

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

BÁRBARA ALVARENGA ALVAREZ

**COMPARAÇÃO FENOTÍPICA E GENÉTICA ENTRE
Pseudomonas aeruginosa SENSÍVEL E RESISTENTE A
POLIMIXINA B, COM FOCO EM FATORES DE VIRULÊNCIA**

Bragança Paulista
2025

BÁRBARA ALVARENGA ALVAREZ – R.A.: 202429615

**COMPARAÇÃO FENOTÍPICA E GENÉTICA ENTRE
Pseudomonas aeruginosa SENSÍVEL E RESISTENTE A
POLIMIXINA B, COM FOCO EM FATORES DE VIRULÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Thiago Rojas Converso

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raquel Girardello

Bragança Paulista
2025

QW 131
A474c

Alvarez, Bárbara Alvarenga
Comparação fenotípica e genética entre
Pseudomonas aeruginosa sensível e resistente a
Polimixina B, com foco em fatores de virulência /
Bárbara Alvarenga Alvarez. -- Bragança Paulista, 2026.
48 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-
Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco.

Orientação de: Thiago Rojas Converso.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Polimixina B.
3. Fatores de virulência. I. Converso, Thiago Rojas.
II. Título.



ALVAREZ, Bárbara Alvarenga. "Comparação fenotípica e genética entre *Pseudomonas Aeruginosa* sensível e resistente a Polimixina B, com foco em fatores de virulência". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 10 de fevereiro de 2026 pela Banca examinadora constituída pelos(as) professores(as):

Prof(a). Dr(a). Thiago Rojas Converso - Orientador(a) e Presidente
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Carina Carvalho dos Santos
(por videoconferência)
Universidade Federal da Bahia

Prof(a). Dr(a). Thais Parisotto Ulmer
Universidade São Francisco

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria muito presente no meio ambiente, principalmente em áreas úmidas, podendo ser encontrada tanto no solo como na água. Em seres humanos, pode colonizar indivíduos saudáveis, sendo frequentemente encontradas nas regiões das axilas e em área genital. No entanto, a bactéria também pode causar infecções de gravidade variável, desde lesões superficiais até quadros sérios que podem evoluir a óbito, especialmente em pacientes imunossuprimidos ou com algum tipo de patologia associada. Sua presença em hospitais é preocupante pois podem ser encontradas em soluções antissépticas vencidas, lavatórios, sanitários, tubulação de água e dispositivos médicos como, cateteres, tubos de respiração e ventiladores mecânicos, onde formam uma grande quantidade de biofilme, dificultando os procedimentos terapêuticos. Temos como objetivo avaliar mudanças no fenótipo, genótipo, virulência, na formação e adesão de biofilme em cepas clínicas de *P. aeruginosa* sensíveis e resistentes a polimixina B. Para isso, a resistência ao antibiótico polimixina B foi induzida em cepas selecionadas do banco de microrganismos do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco. Foram realizados testes de microdiluição para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), curvas de crescimento ao longo de 32 horas, curvas de crescimento sob agitação, quantificação da formação de biofilme em superfície abiótica por coloração com cristal violeta, absorvância e contagem de unidades formadoras de colônia. Após um mês de indução, todas as cepas tornaram-se resistentes, apresentando concentrações inibitórias mínimas variando entre 16 µg/mL e 64 µg/mL. As curvas de crescimento em condições estáticas demonstraram que as cepas resistentes 1087, 1089 e 2744 exibiram taxas de crescimento superiores, além de um aumento significativo na formação de biofilme, em comparação com suas respectivas cepas sensíveis. Essa diferença foi confirmada por meio da coloração com cristal violeta, leitura de absorvância e pela quantificação de células viáveis recuperadas. Em relação ao ensaio de motilidade em 12 horas, houve um deslocamento maior das cepas sensíveis 1089, 2744 e 2626, e a cepa 1087 resistente apresentou maior motilidade que sua versão sensível enquanto a cepa 2636 não demonstrou diferenças significativas em 12 horas, somente dentro de 24 horas apresentou uma motilidade maior da sua cepa resistente em relação a sua sensível; já as demais em 24 horas não apresentaram diferenças relevantes considerando-se as cepas resistentes e sensíveis. Quanto às análises genéticas, observou-se uma diminuição da expressão dos genes *pmrA*, *pmrB*, *phoQ* e *phoP* das cepas 1087, 1089, 2744 e 2636 resistentes em comparação com suas versões sensíveis; porém a cepa 2626 resistente apresentou um aumento significativo na expressão dos genes em comparação com sua versão sensível, diferindo das demais cepas. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a indução de resistência foi eficiente em todas as cepas clínicas avaliadas. Observou-se ainda que os mecanismos de resistência variam conforme o isolado e sua variabilidade genética, podendo envolver a formação de biofilme, a atuação de sistemas reguladores de dois componentes, a regulação negativa de porinas da membrana externa, entre outros mecanismos que favorecem a sobrevivência bacteriana.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Resistência bacteriana. Polimixina B.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a bacterium that is very common in the environment, especially in humid areas, and can be found in both soil and water. In humans, it can colonize healthy individuals, frequently being found in the armpits and genital area. However, the bacterium can also cause infections of varying severity, from superficial lesions to serious conditions that can lead to death, especially in immunocompromised patients or those with some type of associated pathology. Its presence in hospitals is concerning because it can be found in expired antiseptic solutions, sinks, toilets, water pipes, and medical devices such as catheters, breathing tubes, and mechanical ventilators, where it forms a large amount of biofilm, hindering therapeutic procedures. Our objective was to evaluate changes in phenotype, genotype, virulence, biofilm formation, and adhesion in clinical strains of *P. aeruginosa* sensitive and resistant to polymyxin B. To this end, resistance to the antibiotic polymyxin B was induced in selected strains from the microorganism bank of the *Stricto Sensu* Postgraduate Program in Health Sciences, approved by the Research Ethics Committee of the University of São Francisco. Microdilution tests were performed to evaluate the minimum inhibitory concentration (MIC), growth curves over 32 hours, growth curves under agitation, quantification of biofilm formation on abiotic surfaces by crystal violet staining, absorbance, and colony-forming unit count. After one month of induction, all strains became resistant, showing minimum inhibitory concentrations ranging from 16 µg/mL to 64 µg/mL. Growth curves under static conditions demonstrated that resistant strains 1087, 1089, and 2744 exhibited higher growth rates, as well as a significant increase in biofilm formation, compared to their respective susceptible strains. This difference was confirmed by crystal violet staining, absorbance reading, and quantification of recovered viable cells. Regarding the 12-hour motility assay, there was a greater displacement of the susceptible strains 1089, 2744, and 2626, and the resistant strain 1087 showed greater motility than its susceptible version, while strain 2636 did not show significant differences at 12 hours. Only within 24 hours did it show greater motility in its resistant strain compared to its susceptible strain; the others did not show relevant differences at 24 hours considering both resistant and susceptible strains. Regarding genetic analyses, a decrease in the expression of the *pmrA*, *pmrB*, *phoQ*, and *phoP* genes was observed in the resistant strains 1087, 1089, 2744, and 2636 compared to their susceptible versions; however, the resistant strain 2626 showed a significant increase in gene expression compared to its susceptible version, differing from the other strains. According to the results obtained, it was found that the induction of resistance was efficient in all clinical strains evaluated. It was also observed that the resistance mechanisms vary according to the isolate and its genetic variability, and may involve biofilm formation, the action of two-component regulatory systems, the negative regulation of outer membrane porins, among other mechanisms that favor bacterial survival.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial resistance. Polymyxin B.