PA3521 e a montante ao PA3523	WP_114763520.1	Acridine resistance protein	IPR001036	Acridine resistance protein	Q9HY87	Efflux pump membrane transporter	PF00873	AcrB/AcrD/AcrF family
gloA1	A jusante PA3523	WP_003110007.1	lactoylglutathione lyase	IPR004360	Glyoxalase/fosfomycin resistance/dioxygenase domain	Q9HY85	Lactoylglutathione lyase	PF00903	Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase superfamily
PA3575	A montante ao PA3574a	WP_019395750.1	cytochrome b	IPR011577	Cytochrome b561, bacterial/Ni-hydrogenase	Q9HY45	Ni_hydr_CYTB domain-containing protein	PF01292	Prokaryotic cytochrome b561
nalD	A jusante PA3574a	WP_003092152.1	efflux system transcriptional repressor NalD	IPR001647	DNA-binding HTH domain, TetR-type	Q9HY46	NalD	PF00440	Bacterial regulatory proteins, tetR family
PA3921	A montante ao PA3920	WP_126892744.1	helix-turn-helix transcriptional regulator	IPR000792	Transcription regulator LuxR, C-terminal	Q9HX92	Probable transcriptional regulator	PF00196	LuxR-type DNA-binding HTH domain
PA1495	A jusante PA3920	WP_132667731.1	hypothetical protein	-	No mach	Q9I3L7	Uncharacterized protein	-	No mach
PA4140	A montante ao PA4141	WP_003121911.1	FAD-binding protein	IPR006094	FAD linked oxidase, N-terminal	Q9HWP1	FAD-binding PCMH-type domain-containing protein	PF01565	FAD binding domain
PA4142	A jusante PA4141	WP_003159293.1	HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit	-	-	Q9HWN9	Probable secretion protein	PF13437	HlyD family secretion protein
PA4781	A montante ao PA4782	WP_003121086.1	two-component system response regulator	IPR001789	Signal transduction response regulator, receiver domain	Q9HV27	Cyclic di-GMP phosphodiesterase PA4781	PF00072	Response regulator receiver domain
PA4783	A jusante PA4782	WP_031672215.1	drug/metabolite exporter YedA	IPR000620	EamA domain	Q9HV25	Uncharacterized protein	PF00892	EamA-like transporter family
PA4879	A montante ao PA4878	WP_128720975.1	AsmA family protein	IPR007844	AsmA	Q9HUT4	AsmA domain-containing protein	PF05170	AsmA family
PA4877	A jusante PA4878	WP_033989522.1	Rho termination factor N-terminal domain-containing protein	IPR011112	Rho termination factor, N-terminal	Q9HUT6	Rho_N domain-containing protein	PF07498	Rho termination factor, N-terminal domain
qscR	A montante ao phzA	GAA17463.1	quorum-sensing control repressor	IPR005143	Transcription factor LuxR-like, autoinducer-binding domain InterPro entry	G3XD77	Quorum-sensing control repressor	PF03472	Autoinducer binding domain
phzB2	A jusante phzA	WP_003115119.1	phenazine biosynthesis protein phzB 2	IPR004964	Phenazine biosynthesis protein A/B	Q02L47	Phenazine biosynthesis protein PhzB 2	PF03284	Phenazine biosynthesis protein A/B

Figura 1. Cinética de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV em caldo nutriente, em ausência (CN) e na presença de 0,01% cloreto de cobre (CN+Cu). As células foram incubadas a 28 °C por um período de 10 dias (240 h) de cultivo, e nos tempos especificados uma alíquota foi utilizada para contagem de UFC. Os valores estão expressos como \log_{10} UFC/mL versus tempo (horas).

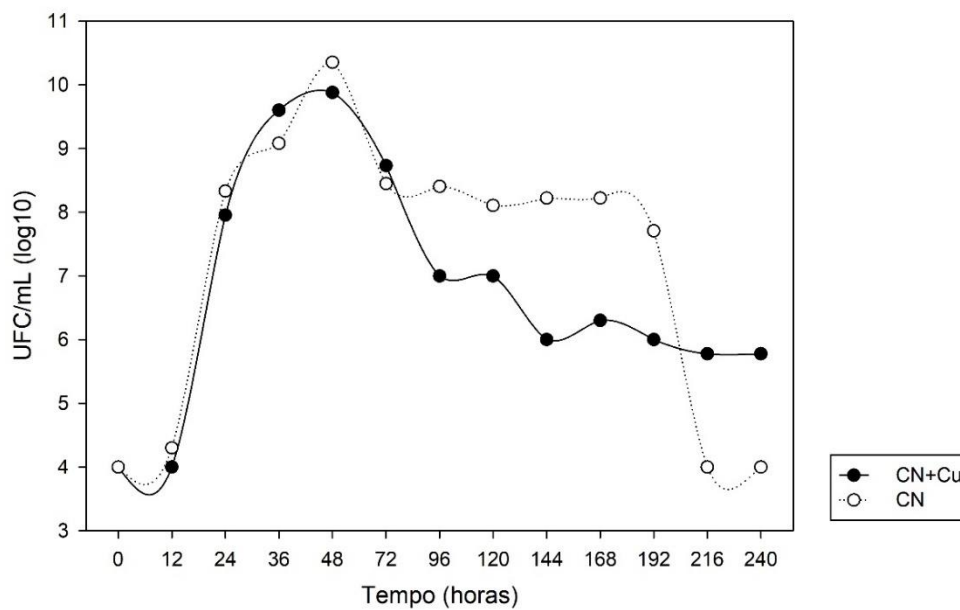


Figura 2. Cinética de produção de Fluopsina C por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV em caldo nutriente suplementado com 0,01% de cloreto de cobre a 28 °C por um período de 10 dias (240 h). Fluopsina C foi detectada por Cromatografia de Alta Eficiência, e os valores expressos como concentração (mg/L) *versus* Tempo (horas).

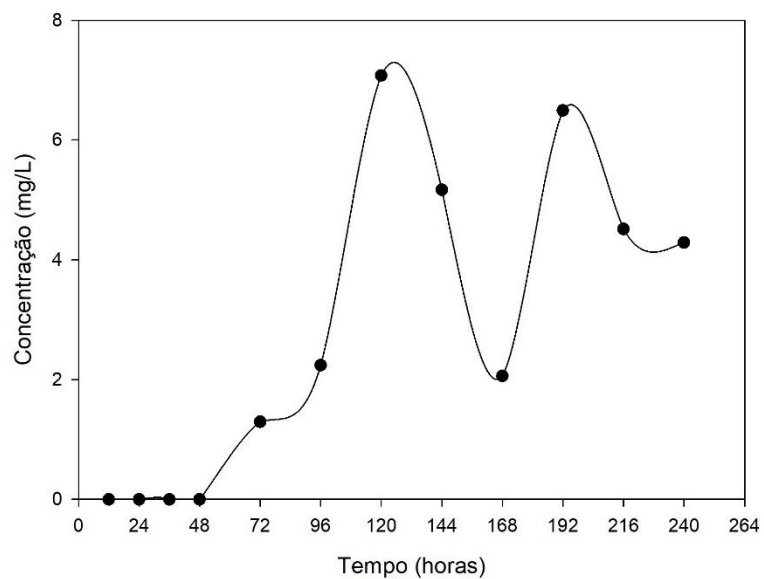
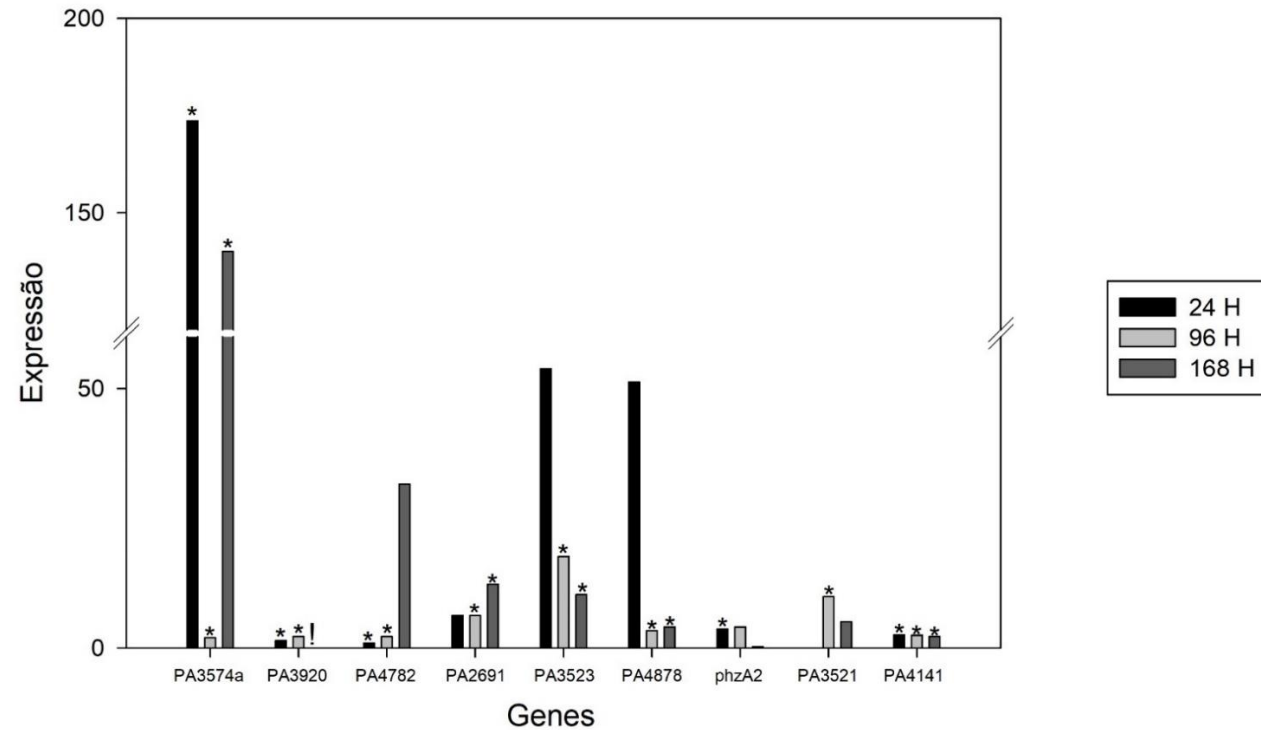


Figura 3. Expressão temporal de genes diferencialmente expressos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV cultivada em caldo nutriente suplementado com 0,01% cloreto de cobre. RNAm de células cultivadas em caldo nutriente na ausência (Controle) ou em presença de cloreto de cobre (Teste) nos diferentes tempos de incubação foram obtidos e os transcritos referentes aos genes selecionados foram quantificados por PCR em tempo real utilizando o sistema QuantiNova™ SYBR® Green RT-PCR e o método *cycle threshold* (Ct). Alterações nos níveis de transcritos foram determinadas utilizando o gene 16S rRNA como controle interno. Resultados estão apresentados como expressão relativa dos genes em relação ao controle. Os resultados correspondem a média padrão para ensaios em duplicatas.



Obs: * Expressão up
! Expressão down

Figura 4. Representação esquemática, desenhada em escala, dos agrupamentos de regiões flanqueantes dos genes diferencialmente expressos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV cultivada em caldo nutriente suplementado com 0,01% cloreto de cobre. Os genes diferencialmente expressos são indicados por setas vermelhas, os genes jusantes indicados por setas rosas e os genes montantes por setas amarelas. A identidade da sequência de nucleotídeos foi de pelo menos 95% nessas regiões comparada com o genoma de referência *P. aeruginosa* PA01.

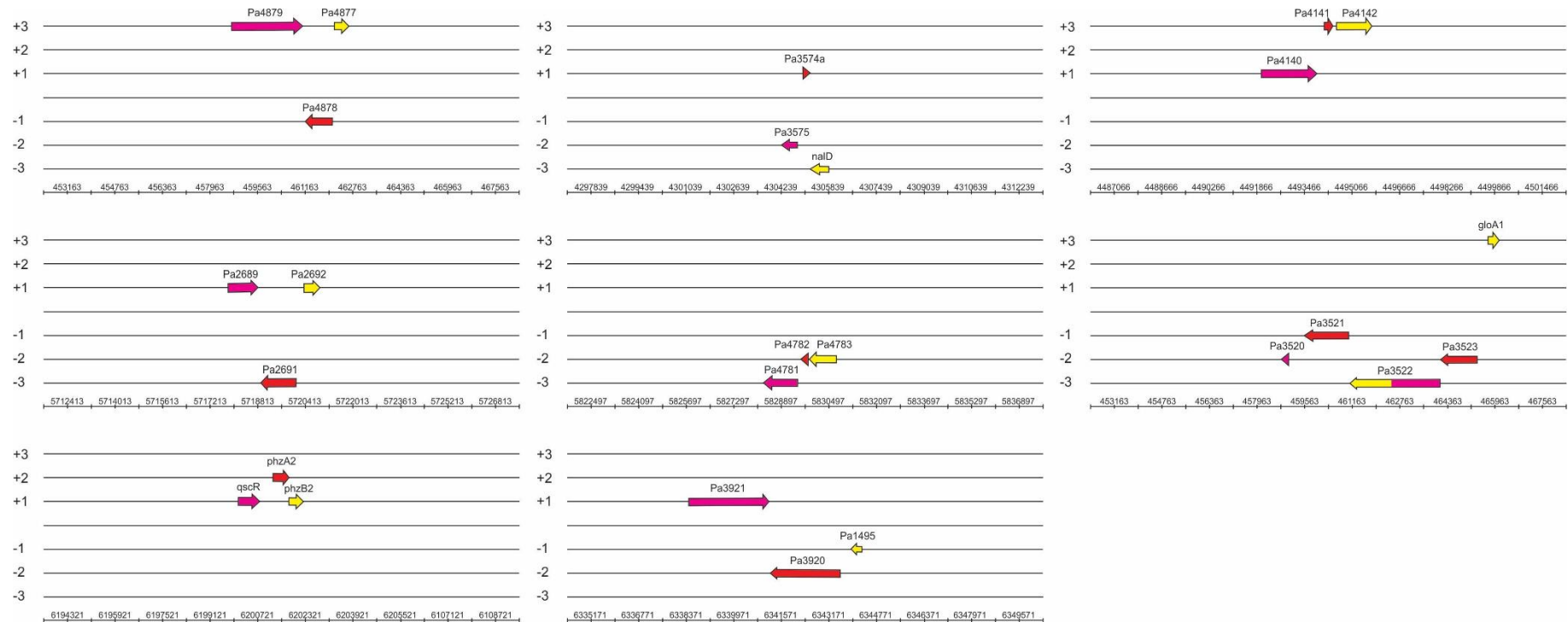
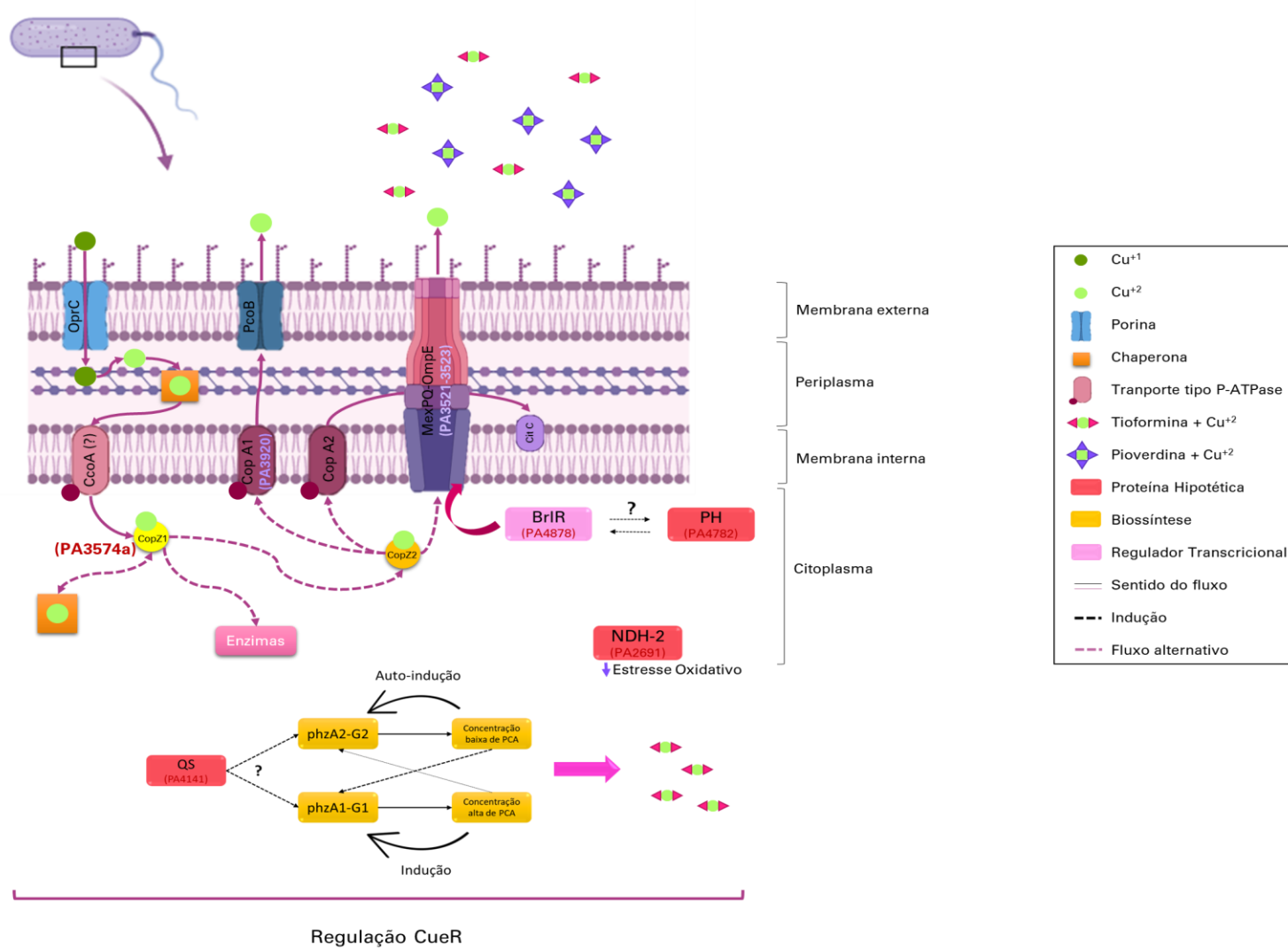


Figura 5. Modelo representativo do sistema de tolerância ao excesso de cloreto de cobre e da relação dos genes hiperexpressos em *Pseudomonas aeruginosa*: o Cu oxidado (Cu^{+1}) entra no periplasma celular através de porinas do tipo OprC, onde com o auxílio do sistema oxidase multicobre será reduzido para Cu^{+2} , sua forma menos tóxica, e sendo conduzido ao citoplasma por transportadores do tipo P-ATPase (CcoA). Uma vez no citoplasma este metal se liga à chaperonas de cobre (CopZ1 – PA3574a e CopZ2), que ativam o regulador transcricional CueR, que por sua vez ativa 11 genes de forma direta e 30 genes de forma indireta que atuam na homeostase de metais pesados, como reguladores BrIR (PA4878 - PA4782) e sistema NDH-2 (PA2691). A partir de então, o Cu^{+2} pode ser extrusado para o periplasma através de transportadores tipo P-ATPase (CopA2) e participar como cofator metálico de citocromo C; ser eliminado através de sistemas de efluxo (MexPQ-OmpE – PA3521-PA3523) e transportadores tipo P-ATPase (CopA1- PA3920)-porinas (PCoB), ou ser capturado por sideróforos no meio extracelular (Pioverdina e Tioformina). Além disso, o excesso de Cu^{+2} no citoplasma pode ativar vias de *Quorum sensing* (PA4141) que participam da regulação da biossíntese de fenazinas (phzA1), que podem estar ligados ao precursor de Tioformina e conseqüentemente a produção de Fluopsina C.



1 CONCLUSÃO

2

3 ◦ Com a análise do sequenciamento completo do genoma da Cepa LV
4 confirmamos que se trata da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, sendo
5 realizado o depósito do mesmo no GenBank sob o número de acesso
6 CP058323.

7 ◦ Através das análises de anotação podemos inferir que esta cepa possui pelo
8 menos 14 clusters de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos
9 secundários, sete genes envolvidos na resistência a antimicrobianos e três
10 regiões de arranjos de CRISPR.

11 ◦ A produção de Fluopsina C por *P. aeruginosa* em caldo nutriente acrescido de
12 0,01% de CuCl_2 ocorre a partir de 72 horas em baixas concentrações,
13 atingindo o pico máximo de produção com 120 horas. Foi possível observar
14 através da curva de crescimento e produção, uma provável seleção de
15 microrganismos mais resistentes a Fluopsina C entre 168 a 192 horas.

16 ◦ Através da expressão temporal dos genes diferencialmente expressos foi
17 possível compreender a provável rota do cobre durante a curva de produção
18 de Fluopsina C. Com os resultados obtidos neste trabalho sugerimos que *P.*
19 *aeruginosa* cepa LV utilize a Fenazina-1-ácido carboxílico como precursora da
20 molécula tioformina, que posteriormente se ligará ao cobre e será convertida
21 em Fluopsina C.

22