



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Pamella Constantino Teles Longuinho

Prevalência de genes do Sistema de Secreção do Tipo III e citotoxicidade de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2

Rio de Janeiro

2023

Pamella Constantino Teles Longuinho

Prevalência de genes do Sistema de Secreção do Tipo III e citotoxicidade de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Mattos Saliba

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L858 Longuinho, Pamella Constantino Teles.
Prevalência de genes do Sistema de Secreção do Tipo III e citotoxicidade de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2 / Pamella Constantino Teles Longuinho – 2023.
81 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Mattos Saliba
Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* - Teses. 2. Sistemas de secreção bacterianos - Teses. 3. SARS-CoV-2. 4. Coinfecção. I. Saliba, Alessandra Mattos. II. Marques, Elizabeth de Andrade Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 576.8

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Pamella Constantino Teles Longuinho

Prevalência de genes do Sistema de Secreção do Tipo III e citotoxicidade de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* oriundos de UTI, coinfetados ou não com SARS-CoV-2

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 19 de dezembro de 2023.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Alessandra Mattos Saliba (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Angela Correa de Freitas Almeida
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Dra. Bianca de Oliveira Fonseca
Hospital Federal da Lagoa

Dra. Laura Maria Andrade de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Suely e Dionísio, meus primeiros professores e maiores incentivadores da minha vida. Sem vocês nada disto seria possível.

AGRADECIMENTOS

Um doutorado no meio da pandemia, que loucura! Tantas incertezas, tantos medos, tantas questões... mas Deus me sustentou até aqui. Obrigada, meu Senhor, por permitir que este trabalho fosse feito, mesmo em meio a tantas adversidades.

Agradecimento mais que especial aos meus pais, por toda compreensão, carinho e cuidado. Vocês fizeram estes 4 anos serem bem mais suportáveis e felizes para mim.

Ao meu marido, meu companheiro de vida, que sempre me apoiou em tudo, sempre com palavras de carinho na hora certa, sempre disposto a me ajudar e me acalmar nos momentos de maiores tribulações. Obrigada!

À minha amada orientadora, Alessandra. Professora, neste último ano passamos por tanta coisa, tantas provações, mas seguimos de pé. Você foi e é incrível para mim. Obrigada por ser, em tantos momentos, muito mais do que minha orientadora. Você é gigante, jamais duvide. Obrigada por ser meu exemplo.

À minha amada coorientadora, Elizabeth, por todo ensinamento e carinho. Professora, você fez a minha passagem pela Micro ser incrível! Jamais esquecerei!

Às minhas meninas do lab 4, Yasmin e Karen. Meus amores, este trabalho não seria possível sem vocês. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos queridos: Mariana, Pedro, Anaroux e Clarice, por todo incentivo e por toda força que me deram quando eu mais precisava. Amo vocês.

Aos meus amigos queridos dos laboratórios 1, 2, 3 e 6, meus companheiros de jornada na pós-graduação que deixaram tudo mais leve e suportável. Quanta coisa maravilhosa que a gente viveu e que pudemos compartilhar. Vocês sabem quem são. Amo vocês.

Aos técnicos do departamento, parte crucial para que todo este trabalho fosse concluído. Nada sem vocês, queridos. Elisa, Angeliquinha, Dri, Dê, Felipe, Manu, vocês moram no meu coração.

Ao meu revisor, professor Robson, pela contribuição e parceria.

Aos membros da banca, pela contribuição e aceite em participar deste trabalho.

Aos professores do departamento de Microbiologia, meu muito obrigada por toda conversa e ensinamentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Meu agradecimento pela bolsa de estudos, que permitiu a realização deste trabalho.

Senhores, são os micróbios que darão a última palavra.

Louis Pasteur

RESUMO

LONGUINHO, Pamella Constantino Teles. **Prevalência de genes do Sistema de Secreção do Tipo III e citotoxicidade de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2.** 2023. 81 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista frequentemente encontrado nos hospitais e capaz de causar tanto infecções crônicas quanto agudas. No ambiente hospitalar um dos principais microrganismos causadores de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. O perfil patogênico de *P. aeruginosa* está associado aos diversos fatores de virulência expressos, sendo o sistema de secreção do tipo 3 e suas proteínas efetoras, ExoS, ExoU, ExoY, e ExoT, um dos mais estudados. As proteínas ExoU e ExoS estão relacionadas a uma maior virulência de isolados clínicos, sendo o genótipo *exoS*⁺/*exoU*⁻ associado a infecções crônicas, enquanto que o genótipo *exoS*⁻/*exoU*⁺ está relacionado a processos infecciosos agudos. A infecção das vias aéreas inferiores por *P. aeruginosa* é uma importante causa de morbidade e mortalidade entre indivíduos hospitalizados e portadores de doenças respiratórias crônicas, parte devido à ação das proteínas do sistema de secreção do tipo 3. Esses indivíduos ficam mais suscetíveis à infecção simultânea com vírus que atingem as vias aéreas, como foi visto recentemente com o SARS-CoV-2, e mais propensos a internações em UTI. Este trabalho teve como objetivo verificar a presença de genes do SST3 e determinar o potencial citotóxico de isolados clínicos de *P. aeruginosa* originários de pacientes de UTI coinfectados ou não com SARS-CoV-2. Para isto, foi feita extração de DNA e PCR de 84 isolados de *P. aeruginosa*, coinfectados ou não com SARS-CoV-2, tendo como alvo as 4 proteínas efetoras do sistema de secreção do tipo 3. Para determinar o potencial citotóxico foi feita a pesquisa da viabilidade de células epiteliais respiratórias da linhagem A549 infectadas com os diferentes isolados. Quando analisamos a prevalência de genes que codificam fatores de virulência do SST3, vemos que ExoT foi o fator de virulência mais prevalente nos isolados, sendo encontrado em 97,61% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* não infectados com SARS-CoV-2, e em 92,85% dos isolados de *P. aeruginosa* coinfectados com SARS-CoV-2. ExoY foi o segundo fator de virulência do SST3 mais prevalente, totalizando 80,95% das cepas, e 71,42% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes sem e com coinfectados com SARS-CoV-2, respectivamente. As toxinas ExoS e ExoU divergiram quando comparados os 2 grupos de pacientes, uma vez que nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2, *exoS* foi mais prevalente, presente em 50% das cepas, enquanto que *exoU* foi detectada em 40,47% das cepas. Os isolados obtidos de pacientes sem coinfeção, observamos proporções iguais (50% cada) de presença de *exoS* e *exoU*. Quanto à citotoxicidade dos isolados, nenhum espécime do grupo com coinfeção apresentou alta citotoxicidade. No grupo com coinfeção, as cepas clínicas 24, 25 e 26 além de apresentarem alta citotoxicidade, também foram *exoU*⁺. Nossos dados mostram que os isolados clínicos simultaneamente infectados com SARS-CoV-2 foram menos diversificados em relação aos grupos de genótipos achados, e menos citotóxico para células de mamíferos quando comparados com espécimes de *P. aeruginosa* sem coinfeção.

Palavras-chave: *P. aeruginosa*, genes do SST3, coinfeção, SARS-CoV-2.

ABSTRACT

LONGUINHO, Pamella Constantino Teles. **Prevalence of Type III Secretion System genes and cytotoxicity of *P. aeruginosa* clinical isolates from ICUs, coinfecting or not with SARS-CoV-2.** 2023. 81 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen frequently found in hospitals and capable of causing both chronic and acute infections. In the hospital environment, is one of the main microorganisms that causes infections related to hospital-acquired infections. The pathogenic profile of *P. aeruginosa* is associated with several expressed virulence factors, including the type 3 secretion system and its effector proteins, ExoS, ExoU, ExoY, and ExoT, one of the most trained. The ExoU and ExoS proteins are related to greater virulence of clinical isolates, with the *exoS*⁺/*exoU*⁻ genotype being associated with chronic infections, while the *exoS*⁻/*exoU*⁺ genotype is related to acute infectious processes. Lower airway infection by *P. aeruginosa* is an important cause of morbidity and mortality among hospitalized individuals and those with chronic respiratory diseases, in part due to the action of type 3 secretion system proteins. These individuals are more susceptible to simultaneous infection with airways' viruses, as recently seen in SARS-CoV-2, and more prone to ICU admissions. This work aimed to verify the presence of type 3 secretion system genes and determine the cytotoxicity of clinical isolates of *P. aeruginosa* from ICU patients, coinfecting or not with SARS-CoV-2. For this, DNA and PCR screening of 84 *P. aeruginosa* isolates, coinfecting or not with SARS-CoV-2, was carried out, targeting the 4 effector proteins of the type 3 secretion system. To determine the cytotoxicity, the viability of respiratory epithelial cells of the A549 lineage infected with the different isolates was investigated. When we analyzed the prevalence of genes encoding type 3 secretion system virulence factors, ExoT was the most prevalent virulence factor in the isolates, found in 97.61% of *P. aeruginosa* clinical isolates not infected with SARS-CoV-2, and in 92.85% of *P. aeruginosa* isolates coinfecting with SARS-CoV-2. ExoY was the second most prevalent SST3 virulence factor, accounting for 80.95% and 71.42% of *P. aeruginosa* clinical isolates obtained from patients without and with co-infection with SARS-CoV-2, respectively. The ExoS and ExoU toxins differed when comparing the 2 groups of patients, since in clinical isolates of *P. aeruginosa* from patients coinfecting with SARS-CoV-2, *exoS* was more prevalent, present in 50% of the strains, while *exoU* was detected in 40.47% of the strains. In isolates from patients without co-infection, we observed equal proportions (50% each) of *exoS* and *exoU*. Regarding the cytotoxicity of the isolates, no specimen from the co-infection group showed high cytotoxicity. In the co-infection group, clinical strains 24, 25 and 26, showed high cytotoxicity, and also were *exoU*⁺. Our data show that clinical isolates simultaneously infected with SARS-CoV-2 were less diverse in relation to the genotype groups found, and less cytotoxic to mammalian cells when compared to *P. aeruginosa* specimens without co-infection.

Keywords: *P. aeruginosa*, T3SS genes, coinfection, SARS-CoV-2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Microscopia de <i>P. aeruginosa</i>	17
Figura 2 –	Morfologia dos diferentes tipos de colônias produzidas por <i>P. aeruginosa</i>	17
Figura 3 –	Evolução das infecções relacionadas à assistência à saúde, em UTI adulto, no estado do Rio de Janeiro, entre 2014-2022.....	21
Figura 4 –	Evolução das infecções relacionadas à assistência à saúde, em UTI pediátrica, no estado do Rio de Janeiro, entre 2012-2022.....	22
Figura 5 –	Distribuição dos surtos infecciosos de <i>P. aeruginosa</i> registrados no Brasil, por sítio de infecção, de 2012 a 2020.....	23
Figura 6 –	Biogênese da formação das vesículas de membrana externa (VME) de <i>P. aeruginosa</i> , através do brotamento membranar.....	25
Figura 7 –	Estágios da formação do biofilme.....	26
Figura 8 –	Modelos dos sistemas de secreção encontrados em <i>P. aeruginosa</i>	27
Figura 9 –	O sistema de secreção do tipo III (SST3) de <i>P. aeruginosa</i>	29
Figura 10 –	Mecanismo de ação das proteínas efetoras secretadas pelo SST3, ExoS, ExoT, ExoU e ExoY.....	34
Figura 11 –	SARS-CoV-2.....	36
Figura 12 –	Esquema de infecção e replicação do vírus SARS-CoV-2 em humanos	37
Quadro 1 –	Características das amostras de <i>P. aeruginosa</i> oriundas de pacientes internados em UTI e coinfectados com SARS-CoV-2.....	45
Quadro 2 –	Características das amostras de <i>P. aeruginosa</i> oriundas de pacientes internados em UTI e não infectados com SARS-CoV-2.....	45
Figura 13 –	Isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2, distribuídos de acordo com o sexo.....	47
Figura 14 –	Isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2, em relação ao tipo de amostra.....	48
Figura 15 –	Isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , obtidos de pacientes em UTI, coinfectados com SARS-CoV-2, em relação ao tipo de amostra.....	49
Figura 16 –	Isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , obtidos de pacientes em UTI e não infectados com SARS-CoV-2, em relação ao tipo de amostra.....	49

Figura 17 –	Genes do SST3 nos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , oriundos de UTI, coinfectados com SARS-CoV-2.....	51
Figura 18 –	Genes do SST3 nos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , oriundos de UTI, obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2.. <i>aeruginosa</i> obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2.....	51
Figura 19 –	Genótipos do SST3 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , oriundos de UTI, obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2.....	52
Figura 20 –	Genótipos do SST3 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , oriundos de UTI, obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2.....	53
Figura 21 –	Genótipos do SST3 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , oriundos de UTI, obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2.....	54
Figura 22 –	Genótipos do SST3 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , oriundos de UTI, obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2.....	54
Figura 23 –	Genótipo <i>exoU/exoS</i> dos isolados clínicos oriundos de UTI, obtidos de pacientes infectados ou não com SARS-CoV-2.....	56
Figura 24 –	Viabilidade dos isolados clínicos obtidos de pacientes infectados ou não com SARS-CoV-2, pós tratamento com gentamicina 300 µg/mL...	57
Figura 25 –	Genótipos do SST3 em isolados de <i>P. aeruginosa</i> obtidos de pacientes internados em UTI.....	58
Figura 26 –	Genótipos do SST3 observados em isolados de <i>P. aeruginosa</i> obtidos de pacientes internados em UTI, coinfectados com SARS-CoV-2.....	58
Figura 27 –	Viabilidade de células epiteliais respiratórias após 1 ou 24 horas de infecção com isolados de <i>P. aeruginosa</i> obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2.....	59
Figura 28 –	Viabilidade de células epiteliais respiratórias após 1 ou 24 horas de infecção com isolados de <i>P. aeruginosa</i> obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2.....	60
Figura 29 –	Isolados de <i>P. aeruginosa</i> obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2 que apresentaram alta e baixa citotoxicidade <i>in vitro</i>	61
Figura 30 –	Isolados de <i>P. aeruginosa</i> obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2 que apresentaram baixa citotoxicidade <i>in vitro</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Infecções primárias de corrente sanguínea causadas por <i>P. aeruginosa</i> , em UTI adulto e pediátrica, no Estado do Rio de Janeiro e no Brasil.....	20
Tabela 2 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho.....	42
Tabela 3 –	Origem dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2.....	47
Tabela 4 –	Genes do SST3 nos 84 isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2.....	50
Tabela 5 –	Genótipo <i>exoU/exoS</i> dos isolados clínicos oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
ADPRT	ADP-ribosiltransferase
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asp.	Aspirado
BGN-NF	Bacilo Gram-negativo não fermentador
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CECIH	Coordenação Estadual de Controle de infecção Hospitalar
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Cif	Fator inibidor de CFTR
CL	Clínica
CMPc	Monofosfato cíclico de citidina
CTI	Centro de terapia intensiva
CXCL-8	Quimiocina motivo CXC ligante 8
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ERM	Ezrina, radixina e moesina
FC	Fibrose cística
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
GAP	Atividade RhoGTPase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFN	Interferon
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-16	Interleucina 16
IPCS	Infecção primária de corrente sanguínea
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU-AC	Infecção do trato urinário associada a cateter

LasA	Elastase A
LasB	Elastase B
LB	Meio Luria Broth
LBA	Líquido broncoalveolar
LipA	Lipase A
LipC	Lipase C
LoxA	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Fenótipo mucoide
MERS	<i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
MAPKs	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NM	Fenótipo não-mucoide
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	<i>P. aeruginosa</i>
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAFR	Receptor do fator de ativação plaquetária
PAH	Pneumonias adquiridas em hospital
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Tampão fosfato salino
PKCδ	Proteína quinase C-delta
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PlcB	Fosfolipase
PlcH	Fosfolipase C hemolítica
PlcN	Fosfolipase C não-hemolítica
RBD	Domínio de ligação ao receptor
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
Sec	Secreção

ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SIRS	Síndrome inflamatória respiratória sistêmica
SpC	Chaperona de <i>P. aeruginosa</i> específica para ExoU
SST1	Sistema de secreção do tipo I
SST2	Sistema de secreção do tipo II
SST3	Sistema de secreção do tipo III
SST5	Sistema de secreção do tipo V
SST6	Sistema de secreção do tipo VI
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TLR2	Receptor toll like 2
TLR4	Receptor toll like 4
TMPRSS2	Serino protease transmembrana tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia
UMPc	Monofosfato cíclico de uridina
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VME	Vesícula de membrana externa

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minute
α	Alfa
γ	Gamma
cm	Centímetro
cm ²	Centímetros quadrados
rpm	Rotações por minuto
α	Alfa
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius
G	Força g
V	Volts
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogeniônico
μM	Micromolar
μL	Microlitro
δ	Delta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	39
1.1	Geral	39
1.2	Específicos	39
2	MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1	Cepas de <i>P. aeruginosa</i>	40
2.2	Células epiteliais respiratórias	40
2.3	Extração de DNA genômico e PCR para detecção dos genes que codificam os fatores de virulência ExoS, ExoT, ExoU e ExoY	41
2.4	Infecção de células epiteliais respiratórias humanas por isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	42
2.5	Avaliação da citotoxicidade dos isolados clínicos para células epiteliais respiratórias	43
2.6	Análise estatística	44
3	RESULTADOS	45
3.1	População e amostra	45
3.2	Prevalência de genes que codificam os fatores de virulência ExoS, ExoT, ExoU, ExoY	50
3.3	Viabilidade de células epiteliais respiratórias humanas após infecção com isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> obtidos de pacientes infectados ou não com SARS-CoV2	58
3.3.1	<u>Avaliação da suscetibilidade à gentamicina</u>	58
3.3.2	<u>Avaliação da citotoxicidade dos isolados clínicos para células epiteliais respiratórias</u>	59
4	DISCUSSÃO	63
4.1	Limitações	70
	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO - Comprovação de publicação de artigo científico	81

INTRODUÇÃO

Características gerais de *Pseudomonas aeruginosa*

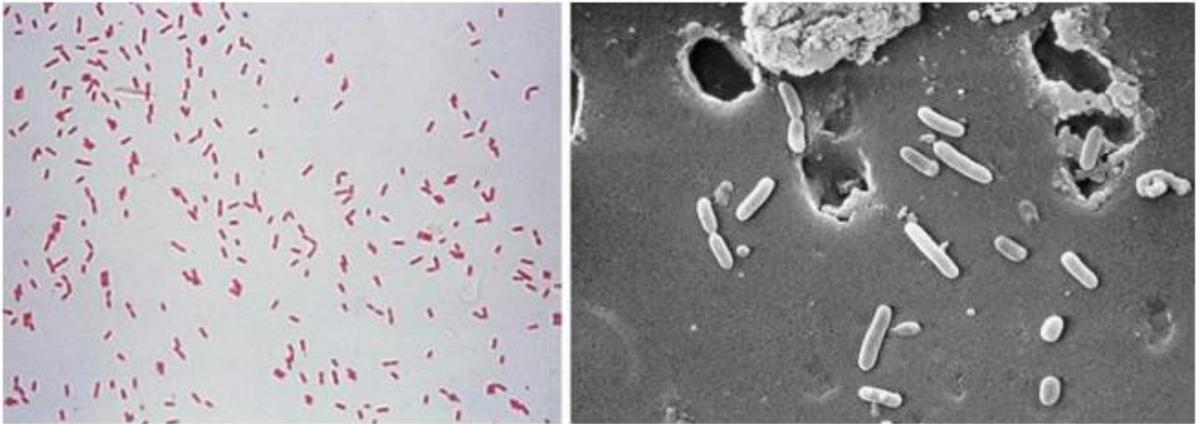
Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria pertencente à família das *Pseudomonadaceae*, gênero *Pseudomonas*, observada pela primeira vez em 1850, por um médico militar francês, que, ao trocar curativos de pacientes infectados, notou que as bandagens utilizadas e as camas do hospital ficavam frequentemente com uma substância de cor verde azulada e com odor doce, frutado. No ano de 1882, pouco mais de 30 anos depois, um farmacêutico francês compartilhou com a sociedade científica que havia isolado com sucesso o patógeno “*Bacillus pyocyaneus*”, posteriormente renomeado para *Pseudomonas aeruginosa*, com um artigo intitulado “*On the blue and green coloration of bandages*” (apud GESSARD, 1891).

P. aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose (BGN-NF), incapaz de usar carboidrato como fonte de energia ou de degradá-lo através da via metabólica oxidativa. Apesar de ser um microrganismo aeróbio facultativo, que tem preferência por utilizar oxigênio como aceptor final de elétrons na respiração aeróbia, *P. aeruginosa* também é capaz de usar o nitrato como aceptor alternativo de elétrons na respiração anaeróbica (YOON *et al.*, 2002; PROCOP *et al.*, 2020; HOIBY *et al.*, 2015).

Atualmente, a identificação taxonômica de *P. aeruginosa* é feita através da unidade 16S do rRNA e comparações das sequências genômicas, análise dos fatores de virulência expressos, composição de ácidos graxos e testes bioquímicos (PROCOPI *et al.*, 2020; SATHE *et al.*, 2023).

Morfologicamente, os bastonetes de *P. aeruginosa* podem ser retos ou levemente curvos, medindo entre 0,5 a 1,0 µm de espessura por 1,5 a 5,0 µm de comprimento, a depender da fase de crescimento do microrganismo. São encontrados tanto isolados quanto aos pares e também em pequenas cadeias, e não produzem esporos (Figura 1). Além disso, são microrganismos móveis, devido à presença de um ou mais flagelos polares, e que apresentam teste fenotípico positivo para a reação da oxidase (PROCOPI *et al.*, 2020; HOIBY *et al.*, 2015).

Figura 1 – Microscopia de *P. aeruginosa*

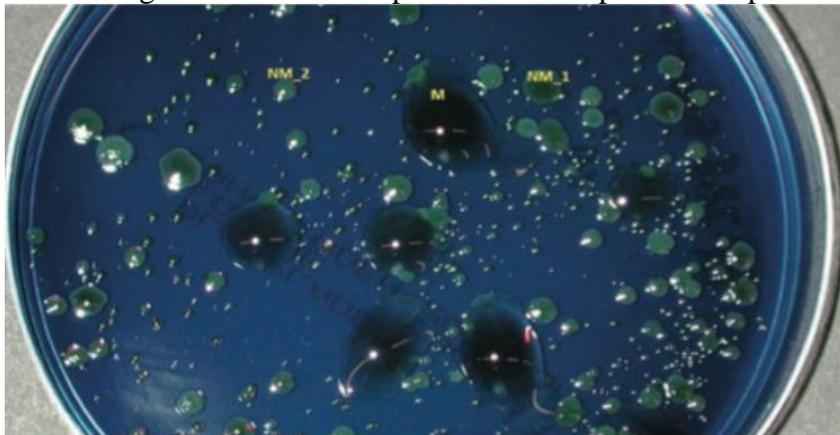


Legenda: *P. aeruginosa* em bacterioscopia com coloração de Gram, à esquerda, e em microscopia eletrônica de varredura, à direita .

Fonte: <http://www.textbookofmicrobiology.net>; Center for Disease Control and Prevention – CDC, Estados Unidos

As colônias de *P. aeruginosa* são grandes, com aspecto rugoso ou mucóide, geralmente apresentam um brilho metálico, odor característico frutado e beta hemólise. Devido à produção de pigmentos hidrossolúveis pela bactéria, as colônias podem ser de cor acinzentada, verdes ou marrom-avermelhadas. Os pigmentos produzidos são: piocianina (azul), pioverdina (verde fluorescente), piorrubina (avermelhado) e piomelanina (marrom e preto). A forma mucóide de algumas colônias ocorre pela produção de alginato, um polissacarídeo extracelular que confere proteção à bactéria e maior aderência a superfícies celulares (Figura 2). É a única positiva, dentre as espécies que compõem o grupo de *Pseudomonas fluorescentes*, para crescimento a 42°C (VASIL, 1986; PROCOP *et al.*, 2017; HOIBY *et al.*, 2015).

Figura 2 – Morfologia dos diferentes tipos de colônias produzidas por *P. aeruginosa*



Legenda: *P. aeruginosa* fenótipo mucóide (M) e fenótipo não-mucóide (NM).

Fonte: HOIBY *et al.*, 2015.

P. aeruginosa é uma bactéria ubíqua e cosmopolita, habitando uma variedade de nichos como plantas, animais, solo e água (FUENTEFRÍA *et al.*, 2011; ADITI *et al.*, 2017; RUTHERFORD *et al.*, 2018). A capacidade de catabolizar uma variedade de moléculas orgânicas como nutrientes garante a essa bactéria a versatilidade bioquímica importante para sua sobrevivência em diversos ambientes. Embora não pertença à microbiota humana, é capaz de colonizar a orofaringe, intestino, pele e períneo (JURADO-MARTÍN *et al.*, 2021; SATHE *et al.*, 2023).

Como agente causador de infecções, *P. aeruginosa* se comporta como um patógeno oportunista, uma vez que não apresenta ameaça a indivíduos imunocompetentes, mas é capaz de causar infecções agudas e crônicas em indivíduos com comprometimento de seus mecanismos de defesa, principalmente da imunidade inata (JURADO-MARTÍN *et al.*, 2021).

Como exemplo de infecções crônicas causadas por *P. aeruginosa* temos a fibrose cística (FC), uma doença multifatorial causada por mutações no gene que codifica o receptor transmembrana da fibrose cística (CFTR), localizado no cromossomo 7, e que atinge, dentre outros órgãos, os pulmões. Este defeito no CFTR causa um transporte anormal de íons, incluindo o cloro, reduzindo sua quantidade nas secreções e levando a um influxo de água para dentro das células. Conseqüentemente, portadores desta condição têm seu muco mais espesso do que o normal e não conseguem eliminá-lo com eficiência (ONG & RAMSEY, 2023).

Nos pulmões de indivíduos com FC, o acúmulo de muco acarreta o mau funcionamento da defesa mucociliar, levando a danos progressivos neste órgão. O muco espesso também contribui para a criação de um ambiente favorável para a colonização de microrganismos oportunistas, como *P. aeruginosa*. De fato, *P. aeruginosa*, uma bactéria ubíqua e de difícil erradicação, é o patógeno mais prevalente em infecções pulmonares em indivíduos com FC. A presença de *P. aeruginosa* nos pulmões desses pacientes é associada ao mau prognóstico, correlacionando-se com uma maior frequência dos atendimentos hospitalares, prolongamento do tempo de internação e aumento da taxa de mortalidade (BILLARD *et al.*, 2017; STEFANI *et al.*, 2017; KIEDROWSKI & BOMBERGER, 2018; ONG & RAMSEY, 2023).

Indivíduos com feridas que não cicatrizam em três meses, como úlceras de pé diabético e úlceras de pressão, também são suscetíveis a infecções crônicas causadas por *P. aeruginosa*. Estudos apontam que este patógeno é a bactéria Gram-negativa mais abundante e frequentemente isolada desses sítios (SATHE *et al.*, 2023).

Já as infecções agudas por *P. aeruginosa* são frequentemente observadas em pacientes hospitalizados. No ambiente hospitalar, *P. aeruginosa* tem predileção por locais úmidos, como pias, equipamentos respiratórios, endoscópios, laringoscópios e catéteres (FILE *et al.*, 1995; BASSETI, 2018; SATHE *et al.*, 2023). Indivíduos hospitalizados com feridas, queimaduras ou que são submetidos a procedimentos invasivos, como intubação e inserção de catéter, têm sua imunidade perturbada com a ruptura da barreira cutâneo-mucosa, dando à bactéria acesso a sítios de colonização e infecção. Além disso, é importante ressaltar que indivíduos infectados com *P. aeruginosa* também podem servir como reservatórios de novas infecções dentro do hospital (JURADO-MARTÍN *et al.*, 2021).

***P. aeruginosa* e o ambiente hospitalar**

Devido à habilidade de se adaptar a variações do ambiente, à resistência a diversas classes de antibióticos e à baixa exigência nutricional, *P. aeruginosa* é amplamente encontrada no ambiente hospitalar. A preferência por locais úmidos faz com que este patógeno colonize desde pias a dispositivos invasivos, como cateteres, sondas e respiradores mecânicos. Somado a este ponto, temos ainda um patógeno extremamente toxigênico que sintetiza uma variedade de fatores de virulência que contribuem para o estabelecimento de infecções agudas e crônicas (CONSTANTINO-TELES *et al.*, 2022; SATHE *et al.*, 2023).

P. aeruginosa é um dos principais patógenos associados a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), sendo responsável por infecções agudas em diversos órgãos e tecidos, como a corrente sanguínea e o trato respiratório, destacando-se a pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV). Em pneumonias adquiridas em hospital (PAH) e em PAV, *P. aeruginosa* é um patógeno frequentemente isolado. As IRAS constituem um grande problema de saúde pública e são definidas como infecções adquiridas após a admissão do paciente no âmbito hospitalar ou após sua alta, desde que tenha correlação com a internação ou com os procedimentos realizados (ANVISA, 2021).

Segundo dados da ANVISA sobre o perfil microbiológico de pacientes em UTI, referentes ao ano de 2020, *P. aeruginosa* foi o terceiro microrganismo mais isolado em pacientes adultos com infecção primária de corrente sanguínea (IPCS), tanto no Brasil, quanto no estado do Rio de Janeiro. Analisando o cenário em UTIs pediátricas, no mesmo ano, *P. aeruginosa* foi o segundo microrganismo mais isolado, no Brasil e no estado do Rio de Janeiro (Tabela 1). No ano seguinte, em 2021, as IPCS notificadas causadas por *P.*

aeruginosa tiveram um aumento comparado com o ano anterior de quase 1000 isolados a mais em UTI adulto no Brasil. O aumento no número de isolados também aconteceu em UTIs adulto no estado do Rio de Janeiro, e em UTIs pediátricas, tanto no âmbito nacional, quanto no estadual, sendo que no estado, *P. aeruginosa* foi o microrganismo mais isolado de IPCS nas UTIs pediátricas. No ano de 2022, a quantidade microrganismo isolada de IPCS diminuiu nas UTIs adultas do país e do estado, e as UTIs pediátricas do país tiveram declínio quando comparado com o ano anterior. Porém, as UTIs pediátricas na esfera estadual registraram um aumento no número de isolados, maior do que os anos anteriores e ainda com *P. aeruginosa* sendo o patógeno mais isolado (tabela 1).

Tabela 1 - Infecções primárias de corrente sanguínea causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, em UTI adulto e pediátrica, no Estado do Rio de Janeiro e no Brasil

Ano	IPCS causadas por <i>P. aeruginosa</i> em UTI adulto (N de microrganismo isolados)		IPCS causadas por <i>P. aeruginosa</i> em UTI pediátrica (N de microrganismo isolados)	
	Brasil	RJ	Brasil	RJ
2020	1.893 (3° + isolado)	238 (3° + isolado)	165 (2° + isolado)	8 (2° + isolado)
2021	2.853 (3° + isolado)	339 (3° + isolado)	258 (2° + isolado)	12 (+ isolado)
2022	1.522 (3° + isolado)	208 (3° + isolado)	165 (2° + isolado)	19 (+ isolado)

Legenda: IPCS= infecção primária de corrente sanguínea; UTI= unidade de terapia intensiva.

Fonte: Adaptado de ANVISA, 2023

Sendo uma bactéria comum em hospitais e de difícil erradicação, *P. aeruginosa* tem sido cada vez mais reconhecida por seus mecanismos de resistência a antibióticos, que se dá por fatores intrínsecos da bactéria ou por mecanismos adquiridos (El ZOWALATY *et al.*, 2015). De acordo com o relatório de resistência microbiana divulgado pela ANVISA, referente ao ano de 2021, de 2.853 isolados clínicos de *P. aeruginosa* de IPCS notificados em UTI adulto no Brasil, 30,9% foram resistentes a carbapenêmicos (imipenem ou meropenem) e 25,2% à colistina. Já em UTI pediátrica, de 258 isolados, 34,4% foram resistentes a carbapenêmicos e 4% à colistina. O surgimento de cepas resistentes e multirresistentes de *P. aeruginosa* não é algo novo: em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de agentes patogênicos resistentes aos antibióticos que são prioritários por apresentarem uma maior ameaça à saúde humana. A lista foi dividida em três categorias, de acordo com a urgência e a necessidade de novos antibióticos: prioridade 1 (crítica), prioridade 2 (alta) e prioridade 3 (média), deixando *P. aeruginosa* na categoria crítica .

Quando analisamos o cenário de PAV em UTIs no estado do Rio de Janeiro, no informativo da Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar (CECIH-RJ) referente ao ano de 2020, vemos que, dos 934.413 pacientes adultos que deram entrada na UTI, 3.349 casos são referentes à PAV, sendo 289 (15,2%) causados por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e 14 (0,7%) por *P. aeruginosa* resistente à polimixina B e/ou E. Em UTIs pediátricas, foram 88.519 notificações, 109 referentes à PAV, sendo 90 destas causadas por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (4,7%) e 3 por *P. aeruginosa* resistente à colistina (0,2%). No ano seguinte, em 2021, o informativo anual da CECIH mudou de formato, disponibilizando apenas a densidade de incidência das IRAS, ao longo de 9 anos, por 100 pacientes ao dia, e nenhum outro dado relacionado à PAV, como mostram as figuras 3 e 4. O padrão do informativo foi mantido no ano de 2022.

Figura 3 - Evolução das infecções relacionadas à assistência à saúde, em UTI adulto, no estado do Rio de Janeiro, entre 2014-2022



Legenda: IPCSL= infecção primária de corrente sanguínea laboratorial. PAV= pneumonia associada à ventilação mecânica. ITU-AC= infecção do trato urinário associada a cateter.

Fonte: CECIH-RJ, 2023.

Figura 4 – Evolução das infecções relacionadas à assistência à saúde, em UTI pediátrica, no estado do Rio de Janeiro, entre 2012-2022



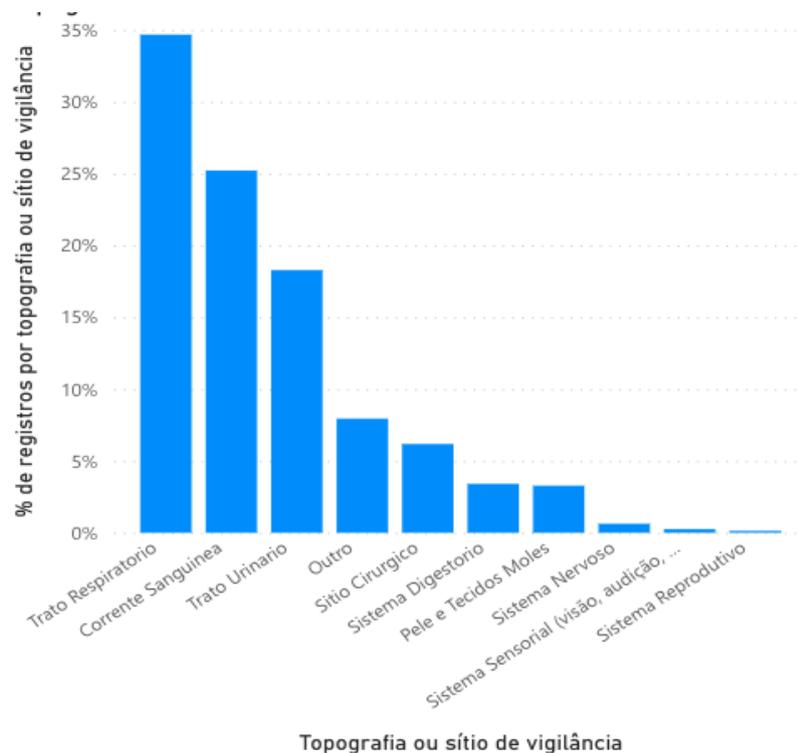
Legenda: IPCSL: infecção primária de corrente sanguínea laboratorial. PAV: pneumonia associada à ventilação mecânica. ITU-AC: infecção do trato urinário associada a catéter.

Fonte: CECIH-RJ, 2023.

Extrapolando mais para o cenário nacional, a ANVISA fez um apanhado de surtos infecciosos registrados no Brasil de 2012 a 2020, constatando a notificação de 1410 surtos infecciosos, 5,4% destes causados por *P. aeruginosa* (quinto microrganismo mais isolado). O principal setor acometido foi a UTI adulta, com 43,18% dos casos, e o principal foco de infecção foi o trato respiratório (Figura 5).

Ainda no Brasil, a literatura varia quanto aos dados sobre IRAS: alguns estudos apontam que o trato mais acometido é o urinário, seguido do trato respiratório, corrente sanguínea e sítio cirúrgico, enquanto outras pesquisas apontam a infecção de corrente sanguínea sendo a mais comum, seguida de pneumonia (LOPES *et al.*, 2018; SABINO *et al.*, 2020; ANVISA, 2023). No período de 2011 a 2013, foi feito um estudo envolvendo 152 hospitais de diferentes portes de cinco regiões do país. Segundo dados desse trabalho, a região norte do Brasil apresentou maior predomínio destas infecções (12,2%), seguida pela região centro-oeste (11,3%), sudeste (10,2%), nordeste (9,3%) e sul (8,3%). Em relação ao tipo de infecção, a pneumonia foi a mais frequente (3,6%), seguida por infecções de corrente sanguínea (2,9%), sítio cirúrgico (1,5%) e trato urinário (1,4%). (FORTALEZA *et al.*, 2017).

Figura 5 – Distribuição dos surtos infecciosos de *P. aeruginosa* registrados no Brasil, por sítio de infecção, de 2012 a 2020.



Fonte: ANVISA, 2023.

A relevância de *P. aeruginosa* como patógeno hospitalar se dá pela sua capacidade de persistir no ambiente por períodos prolongados, sobrevivendo à pressão seletiva mediada por antibióticos, antissépticos e desinfetantes, e de produzir fatores de virulência que possibilitam a infecção do hospedeiro. A adaptação de *P. aeruginosa* às variações do meio e sua habilidade de sobreviver apesar dos desafios impostos pelos diferentes ambientes que a cercam são um reflexo da plasticidade do genoma desta bactéria, que inclui muitos genes que codificam transportadores, reguladores transcricionais e vias metabólicas, e da diversidade do seu genoma acessório, que corresponde a até 20% do genoma total (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2020; ESPINOZA-CAMACHO *et al.*, 2021). Assim, a capacidade de expressar, no momento apropriado, uma ampla variedade de genes que codificam diversos fatores de virulência e conferem resistência a várias classes de antibióticos permite a este patógeno oportunista causar infecções que vão desde lesões superficiais na pele até bacteremia e sepse fatal (MIELKO *et al.*, 2019).

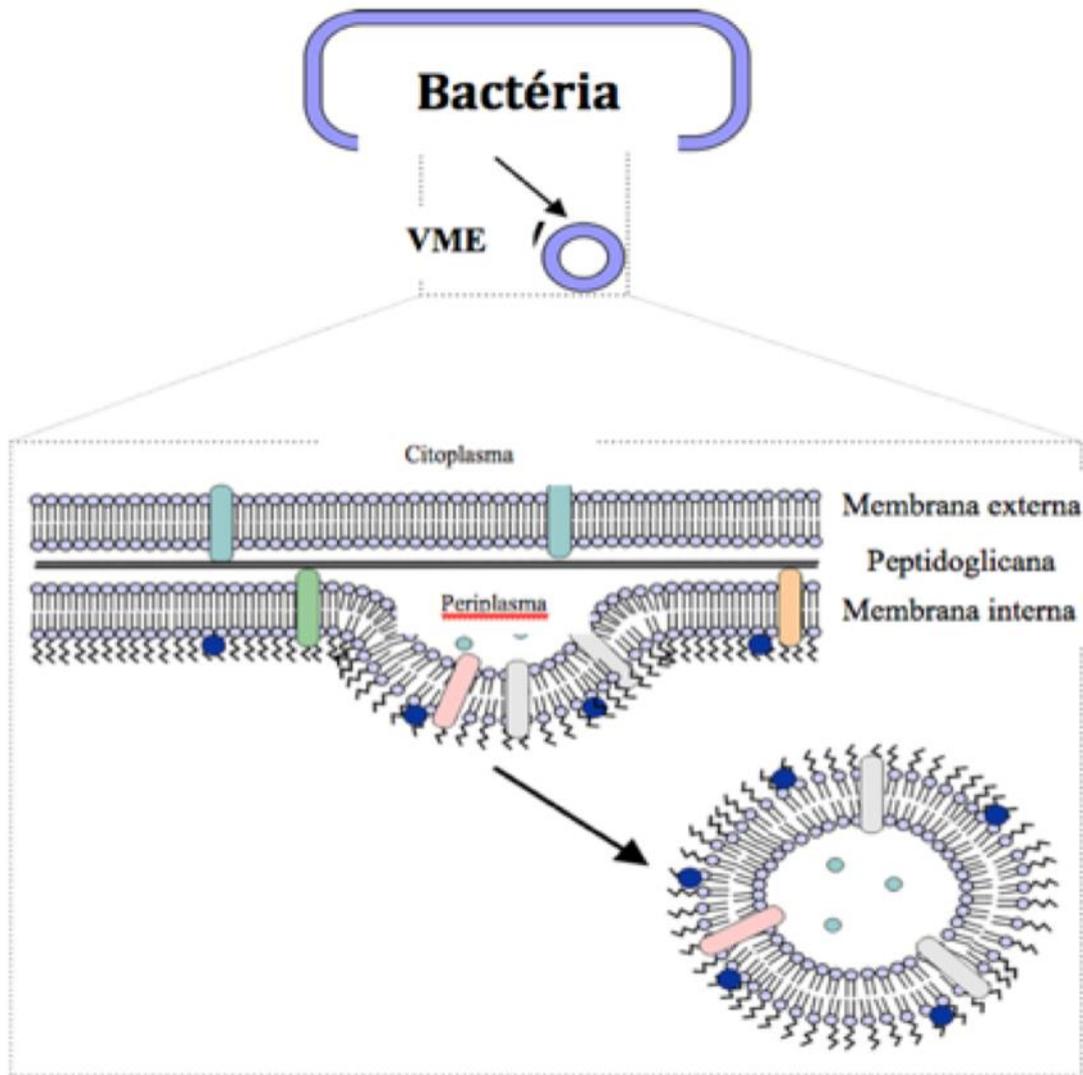
Fatores de virulência de *P. aeruginosa*

Graças à flexibilidade metabólica, garantida pelo seu genoma, e à sua adaptabilidade, *P. aeruginosa* é capaz de sintetizar um amplo arsenal de virulência, causando tanto infecções crônicas quanto infecções agudas, principalmente no trato respiratório (JURADO-MARTÍN *et al.*, 2021; CONSTANTINO-TELES *et al.*, 2022; SATHE *et al.*, 2023).

A membrana externa de *P. aeruginosa* é composta por um lipopolissacarídeo (LPS), que garante a integridade da membrana e que, ao interagir com as células hospedeiras, causa dano tecidual devido a sua atividade endotóxica (KING *et al.*, 2009). O LPS estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a formação de mucinas nas células epiteliais respiratórias, que estão associadas com o aumento das taxas de morbidade e mortalidade em indivíduos com FC e DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica) (JURADO-MARTÍN *et al.*, 2021; ONG & RAMSEY, 2023). Além disso, o LPS aumenta a permeabilidade das células epiteliais respiratórias e induz a inflamação nos pulmões por estimular a produção de TNF, IL-1, IL-6 e IFN- γ (EUTAMENE *et al.*, 2005). O LPS também contribui para a formação de outros fatores de virulência, como as vesículas de membrana externa e o biofilme (HUSZCZYNSKI *et al.* 2019).

As vesículas da membrana externa (VME) são nanopartículas esféricas, produzidas através do brotamento da membrana externa bacteriana, que estão envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo a entrega de fatores de virulência nas células hospedeiras (METRUCCIO *et al.*, 2016; PAULSSON *et al.*, 2018). A membrana lipídica protege o conteúdo da vesícula da degradação de enzimas extracelulares, permitindo, assim, o transporte de longa distância. Em infecções respiratórias por *P. aeruginosa*, as VME podem entregar, no citosol da célula hospedeira, fatores de virulência, como o fator inibidor de CFTR (Cif) e a fosfolipase C hemolítica (BOMBERGER *et al.*, 2009) (Figura 6).

Figura 6 – Biogênese da formação das vesículas de membrana externa (VME) de *P. aeruginosa*, através do brotamento membranar

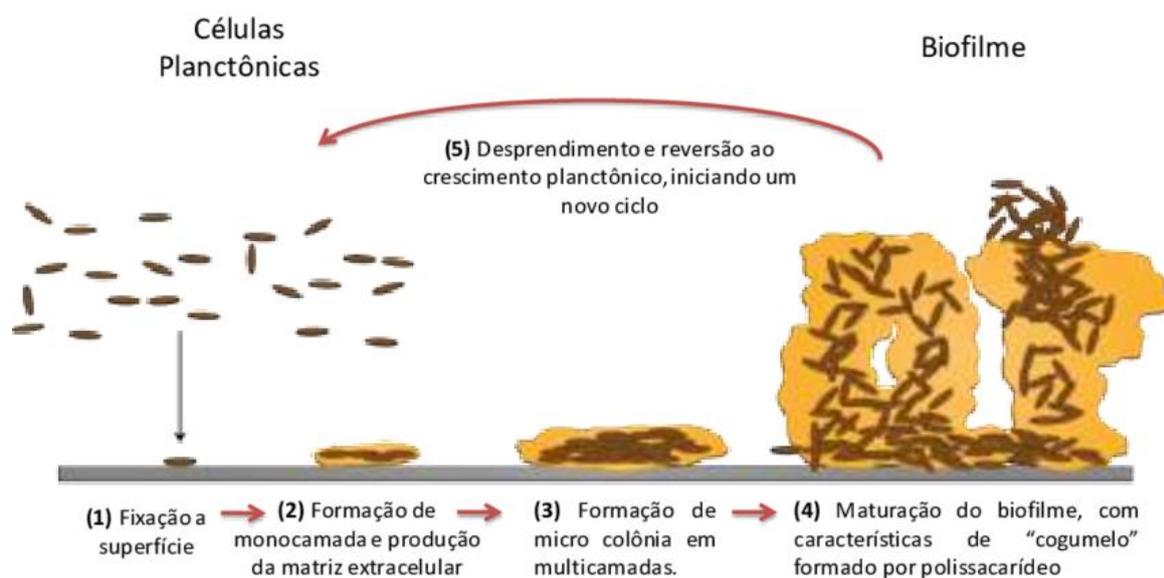


Fonte: Adaptado de COLLINS *et al.*, 2021.

P. aeruginosa é uma bactéria conhecida por formar biofilmes que são altamente resistentes aos antibióticos, aos desinfetantes e às defesas do hospedeiro (LEE & YOON, 2017; YAN & WU, 2019). O biofilme é formado por uma comunidade bacteriana envolta em uma matriz extracelular, que habita superfícies bióticas ou abióticas (Figura 7) e, com isso, dificulta a eliminação do microrganismo, levando ao estabelecimento de infecções crônicas (LEE & YOON, 2017; MENSA *et al.*, 2018). Os isolados de *P. aeruginosa* podem produzir um polissacarídeo extracelular, conhecido como alginato, que confere fenótipo mucóide às colônias. Entretanto, o alginato não é um fator determinante para a formação do biofilme, mas ajuda a comunidade microbiana na arquitetura e na estabilidade do biofilme (THI *et al.*, 2020; MOSER *et al.*, 2021; CONSTANTINO-TELES *et al.*, 2022). A produção de alginato

geralmente é observada em isolados de indivíduos com infecções crônicas, como a FC, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e bronquiectasia.

Figura 7 – Estágios da formação do biofilme.



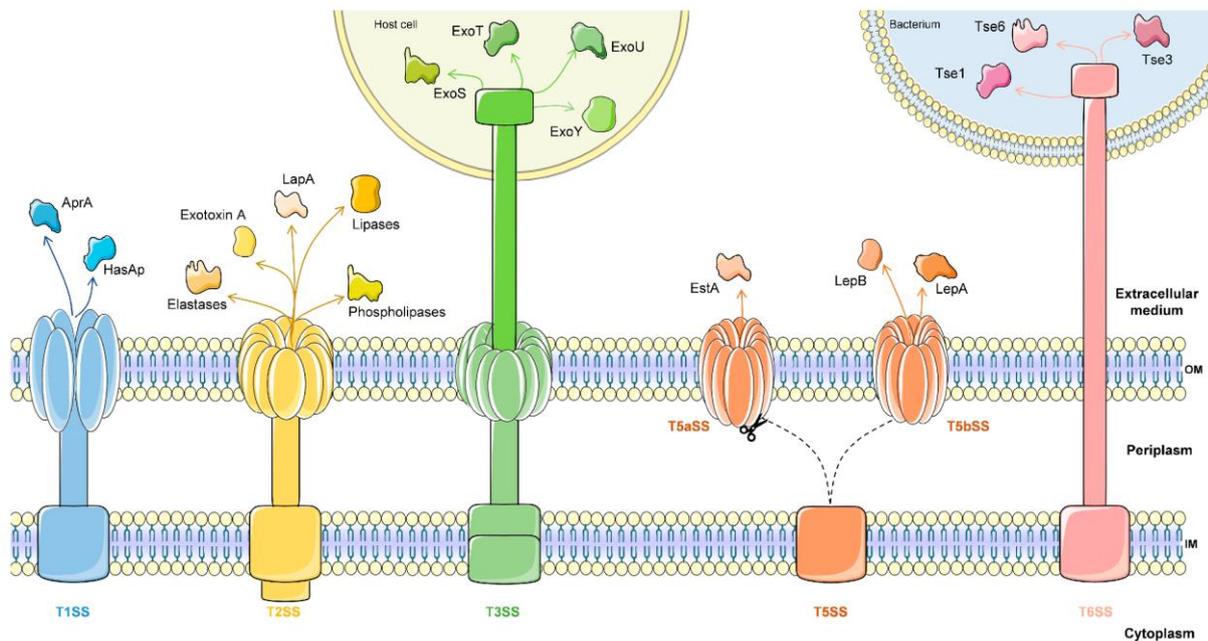
Fonte: DA ROCHA NEVES *et al.*, 2021.

O transporte de fatores de virulência para o meio extracelular ou para dentro de células procarióticas ou eucarióticas depende de sistemas de secreção de proteínas, que são aparatos moleculares utilizados pela bactéria para secretar toxinas e enzimas hidrolíticas que contribuem para a colonização e a manutenção do processo infeccioso no hospedeiro (BLEVES *et al.*, 2010; JURADO-MARTÍN *et al.*, 2021).

P. aeruginosa é capaz de expressar cinco dos seis tipos de sistema de secreção descritos em bactérias Gram-negativas (Figura 8). O sistema de secreção do tipo I (SST1) e o sistema de secreção do tipo V (SST5) detêm as vias de secreção mais simples para liberar seus produtos para o meio extracelular. O SST1 está associado à secreção da protease alcalina AprA e do hemóforo HasAp, um captador do grupo heme de íons ferro (WANDERSMAN & DELEPELAIRE, 2012). Já o SST5 é responsável pela secreção de lipases, adesinas e proteases (BLEVES *et al.*, 2010). O sistema de secreção do tipo II (SST2) é o mais versátil de *P. aeruginosa*, sendo responsável pela secreção da maioria das exoproteínas, incluindo a exotoxina A (uma ADP-ribosiltransferase) e as elastases LasA e LasB, que são enzimas proteolíticas com papel importante na invasão durante infecções agudas. O SST2 também é responsável pela secreção das lipases LipA e Lip C, enzimas lipolíticas que clivam lipídeos, gerando ácidos graxos e glicerol como produtos, da lipoxigenase LoxA, das fosfolipases

PlcB, PlcH e PlcN, das fosfatases alcalinas PhoA e LapA, e da proteína ligadora de quitina CbpD (BLEVES *et al.*, 2010; MORELLO *et al.*, 2019; VERMA *et al.* 2020). O sistema de secreção do tipo VI (SST6) foi descoberto mais recentemente, sendo importante na competição bacteriana, uma vez que produz toxinas que destroem a flora microbiana do hospedeiro (SANA *et al.*, 2016). Os efetores tóxicos (Tse1, Tse2, Tse3 e VgrG) são inoculados diretamente em bactérias vizinhas, causando lise celular ou a interrupção do crescimento dos microrganismos competidores (CROUSILLES *et al.*, 2015; CORBITT *et al.*, 2018). O sistema de secreção do tipo III (SST3) é um dos mais estudados por causa da sua relevância para a patogênese.

Figura 8 – Modelos dos sistemas de secreção encontrados em *P. aeruginosa*.



Legenda: Os cinco sistemas de secreção de *P. aeruginosa*: Sistema de Secreção do Tipo 1, Sistema de Secreção do Tipo 2, Sistema de Secreção do Tipo 3, Sistema de Secreção do Tipo 5 e Sistema de Secreção do Tipo 6.
Fonte: BLEVES *et al.*, 2010.

Entre os cinco sistemas de secreção de proteínas identificados em *P. aeruginosa* até o momento, o SST3 é um dos mais importantes por estar associado à patogênese de infecções crônicas e agudas e se relacionar diretamente com o aumento da taxa de mortalidade (HAUSER, 2009; DENG *et al.*, 2017).

O Sistema de Secreção do Tipo III (SST3)

O SST3 é formado por um aparato semelhante a uma seringa, conhecido como “injectissoma”, capaz de injetar toxinas efetoras diretamente no citosol da célula hospedeira. O injectissoma é composto por, pelo menos, 20 proteínas, divididas entre o aparato de secreção responsável por transportar as proteínas efetoras através das membranas interna e externa da bactéria, e o aparato de translocação, que transloca os efetores através da membrana plasmática da célula hospedeira (HAUSER, 2009; ANANTHARAJAH *et al.*, 2016).

A expressão de genes do SST3 é controlada pelo gene regulador transcricional central *exsA*, que é ativado em determinadas condições ambientais, como o contato de *P. aeruginosa* com a célula hospedeira e a baixa concentração extracelular de cálcio (MARSDEN *et al.*, 2016; KROKEN *et al.*, 2018).

O aparato de secreção é composto por: i) uma agulha formada por uma proteína polimerizada (Pscf) acoplada ao corpo basal, que compreende uma ATPase citoplasmática (PscN), ii) um anel citoplasmático na membrana interna formado pela lipoproteína PscJ e iii) um anel oligomerizado na membrana externa (PscC).

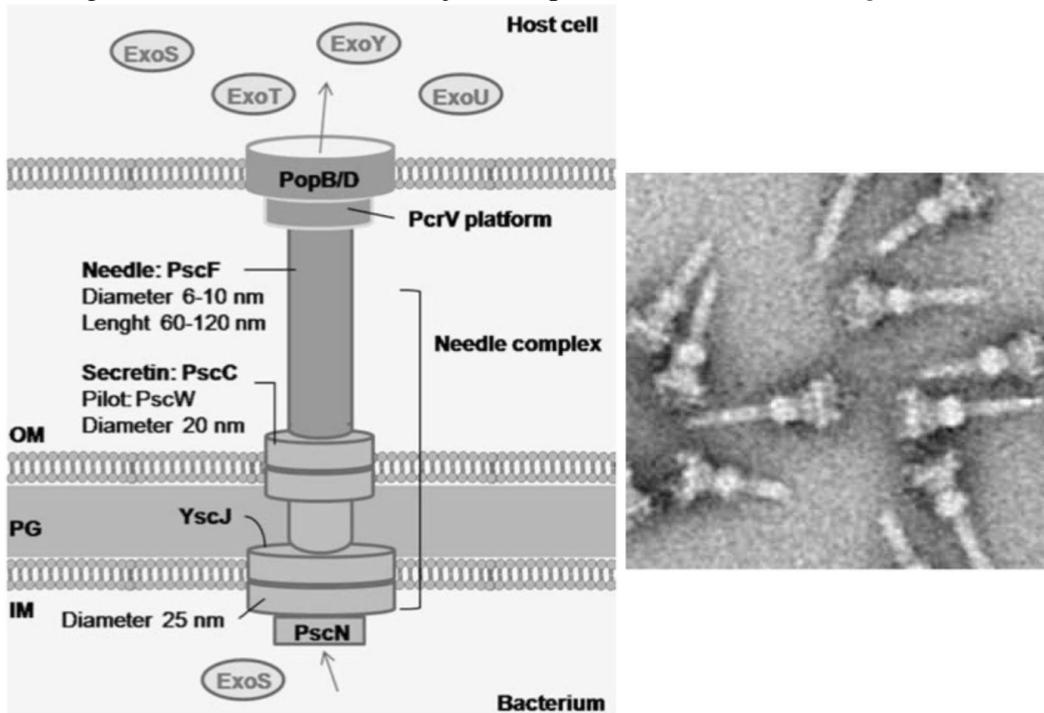
O aparato de translocação é composto por 2 proteínas hidrofóbicas, PopB e PopD, e uma proteína hidrofílica, PcrV. PopB e PopD interagem com a membrana da célula hospedeira para a formação do poro de translocação, enquanto PcrV assegura a inserção correta de PopB e PopD na membrana celular (Figura 9) (GOURE *et al.*, 2004; ANANTHARAJAH *et al.*, 2016).

Após a ligação do injectisoma à célula hospedeira, *P. aeruginosa* é capaz de sintetizar e secretar quatro exotoxinas, que são entregues direto no citoplasma da célula eucariótica: ExoS, ExoT, ExoU e/ou ExoY (HORNA & RUIZ, 2021). É importante ressaltar que, até o momento de serem translocadas para a célula hospedeira, ExoS e ExoU permanecem ligadas a chaperonas (GALLE *et al.*, 2012). Uma vez injetados na célula eucariótica, esses fatores de virulência podem matar as células infectadas ou interferir em vias de sinalização celular que culminam em diversos fenômenos, incluindo a inflamação e a resposta antiviral, subvertendo a resposta aos microrganismos (DENG *et al.*, 2017; FOULKES *et al.*, 2019).

As proteínas ExoU e ExoS estão relacionadas a uma maior virulência em cepas de *P. aeruginosa*, porém, a expressão dessas proteínas pelos isolados clínicos varia de acordo com sítio de infecção e o histórico do paciente. Diversos estudos sugerem que isolados com genótipo *exoS+/exoU-* estão relacionados a infecções crônicas, enquanto aqueles com

genótipo *exoS*⁻/*exoU*⁺ são altamente citotóxicos e estão relacionados a processos infecciosos agudos (DIAZ & HAUSER, 2010; JUAN *et al.*, 2017).

Figura 9 – O sistema de secreção do tipo III (SST3) de *P. aeruginosa*.



Legenda: Esquema representando a estrutura do SST3 e suas proteínas efetoras, à esquerda, e uma micrografia eletrônica dos injectissomas purificados, à direita.

Fonte: GALLE *et al.*, 2012; GALÁN & COLLMER, 1999.

ExoU

ExoU é a exotoxina mais citotóxica secretada pelo SST3 e menos frequentemente encontrada em isolados de *P. aeruginosa*, estando presente em aproximadamente 20 a 40% das amostras. É codificada, junto com sua chaperona SpcU, pela ilha de patogenicidade PAPI-2, que está associada à infecção aguda. Sua atividade tipo fosfolipase A₂ (PLA₂) hidrolisa os fosfolípidos da membrana da célula hospedeira, causando morte celular.

Esta toxina tem papel importante em infecções nosocomiais agudas, como na pneumonia, uma vez que sua virulência está associada à invasão da corrente sanguínea (bacteremia). Por ser extremamente citotóxica, a produção de ExoU por isolados clínicos é indicativa de mau prognóstico, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade de indivíduos hospitalizados que sofrem de PAH ou PAV (EL-SOLH *et al.*, 2012; RECIO *et al.*, 2021).

A atividade fosfolipásica de ExoU na membrana da célula hospedeira leva à rápida lise celular e à liberação de ácido araquidônico, que, por sua vez, pode ser metabolizado de duas maneiras: pelas vias das cicloxigenases ou das lipoxigenases (SALIBA *et al.*, 2005). As cicloxigenases convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas, enquanto as lipoxigenases oxidam o ácido araquidônico para produção de lipoxinas e leucotrienos.

A ação de ExoU também leva à acetilação de lisofosfolipídeos, acarretando na síntese do fator de ativação plaquetária (PAF), que, ao se ligar ao seu receptor, PAFR, ativa o fator transcricional NF- κ B. O resultado destes eventos é o estímulo de uma potente resposta pró-inflamatória, caracterizada pela secreção de CXCL-8 e pelo influxo de neutrófilos (SALIBA *et al.*, 2005; DE LIMA *et al.*, 2012; MALLET DE LIMA *et al.*, 2014).

Estudos *in vivo* feitos pelo nosso grupo mostraram, ainda, que esta exotoxina aumentou a peroxidação lipídica nos pulmões dos camundongos infectados com a cepa produtora de ExoU PA103, que foi acompanhada de um desequilíbrio nas espécies reativas de oxigênio (ROS) (DA CUNHA *et al.*, 2015). Apesar de ExoU ser extremamente tóxica para as células do trato respiratório e causar desequilíbrio em ROS, as células remanescentes não infectadas ainda são capazes de ativar reguladores transcricionais e modular a resposta do hospedeiro (DE LIMA *et al.*, 2012; MALLET DE LIMA *et al.*, 2014; DA CUNHA *et al.*, 2015).

Mais recentemente, foi visto que a atividade citotóxica de ExoU promove dano celular epitelial, associado à geração de ROS e à ativação da caspase-1, corroborando os resultados encontrados pelo nosso grupo de pesquisa. A caspase-1 é uma protease associada aos inflamassomas que induz a maturação de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-18. Neste contexto, ExoU foi capaz de induzir o estresse oxidativo mitocondrial, ativar a caspase-1 e a produção de IL-1 β (HARDY *et al.*, 2022).

A capacidade de quebrar as barreiras celulares à disseminação bacteriana, como epitélio e endotélio, ajuda a explicar porque ExoU é um preditor de infecções invasivas e tem sido associada à pneumonia grave seguida de bacteremia e sepse.

1.3.3. ExoS

ExoS é encontrada em aproximadamente 58 a 72% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* e está associada a infecções crônicas e à piora no estado de saúde do indivíduo infectado (JAVANMARDI *et al.*, 2019). É uma toxina bifuncional, com uma porção amino-

terminal com atividade RhoGTPase (GAP) e uma porção carboxi-terminal com atividade ADP-ribosiltransferase (ADPRT). Em conjunto, estas atividades promovem a desorganização do citoesqueleto do hospedeiro e a subsequente morte celular.

Em infecções crônicas, como na DPOC e principalmente na FC, a presença de ExoS é um indicativo de mau prognóstico. Estudos que avaliaram a prevalência do gene *exoS* nos isolados de pacientes com FC mostraram resultados que variaram de 21% a 84% de cepas *exoS+* (WAREHAM & CURTIS, 2007; MITOV *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2013; FARAJI *et al.*, 2016). Ainda nestes indivíduos imunocomprometidos, ExoS induz a morte de células do sistema imune, favorecendo o processo infeccioso por *P. aeruginosa* (JIA *et al.*, 2006).

Apesar da homologia com ExoT, o domínio ADPRT de ExoS é capaz de ribosilar uma variedade maior de proteínas, tendo como alvo diversos fatores eucarióticos e vias celulares hospedeira, culminando na interrupção do citoesqueleto de actina e na inibição da síntese de DNA e do tráfego vesicular (SUN & BARBIERI, 2003; HAUSER, 2009).

Estudos feitos em modelo murino de pneumonia mostraram que, diferente de estudos *in vitro*, a atividade antifagocítica de ExoS é atribuída ao seu domínio ADPRT. A hipótese é que ExoS ribosile Ras, uma GTPase envolvida no rearranjo do citoesqueleto de actina (RANGEL *et al.*, 2014). Esta modificação, por sua vez, resulta na inibição de Ras, deixando-a em seu estado inativo e impedindo a sinalização para a polimerização da actina. Além de Ras, ExoS também tem como alvo as proteínas ezrina, radixina e moesina (ERM), interrompendo as interações de adesão com o citoesqueleto de actina da célula hospedeira e bloqueando a fagocitose (MARESSO *et al.*, 2007; RANGEL *et al.*, 2014).

No início do processo infeccioso, ExoS é inoculada, principalmente, nos neutrófilos, onde a atividade ADPRT é o principal fator contribuinte para a prevenção da fagocitose (RANGEL *et al.*, 2014; RANGEL *et al.*, 2015). Além de ativar as vias dependentes de TLR2 e TLR4 (EPELMAN *et al.*, 2004), ExoS também causa ruptura da barreira vascular pulmonar e inativa várias proteínas envolvidas na motilidade, fagocitose, adesão e manutenção da forma celular (HAUSER, 2009; RANGEL *et al.*, 2015). Dados não publicados do nosso grupo mostram, ainda, que ExoS inibe a expressão de genes que são associados à via de IFN do tipo 1, incluindo IFNB-1, e genes associados à multiplicação viral.

ExoT

ExoT é a exotoxina de *P. aeruginosa* mais frequentemente produzida por isolados clínicos (92 a 100%) (JAVANMARDI *et al.*, 2019). Assim como ExoS, ExoT também é uma

toxina bifuncional, com uma porção amino-terminal com atividade GAP e uma porção carboxi-terminal com atividade ADPRT. De fato, ExoS e ExoT compartilham 76% de similaridade nas sequências de aminoácidos. A atividade GAP e a atividade ADPRT atuam sinergicamente, impedindo a fagocitose e rompendo barreiras epiteliais (HAUSER, 2009).

O domínio com atividade GAP de ExoT é similar ao de ExoS, uma vez que inativa três GTPases (Rac, Rho e Cdc42) cruciais para a organização do citoesqueleto de actina. Esta atividade pode causar uma ruptura reversível no citoesqueleto hospedeiro, levando ao arredondamento celular, à inibição da migração celular e à inibição da fagocitose. Logo, a inativação das GTPases das células hospedeiras, causada por ExoT, contribui para impedir a internalização de *P. aeruginosa* (SUN & BARBIERI, 2003)

O domínio com atividade ADPRT necessita se ligar à proteína 14-3-3 da célula hospedeira para sua ativação e, a partir desta ligação, ExoT consegue modificar as proteínas quinases reguladoras CrkI e CrkII. A distinção entre as exotoxinas ExoT e ExoS se dá no espectro de ribosilação de proteínas, já que ExoT tem atividade apenas contra um número limitado de proteínas do hospedeiro (SUN & BARBIERI, 2003).

Corroborando os dados de danos às células epiteliais, foi observado, em células HeLa, que ExoT é um fator de virulência suficiente e necessário para induzir apoptose (SHAFIKHANI, 2008). Recentemente, a análise de feridas infectadas por *P. aeruginosa* mostrou que o contato do injectissoma do SST3 com as células hospedeiras desencadeia uma cascata de fosforilação envolvendo CrkII/Abl-PKC δ -NLRC4, culminando na ativação do inflamassoma e de respostas inflamatórias. Estes eventos limitam a infecção por esta bactéria, por mobilizarem neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção. Porém, neste mesmo estudo, foi visto que *P. aeruginosa* consegue driblar o sistema imune através de ExoT, que, neste caso, funciona como um agente anti-inflamatório, diminuindo a cascata de fosforilação e, conseqüentemente, inibindo a ativação do inflamassoma pela interferência na interação entre CrkII e Abl (MOHAMED *et al.*, 2022).

ExoY

ExoY foi identificada pela primeira vez em 1998, por Yahr e colaboradores. A descoberta foi feita através da caracterização do transposon de cepas mutantes de *P. aeruginosa* defeituosas em expressar o aparato do SST3. Durante o experimento, foi observado que diversas proteínas estavam ausentes no sobrenadante, incluindo uma proteína

de aproximadamente 42 kDa (YAHR *et al.*, 1998). Análises posteriores de bioinformática e de sequenciamento da proteína revelaram a existência de homologia com proteínas com atividade adenilato ciclase produzidas pelas bactérias *Bordetella pertussis* e *Bacillus anthracis* (CARBONETTI, 2010; MOAYERI *et al.*, 2015). Diferente da adenilato ciclase produzida por essas duas bactérias, ExoY não é estimulada por calmodulina, mas sim pelos filamentos de actina (F-actina) (BELYY *et al.*, 2016).

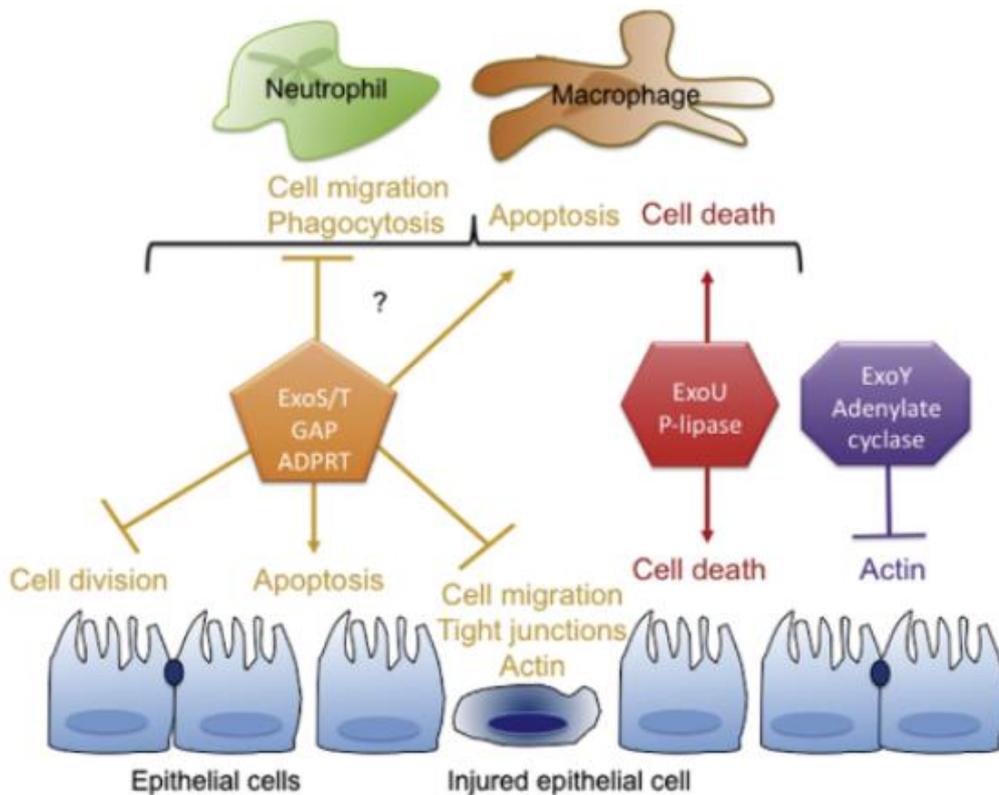
ExoY é uma adenilato ciclase e a segunda exotoxina do SST3 mais prevalente entre os isolados de *P. aeruginosa*, sendo expressa por aproximadamente 89% dos isolados (JAVANMARDI *et al.*, 2019). As toxinas do tipo adenilato ciclase são fatores de virulência que invadem as células eucarióticas quando estimuladas com fatores endógenos, gerando alta quantidade de nucleotídeos, como o monofosfato cíclico de guanosina (GMPC), o monofosfato de adenosina (AMPC), o monofosfato de citidina (CMPc) e o monofosfato de uridina (UMPc) (CARBONETTI, 2010; MOAYERI *et al.*, 2015).

Estudos mostram que, ao se ligar aos filamentos de actina, ExoY passa por vários rearranjos estruturais que aumentam sua atividade catalítica e geram grandes quantidades de nucleotídeos cíclicos. Em culturas de células, essa elevada quantidade de nucleotídeos cíclicos leva à interrupção da sinalização celular, à desorganização do citoesqueleto e à morte celular (SAYNER *et al.*, 2004). Os sinais induzidos por ExoY ativam proteínas quinases e levam à fosforilação da proteína Tau (responsável por estabilizar os microtúbulos) e ao colapso dos microtúbulos. Em células endoteliais, a fosforilação de Tau e a consequente desestabilização do microtúbulo perturbam a barreira celular e aumentam a permeabilidade a macromoléculas (OCHOA *et al.*, 2012). O trabalho publicado em 2014 por Stevens e colaboradores, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, mostrou que a intoxicação da célula por ExoY induz a formação de poros nos endotélios que comprometem a migração e a proliferação celular, causando edema alveolar e atraso na reparação do pulmão lesionado.

Outro fato sobre ExoY é que esta proteína regula negativamente a ativação de TAK1, NF- κ B e MAPKs, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e células epiteliais durante a infecção por *P. aeruginosa* (HE *et al.*, 2017). Também foi demonstrado que a atividade adenilato ciclase de ExoY diminui a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β e a citotoxicidade decorrente da morte celular por piroptose. A piroptose induzida pelo inflamassoma junto com o recrutamento de neutrófilos mediado por IL-1 β são mecanismos importantes de resposta do hospedeiro para promover a eliminação bacteriana (JEON *et al.*, 2017).

Mais recentemente, um estudo feito com pacientes assistidos em UTI e submetidos à ventilação mecânica revelou que a presença de ExoY em isolados clínicos leva à disfunção de órgãos-alvo durante a infecção por *P. aeruginosa*, mostrando a importância desta exotoxina em infecções agudas como a pneumonia nosocomial (WAGENER *et al.*, 2020) (Figura 10).

Figura 10 – Mecanismo de ação das proteínas efetoras secretadas pelo SST3, ExoS, ExoT, ExoU e ExoY.



Fonte: ENGEL & BALACHANDRAN, 2009

A infecção das vias aéreas inferiores por *P. aeruginosa* é uma importante causa de morbidade e mortalidade entre indivíduos hospitalizados e portadores de doenças respiratórias crônicas, em grande parte devido à ação das proteínas efetoras transportadas pelo SST3. Esses indivíduos também estão suscetíveis à infecção simultânea com vírus que atingem as vias aéreas, como vírus sincicial respiratório, influenza, adenovírus, rinovírus e, mais recentemente, SARS-CoV-2.

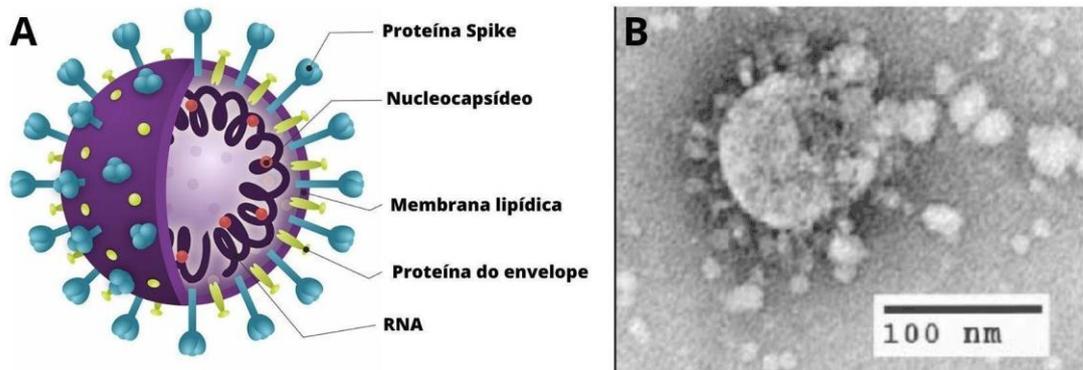
SARS-CoV-2 e a COVID-19 (Coronavirus disease)

Em dezembro de 2019, foi identificado, na cidade de Wuhan, na China, um novo tipo de coronavírus: o coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*). Em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou estado de pandemia frente à nova ameaça viral que surgira. Até novembro de 2023, foram registradas quase 7 milhões de mortes no mundo, sendo 704 mil só no Brasil (disponível em <https://covid19.who.int/table>).

Nas últimas décadas, a população mundial passou por outras duas pandemias causadas por vírus respiratórios pertencentes à família do novo coronavírus, incluindo a Síndrome Respiratória Aguda Severa - SARS (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*) e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio - MERS (do inglês *Middle East Respiratory Syndrome*). A epidemia de SARS teve início em novembro de 2002, sendo o vírus causador identificado em fevereiro de 2003. Com a rápida transmissão do vírus, foram registrados mais de 8.000 casos, com taxa de mortalidade de 11%. Já o MERS foi primeiro identificado na Arábia Saudita em setembro de 2012, tendo 2.494 casos reportados em 27 países e um total de mais de 800 mortes. Com base no sequenciamento genômico, o novo coronavírus SARS-CoV-2 apresenta 79% de homologia com o SARS-CoV em seu genoma e mais de 50% de homologia com MERS-CoV, porém, a transmissibilidade é mais alta (TANG *et al.*, 2021).

O SARS-CoV-2 pertence à ordem Nidovirales, família *Coronaviridae*, que são vírus capazes de infectar mamíferos, incluindo seres humanos. São vírus envelopados de RNA fita simples, com diâmetro de 60 a 140 nm, e que possuem em sua estrutura projeções características acopladas ao envelope, chamadas de proteína spike, dando aparência ao vírus semelhante a uma coroa (Figura 11). Na proteína spike está localizado o domínio de ligação ao receptor (RBD), responsável pela ligação do vírus às células hospedeiras (GOLDSMITH *et al.*, 2004; WIERSINGA *et al.*, 2020).

Figura 11 – SARS-CoV-2.

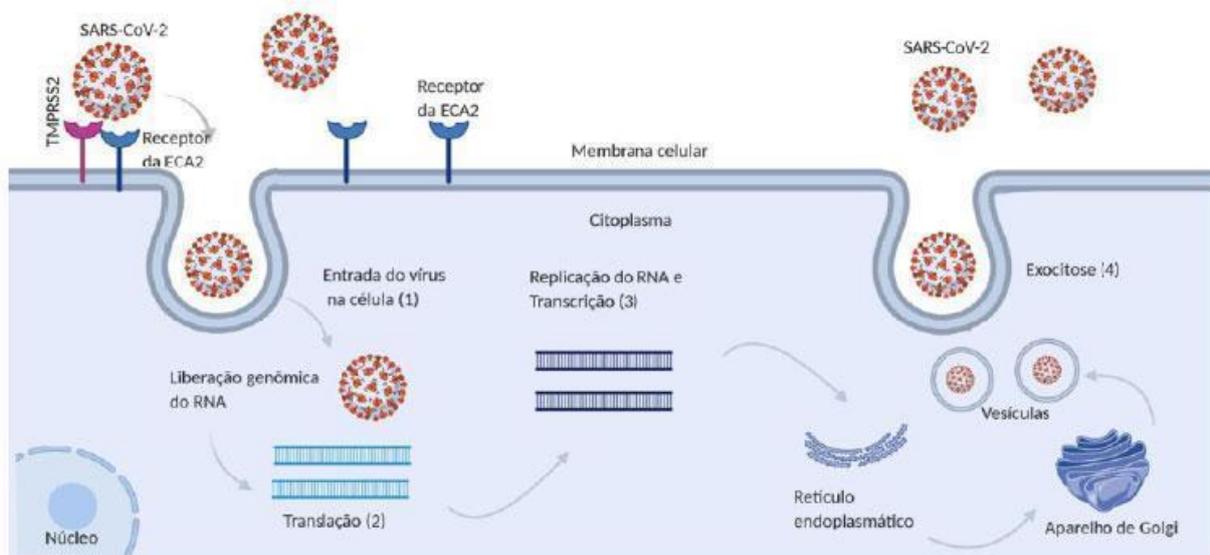


Legenda: A - Esquema das principais estruturas virais do SARS-CoV-2. (B) Microscopia eletrônica do vírus apresentando as projeções características proteínas spike.
 Fonte: Adaptado de ANDRADE SANTOS *et al.*, 2020; CDC, 2023.

A transmissão acontece de pessoa para pessoa, principalmente pelo trato respiratório, quando há contato com gotículas de saliva ou aerossóis de indivíduos infectados, que são expelidos durante espirro, tosse ou fala. Há ainda na literatura relatos de transmissão vertical, via placenta (UMAKANTHAN *et al.*, 2020; WIERSINGA *et al.*, 2020). Após a infecção, os sintomas levam, em média, de 5 a 6 dias para se desenvolverem (período de incubação), embora o vírus possa ser detectado no trato respiratório até 3 dias antes ao início dos sintomas. Porém, indivíduos assintomáticos também podem testar positivo (WHO, 2020).

Tratando-se de um vírus respiratório, a infecção inicial tem como alvo as células epiteliais nasais e brônquicas, assim como os pneumócitos, através da ligação da proteína spike do vírus ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), presente nessas células. A partir da ligação da proteína spike ao receptor ACE2, a célula hospedeira passa a expressar a serino protease transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), que medeia a entrada do coronavírus nas células pela clivagem de ECA2 e ativação da proteína spike do vírus (HOFFMANN *et al.*, 2020; WIERSINGA *et al.*, 2020) (Figura 12).

Figura 12 – Esquema de infecção e replicação do vírus SARS-CoV-2 em humanos.



Legenda: Ligação na parede da célula das vias aéreas através do receptor ECA2, internalização, translação, replicação, transcrição e exocitose do SARS-CoV-2 .

Fonte: CASIMIRO *et al.*, 2022.

O curso da doença em indivíduos infectados pode apresentar diferentes manifestações clínicas, assim como diferentes graus de intensidade e gravidade, que vão de casos assintomáticos ou com sintomas leves de infecção do trato respiratório superior (aproximadamente 80%) a complicações como pneumonia grave (15%), insuficiência respiratória (5%) e óbito (JOLY *et al.*, 2020; PARASHER, 2021).

A infecção e a replicação do vírus comprometem a integridade das barreiras formadas pelas células epiteliais e endoteliais no ambiente pulmonar, levando a uma resposta inflamatória acentuada e desencadeando um influxo de neutrófilos e monócitos (JOLY *et al.*, 2020; WIERSINGA *et al.*, 2020). A quebra da integridade das barreiras, juntamente com o influxo alveolar, acarreta a produção de altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL6, TNF). Este descontrole no exacerbamento da resposta inflamatória em pacientes graves com COVID-19 é descrito como tempestade de citocinas. O aumento dos níveis séricos de citocinas inflamatórias e quimiocinas dão início à síndrome inflamatória respiratória sistêmica (SIRS), que, além de levar à lesão pulmonar local e ao agravamento da doença, pode causar morte. (HANAN *et al.*, 2021; JOLY *et al.*, 2020). Além da tempestade de citocinas, pacientes mais graves apresentam uma deficiência na resposta antiviral mediada por interferon (IFN) do tipo 1, caracterizada pela ausência de IFN- β e pela baixa produção e atividade de IFN- α . Essa deficiência na resposta de IFN do tipo 1 é associada a uma carga

viral sanguínea persistente e ao exacerbamento da resposta inflamatória (HADJADJ *et al.*, 2020).

Os casos mais graves e que necessitam de internação deixam os pacientes mais suscetíveis a infecções nosocomiais por patógenos oportunistas, principalmente entre aqueles que necessitam de tratamento intensivo e respiração mecânica. O ambiente torna-se, assim, favorável à infecção por *P. aeruginosa*. O sucesso do patógeno em sua infecção e colonização está intimamente ligado à expressão de um arsenal de fatores de virulência, que podem desencadear um extenso processo inflamatório, matar as células hospedeiras e/ou inibir a sinalização celular dependente de IFN do tipo 1.

Tendo em vista a relevância de *P. aeruginosa* no contexto das infecções e coinfeções respiratórias, e a capacidade dos fatores de virulência do SST3 de interferir na patogênese da doença, o presente estudo se propôs a investigar a prevalência de genes do SST3 e a citotoxicidade de isolados clínicos oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2. Como a pandemia de COVID-19 é um evento recente, acreditamos que este estudo possa ajudar a entender o comportamento de *P. aeruginosa* durante a coinfeção com SARS-CoV-2.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Em isolados clínicos de *P. aeruginosa* originários de pacientes assistidos em UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2, verificar a presença de genes que codificam fatores de virulência e determinar o potencial citotóxico em culturas de células epiteliais respiratórias.

1.2. Objetivos específicos

- a) Pesquisar a prevalência de genes que codificam os fatores de virulência secretados pelo SST3, ExoS, ExoT, ExoU e ExoY, em isolados clínicos;
- b) Avaliar o potencial citotóxico de isolados clínicos, pela pesquisa da viabilidade de células epiteliais respiratórias infectadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cepas de *P. aeruginosa*

Para realização deste trabalho, foram utilizados 84 isolados clínicos coletados entre 2020 e 2022, oriundos de secreções respiratórias ou de sangue de pacientes internados em UTI no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). Desses 84 isolados clínicos, 42 são provenientes de pacientes coinfectados com *P. aeruginosa* e SARS-CoV-2, enquanto os outros 42 isolados são oriundos de pacientes infectados somente com *P. aeruginosa*. Como controle da presença de genes de virulência, foram utilizadas 3 cepas laboratoriais de *P. aeruginosa*: PA103 (utilizada como controle positivo para o alvo *exoU*), PAK (controle positivo para *exoS*), e sua mutante isogênica, deletada no gene *exoS*, PAK Δ *exoS*. As cepas foram estocadas em meio Luria Broth Base (LB, Invitrogen), acrescido de 20% de glicerol, a -80°C.

Para a realização dos experimentos, as bactérias do estoque foram semeadas por esgotamento em placas de Petri contendo meio LB-ágar (Life Technologies) e incubadas por 14 a 18 horas, de 35 a 37°C, em aerobiose, para obtenção de colônias isoladas. Uma colônia do crescimento foi, então, semeada em 3 mL de meio LB caldo e incubada sob agitação de 150 rpm, por aproximadamente 18 horas e a 37°C. Após a incubação, as culturas bacterianas foram centrifugadas por 10 minutos, 4°C, 1260 x g, para sedimentação bacteriana, seguido de descarte do sobrenadante. O sedimento bacteriano foi ressuspendido em tampão fosfato salino (PBS) ou meio de cultura (LB caldo ou meio F12) e empregado na preparação das suspensões bacterianas utilizadas nos experimentos de extração de DNA genômico ou infecção de células respiratórias, respectivamente.

2.2. Células epiteliais respiratórias

Células epiteliais alveolares de carcinoma humano da linhagem A549 (ATCC CCL-185) foram cultivadas em garrafas para cultura de células de 75 cm² contendo meio F12 (Sigma-Aldrich) acrescido de 10% de soro fetal bovino, glutamina (250 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL) e fungizona (anfotericina B; 2,5 µg/mL). As culturas celulares foram mantidas a 37°C e em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Aproximadamente 48 horas antes da infecção bacteriana, as células foram lavadas com PBS, pH 7,4, e dissociadas da garrafa de cultura com uma solução de tripsina a 0,1% e ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 0,01%, em tampão fosfato salino Dulbecco sem cálcio ou magnésio, com 1% de vermelho de fenol (solução de tripsina-EDTA). As suspensões celulares obtidas foram padronizadas pela adição de azul de trypan a 0,4% (vol/vol) seguida da contagem das células viáveis em câmara de Neubauer.

Para realização dos experimentos, as suspensões celulares foram distribuídas em placa de microtitulação para culturas de células de 96 poços, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL (200 μ L/poço), e incubadas a 37°C, com 5% de CO₂.

2.3. Extração de DNA genômico e PCR para detecção dos genes que codificam os fatores de virulência ExoS, ExoT, ExoU e ExoY

Para pesquisa de genes de virulência específicos no genoma de *P. aeruginosa*, uma colônia de cada isolado clínico foi cultivada em 9 mL de LB caldo por 18 horas, a 37°C, sob agitação de 150 rpm. Após incubação, a cultura bacteriana obtida foi centrifugada a 1260 x g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1000 μ L de PBS, seguido da preparação das suspensões bacterianas contendo $2,0 \times 10^9$ células em PBS. As concentrações das suspensões bacterianas foram padronizadas por espectrofotometria, a fim de se obter suspensões com absorvância igual a 2,0 em comprimento de onda de 590nm ($A_{590nm} = 2,0$), que corresponde a $2,0 \times 10^9$ Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL). As suspensões bacterianas foram, então, centrifugadas por 10 minutos, a 5000 x g, tendo o seu sobrenadante descartado. Após, o sedimento formado, foi submetido à extração de DNA genômico utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), conforme recomendações do fabricante.

A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE). A concentração e a pureza das amostras foram determinadas através da leitura da absorvância nos comprimentos de onda 260 nm, 230 nm e 280 nm, utilizando o espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare). O DNA recuperado foi acondicionado a -20°C até a realização das PCR.

Após quantificação e avaliação da pureza das amostras, 50 ng de DNA genômico foram amplificados por PCR, utilizando 1,25 unidades da enzima GoTaq DNA polimerase (Promega), dNTP (10 μ M), oligonucleotídeos iniciadores (10 μ M) para os genes alvo, tampão

para a enzima e água. As condições de ciclagem foram as seguintes para os genes *exoU*, *exoY*, e *exoT*: desnaturação a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para o gene *exoS*, a única modificação feita na ciclagem foi em relação à temperatura de anelamento, que foi de 52°C. Os amplicons foram avaliados através de eletroforese, e revelação em gel de agarose a 1% em TBE, na presença de marcador de peso molecular (Tabela 2).

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho

Gene alvo	Oligonucleotídeos Iniciadores	Referência
<i>exoS</i>	Senso: 5' - TGTTGCGCCAAGCGGTAGAG Antissenso 5' - CGCGCATGTCGGTCTCTTTG -3'	Este estudo
<i>exoU</i>	Senso: 5' - ATATCTCCGGTTCCTTCCCAGGAGT-3' Antissenso: 5' - CGAAGGTATGACGCTCTGAAGCC - 3'	Este estudo
<i>exoY</i>	Senso: 5' - CCGGTTGAAAGAATCGTCACCAC -3 Antissenso 5' - TGTGGTGAAACATCTCCCTGTGCT -3'	Este estudo
<i>exoT</i>	Senso: 5' - AGAGGCTGGCGAAGGATCACAC-3' Antissenso 5' - GCCGAACAGGGTGGTTATCGTG -3	Este estudo

Fonte: A Autora, 2023.

2.4. Infecção de células epiteliais respiratórias humanas por isolados clínicos de *P. aeruginosa*

Suspensões padronizadas de *P. aeruginosa* foram obtidas pela ressuspensão do sedimento bacteriano, descrito anteriormente, em meio de cultura F12 contendo 10% de SFB e glutamina (250µg/mL), sem antibióticos. As concentrações das suspensões bacterianas foram padronizadas por espectrofotometria, de modo a se obter suspensões com absorvância igual a 0,3 em comprimento de onda de 590nm ($A_{590nm} = 0,3$), que corresponde a $3,0 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL).

As culturas de células epiteliais semeadas em placas de microtitulação de 96 poços foram primeiramente lavadas uma vez com 200µL de meio de cultura F12 puro, para remoção de células não aderidas, e infectadas, em quadruplicata, com os isolados clínicos de *P. aeruginosa* (multiplicidade de infecção igual a 10), ou tratadas com meio de cultura (controle), e centrifugadas (1260 x g, por 10 minutos, a 15°C), para favorecer o contato entre

as bactérias e as células hospedeiras. Após 1 hora, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, as culturas foram lavadas 3 vezes com PBS, para remoção de bactérias que não aderiram, e tratadas com gentamicina a 300 µg/mL em meio F12 contendo 10% de SFB, glutamina e fungizona, para eliminação dos microrganismos extracelulares. Após incubação com gentamicina, por 1 e 23 horas, uma alíquota de 10µL de cada poço da microplaca com os isolados clínicos foi semeada em LB-ágar para avaliar o efeito do tratamento com gentamicina na viabilidade das cepas bacterianas. Os isolados clínicos que se mostraram resistentes à gentamicina a 300 µg/mL foram retirados dos experimentos de citotoxicidade.

2.5. Avaliação da citotoxicidade dos isolados clínicos para células epiteliais respiratórias

Células epiteliais da linhagem A549 foram infectadas com os diferentes isolados clínicos ou tratadas com meio de cultura (controle) por 1 hora e, então, tratadas com gentamicina a 300 µg/mL por mais 1 ou 23 horas, como descrito no item anterior.

A viabilidade das células infectadas e não infectadas foi determinada pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT). Para isso, o sobrenadante das culturas celulares foi descartado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS para remoção de células não aderidas. As células foram tratadas com uma solução estéril de MTT a 1mg/ml em meio de cultura F12, acrescido de 10% de SFB, glutamina e antibióticos, por 1 hora, a 37°C e em atmosfera com 5% de CO₂. Seguiu-se o descarte dos sobrenadantes e a adição de 250 µL de álcool isopropílico aos poços da microplaca, seguido de 20 homogeneizações com pipeta multicanal, para solubilização dos cristais de formazana. Para leitura dos valores, foi utilizada uma nova microplaca de 96 poços, na qual cada poço da placa anterior gerou uma duplicata de 95 µl. Todos os valores de absorbância gerados pela solubilização da formazana foram determinados por espectrofotometria, utilizando comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular foi calculada através da seguinte fórmula: (médias das absorbâncias dos poços de células infectadas/ médias das absorbâncias dos poços de células da cultura controle) x 100, utilizando 3 experimentos independentes. A análise estatística comparando os 2 grupos: 1- células A549 infectadas com diferentes isolados clínicos por 1 hora (sem tratamento), e 2- células A549 infectadas com diferentes isolados clínicos por 1 hora, tratadas com gentamicina por 23 horas, totalizando 24 horas, foi realizada de acordo com o método “two-way ANOVA”. A significância estatística foi aceita quando $P < 0,05$.

2.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão obtido pela realização de pelo menos três experimentos independentes. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do software Graphpad Prism, e a significância estatística foi aceita quando $P < 0,05$, de acordo com o método “two-way ANOVA” para análise multivariada entre os grupos.

3. RESULTADOS

3.1. População e amostra

Os critérios de elegibilidade para os isolados clínicos no estudo em questão foram: 1) O espécime clínico ser de algum indivíduo internado em UTI. 2) A amostra ser de origem respiratória ou de sangue. 3) Infecção confirmada por *P. aeruginosa* com (Quadro 1) ou sem (Quadro 2) coinfeccção confirmada por SARS-CoV-2.

Quadro 1 - Características das amostras de *P. aeruginosa* oriundas de pacientes internados em UTI e coinfectados com SARS-CoV-2.

Isolados de <i>P. aeruginosa</i> oriundos de UTI coinfectados com SARS-CoV-2							
PA	Amostra	Sexo	Idade (Anos)	PA	Amostra	Sexo	Idade (Anos)
CL 7	Asp. Traqueal	F	67	CL 10	Asp. Transtraq.	M	31
CL 1	Asp. Traqueal	F	82	CL 11	Asp. Transtraq.	F	50
CL 2	Asp. Traqueal	M	47	CL 19	Asp. Transtraq.	F	68
CL 3	Asp. Traqueal	F	41	CL 33	Asp. Transtraq.	M	68
CL 23	Asp. Traqueal	M	41	CL 12	Sec. traqueal	F	51
CL 21	Asp. Traqueal	F	79	CL 13	Sec. traqueal	M	47
CL 4	Asp. Traqueal	M	78	CL 34	Sec. traqueal	F	62
CL 22	Asp. traqueal	M	67	CL 14	Sec. traqueal	F	16
CL 24	Asp. traqueal	M	57	CL 35	Sec. traqueal	F	43
CL 5	Asp. traqueal	M	32	CL 36	Sec. traqueal	M	55
CL 25	Asp. traqueal	F	84	CL 37	Sec. traqueal	M	35
CL 26	Asp. traqueal	M	50	CL 38	Sec. traqueal	F	51
CL 6	Asp. traqueal	M	80	CL 39	Sec. traqueal	M	34
CL 8	Asp. traqueal	M	21	CL 15	Sec. traqueal	M	59
CL 9	Asp. traqueal	M	68	CL 41	LBA	M	63
CL 27	Asp. traqueal	M	71	CL 42	Sangue	M	44
CL 28	Asp. Transtraq.	M	44	CL 16	Sangue	M	50
CL 29	Asp. Transtraq.	F	32	CL 17	Asp. traqueal	F	42
CL 30	Asp. Transtraq.	M	74	CL 18	Asp. traqueal	M	27
CL 31	Asp. Transtraq.	F	63	CL 20	Sec. traqueal	M	65
CL 32	Asp. Transtraq.	M	51				

Legenda: PA= *P. aeruginosa*; Asp. traqueal= aspirado traqueal; Asp. transtraqueal= aspirado transtraqueal; Sec. traqueal= secreção traqueal; Sec. brônquica= secreção brônquica; LBA= líquido broncoalveolar; F= feminino; M= masculino; CL= clínica

Fonte: A Autora, 2023.

Quadro 3 – Características das amostras de *P. aeruginosa* oriundas de pacientes internados em UTI e não infectados com SARS-CoV-2

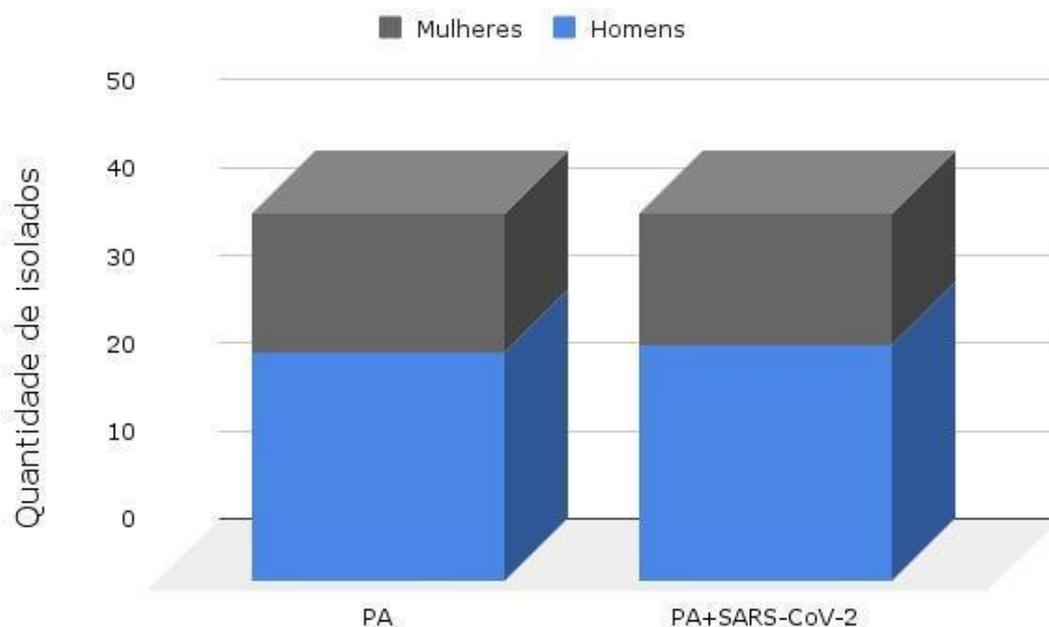
Isolados de <i>P. aeruginosa</i> oriundos de UTI							
PA	Amostra	Sexo	Idade (anos)	PA	Amostra	Sexo	Idade (anos)
CL 1	Asp. Traqueal	F	67	CL 22	Sec. Traqueal	H	31
CL 2	Asp. Traqueal	F	82	CL 23	Sec. Traqueal	M	50
CL 3	Sec. Traqueal	F	47	CL 24	Asp. Traqueal	M	68
CL 4	Asp. Transtraq.	M	41	CL 25	Sec. Traqueal	H	68
CL 5	Asp. Traqueal	M	41	CL 26	Sangue	H	51
CL 6	Asp. Traqueal	M	79	CL 27	Asp. Traqueal	H	47
CL 7	Asp. Traqueal	M	78	CL 28	Asp. Traqueal	H	62
CL 8	Asp. Traqueal	H	67	CL 29	Asp. Traqueal	M	16
CL 9	Asp. Traqueal	M	57	CL 30	Sec. Traqueal	H	43
CL 10	Asp. Traqueal	H	32	CL 31	Sec. Traqueal	H	55
CL 11	Asp. Traqueal	H	84	CL 32	Sangue	M	35
CL 12	Sec. Brônquica	H	50	CL 33	Asp. Traqueal	H	51
CL 13	Sec. Traqueal	M	80	CL 34	Sangue	M	34
CL 14	Sec. Traqueal	M	21	CL 35	Sec. Traqueal	H	59
CL 15	Sec. traqueal	M	68	CL 36	Sec. Traqueal	M	63
CL 16	Sec. traqueal	H	71	CL 37	Asp. Traqueal	H	44
CL 17	Sec. traqueal	M	44	CL 38	Asp. Traqueal	M	50
CL 18	Sec. traqueal	H	32	CL 39	Asp. Traqueal	H	42
CL 19	Sangue	H	74	CL 40	Sec. Traqueal	H	27
CL 20	Sec. traqueal	M	63	CL 41	Líq. pleural	M	65
CL 21	Sec. traqueal	M	51	CL 42	LBA	M	

Legenda: PA= *P. aeruginosa*; Asp. traqueal= aspirado traqueal; Asp. transtraqueal= aspirado transtraqueal; Sec. traqueal= secreção traqueal; Sec. brônquica= secreção brônquica; LBA= líquido broncoalveolar; F= feminino; M= masculino; CL= clínica

Fonte: A Autora, 2023.

Ao todo, dos 42 espécimes clínicos de pacientes simultaneamente infectados com *P. aeruginosa* e SARS-CoV-2, 27 foram isolados de homens, enquanto que 15 foram isolados de mulheres. Já entre as cepas clínicas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes sem infecção concomitante por SARS-CoV-2, 26 foram isoladas de homens e 16 de mulheres, também totalizando 42 espécimes no total, como mostra a figura 13.

Figura 13 - Isolados clínicos de *P. aeruginosa*, oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2, distribuídos de acordo com o sexo



Legenda: PA= *P. aeruginosa*

Fonte: A Autora, 2023.

Em relação ao tipo de amostra, as cepas clínicas foram isoladas de secreções respiratórias ou de sangue (tabela 2).

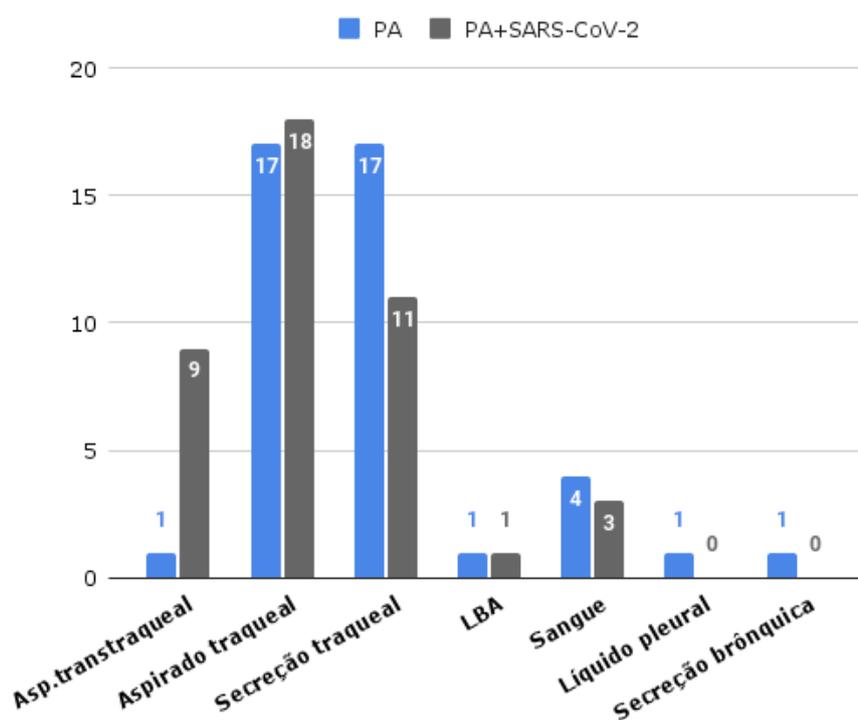
Tabela 3- Origem dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2

	Asp. transtraqueal n (%)	Aspirado traqueal n (%)	Secreção traqueal n (%)	LBA n (%)	Sangue n (%)	Líquido pleural n (%)	Secreção brônquica n (%)	Total
Isolados de PA - SARS-CoV-2 +	9 (21,4)	18 (42,9)	11 (26,2)	1 (2,4)	3 (7,1)	0	0	42
Isolados de PA- SARS-CoV-2 -	1 (2,4)	17 (4,5)	17 (4,5)	1 (2,4)	4 (9,5)	1 (2,4)	1 (2,4)	42

Legenda: PA= *P. aeruginosa*; Asp. transtraqueal= aspirado transtraqueal; LBA= líquido broncoalveolar;
Fonte: A Autora, 2023.

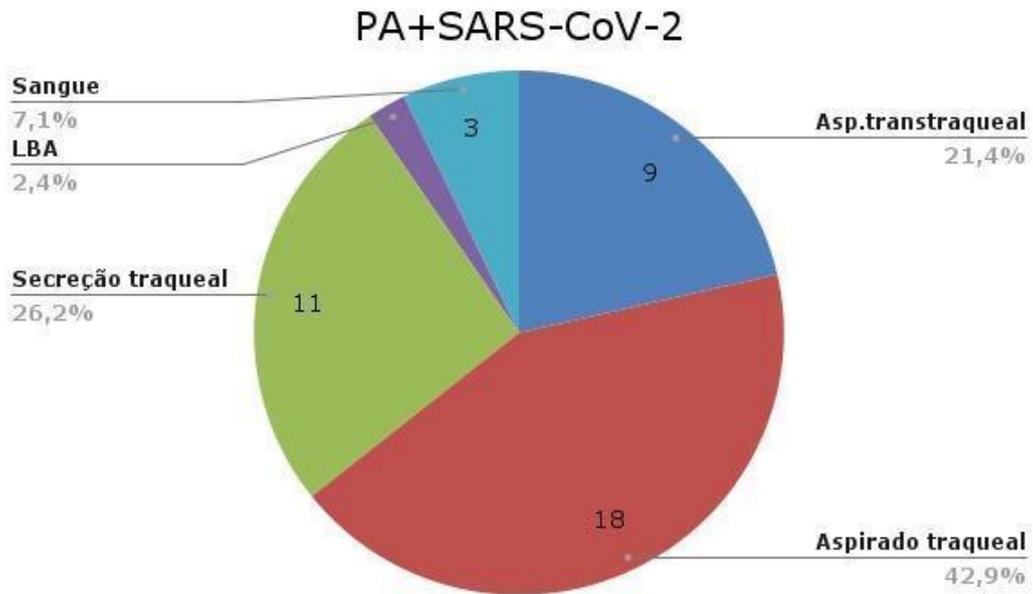
Os isolados de pacientes infectados somente com *P. aeruginosa* foram mais diversificados em relação ao tipo de secreção respiratória coletada, e também foram mais numerosos em relação às amostras de sangue (figuras 14, 15 e 16).

Figura 14 – Isolados clínicos de *P. aeruginosa*, oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2, em relação ao tipo de amostra.



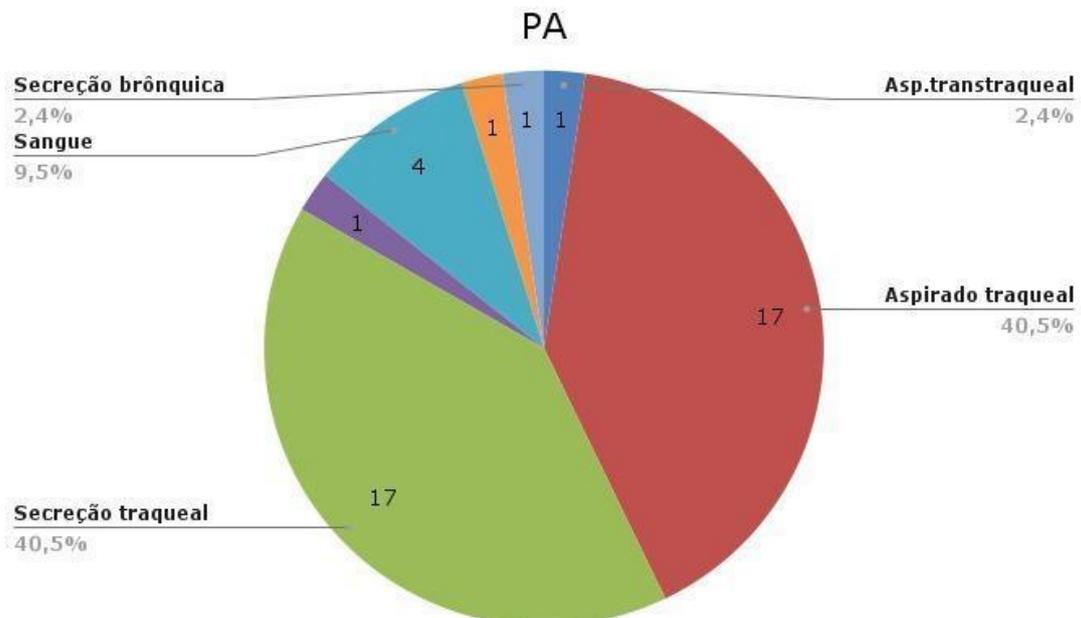
Legenda: Asp. transtraqueal= aspirado transtraqueal; LBA= líquido broncoalveolar; PA= *P. aeruginosa*.
Fonte: A Autora, 2023.

Figura 15 – Isolados clínicos de *P. aeruginosa*, obtidos de pacientes em UTI, coinfetados com SARS-CoV-2, em relação ao tipo de amostra.



Legenda: Asp. transtraqueal= aspirado transtraqueal; LBA= líquido broncoalveolar.
Fonte: A Autora, 2023.

Figura 16 – Isolados clínicos de *P. aeruginosa*, obtidos de pacientes em UTI e não infectados com SARS-CoV-2, em relação ao tipo de amostra.



Legenda: Asp. transtraqueal= aspirado transtraqueal.
Fonte: A Autora, 2023.

3.2. Prevalência de genes que codificam os fatores de virulência ExoS, ExoT, ExoU, ExoY

Após a extração e a avaliação da pureza do DNA, os isolados clínicos foram analisados quanto à prevalência de genes que codificam fatores de virulência do SST3. As PCR para confirmação da presença dos genes alvos foram feitas em duplicata ou triplicata, dependendo de resultado divergente dos 2 primeiros experimentos.

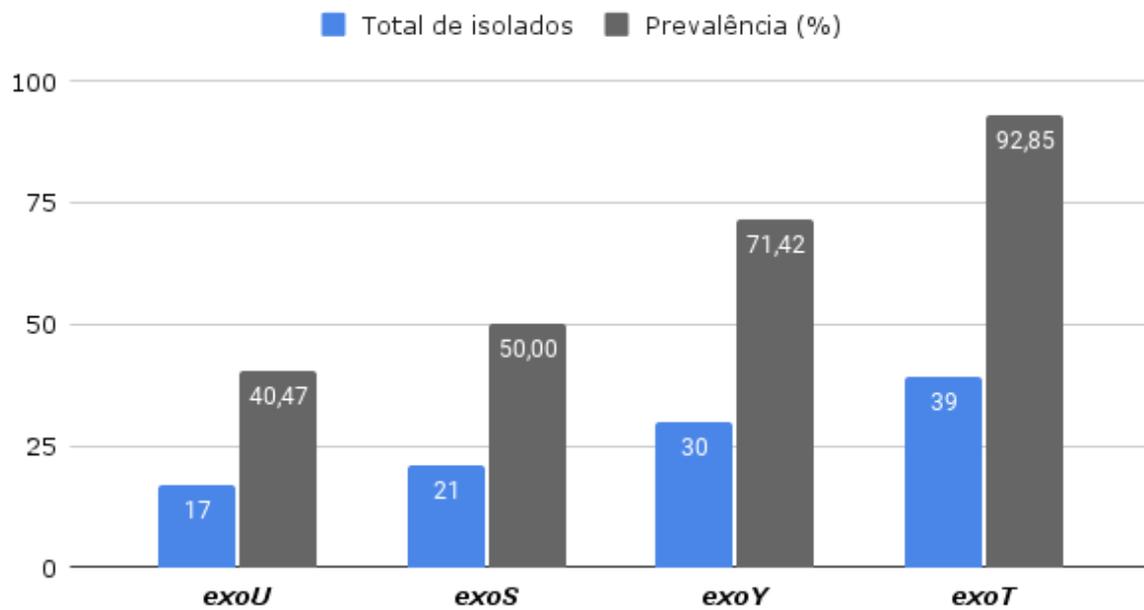
Tabela 4 – Genes do SST3 nos 84 isolados clínicos de *P. aeruginosa* oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2

	Genes do Sistema de Secreção do Tipo III			
	ExoU (%)	ExoS (%)	ExoY (%)	ExoT (%)
<i>P. aeruginosa</i> + Covid-19	17 (40,47)	21 (50)	30 (71,42)	39 (92,85)
<i>P. aeruginosa</i>	21 (50)	21 (50)	34 (80,95)	41 (97,61)
Total	38	42	64	80

Fonte: A Autora, 2023.

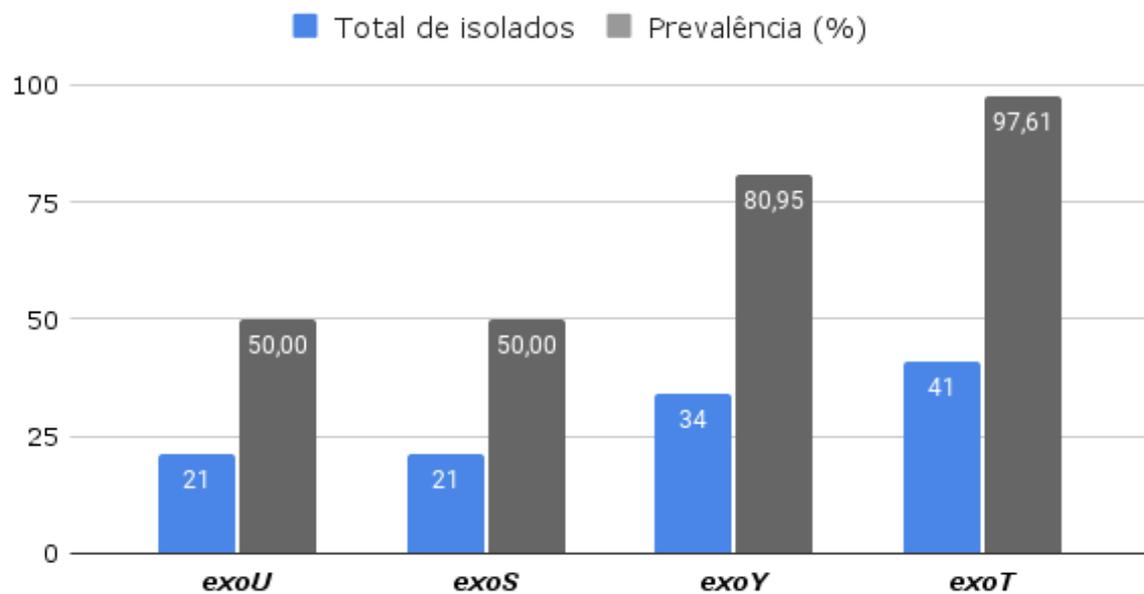
ExoT foi o fator de virulência mais prevalente nos isolados clínicos, sendo encontrado em 97,61% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes internados em UTI e não infectados com SARS-CoV-2, e em 92,85% dos isolados de *P. aeruginosa* coinfectados com SARS-CoV-2 (Tabela 3 e Figuras 18 e 19). ExoY foi o segundo fator de virulência do SST3 mais prevalente, totalizando 34 (80,95%) e 30 (71,42%) nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes sem e com coinfeção com SARS-CoV-2, respectivamente (Tabela 3 e Figuras 17 e 18). O resultado das toxinas ExoS e ExoU foi divergente quando comparados os 2 grupos de pacientes, uma vez que nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2, *exoS* foi mais prevalente, estando presente em 21 (50% das cepas), enquanto que *exoU* foi detectada em 17 cepas (40,47%). Já nos isolados obtidos de pacientes sem coinfeção, observamos proporções iguais (50% cada) de presença de *exoS* e *exoU* (Tabela 3 e Figuras 17 e 18).

Figura 17 – Genes do SST3 nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*, oriundos de UTI, coinfectados com SARS-CoV-2.



Fonte: A Autora, 2023.

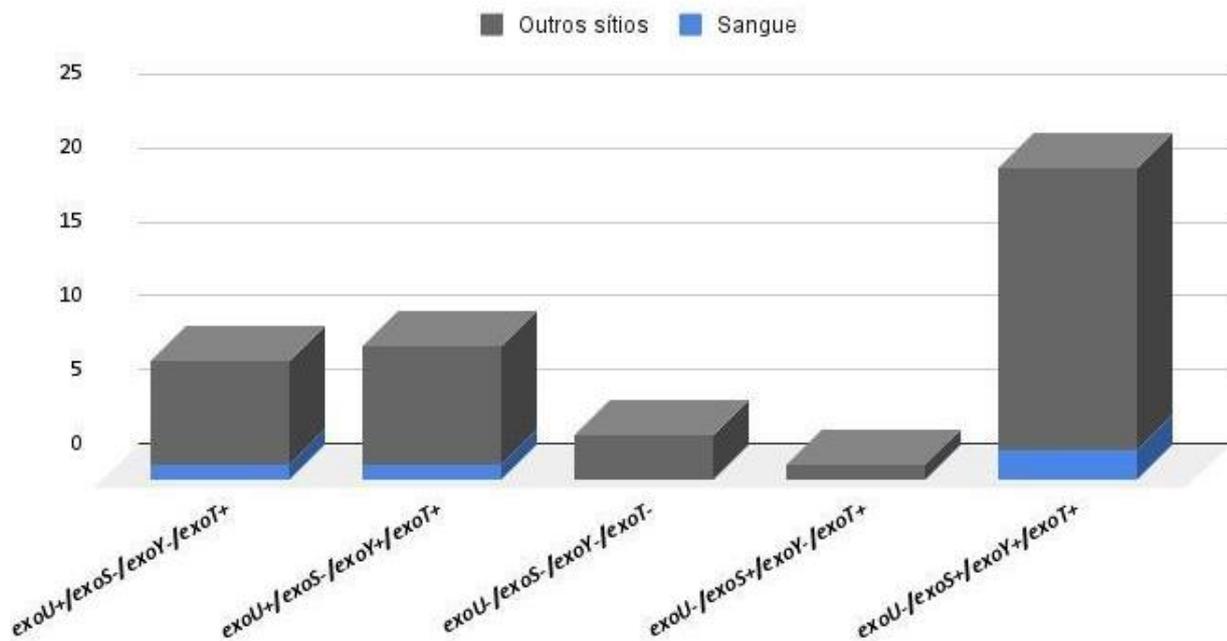
Figura 18 – Genes do SST3 nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*, oriundos de UTI, obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2.



Fonte: A Autora, 2023.

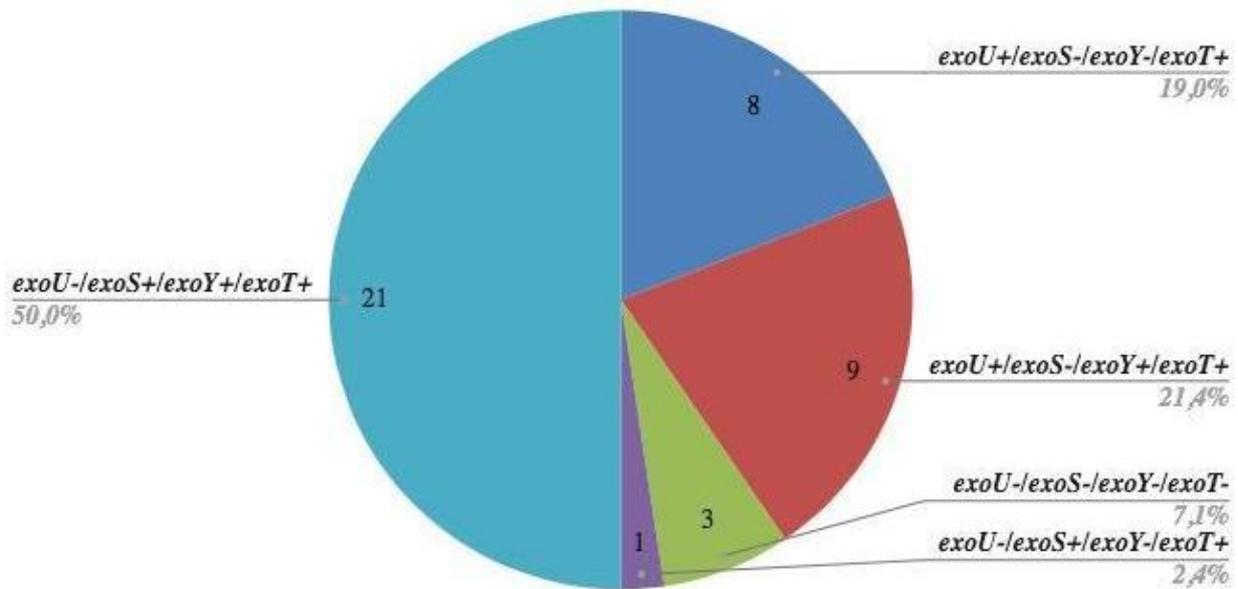
Quando analisamos os 4 genes do SST3 nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* coinfectados com SARS-CoV-2, observamos 5 grupos diferentes: *exoU+*/*exoS-*/*exoY-*/*exoT+*, *exoU+*/*exoS-*/*exoY+*/*exoT+*, *exoU-*/*exoS-*/*exoY-*/*exoT-*, *exoU-*/*exoS+*/*exoY-*/*exoT+*, e *exoU-*/*exoS+*/*exoY+*/*exoT+*. O genótipo mais encontrado foi *exoU-*/*exoS+*/*exoY+*/*exoT+* (21 amostras, sendo 17 de secreções respiratórias e 2 de sangue), seguido por *exoU+*/*exoS-*/*exoY+*/*exoT+* (8 amostras de secreções respiratórias) e *exoU+*/*exoS-*/*exoY-*/*exoT+* (7 amostras de secreções respiratórias e 1 de sangue). As cepas clínicas 12, 18 e 26 mostraram genótipo negativo para os 4 genes (*exoU-*/*exoS-*/*exoY-*/*exoT-*), enquanto que a cepa clínica 3 foi a única a apresentar o genótipo *exoU-*/*exoS+*/*exoY-*/*exoT+* (Figuras 19 e 20).

Figura 19 - Genótipos do SST3 em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, oriundos de UTI, obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2.



Fonte: A Autora, 2023.

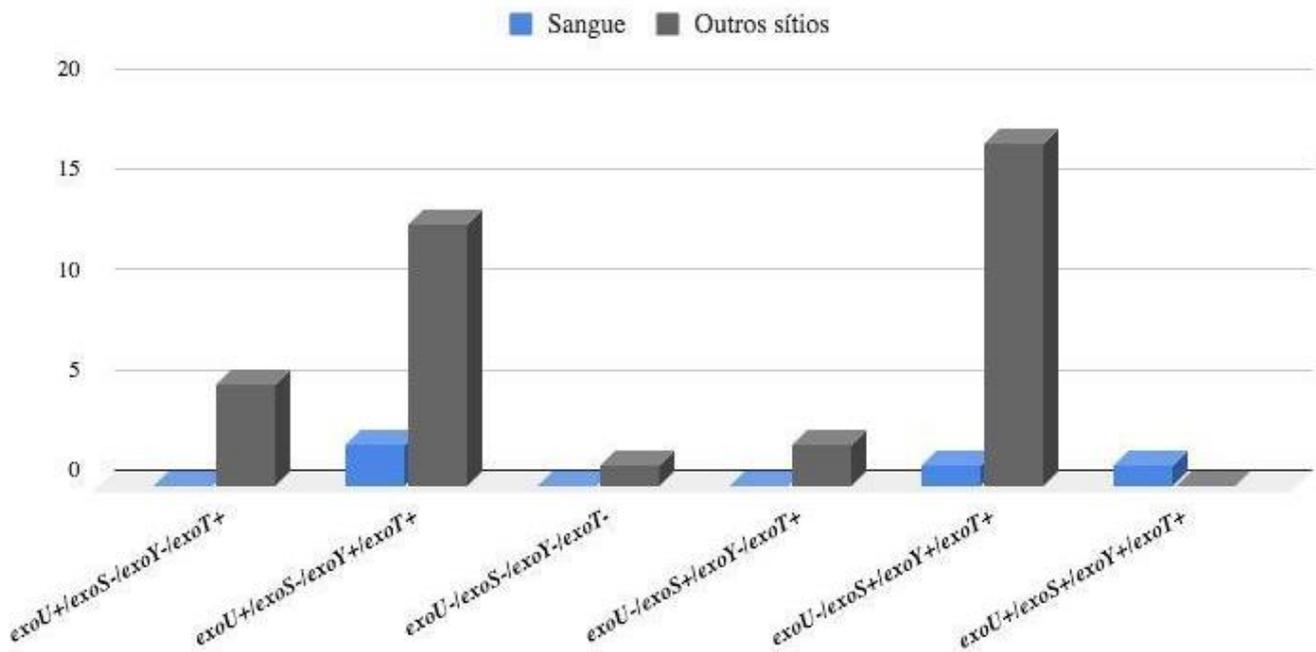
Figura 20 - Genótipos do SST3 em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, oriundos de UTI, obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2



Fonte: A Autora, 2023.

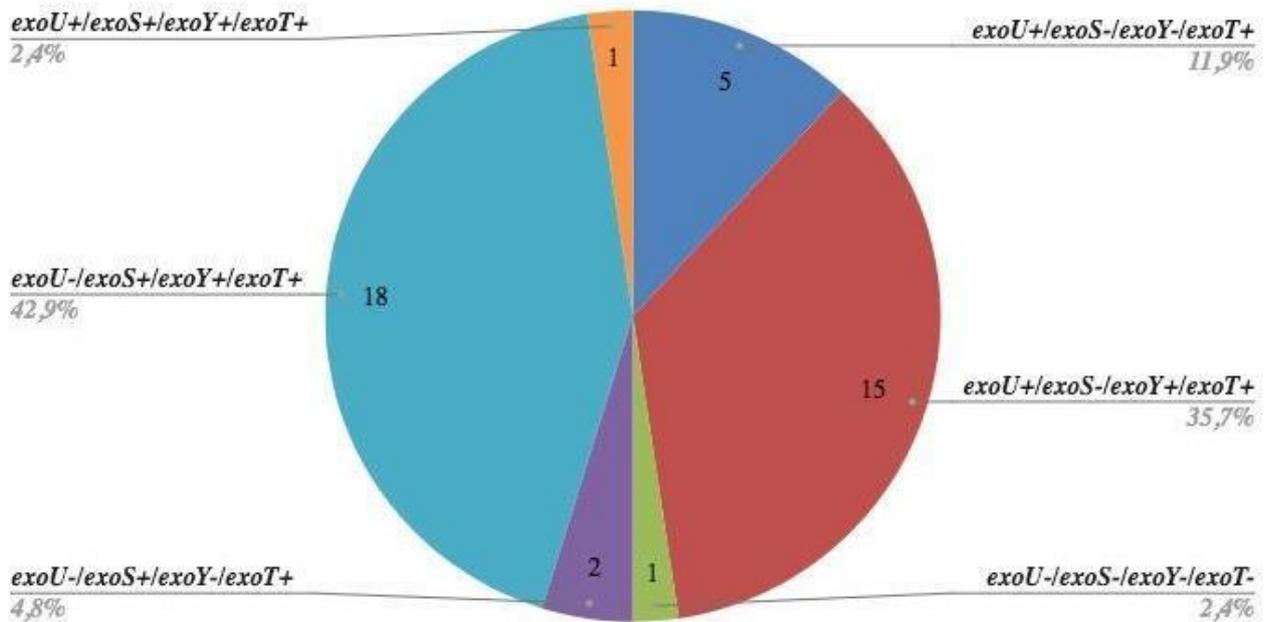
Os isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2 apresentaram 6 genótipos diferentes em relação à expressão dos 4 fatores de virulência do SST3: *exoU+/exoS-/exoY-/exoT+*, *exoU+/exoS-/exoY+/exoT+*, *exoU-/exoS-/exoY-/exoT-*, *exoU-/exoS+/exoY-/exoT+*, *exoU-/exoS+/exoY+/exoT+* e *exoU+/exoS+/exoY+/exoT+*. O genótipo mais encontrado foi *exoU-/exoS+/exoY+/exoT+*, presente em 17 amostras de secreções respiratórias e em 1 amostra de sangue. O segundo genótipo mais presente foi *exoU+/exoS-/exoY+/exoT+*, detectado em 13 amostras de secreções respiratórias e 2 de sangue, seguido por *exoU+/exoS-/exoY-/exoT+* com 5 amostras (Figuras 22 e 23). A cepa clínica 11 foi a única que não expressou nenhum dos 4 genes, sendo *exoU-/exoS-/exoY-/exoT-*. Em contrapartida, a cepa clínica 32, oriunda de um episódio de bacteremia, mostrou genótipo menos frequente, sendo positiva para todos genes *exoU+/exoS+/exoY+/exoT+* (Figuras 21 e 22).

Figura 21 – Genótipos do SST3 em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, oriundos de UTI, obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2



Fonte: A Autora, 2023.

Figura 22 - Genótipos do SST3 em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, oriundos de UTI, obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2



Fonte: A Autora, 2023.

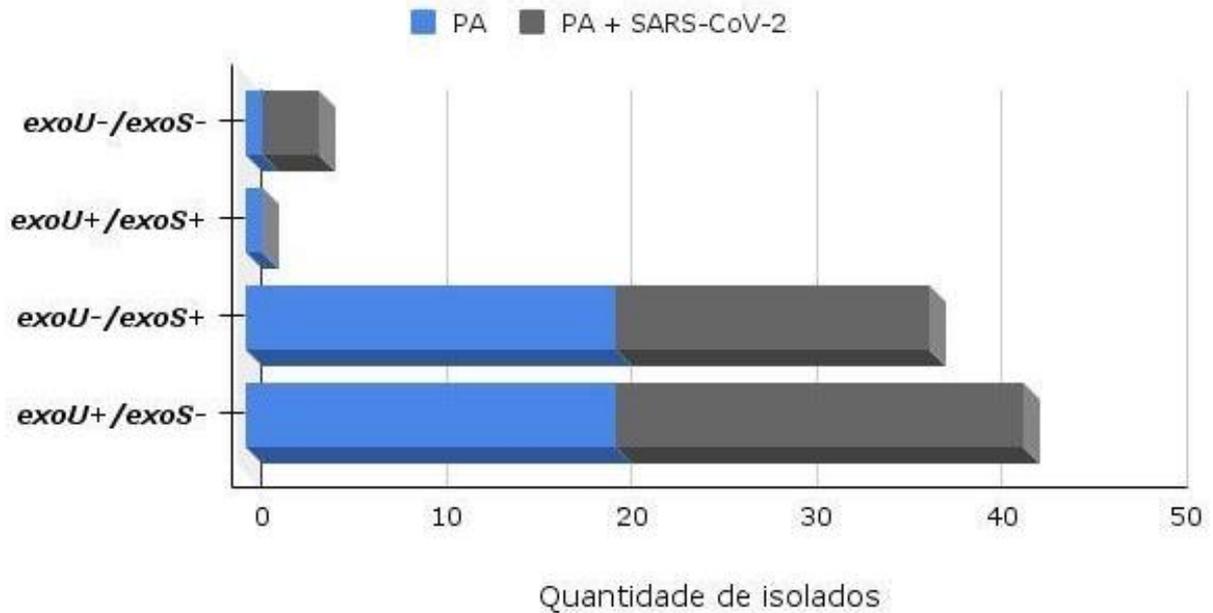
ExoY e ExoT são exotoxinas já descritas na literatura como sendo as mais expressas por isolados de amostras de diferentes fontes, enquanto que as toxinas ExoS e ExoU, geralmente, não são expressas juntas. As cepas clínicas de *P. aeruginosa* obtidas de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2 mostraram uma prevalência maior de *exoU* (22 cepas em relação à *exoS*), sendo este gene presente em 17 dos 42 isolados clínicos (40,47%). Três isolados, as cepas clínicas 12, 18 e 26, apresentaram o genótipo *exoU*-/*exoS*-, não expressando nenhuma das exotoxinas citadas (tabela 4 e figura 23). Quando analisamos os isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2, vemos que 21 cepas, de 42, expressam *exoU*, enquanto a outra metade (21 cepas) expressa *exoS*. A cepa clínica 11 se mostrou negativa para a expressão de *exoU* e *exoS*, enquanto que a clínica 32 apresentou genótipo duplo positivo *exoU*+/*exoS*+.

Tabela 5 - Genótipo *exoU/exoS* dos isolados clínicos oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2

		Genótipos do SST3			
		<i>exoU</i> +/ <i>exoS</i> - (n)	<i>exoU</i> -/ <i>exoS</i> + (n)	<i>exoU</i> +/ <i>exoS</i> + (n)	<i>exoU</i> -/ <i>exoS</i> - (n)
Isolados de <i>P. aeruginosa</i> SARS-CoV-2 +	Sangue	2	1	0	0
	Outros sítios	17	20	0	2
Isolados de <i>P. aeruginosa</i> SARS-CoV-2-	Sangue	3	0	1	0
	Outros sítios	16	25	0	1
Total		38	46	1	3

Fonte: A Autora, 2023.

Figura 23 - Genótipo *exoU/exoS* dos isolados clínicos oriundos de UTI, obtidos de pacientes infectados ou não com SARS-CoV-2.



Legenda: PA= *P. aeruginosa*

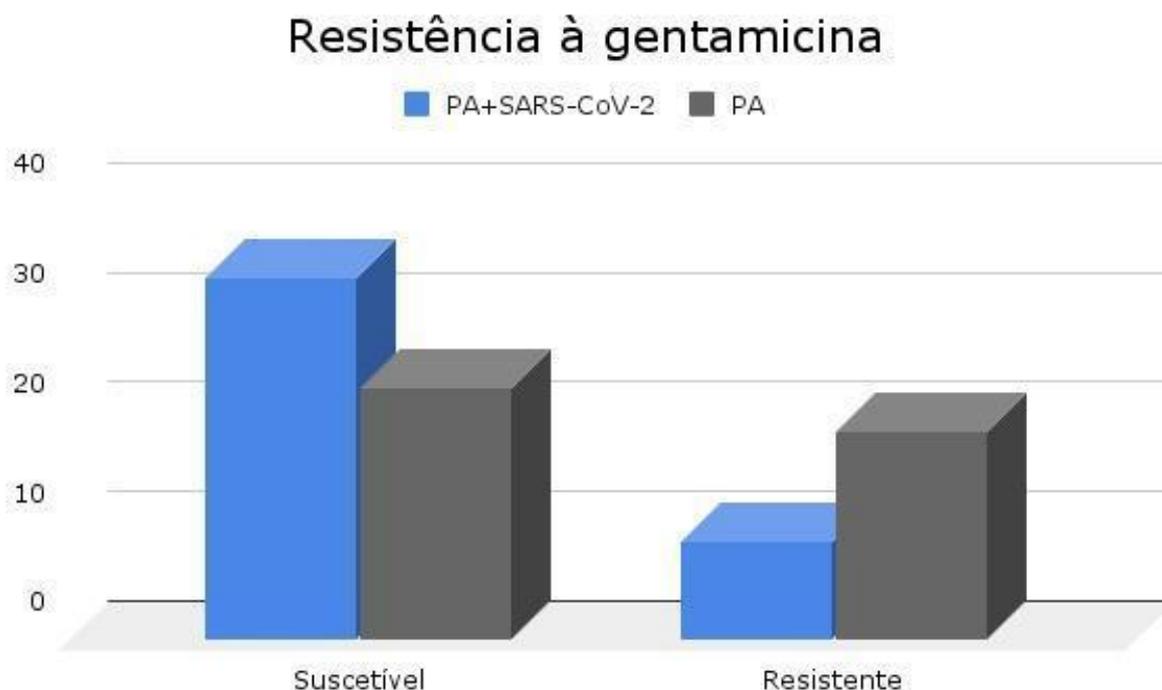
Fonte: A Autora, 2023.

3.3. Viabilidade de células epiteliais respiratórias humanas após infecção com isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes infectados ou não com SARS-CoV-2.

3.3.1. Avaliação da suscetibilidade à gentamicina

A viabilidade dos isolados clínicos após infecção das células epiteliais respiratórias e tratamento com gentamicina a 300 µg/mL, por 1 e 23 horas, mostrou que, dos 42 isolados clínicos provenientes de pacientes coinfetados com *P. aeruginosa* e SARS-CoV-2, 10 (23,8%) foram resistentes ao antibiótico. Dos 42 isolados clínicos de *P. aeruginosa* oriundos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2, tivemos mais isolados resistentes, totalizando 19 (45,2%) (Figura 24).

Figura 24 - Viabilidade dos isolados clínicos obtidos de pacientes infectados ou não com SARS-CoV-2, pós tratamento com gentamicina 300 µg/mL

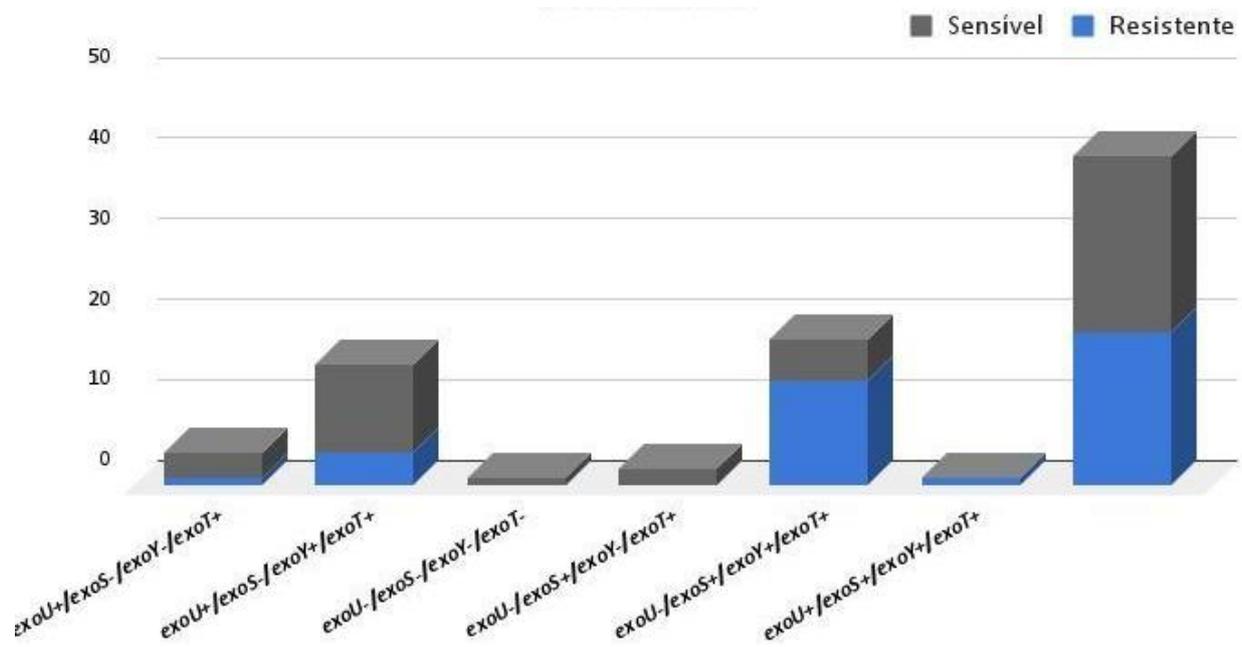


Legenda: viabilidade dos isolados clínicos obtidos de pacientes infectados ou não com SARS-CoV-2 após infecção de células epiteliais respiratórias da linhagem A459, por 1 hora, e tratamento com gentamicina a 300 µg/mL, por 23 horas..

Fonte: A Autora, 2023.

Dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2, as cepas clínicas 7, 9, 10, 18, 20, 27-29, 32-42 foram resistentes à gentamicina na concentração de 300 µg/mL. Já nos isolados clínicos obtidos de pacientes concomitantemente infectados com SARS-CoV-2, o número de cepas resistentes foi menor, sendo resistentes os isolados clínicos 12, 14, 16, 28-32, 38-42 (Figura 24). Analisando os diferentes genótipos, vemos que nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes à gentamicina, o genótipo mais frequente foi *exoU-/exoS+/exoY+/exoT+*, totalizando 13 isolados clínicos, e o genótipo mais frequente nas cepas suscetíveis foi *exoU+/exoS-/exoY+/exoT+*. Ainda foi possível observar que uma cepa resistente (CL 32) apresentou genótipo *exoU+/exoS+/exoY+/exoT+* e uma cepa sensível (CL 11) apresentou genótipo *exoU-/exoS-/exoY-/exoT-* (Figura 25). O genótipo mais encontrado nos isolados obtidos de pacientes infectados concomitantemente com SARS-CoV-2 foi *exoU-/exoS+/exoY+/exoT+*, tanto para as mostras sensíveis, quanto as resistentes (Figura 26).

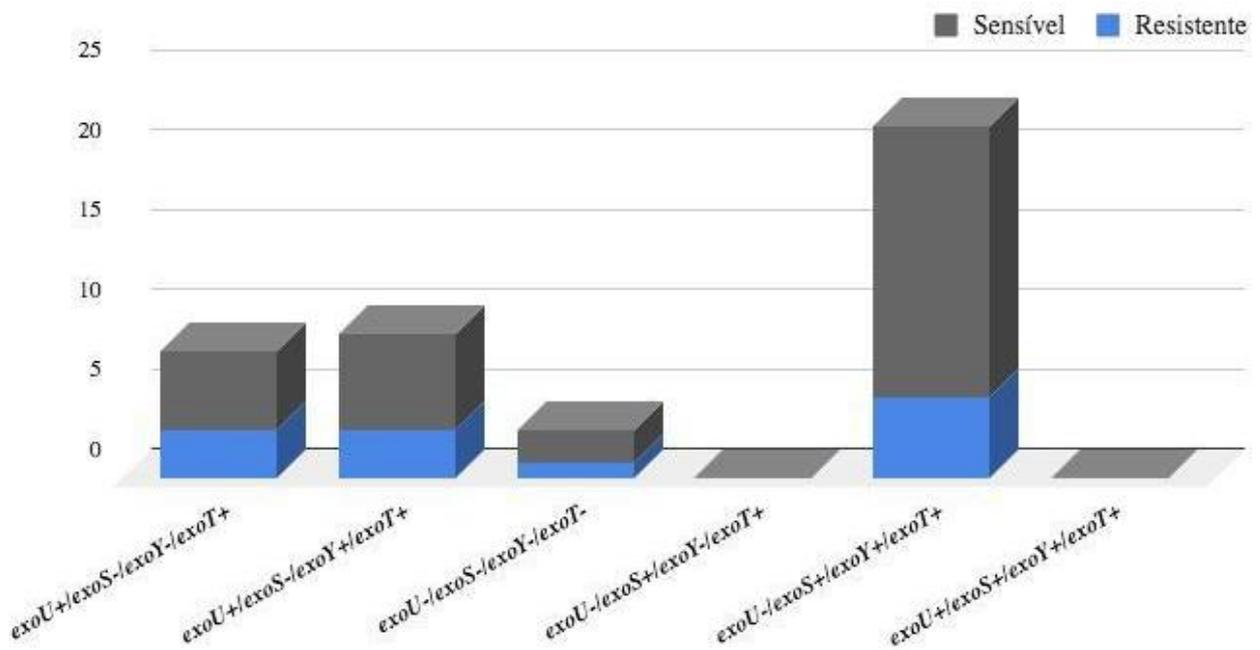
Figura 25 - Genótipos do SST3 em isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes internados em UTI



Legenda: Genótipos encontrados após tratamento com gentamicina a 300 µg/mL.

Fonte: A Autora, 2023.

Figura 26- Genótipos do SST3 observados em isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes internados em UTI, coinfectados com SARS-CoV-2



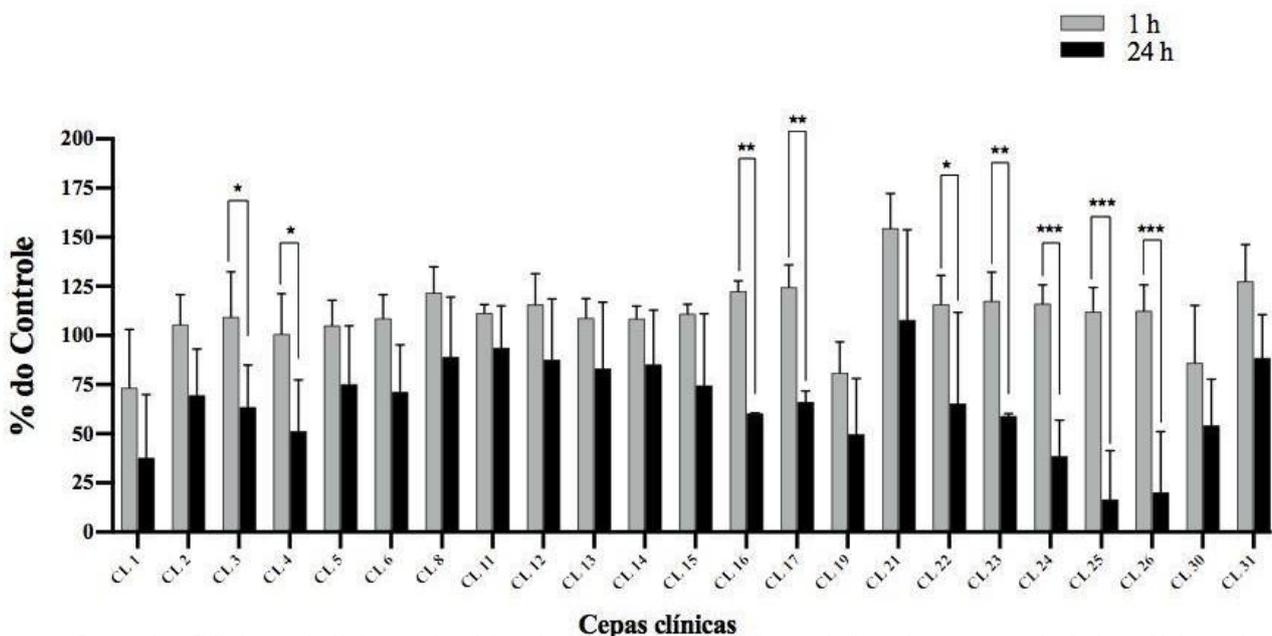
Legenda: Genótipos encontrados após tratamento com gentamicina a 300 µg/mL.

Fonte: A Autora, 2023.

3.3.2. Avaliação da citotoxicidade dos isolados clínicos para células epiteliais respiratórias

Os 33 isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2 e os 28 isolados de pacientes sem coinfeção suscetíveis à gentamicina na concentração de 300 µg/mL foram utilizados para infectar células epiteliais respiratórias por 1 hora, seguido de tratamento com antibiótico por 23 horas, para avaliação da citotoxicidade (Figuras 27 e 28). A análise estatística comparando os 2 grupos: 1- células A549 infectadas com diferentes isolados clínicos por 1 hora (sem tratamento), e 2- células A549 infectadas com diferentes isolados clínicos por 1 hora, tratadas com gentamicina por 23 horas, totalizando 24 horas, foi realizada de acordo com o método “two-way ANOVA”. A significância estatística foi aceita quando $P < 0,05$.

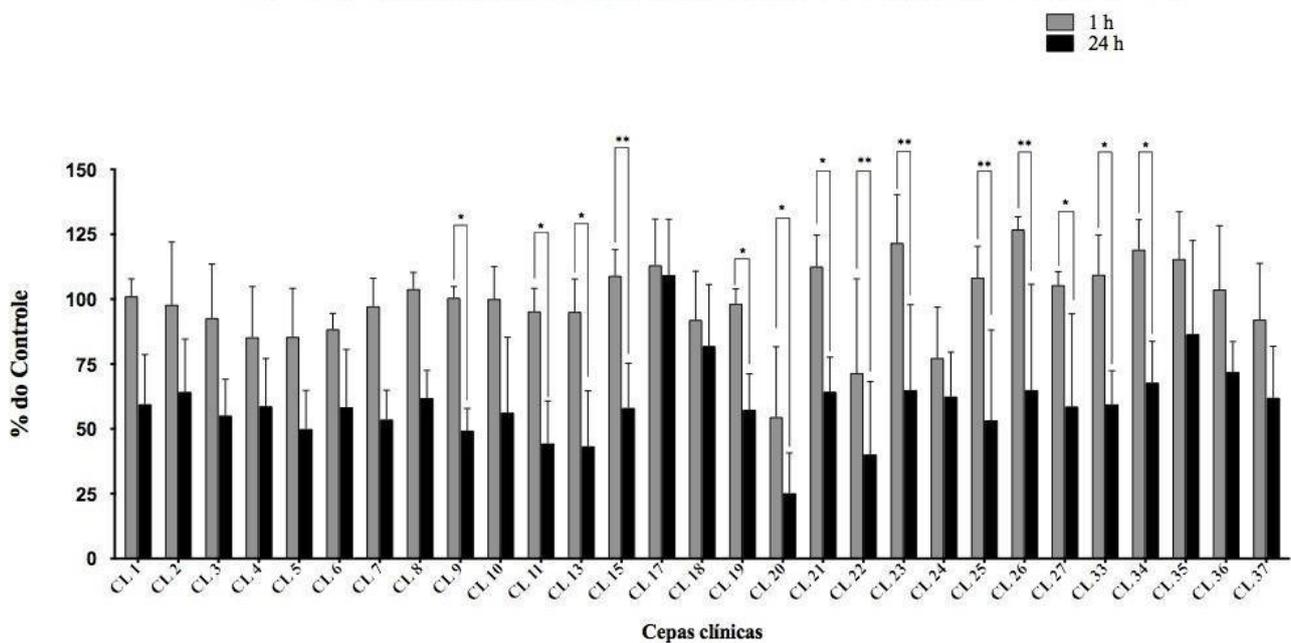
Figura 27 - Viabilidade de células epiteliais respiratórias após 1 ou 24 horas de infecção com isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2.



Cepas clínicas
 Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com os isolados clínicos de *P. aeruginosa* por 1h e tratados com gentamicina 300 µg/mL por 23h. A viabilidade celular foi medida através do método MTT. O gráfico representa as médias ± SEM obtidas em 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado os tempos de 1 e 24h (1 hora de infecção, seguido por 23 horas de tratamento com antibiótico).

Fonte: A Autora, 2023.

Figura 28 - Viabilidade de células epiteliais respiratórias após 1 ou 24 horas de infecção com isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2



Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com os isolados clínicos de *P. aeruginosa* por 1h e tratados com gentamicina 300 µg/mL por 23h. A viabilidade celular foi medida através do método MTT. O gráfico representa as médias ± SEM obtidas em 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado os tempos de 1 e 24h (1 hora de infecção, seguido por 23 horas de tratamento com antibiótico).

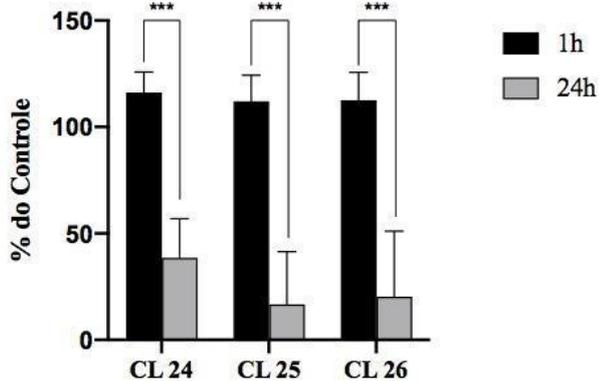
Fonte: A Autora, 2023.

As cepas clínicas foram divididas em 3 grupos, de acordo com a sua atividade citotóxica em células epiteliais alveolares humanas: alta citotoxicidade, média citotoxicidade e baixa citotoxicidade. A alta citotoxicidade foi considerada quando a viabilidade de células A549 infectadas foi menor ou igual do que 25% após 23 horas de tratamento com gentamicina. A citotoxicidade média foi utilizada para aqueles isolados em que a viabilidade foi igual ou maior do que 25% e menor do que 75%, e a baixa citotoxicidade para os isolados em que a viabilidade celular foi igual ou maior que 75%.

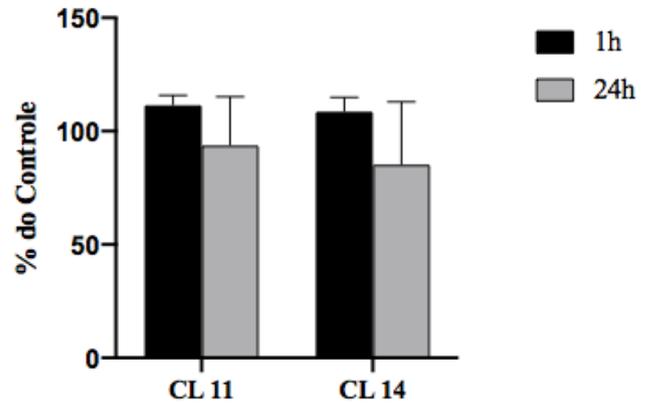
As cepas de *P. aeruginosa* com alta citotoxicidade foram as clínicas 24, 25 e 26 (Figura 29). Os perfis genotípicos das cepas clínicas 24, 25 e 26 foram, respectivamente, *exoU+*/*exoS-*/*exoY+*/*exoT+*, *exoU+*/*exoS-*/*exoY-*/*exoT+*, *exoU+*/*exoS-*/*exoY+*/*exoT+*. A maioria dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* teve citotoxicidade moderada para células epiteliais alveolares *in vitro*, enquanto os isolados clínicos 11 e 14 se mostraram pouco citotóxicos (Figura 29). O genótipo das cepas menos citotóxicas foi *exoU-*/*exoS-*/*exoY-*/*exoT-* (clínica 11) e *exoU-*/*exoS+*/*exoY+*/*exoT+* (clínica 14), respectivamente.

Figura 29 - Isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2 que apresentaram alta e baixa citotoxicidade *in vitro*

Isolados clínicos de PA com alta citotoxicidade



Isolados clínicos de PA com baixa citotoxicidade



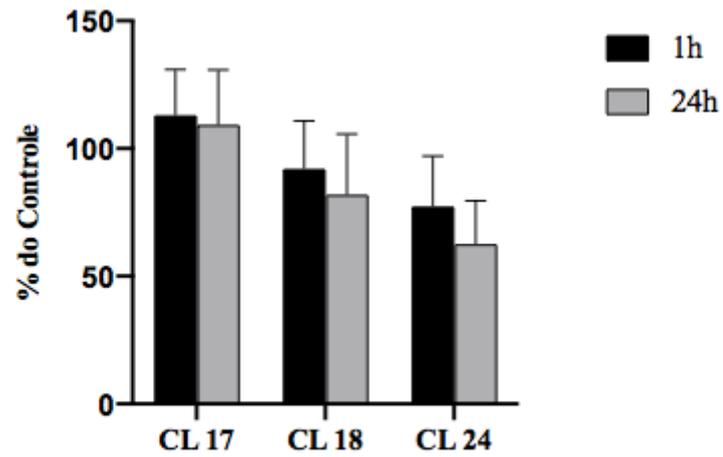
Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com os isolados clínicos de *P. aeruginosa* por 1h e tratados com gentamicina 300 µg/mL por 23h. A viabilidade celular foi medida através do método MTT. O gráfico representa as médias ± SEM obtidas em 3 ensaios independentes. ***p <0,001 quando comparado os tempos de 1 e 24h (1 hora de infecção, seguido por 23 horas de tratamento com antibiótico).

Fonte: A Autora, 2023.

Entre os isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes simultaneamente infectados com SARS-CoV-2, não foi observado nenhuma cepa com alta citotoxicidade *in vitro*. A maioria das cepas clínicas mostrou citotoxicidade média, com exceção das clínicas 17, 18 e 24, que apresentaram baixa citotoxicidade (Figuras 30).

Assim como a clínica 11 dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2, a clínica 18 dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2 também apresentou genótipo *exoU*-/*exoS*-/*exoY*-/*exoT*-, enquanto que as clínicas 17 e 24, de forma diferente do outro grupo em estudo, apresentaram genótipo *exoU*+/*exoU*+/*exoS*-/*exoY*-/*exoT*+ e *exoU*+/*exoS*-/*exoY*+/*exoT*+, respectivamente.

Figura 30 - Isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes coinfetados com SARS-CoV-2 que apresentaram baixa citotoxicidade *in vitro*



Legenda: Células epiteliais respiratórias da linhagem A549 foram infectadas com os isolados clínicos de *P. aeruginosa* por 1h e tratados com gentamicina 300 µg/mL por 23h. A viabilidade celular foi medida através do método MTT. O gráfico representa as médias \pm SEM obtidas em 3 ensaios independentes.

Fonte: A Autora, 2023.

4. DISCUSSÃO

Por ser uma bactéria ubíqua, multirresistente e capaz de expressar uma arsenal de fatores de virulência, *P. aeruginosa* é um dos principais microrganismos causadores de IRAS, tanto em adultos quanto em crianças, sendo frequentemente isolado de PAV, IPCS e ITU, com especial destaque para PAV, uma vez que *P. aeruginosa* tem como principal foco de infecção o trato respiratório (CONSTANTINO-TELES *et al.*, 2022).

No fim do ano de 2019, teve início a pandemia causada pelo vírus respiratório SARS-CoV-2, que, logo no ano seguinte, aumentou as taxas de internação em UTIs, assim como a necessidade de uso de respiradores artificiais por pacientes graves, configurando um ambiente extremamente favorável para a coinfeção por *P. aeruginosa*.

Assim, o foco deste trabalho foi avaliar a prevalência dos genes que codificam os fatores de virulência transportados pelo SST3, assim como a citotoxicidade para células epiteliais respiratórias, em isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes internados em UTI coinfectados ou não com SARS-CoV-2.

Estudos anteriores realizados por outros grupos de pesquisa já documentaram a prevalência dos fatores de virulência transportados pelo SST3 em cepas ambientais e clínicas. Um estudo publicado em 2018 (RUTHERFORD *et al.*, 2018) mostrou a prevalência de genes que codificam as exotoxinas do SST3 em 120 cepas de *P. aeruginosa* de origem ambiental isoladas de locais naturais ou locais feitos pelo homem (água, solo, substratos úmidos). Similarmente ao encontrado em nosso estudo, *exoT* foi o gene mais prevalente, encontrado em todos os isolados ambientais, seguido por *exoY*, presente em 115 (96%) dos isolados. Apesar de se tratarem de amostras de diferentes origens, no presente trabalho, *exoT* também foi o gene mais encontrado, tanto nos isolados de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes não infectados com SARS-CoV-2 (97,61%), quanto nos isolados provenientes de pacientes com coinfeção (92,85%). O gene *exoY* também foi o segundo mais prevalente neste trabalho: 71,42% e 80,95% em cepas de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes infectados ou não com SARS-CoV-2, respectivamente. Para *exoS* e *exoU*, os resultados também foram parecidos: entre as cepas ambientais restantes após exclusão de isolados da mesma amostra, 74 foram *exoS*⁺ e 16 *exoU*⁺. Um dado importante deste estudo de 2018 é que a maioria dos isolados *exoS*⁺ (total de 41 cepas, correspondente a 55%) foram encontrados em locais naturais, enquanto que a maioria dos isolados *exoU*⁺ (13 isolados, correspondente a 81%) vieram de locais feitos pelo homem, apontando que os reservatórios de água feitos pelo homem podem servir de fonte para cepas portadoras do gene *exoU*. Este dado é importante,

visto que *P. aeruginosa* pode ser encontrada em reservatórios de água no ambiente hospitalar. Quando observamos os isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes coinfectados com o vírus, o número de amostras *exoS*⁺ também foi maior do que o de *exoU*⁺, 21 (50%) e 17 (40,47%), respectivamente. Já entre os isolados de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes que não estavam coinfectados com SARS-CoV-2, o número de isolados *exoS*⁺ e *exoU*⁺ foi o mesmo. A presença de *exoU* nesses isolados pode ser proveniente, também, da contaminação dos reservatórios de água por *P. aeruginosa*.

Também em 2018, foi publicado um estudo comparando a prevalência de genes que codificam as exotoxinas do SST3 em 185 isolados clínicos de origens diversas (sepse, infecção do trato urinário [ITU], FC e infecções pulmonares) e 47 isolados ambientais. Mais uma vez, *exoT* foi o gene mais prevalente (98,5%), seguido de *exoY* (90%), *exoS* (65,2%) e *exoU* (32,3%). Apesar de estar presente em menos isolados, *exoU* foi mais prevalente (53,3%) em infecções agudas invasivas, como sepse e infecção pulmonar, em comparação aos isolados ambientais (32,3%), de ITU (18,2%) e FC (5,4%) (BOULANT *et al.*, 2018). No nosso trabalho, *exoU* também foi o gene menos prevalente no total dos isolados, mas a mais presente nas amostras de bacteremia (6 de 7), corroborando que a presença de *exoU* está associada a infecções agudas e invasivas.

Já no trabalho publicado por Liew e colaboradores, diferentemente de outros relatos encontrados na literatura e dos dados desta tese, o gene *exoT* não foi detectado em nenhum dos 105 isolados clínicos avaliados, incluindo espécimes de bacteremia e de infecções crônicas, mostrando que a presença deste gene parece não influenciar no curso ou no tipo de infecção (LIEW *et al.*, 2019).

A prevalência dos genes que codificam as toxinas do SST3 também já foi avaliada em amostras clínicas de *P. aeruginosa* isoladas de cães e gatos. Em um estudo com 27 isolados de *P. aeruginosa* oriundos de amostras de urina, lesão labial, exsudato de orelha e vaginal, e dermatite ulcerativa crônica de cães, 100% das cepas foram positivas para *exoS*, *exoT* e *exoY*, e negativas para *exoU*. Entre esses isolados estudados, observamos diferentes tipos de infecção crônica e a presença de 3 proteínas efetoras do SST3, porém, não foi detectada ExoU. Este achado pode estar relacionado ao tipo de infecção, uma vez que *exoU* é mais frequente em isolados de infecção aguda (SOUSA *et al.*, 2023).

Em outro estudo publicado em 2023, em que foi avaliado o perfil de resistência a antimicrobianos e a presença de genes que codificam exotoxinas em 271 cepas clínicas isoladas de infecções diversas de cães e gatos, foi mostrada uma prevalência semelhante dos genes que codificam as exotoxinas do SST3 ao reportado no presente estudo e em outros

relatos da literatura: *exoT* foi mais prevalente (97,8%), seguido de *exoY* (mais de 80%), *exoS* (79,7%) e *exoU* (17,3%). Houve uma associação significativa entre os isolados *exoU*⁺ e a resistência a amicacina e marbofloxacino (PLÓKARZ *et al.*, 2023).

Ainda na linha de pesquisa sobre resistência a antimicrobianos e virulotipos do SST3 de *P. aeruginosa* em cães e gatos, em um trabalho com 240 isolados clínicos, o genótipo mais observado foi *exoU*⁻/*exoS*⁺ (81,3%), seguido por *exoU*⁺/*exoS*⁻ (14,6%), *exoU*⁻/*exoS*⁻ (2,9%), e *exoU*⁺/*exoS*⁺ (1,3%), não havendo associação entre as cepas *exoU*⁺ com a resistência a fluoroquinolonas. Neste caso, vemos que animais domésticos também podem servir de reservatório para *exoS* e *exoU*. Não foi possível associar o genótipo *exoU*/*exoS* com o tipo de infecção causada pela falta de informação no estudo. (HAYASHI *et al.*, 2021). A presença dos virulotipos foi similar ao observado nesta tese, que encontrou mais isolados *exoS*⁺/*exoU*⁻ (46/84) seguido por *exoS*⁻/*exoU*⁺ (38/84), *exoS*⁻/*exoU*⁻ (3/84) e *exoS*⁺/*exoU*⁺ (1/84).

No cenário hospitalar, *P. aeruginosa* também é um microrganismo frequentemente isolado de feridas provocadas por queimaduras. Em 100 cepas isoladas de queimaduras de pacientes iranianos, 100% dos isolados foram positivos para *exoT* e *exoY*. O gene *exoS* estava presente em 59% das cepas, e *exoU* em 41%, sendo que a presença de um desses fatores de virulência foi associada à resistência a antibióticos (KHODAYARY *et al.*, 2019).

Contrastando com esse resultado, a diversidade de genes dos fatores de virulência do SST3, em outro estudo com feridas causadas por queimaduras, foi discrepante dos demais. Foram avaliadas 93 amostras de *P. aeruginosa* MDR (*multidrug-resistant*), sendo *exoY* o gene mais prevalente (93,1%), seguido por *exoS* (43%). Nenhum desses isolados apresentou *exoU*, e apenas 20,4% apresentou *exoT*, mostrando a heterogeneidade de cepas MDR no perfil de expressão gênica (HAGHI *et al.*, 2017).

Em outros tipos de feridas, nas crônicas, como ferida de "pé diabético", por exemplo, o perfil da frequência de genes do SST3 foi semelhante ao dos nossos achados: das 63 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pé diabético, *exoT* foi encontrada 100%, *exoY* em 92%, e *exoS* em 78%. Neste estudo, nenhuma das exotoxinas do SST3 mostrou ter papel importante na invasão do tecido ou na lesão tecidual (ERTUGRUL *et al.*, 2017).

A frequência das exotoxinas em outras infecções crônicas, como a otite média, também já foi reportada. Park e colaboradores avaliaram a correlação de genótipos *exoU*/*exoS* e a resistência a antimicrobianos. Ao todo, foram 17 isolados de otite média crônica e 30 isolados de infecção respiratória e bacteremia. Os isolados de otite crônica mostraram diferença quanto à frequência de genes do SST3 quando comparado com as amostras respiratórias e de sangue: *exoT* 100%, *exoY* 94,1%, *exoS* 29,4%, e *exoU* 70,6%, contra *exoT*

96,7%, *exoY* 83,3%, *exoS* 90%, e *exoU* 6,7%. Apesar de ExoS ser uma exotoxina associada a infecções crônicas, este estudo reportou maior prevalência em infecções agudas (90%) do que em infecções crônicas (29,4%). ExoU, por ser uma fosfolipase, tem atividade citotóxica e garante à bactéria características mais invasivas, geralmente sendo mais observada em infecções agudas, como bacteremia e VAP, porém, neste caso, *exoU* foi mais prevalente nos isolados crônicos. Em relação à resistência a antimicrobianos, em cepas *exoU*⁺ foi observada maior resistência a ciprofloxacino e à tobramicina, o que pode explicar a cronicidade da otite média crônica (PARK *et al.*, 2016). Em nosso trabalho, todos os isolados respiratórios e de sangue são provenientes de infecção aguda. No entanto, nos isolados de bacteremia, *exoU* foi mais prevalente do que *exoS*, enquanto que, nas amostras de origem respiratória, *exoS* foi mais prevalente.

Na FC, o ambiente pulmonar contribui para a infecção por *P. aeruginosa*, principal patógeno a colonizar o pulmão de portadores adultos de FC, e segundo mais isolado do pulmão de crianças, ficando atrás apenas de *Staphylococcus aureus*. Nesse contexto, a pesquisa de genes do SST3 em isolados de pacientes com FC se dá principalmente pela avaliação do genótipo *exoS/exoU*, com mais cepas *exoS*⁺.

Um estudo que comparou 114 cepas clínicas (57 isoladas de ferida de queimadura e 57 isoladas de portadores de FC) apontou que *exoS* foi mais prevalente nos isolados provenientes de FC (70,8%) do que nos isolados oriundos de queimadura (21,1%), sugerindo um possível papel de *exoS* na patogênese das infecções por *P. aeruginosa* em indivíduos com FC (FARAJI *et al.*, 2016).

Em outro estudo, realizado só com isolados de *P. aeruginosa* provenientes de crianças e adultos com FC, 129 das 143 (90,2%) cepas foram *exoS*⁺. A prevalência do gene que codifica esta exotoxina foi maior do que a dos genes que codificam outras proteínas secretadas pelo SST3 (POURNAJAF *et al.*, 2018).

Quando foram analisados os virulotipos *exoS/exoU* na FC, foram encontrados dados atípicos, visto que raramente *exoS/exoU* são expressas juntas. Em um estudo, 49 isolados de pacientes com FC foram agrupados em infecções crônicas ou intermitentes. Desses 49 isolados, 30 (61,2%) apresentaram o virulotipo *exoS*⁺/*exoU*⁺, seguido por *exoS*⁺/*exoU*⁻ (18 isolados), e apenas um isolado apresentou o virulotipo *exoS*⁻/*exoU*⁺. A maior frequência de *exoS*⁺/*exoU*⁺ foi observada nos isolados de infecção intermitente, enquanto que o virulotipo *exoS*⁺/*exoU*⁻ foi mais frequente em infecções crônicas (SOCORRO *et al.*, 2020). Como mencionado anteriormente, no presente trabalho foi encontrado apenas um isolado clínico

exoS⁺/*exoU*⁺, pertencente ao grupo de cepas provenientes de pacientes não infectados com SARS-CoV-2.

Um estudo interessante foi publicado com o intuito de verificar a expressão de *exoU* e *exoS* em recém nascidos e crianças, e comparar com amostras ambientais oriundas das casas destas crianças e recém nascidos, e de casas sem portadores de FC. A presença de *exoS* foi similar entre as cepas clínicas e ambientais, com 71% e 79%, respectivamente. Porém, as cepas ambientais apresentaram frequência menor na expressão do que nas cepas clínicas: 13% e 16%, respectivamente (HU *et al.*, 2012).

A presença de genes que codificam os fatores de virulência do SST3 também já foi estudada em outro tipo de infecção, a ceratite. Um estudo feito com 46 isolados de ceratite de *P. aeruginosa* evidenciou que 46% das cepas não apresentavam *exoU* ou *exoS*, 44% (20/46) foram *exoU*⁺/*exoS*⁻, 50% (23/46) *exoS*⁺/*exoU*⁻, e 7% (3/46) apresentaram genótipo duplo positivo *exoU*⁺/*exoS*⁺ (ZHU *et al.*, 2006). Essa distribuição foi parecida com a relatada em outro estudo envolvendo 55 cepas de ceratite de *P. aeruginosa* (28 isoladas de ceratite oriundas de lente de contato e 27 provenientes de infecção sem lente de contato): 64% (35/55) apresentaram genótipo *exoS*⁺/*exoU*⁻, 33 % (18/55) foram *exoS*⁻/*exoU*⁺ e 4 % (2/55) foram *exoS*⁺/*exoU*⁺ (CHOY *et al.*, 2008).

Quando analisamos o comportamento dos fatores de virulência do SST3 de isolados clínicos em infecções hospitalares, temos uma distribuição heterogênea e sem padrão definido. Em bacteremias, por exemplo, o estudo realizado por SANCHEZ-DIENER e colaboradores apresentou o impacto dos fatores de virulência ExoS e ExoU em 593 isolados de *P. aeruginosa* de sangue e em como a presença destes fatores de virulência influenciou no resultado clínico do paciente. Dos 593 isolados clínicos, 406 (68,4%) foram positivos para *exoS* e 122 (20,6%) foram positivos para *exoU*. Apesar de menos frequente nos isolados, as cepas *exoU*⁺ foram mais encontradas nos isolados mais citotóxicos (SÁNCHEZ-DIENER *et al.*, 2019).

Em nosso estudo, nos isolados oriundos de bacteremia (7), *exoU* foi mais frequente detectado do que *exoS* (6/7), porém, o número de isolados analisados foi menor. Em relação à citotoxicidade, em nosso trabalho, tivemos algumas diferenças dos resultados apresentados acima: nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* oriundos de pacientes sem infecção por SARS-CoV-2, as cepas mais citotóxicas também foram *exoU*⁺, enquanto as menos citotóxicas foram *exoU*⁻.

Outro trabalho feito com 590 amostras clínicas de sangue verificou a presença dos genótipos *exoS*/*exoU* e sua correlação com a resistência a antimicrobianos. O gene *exoS* foi

mais frequente (75%), enquanto que *exoU* foi encontrado em 21% das amostras. A frequência dos genótipos foi: três isolados *exoU*⁺/*exoS*⁺ (0,5%), 21 *exoU*⁻/*exoS*⁻ (3,5%), 126 *exoU*⁺/*exoS*⁻, 443 *exoU*⁻/*exoS*⁺ e 21 *exoU*⁻/*exoS*⁻. Mais uma vez, apesar de menos frequente do que *exoS*, a presença de *exoU* foi associada com mortalidade precoce (PEÑA *et al.*, 2014).

Como citado anteriormente, a expressão dos fatores de virulência pode não seguir o padrão esperado, a depender de vários fatores. Uma pesquisa feita com 85 cepas de bacteremia apontou que mais da metade dos isolados (56%) não apresentava nenhuma das duas exotoxinas, ExoU ou ExoS, incomum em isolados clínicos de sangue. O genótipo *exoU/exoT* foi o mais prevalente, com 37 (49%) cepas, seguido de *exoT/exoS* (8 cepas ou 22%), *exoT* (9 cepas ou 24%) e *exoS* (2 cepas ou 5%). No geral, a presença de genes do SST3 confere um aumento na virulência em bacteremias causadas por *P. aeruginosa* (EL-SOLH *et al.*, 2012).

A expressão de fatores de virulência do SST3 também já foi relacionada com os sorotipos do antígeno O de *P. aeruginosa*: 92 isolados de bacteremia foram analisados quanto à presença de genes do SST3, à citotoxicidade e a uma possível correlação com o antígeno O, sendo o grau de citotoxicidade dividido entre os grupos de citotoxicidade alta, média e baixa. Das 92 cepas, 26 que apresentaram alta citotoxicidade possuíam *exoU*. A maioria dos isolados que apresentaram citotoxicidade média (48) possuíam *exoS*, mas não *exoU*, e apenas 18 apresentaram baixa ou nenhuma citotoxicidade. Outro fato interessante deste trabalho é que *exoU* foi detectado mais frequentemente nos sorotipos de antígeno O que causam infecções em humanos (BERTHELOT *et al.*, 2003).

A prevalência de genes que codificam as exotoxinas do SST3 e a sensibilidade a antimicrobianos em isolados clínicos de bacteremia também foi avaliada por outros grupos de pesquisa. Um estudo envolvendo 122 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de sangue mostrou que *exoS* foi mais prevalente (70,5%) do que *exoU* (25,4%), e que as cepas clínicas *exoU*⁺ foram mais propensas à resistência a cefepime, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e gentamicina (GAREY *et al.*, 2008).

Em relação à resistência a antimicrobianos, nos testes de citotoxicidade, algumas cepas não puderam ser analisadas por sua resistência à gentamicina. Nestas cepas, *exoS* foi mais prevalente nos isolados resistentes, enquanto que *exoU* foi mais prevalente em isolados sensíveis à gentamicina.

Devido ao constante aumento de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes, alguns trabalhos evidenciaram o perfil dos genes de fatores de virulência do SST3 em cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes isoladas de IRAS. De 72 amostras de crianças com ITU, o gene

exoS foi detectado em 66 isolados (92,95%) e *exoU*, em 40 (56,33%). Os isolados tiveram níveis mais altos de resistência a ampicilina, ciprofloxacina e gentamicina. O gene de fator de virulência mais detectado em amostras de infecção uretral foi *exoU*, enquanto que nas amostras de pielonefrite e cistite, *exoS* foi mais frequente (HEIDARY *et al.*, 2016).

Outro estudo realizado com 102 isolados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa* provenientes de diversas fontes de infecção hospitalar mostrou que o gene de exotoxina do SST3 mais frequente foi *exoS* (69/102), seguido por *exoT* (37/102), *exoY* (23/102) e *exoU* (14/102). As cepas bacterianas apresentaram níveis mais altos de resistência a penicilina, estreptomicina e tetraciclina (FAZELI E MOMTAZ, 2014).

Ainda na linha de infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa*, perfil de secreção de exotoxinas do SST3 e resistência a antimicrobianos, há um estudo feito com isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a quinolonas e carbapenemas, e sua correlação com *exoS*, *exoU*, *exoY* e *exoT*, em isolados de VAP e sangue. Todos os isolados clínicos apresentaram *exoS*, 87,5% apresentaram *exoT*, 81,2% apresentaram *exoY* e 9,4%, *exoU*. O genótipo mais comum encontrado nos isolados foi *exoS*+/*exoT*+/*exoY*+, genótipo até então não observado no Brasil, e a resistência a carbapenêmicos foi mais frequente nos isolados de VAP (FERREIRA *et al.*, 2015). Os dados de genótipos são similares aos nossos, visto que nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes sem (42,9%) ou com COVID-19 (50%), a frequência de *exoS*+/*exoT*+/*exoY*+ foi maior do que a dos outros genótipos. Tais resultados mostram que o genótipo antes não observado no país é visto com mais frequência com o passar dos anos.

Comparando os genótipos de isolados de *P. aeruginosa* provenientes de infecção crônica (FC) e de infecção aguda (bacteremia), vemos que o genótipo *exoS*+/*exoU*- foi mais encontrado em isolados de FC (84%) do que nos de sangue (56%), enquanto que o genótipo *exoU*+/*exoS*- foi encontrado em 43% dos isolados de sangue e em 12% dos isolados de FC (WAREHAM & CURTIS, 2008). Esses achados corroboram que, geralmente, *exoU* é mais frequente em infecções agudas e *exoS* em infecções crônicas.

A diferença nos achados de genótipos e citotoxicidade mostra a heterogeneidade dos isolados clínicos. Em primeiro lugar, vemos uma distribuição diferente dos genótipos quando comparamos os dois grupos analisados no presente estudo, com isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2 apresentando seis genótipos do SST3 distintos, enquanto que os isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes infectados com SARS-CoV-2 apresentaram cinco.

Como descrito na literatura, o gene *exoU* costuma ser detectado em cepas mais citotóxicas, resultado também visto neste trabalho. Porém, em cepas menos citotóxicas, *exoU* também foi encontrado, mostrando que outros fatores, além da expressão de proteínas do SST3, contribuem com a citotoxicidade dos isolados de *P. aeruginosa*.

De um modo geral, as cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes sem COVID-19 se mostraram mais resistentes à gentamicina, mais heterogêneas em relação aos virulotipos e mais citotóxicas, quando comparadas com as cepas isoladas de pacientes com COVID-19. Além disso, nenhum isolado *P. aeruginosa* proveniente de pacientes com COVID-19 apresentou alto grau de citotoxicidade *in vitro*.

Devido à recente pandemia SARS-CoV-2, existem poucas evidências na literatura sobre a correlação entre a infecção por este vírus e a infecção por *P. aeruginosa*, necessitando-se, assim, de estudos mais aprofundados. Os dados presentes nesta tese podem ajudar a entender o comportamento de *P. aeruginosa* em infecções respiratórias durante a coinfeção com o SARS-CoV-2, norteando o caminho dos cientistas para pesquisas futuras.

4.1. Limitações

Durante o desenvolvimento deste trabalho, encontramos algumas limitações, como a origem dos espécimes clínicos, que são, em sua maioria, oriundos de secreções respiratórias, uma vez que episódios de bacteremia são menos frequentes. Por este motivo, a discrepância entre a origem dos isolados clínicos é alta.

Em relação aos espécimes clínicos, não podemos afirmar se *P. aeruginosa* foi proveniente de infecção ou de um episódio de colonização.

A resistência de alguns isolados clínicos à gentamicina não nos deixou avaliar a citotoxicidade para células de mamífero destes espécimes.

A pandemia de COVID-19 é um evento recente, e por este motivo, existem poucas evidências na literatura sobre coinfeção respiratória com *P. aeruginosa*. A falta de trabalhos que forneça informações sobre a presença de genes do SST3 durante a coinfeção com SARS-CoV-2 não nos permitiu uma análise comparativa aprofundada sobre o comportamento destes genes específicos.

CONCLUSÕES

A análise da prevalência de genes que codificam fatores de virulência do SST3 nas amostras de *P. aeruginosa*, mostrou que ExoT e ExoY foram os dois fatores de virulência observados na maioria dos isolados clínicos nos dois grupos de pacientes: com e sem infecção simultânea com SARS-CoV-2;

As amostras de *P. aeruginosa* oriundas de pacientes assistidos em UTI coinfectados com SARS-CoV-2 apresentaram cinco perfis de genes do SST3: *exoU*⁺/*exoS*⁻/*exoY*⁻/*exoT*⁺; *exoU*⁺/*exoS*⁻/*exoY*⁺/*exoT*⁺; *exoU*⁻/*exoS*⁻/*exoY*⁻/*exoT*⁻; *exoU*⁻/*exoS*⁺/*exoY*⁻/*exoT*⁺ e *exoU*⁻/*exoS*⁺/*exoY*⁺/*exoT*⁺, enquanto que as amostras clínicas de indivíduos sem coinfeção apresentaram seis perfis com apenas uma cepa clínica positiva para os quatro genes;

O genótipo *exoU*⁺/*exoS*⁺/*exoY*⁺/*exoT*⁺, como já descrito na literatura, é menos frequente, e é associado a cepas mais virulentas. A cepa clínica 32 (única positiva para os quatro genes) foi encontrada em amostra sanguínea de um paciente sem coinfeção pelo SARS-CoV. É possível que o perfil de genes do SST3 encontrado neste isolado clínico possa estar associado a natureza e gravidade da infecção associada;

O genótipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ ocorreu na maioria das amostras de *P. aeruginosa* isoladas de sangue (6/7 cepas), sugerindo que a presença de *exoU* possa estar relacionado com o tipo de infecção causada (aguda), visto que esta exoproteína tem atividade fosfolipásica na membrana das células de mamífero e, leva à rápida morte celular e confere à bactéria um caráter mais invasivo;

Quanto à citotoxicidade dos isolados para células de mamíferos, os espécimes clínicos de *P. aeruginosa* com coinfeção pelo SARS-CoV-2 foram menos citotóxicos do que os espécimes clínicos sem coinfeção. Nenhum isolado do grupo com coinfeção apresentou alta citotoxicidade nos testes *in vitro*;

No grupo de espécimes clínicos sem coinfeção pelo SARS-CoV-2, as cepas clínicas 24, 25 e 26 apresentaram alta citotoxicidade para células de mamíferos (viabilidade celular pós infecção e tratamento com antibiótico menor que 25%). Nestas cepas mais citotóxicas, observamos a presença de *exoU* em todas, e nenhuma foi positiva para *exoS*, corroborando os dados encontrados na literatura de que cepas de *P. aeruginosa* com *exoU* costumam ser mais citotóxicas e invasivas.

REFERÊNCIAS

- ADITI *et al.* Similar virulence properties of infection and colonization associated *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 1489-1498, 2017.
- ANANTHARAJAH, A.; MINGEOT-LECLERCQ, MP.; VAN BAMBEKE, F. Targeting the type three secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. **Trends in pharmacological sciences**, v. 37, n. 9, p. 734-749, 2016.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Critérios Diagnósticos das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde - 2021 - **NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES/ANVISA nº 02/2021**, de fevereiro de 2021.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boletins e relatórios das notificações de IRAS e outros eventos adversos. **Boletins e relatórios**. 2023 Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/boletins-e-relatorios-das-notificacoes-de-iras-e-outros-eventos-adversos-1/boletins-e-relatorios-das-notificacoes-de-iras-e-outros-eventos-adversos>.
- BASSETTI M, *et al.* How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs Context**. v. 7, n. 29, 2018.
- BELYY, A. *et al.* Actin activates *Pseudomonas aeruginosa* ExoY nucleotidyl cyclase toxin and ExoY-like effector domains from MARTX toxins. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 13582, 2016
- BILLARD, Lisa *et al.* Viruses in cystic fibrosis patients' airways. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 6, p. 690-708, 2017.
- BERTHELOT, P. *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. **The Journal of infectious diseases**, v. 188, n. 4, p. 512-518, 2003.
- BLEVES, S. *et al.* Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 8, p. 534-543, 2010.
- BOMBERGER, JM. *et al.* Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000382, 2009.
- BOULANT, T. *et al.* Higher prevalence of *PldA*, a *Pseudomonas aeruginosa* trans-kingdom H2-type VI secretion system effector, in clinical isolates responsible for acute infections and in multidrug resistant strains. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2578, 2018.

CARBONETTI, NH. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. **Future microbiology**, v. 5, n. 3, p. 455-469, 2010.

CHOY, MH. *et al.* Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis. **Journal of medical microbiology**, v. 57, n. 12, p. 1539-1546, 2008.

COLLINS, SM. *et al.* Size exclusion chromatography to analyze bacterial outer membrane vesicle heterogeneity. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 169, p. e62429, 2021.

CONSTANTINO-TELES P. *et al.* Role of host and bacterial lipids in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 931027, 2022.

COORDENAÇÃO ESTADUAL DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR (CECIH/RJ). Divulgação dos dados referentes a IRAS e Multirresistência no Estado do Rio de Janeiro 2020. **Informativo da Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar**, 2021.

COORDENAÇÃO ESTADUAL DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR (CECIH/RJ). Divulgação dos dados referentes a IRAS e Multirresistência no Estado do Rio de Janeiro 2021. **Informativo da Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar**, 2022.

COORDENAÇÃO ESTADUAL DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR (CECIH/RJ). Divulgação dos dados referentes a IRAS e Multirresistência no Estado do Rio de Janeiro 2022. **Informativo da Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar**, 2023.

CORBITT, J. *et al.* Type VI secretion system dynamics reveals a novel secretion mechanism in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 200, n. 11, p. 10.1128/jb. 00744-17, 2018.

CROUSILLES, A. *et al.* Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections?. **Future microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1825-1836, 2015.

DA CUNHA, LG. *et al.* ExoU-induced redox imbalance and oxidative stress in airway epithelial cells during *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. **Medical microbiology and immunology**, v. 204, p. 673-680, 2015.

DA ROCHA NEVES, ML. *et al.* A influência do quórum sensing na formação do biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e33910212659-e33910212659, 2021.

DIAZ, MH.; HAUSER, AR. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia. **Infection and immunity**, v. 78, n. 4, p. 1447-1456, 2010.

DE LIMA, CDM. *et al.* ExoU activates NF- κ B and increases IL-8/KC secretion during *Pseudomonas aeruginosa* infection. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41772, 2012.

- DE SOUSA, T. *et al.* The Impact of the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Dogs. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 5, p. 343, 2023.
- DENG, X. *et al.* Fis regulates type III secretion system by influencing the transcription of *exsA* in *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 669, 2017.
- EL-SOLH, AA. *et al.* Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Critical care medicine**, v. 40, n. 4, p. 1157, 2012.
- EL ZOWALATY, ME. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. **Future Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 1683-1706, 2015.
- ENGEL, J.; BALACHANDRAN, P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. **Current opinion in microbiology**, v. 12, n. 1, p. 61-66, 2009.
- EPELMAN, S. *et al.* Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 3, p. 2031-2040, 2004.
- ERTUGRUL, BM. *et al.* Risk factors for infection with *Pseudomonas aeruginosa* in diabetic foot infections. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 107, n. 6, p. 483-489, 2017.
- ESPINOSA-CAMACHO, L. *et al.* Complete genome sequences of four extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains, isolated from adults with ventilator-associated pneumonia at a tertiary referral hospital in Mexico City. **Genome Announcements**, v. 5, n. 36, p. 10.1128/genomea.00925-17, 2017
- EUTAMÈNE H. *et al.* LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK. **European Respiratory Journal**, v. 25, n. 5, p. 789-796, 2005.
- FARAJI, F. *et al.* Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. **Microbial pathogenesis**, v. 99, p. 1-4, 2016.
- FAZELI, N.; MOMTAZ, H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 16, n. 10, 2014.
- FERREIRA, ML. *et al.* Molecular epidemiological survey of the quinolone-and carbapenem-resistant genotype and its association with the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 262-271, 2015.
- FILE, T. *et al.* An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated respiratory infections due to contaminated food coloring dye-further evidence of the significance of gastric colonization preceding nosocomial pneumonia. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 16, n. 7, p. 417-418, 1995.

- FORTALEZA, C. Magno Castelo Branco *et al.* Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 96, n. 2, p. 139-144, 2017.
- FOULKES, DM. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU as a therapeutic target in the treatment of bacterial infections. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 707, 2019.
- FRESCHI, Luca *et al.* Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1036, 2015.
- FUENTEFRIA, Daiane Bopp; FERREIRA, Alessandra Einsfeld; CORÇÃO, Gertrudes. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: are they genetically related?. **Journal of environmental management**, v. 92, n. 1, p. 250-255, 2011.
- GALLE, M.; CARPENTIER, I.; BEYAERT, R. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, n. 8, p. 831-842, 2012.
- GAREY, KW. *et al.* Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Journal of chemotherapy**, v. 20, n. 6, p. 714-720, 2008.
- GESSARD, C. Des races du bacille pyocyanique. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 5, p. 65, 1891.
- GJØDSBØL K, *et al.* Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. **Int Wound J**. v. 3, n. 3 p. 225-31, 2006.
- GOLDSMITH, CS. *et al.* Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 2, p. 320, 2004.
- GOURE, J. *et al.* The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. **Infection and immunity**, v. 72, n. 8, p. 4741-4750, 2004.
- HADJADJ, J. *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 718-724, 2020.
- HAGHI, F. *et al.* Diversity of virulence genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. **Microbial pathogenesis**, v. 115, p. 251-256, 2018.
- HANAN, N. *et al.* The many faces of innate immunity in SARS-CoV-2 infection. **Vaccines**, v. 9, n. 6, p. 596, 2021.
- HARDY, KS. *et al.* ExoU induces lung endothelial cell damage and activates pro-inflammatory caspase-1 during *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Toxins**, v. 14, n. 2, p. 152, 2022.
- HAUSER, AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 654-665, 2009.

HAYASHI, W. *et al.* Antimicrobial resistance and type III secretion system virulotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs and cats in primary veterinary hospitals in Japan: identification of the international high-risk clone sequence type 235. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, p. e00408-21, 2021.

HE, C. *et al.* Bacterial nucleotidyl cyclase inhibits the host innate immune response by suppressing TAK1 activation. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 9, p. 10.1128/iai.00239-17, 2017.

HEIDARY, Z. *et al.* Virulence genes profile of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian children with UTIs. **Acta Medica Iranica**, p. 201-210, 2016.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280. e8, 2020.

HØIBY N, CIOFU O, BJARNSHOLT T. *Pseudomonas*. In Warnock D, editor, **ASM Manual of Clinical Microbiology**. 11 ed. p. 773-790. ASM Press. 2015.

HORNA, G.; RUIZ, J. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological research**, v. 246, p. 126719, 2021.

HU, H. *et al.* Type 3 secretion system effector genotype and secretion phenotype of longitudinally collected *Pseudomonas aeruginosa* isolates from young children diagnosed with cystic fibrosis following newborn screening. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 3, p. 266-272, 2013.

HUSZCZYNSKI, M; LAM, JS; KHURSIGARA, CM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. **Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 6, 2019.

JAVANMARDI, F. *et al.* A systematic review and meta-analysis on Exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 75, p. 104037, 2019.

JIA, J. *et al.* Expression of *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoS effectively induces apoptosis in host cells. **Infection and immunity**, v. 74, n. 12, p. 6557-6570, 2006

JEON, J. *et al.* T3SS effector ExoY reduces inflammasome-related responses by suppressing bacterial motility and delaying activation of NF- κ B and caspase-1. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 20, p. 3392-3403, 2017.

JOLY, BS.; SIGURET, V.; VEYRADIER, A. Understanding pathophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 8, p. 1603-1606, 2020.

JUAN, C.; PEÑA, C.; OLIVER, A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S44-S51, 2017.

- JURADO-MARTÍN, Irene; SAINZ-MEJÍAS, Maite; MCCLEAN, Siobhán. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 6, p. 3128, 2021.
- KIEDROWSKI MR, BOMBERGER JM. Viral-Bacterial Co-infections in the Cystic Fibrosis Respiratory Tract. **Front Immunol**. v. 9, n. 20, p. 3067, 2018.
- KHODAYARY, R. *et al.* High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes) in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian burn patients. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2019.
- KING, J. *et al.* Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Innate immunity**, v. 15, n. 5, p. 261-312, 2009.
- LEE, K; YOON, SS. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. 2017.
- KROKEN, AR. *et al.* The impact of ExoS on *Pseudomonas aeruginosa* internalization by epithelial cells is independent of *fleQ* and correlates with bistability of type three secretion system gene expression. **MBio**, v. 9, n. 3, p. 10.1128/mbio.00668-18, 2018.
- LIEW, SM. *et al.* Antimicrobial susceptibility and virulence genes of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **PeerJ**, v. 7, p. e6217, 2019.
- MALLET DE LIMA, CD. *et al.* Central role of PAFR signalling in ExoU-induced NF- κ B activation. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 1244-1254, 2014
- MARESSO, AW. *et al.* (2007), *Pseudomonas aeruginosa* ExoS ADP-ribosyltransferase inhibits ERM phosphorylation. *Cellular Microbiology*, v.9, p.97-105, 2007.
- MARSDEN, AE. *et al.* Vfr directly activates *exsA* transcription to regulate expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. **Journal of bacteriology**, v. 198, n. 9, p. 1442-1450, 2016.
- METRUCCHIO, MME. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles triggered by human mucosal fluid and lysozyme can prime host tissue surfaces for bacterial adhesion. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 871, 2016.
- MENSA, J. *et al.* Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 31, n. 1, p. 78, 2018.
- MIELKO, K. *et al.* Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1-11, 2019.
- MITOV, I.; STRATEVA, T.; MARKOVA, B. Prevalence of virulence genes among bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 588-595, 2010.
- MOAYERI, M. *et al.* Anthrax pathogenesis. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 185-208, 2015.

- MOHAMED, MF. *et al.* CrkII/Abl phosphorylation cascade is critical for NLRC4 inflammasome activity and is blocked by *Pseudomonas aeruginosa* ExoT. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 1295, 2022.
- MOSER, C. *et al.* Immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 625597, 2021.
- MORELLO, E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase LoxA contributes to lung infection by altering the host immune lipid signaling. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1826, 2019.
- MUTHUKUMARASAMY, Uthayakumar *et al.* Single-nucleotide polymorphism-based genetic diversity analysis of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 396-406, 2020.
- OCHOA, CD. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin Y is a promiscuous cyclase that increases endothelial tau phosphorylation and permeability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 30, p. 25407-25418, 2012.
- ONG T, RBW. Cystic Fibrosis: A Review. **JAMA**. Jun 6;329(21) p. 1859-1871, 2023.
- PARASHER, A. COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. **Postgraduate medical journal**, v. 97, n. 1147, p. 312-320, 2021.
- PARK, MH. *et al.* Difference of Type 3 secretion system (T3SS) effector gene genotypes (*exoU* and *exoS*) and its implication to antibiotics resistances in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronic otitis media. **Auris Nasus Larynx**, v. 44, n. 3, p. 258-265, 2017.
- PAULSSON, M. *et al.* Bacterial outer membrane vesicles induce vitronectin release into the bronchoalveolar space conferring protection from complement-mediated killing. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1559, 2018.
- PŁÓKARZ, D.; BIEROWIEC, K.; RYPUŁA, K. Screening for Antimicrobial Resistance and Genes of Exotoxins in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Infected Dogs and Cats in Poland. **Antibiotics**, v. 12, n. 7, p. 1226, 2023.
- POURNAJAF, A. *et al.* Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Infez Med**, v. 26, n. 3, p. 226-36, 2018.
- PROCOP, Gary W. *et al.* **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Jones & Bartlett Learning, 2020.
- RANGEL, SM.; LOGAN, LK.; HAUSER, AR. The ADP-ribosyltransferase domain of the effector protein ExoS inhibits phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. **MBio**, v. 5, n. 3, p. 10.1128/mbio.01080-14, 2014.
- RANGEL, SM. *et al.* The role of ExoS in dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004945, 2015.

RECIO, R. *et al.* Clinical and bacterial characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* affecting the outcome of patients with bacteraemic pneumonia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 58, n. 6, p. 106450, 2021.

RUTHERFORD, Victoria *et al.* Environmental reservoirs for *exoS*⁺ and *exoU*⁺ strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental microbiology reports**, v. 10, n. 4, p. 485-492, 2018.

SALIBA, AM. *et al.* Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 12, p. 1811-1822, 2005.

SANA, TG.; BERNI, B.; BLEVES, S. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 and their effectors: beyond bacterial-cell targeting. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 61, 2016.

SÁNCHEZ-DIENER, I. *et al.* Weighting the impact of virulence on the outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. **Clinical microbiology and infection**, v. 26, n. 3, p. 351-357, 2020.

SATHE, N. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and Novel Approaches to Treatment “Knowing the enemy” the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and exploring novel approaches to treatment. **Infectious Medicine**, 2023.

SAYNER, SL. *et al.* Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. **Circulation research**, v. 95, n. 2, p. 196-203, 2004.

SHAFIKHANI, SH.; MORALES, C.; ENGEL, J. The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 4, p. 994-1007, 2008.

STEFANI, S. *et al.* Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 6, p. 353-362, 2017.

SUN, J.; BARBIERI, JT. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 32794-32800, 2003.

TANG, JL.; ABBASI, K. What can the world learn from China’s response to covid-19?. **BMJ**, v. 375, 2021.

THI, MTT; WIBOWO, D; REHM, BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8671, 2020.

UMAKANTHAN, S. *et al.* Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Postgraduate medical journal**, v. 96, n. 1142, p. 753-758, 2020.

VALOT, Benoît *et al.* What it takes to be a *Pseudomonas aeruginosa*? The core genome of the opportunistic pathogen updated. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126468, 2015.

- VASIL, Michael L. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **The Journal of pediatrics**, v. 108, n. 5, p. 800-805, 1986.
- VERMA, N. *et al.* The Membrane-Integrated Steric Chaperone Lif Facilitates Active Site Opening of *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A. **Journal of computational chemistry**, v. 41, n. 6, p. 500-512, 2020.
- WAGENER, BM. *et al.* Exoenzyme Y contributes to end-organ dysfunction caused by *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in critically ill patients: an exploratory study. **Toxins**, v. 12, n. 6, p. 369, 2020.
- WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. Haemophore functions revisited. **Molecular microbiology**, v. 85, n. 4, p. 618-631, 2012.
- WAREHAM, DW.; CURTIS, MA. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. **International journal of medical microbiology**, v. 297, n. 4, p. 227-234, 2007.
- WIERSINGA, WJ. *et al.* Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. **Jama**, v. 324, n. 8, p. 782-793, 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance**. Geneva, WHO, 2017.
- YAHR, TL. *et al.* ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13899-13904, 1998.
- YAN, S; WU, G. Can biofilm be reversed through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*?. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1582, 2019.
- YOON, Sang Sun *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. **Developmental cell**, v. 3, n. 4, p. 593-603, 2002.
- ZHU, H. *et al.* Type III secretion system-associated toxins, proteases, serotypes, and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with keratitis. **Current eye research**, v. 31, n. 4, p. 297-306, 2006.

ANEXO – Comprovação de publicação de artigo científico



Role of Host and Bacterial Lipids in *Pseudomonas aeruginosa* Respiratory Infections

Pamella Constantino-Teles¹, Albane Jouault², Lhousseine Touqui² and Alessandra Mattos Saliba^{1*}

¹ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil, ² Sorbonne Université, Centre de Recherche Saint-Antoine, Inserm, Institut Pasteur, Mucoviscidose et Bronchopathies Chroniques, Département Santé Globale, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Gee W. Lau,
University of Illinois at Urbana-
Champaign, United States

Reviewed by:

Gloria Saberdn-Chávez,
National Autonomous University of
Mexico, Mexico
Jon Audia,
University of South Alabama,
United States

*Correspondence:

Alessandra Mattos Saliba
alessandra.saliba@uerj.br

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance
and Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 29 April 2022

Accepted: 07 June 2022

Published: 04 July 2022

Citation:

Constantino-Teles P, Jouault A,
Touqui L and Saliba AM (2022) Role of
Host and Bacterial Lipids
in *Pseudomonas aeruginosa*
Respiratory Infections.
Front. Immunol. 13:931027.
doi: 10.3389/fimmu.2022.931027

The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most common agents of respiratory infections and has been associated with high morbidity and mortality rates. The ability of *P. aeruginosa* to cause severe respiratory infections results from the coordinated action of a variety of virulence factors that promote bacterial persistence in the lungs. Several of these *P. aeruginosa* virulence mechanisms are mediated by bacterial lipids, mainly lipopolysaccharide, rhamnolipid, and outer membrane vesicles. Other mechanisms arise from the activity of *P. aeruginosa* enzymes, particularly ExoU, phospholipase C, and lipoxygenase A, which modulate host lipid signaling pathways. Moreover, host phospholipases, such as cPLA₂α and sPLA₂, are also activated during the infectious process and play important roles in *P. aeruginosa* pathogenesis. These mechanisms affect key points of the *P. aeruginosa*-host interaction, such as: i) biofilm formation that contributes to bacterial colonization and survival, ii) invasion of tissue barriers that allows bacterial dissemination, iii) modulation of inflammatory responses, and iv) escape from host defenses. In this mini-review, we present the lipid-based mechanism that interferes with the establishment of *P. aeruginosa* in the lungs and discuss how bacterial and host lipids can impact the outcome of *P. aeruginosa* respiratory infections.

Keywords: lipid, respiratory infection, *Pseudomonas aeruginosa*, phospholipase, inflammation, virulence

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a major etiological agent of both acute and chronic respiratory infections in immunocompromised and critically ill individuals. Several features explain the success of *P. aeruginosa* as an opportunistic pathogen, including the wide distribution of these bacteria in the environment (1, 2), the high frequency of multidrug-resistant strains (3–7), and the ability to produce an extensive and adaptable set of virulence factors, which are expressed depending on environmental conditions (8, 9).

In hospitalized patients, *P. aeruginosa* is usually associated with acute infections, representing one of the most common causes of hospital-acquired pneumonia (HAP) and the most isolated pathogen in ventilator-associated pneumonia (VAP) (10–12). Additionally, *P. aeruginosa* can persist in the lungs of individuals suffering from chronic respiratory diseases, such as cystic fibrosis (CF) or chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In fact, *P. aeruginosa* is the most frequently