

Estudo piloto do fenômeno quorum sensing e as respectivas alterações estruturais bioquímicas da *Pseudomonas aeruginosa* em Ágar Mueller Hinton, NaCl 0,9% e H₂O através da microespectroscopia no infravermelho.

I. M. Barbosa*, L. dos Santos* L. P. M. Neto* A. A. Martin*

*Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, Brasil.
e-mail: icarobiomedico@gmail.com

Resumo: *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram negativo, pertencente ao grupo de não fermentadores de glicose, considerado o maior agente causador de infecções oportunistas em ambiente nosocomial. Este bacilo possui a notável capacidade de se adaptar em diferentes nichos ecológicos como, por exemplo, água, solo, plantas e animais, devido a sua habilidade de modular um ou vários mecanismos moleculares, resultando em alterações estruturais bioquímicas a nível celular, sendo a maioria destas responsáveis por conferirem resistência a diversos agentes antimicrobianos. Neste trabalho foi desenvolvido um estudo piloto que evidenciou alterações estruturais bioquímicas moduladas por diferentes ambientes com diferentes gradientes e nutrientes através da microespectroscopia FTIR.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, Alterações Estruturais Bioquímicas, Análise estatística multivariada, Mecanismos de Resistência bacteriana, Micro-espectroscopia FTIR.

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is a gram negative bacillus, that belongs to the group of glucose non-fermenters, the largest cause of opportunistic infections in the nosocomial environment. This bacillus has a remarkable capacity to adapt to different ecological niches such as soil, water, plants, and animals, due to its ability to modulate one or more molecular mechanisms, resulting in biochemical structural alterations at the cellular level, most of those responsible for conferring resistance to various antimicrobial agents. In this work, a pilot study was developed which showed some biochemical structural changes modulated by different environments with different gradients and nutrients through FTIR microspectroscopy.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Structural Changes Biochemical, multivariate statistical analysis, Mechanisms of Bacterial Resistance, Micro-spectroscopy FTIR.

Introdução

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram negativo, pertencente ao grupo de não fermentadores de glicose, capaz de sobreviver e tolerar condições físicas e nutricionais extremas, adaptando-se em diferentes nichos ecológicos como, por exemplo, água, solo, plantas e animais. Por fazer parte da microbiota, raramente causa infecções em indivíduos saudáveis. Por outro lado, é considerada mundialmente a maior agente causadora de infecções oportunistas, principalmente em ambiente nosocomial podendo ser também isolada de várias fontes como equipamentos de terapia respiratória, reservatórios de água, cateteres, anti-sépticos e de outras

superfícies inanimadas, sempre associada a elevados índices de morbidade e mortalidade [1,2].

A capacidade que a *Pseudomonas aeruginosa* possui de se adaptar a diferentes nichos ecológicos demonstra a sua facilidade em modular um ou mais mecanismos moleculares como, por exemplo, diminuição ou ausência de expressão de porinas, aumento da expressão de bombas de efluxo resultando em alterações estruturais bioquímicas a nível celular de acordo com o tipo de ambiente, gradiente de concentração por exemplo. Sendo esses mesmos mecanismos moleculares responsáveis por induzir resistência a agentes antimicrobianos. Do ponto de vista clínico, esta bactéria é muito difícil de ser tratada devido a sua resistência intrínseca a diversos antibióticos, destacando ainda a sua habilidade de adquirir outros mecanismos de resistência a múltiplos grupos de agentes antimicrobianos comprovando que ela pode combinar mais de um ou todos os mecanismos de mutação e enzimáticos [3].

A microespectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica não destrutiva amplamente usada como referência nos campos de análises farmacêutica, química e na área de microbiologia, tendo como princípio a interação da luz do espectro eletromagnético com a amostra bacteriana, fornecendo informações dos principais componentes bioquímicos como, por exemplo, proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA permitindo diferenciar, classificar e identificar bactérias quanto ao gênero, espécie e até sub-espécies em tempo reduzido [4,5,6].

Empregar uma técnica diagnóstica que seja capaz de detectar tais mudanças estruturais nos abre novas perspectivas na identificação e diferenciação rápida de cepas resistentes das não resistentes, permitindo ainda determinar qual e/ou quais mecanismos moleculares envolvidos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é desenvolver um estudo piloto que evidencie alterações estruturais bioquímicas moduladas submetendo a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 5698 a diferentes ambientes com diferentes concentrações de nutrientes e eletrólitos. Foram usados os seguintes ambientes: Ágar Mueller Hinton, NaCl 0,9% e H₂O através da microespectroscopia FTIR em combinação com o método quimiométrico análise de componentes principais (PCA).

Material e Métodos

Cepa e Preparação da Amostra – A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 5698 foi gentilmente doada pela Coleção de Culturas Bacterianas de Infecções Hospitalares da FIOCRUZ, sendo subcultivada em placas com ágar Mueller Hinton a 37°C atingindo o tempo de crescimento de 8 horas. Por método de estampagem, foi diretamente coletada da

placa ficando a amostra em janela de ZnSe para posterior análise por microespectroscopia FTIR. Foram preparadas soluções com 500 μ L de água e soro fisiológico a 0,5 Mac Farland com a mesma bactéria. Após um intervalo de uma hora, foi depositado 10 μ L de cada solução em janelas de CaF₂, desidratadas, para posterior análise por microespectroscopia FTIR.

Análise por Microespectroscopia FTIR e tratamento dos dados – Foram obtidos 10 espectros para cada condição em modo ponto por transmissão no intervalo de 4000-900 cm⁻¹, com 32 varreduras realizadas e resolução espacial de 2 cm⁻¹ utilizando o espectrômetro Spectrum Spotlight 400 FT-IR (Perkin Elmer) equipado com detector MCT operando a temperatura do nitrogênio líquido. Todos os espectros foram pré-processados usando o software OPUS® v.4.2.

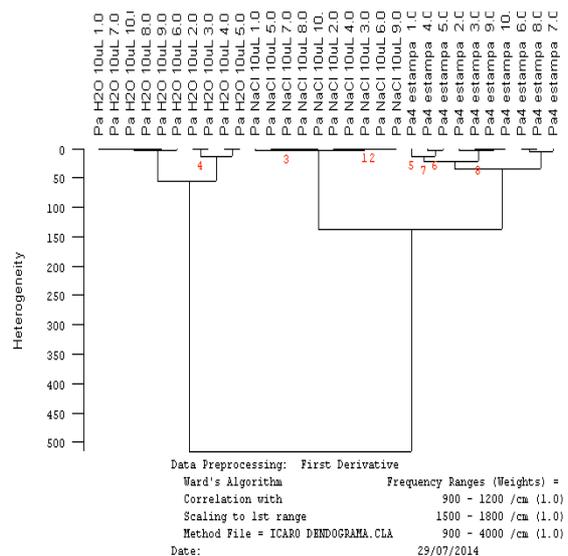
Métodos Quimiométricos – Análise de componentes principais foi aplicada neste caso, pois reduz um conjunto de dados multivariados, transformando em componentes ortogonais que são combinações lineares das variáveis originais, sendo estas variáveis, cada espectro obtido, para um componente particular, aonde cada componente em particular explica grande parte das variâncias usando o software Minitab® v.16.2.1. [8]

Resultados e Discussão

Avaliação da diferenciação estrutural bioquímica por algoritmo de Wards – Para evidenciar a diferenciação bioquímica estrutural, dependemos exclusivamente de um fenômeno chamado *Quorum sensing*, que pode ser definido como a capacidade de um determinado micro-organismo em reconhecer através de vários fatores externos, por exemplo, a concentração de determinadas moléculas, autoinduzir mudanças estruturais em sua parede quando se depara com diferentes e/ou extremas condições ambientais para se adaptar [7]. Neste trabalho, a *Pseudomonas aeruginosa* foi submetida em três diferentes condições ambientais e nutricionais sendo elas: Placa com Agar Mueller Hinton (Pa4 estampa), NaCl 0,9% (Pa NaCl 10 uL) e H₂O (Pa H2O 10 uL) respectivamente.

Conforme visto na figura 1, é demonstrada a variação da composição estrutural bioquímica deste micro-organismo quando partimos de um meio aquoso sem nenhum eletrólito, no caso, H₂O e à medida que aumentamos a gradiente de concentração eles assumem configurações estruturais bioquímicas inerentes ao meio em que se encontram, obtendo uma excelente discriminação entre os diferentes grupos.

Figura 1 – Dendrograma da *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes condições ambientais:



Para esta e as análises posteriores foram pré-definidas três regiões espectrais compreendidas em:

900-1200 cm⁻¹ – Referem-se a grupos funcionais de DNA e açúcares.

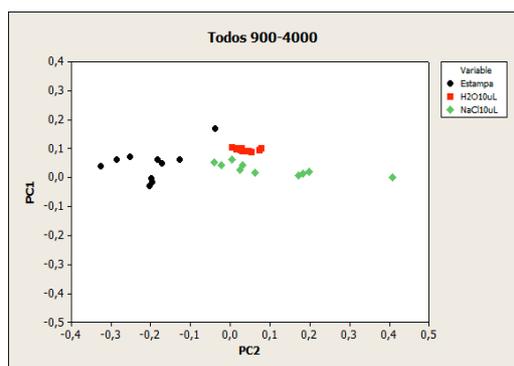
1500-1800 cm⁻¹ – Referem-se a grupos funcionais e Lipídeos e proteínas.

900-4000 cm⁻¹ – Refere-se a todo espectro da *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes condições.

Avaliação da diferenciação estrutural bioquímica por análise de componentes principais em diferentes regiões espectrais – Esse método permitiu explorar detalhadamente cada uma das regiões através das duas primeiras principais componentes (PC1 e PC2), que juntas representam a maior parte da variabilidade presente entre as amostras (70-80%), associando as diferentes condições ambientais e nutricionais em que a *P. aeruginosa* foi submetida. Foram analisados comparativamente os grupos Estampa versus H₂O 10 uL versus NaCl 10 uL nas regiões de 900-4000 cm⁻¹ (fig.2), 900-1200 cm⁻¹ (fig.3) e 1500-1800 cm⁻¹ (fig.4).

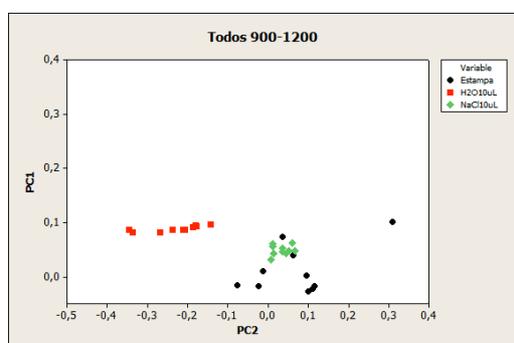
Ao analisarmos a região espectral compreendida entre 900-4000 cm⁻¹ conforme figura 2, o grupo estampa apresentou um deslocamento negativo em PC2 quando comparado aos outros grupos submetidos a condições aquosas durante 1 hora, indicando que na presença de meio sólido, há ausência ou diminuição da expressão de determinados constituintes presentes apenas quando elas estão meio aquoso.

Figura 2 – Análise de componentes principais da região 900-4000 cm⁻¹.



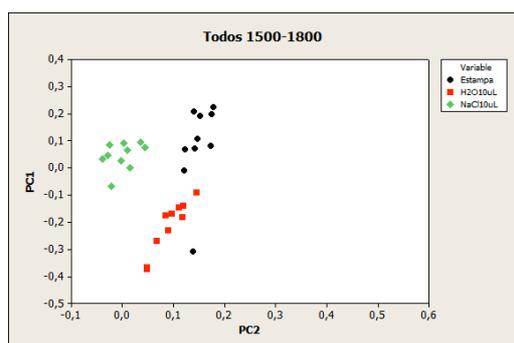
Na região entre 900-1200 cm^{-1} conforme figura 3, que representa principalmente os grupos funcionais de DNA e carboidratos, percebemos um deslocamento negativo apenas pelo grupo H_2O no eixo de PC2 quando comparado aos outros grupos, indicando a redução ou ausência destes constituintes nesta condição.

Figura 3 – Análise de componentes principais da região 900-1200 cm^{-1} .



Já na região entre 1500-1800 cm^{-1} conforme figura 4, que representa principalmente os grupos funcionais de lipídeos e proteínas, percebemos um deslocamento negativo apenas pelo grupo H_2O no eixo de PC1 quando comparado aos outros grupos, indicando neste caso por se tratar de um meio hidrofílico, um rearranjo estrutural bioquímico com perfil negativo associado a moléculas com características hidrofóbicas.

Figura 4 – Análise de componentes principais da região 1500-1800 cm^{-1} .



Conclusão

Este trabalho teve por objetivo evidenciar as diferenças bioquímicas estruturais da *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes ambientes: Agar Mueller Hinton, NaCl 0,9% e H_2O . Neste estudo piloto foi utilizada a técnica de microespectroscopia FTIR combinada à análise de PCA.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível evidenciar de maneira direta a correlação entre as alterações estruturais bioquímicas nos três diferentes ambientes em que a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 5698 foi submetida. Essas diferenças foram detectadas em distintas regiões espectrais, discriminando claramente cada um dos grupos.

Através deste estudo preliminar da análise do fenômeno *Quorum Sensing*, associado ou não a um fenótipo de resistência por parte do micro-organismo, em determinados ambientes com diferentes condições nutricionais em função do tempo, usando FTIR e PCA viabiliza diagnosticar e diferenciar cepas com diferentes perfis de resistência. Contribuindo, dentro da engenharia biomédica, desenvolvimento de métodos, protocolos e validações de identificação em tempo reduzido (6-8h) dos mecanismos de resistência empregado pelo micro-organismo em questão, corroborando para o emprego da correta estratégia terapêutica em micro-organismo que apresentem fenótipo de multiresistência.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] KONEMAN, E. W. *et al.* *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- [2] LISTER, P.D.; WOLTER, D.J.; HANSON, N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 22(4):582-610,2009.
- [3] STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology.* (2009),58,1133-1148.
- [4] MAQUELIN, K. *et al.* Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, v. 51, p. 255–271.
- [5] MAQUELIN, K. *et al.* Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 324–329, 2003.
- [6] NAUMANN, D. *Infrared Spectroscopy in Microbiology*. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000, p. 102–131.
- [7] BAYSSE, C. *et al.* Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology* (2005), 151, 2529-2542.

- [8] MARIEY, L. et al. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, v. 26 151- 159, 2001.