

Letícia Busato Migliorini

**Papel dos mecanismos de reparo de DNA na resposta de
Pseudomonas aeruginosa aos antimicrobianos Ciprofloxacina e
Ceftazidima**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Rodrigo da Silva Galhardo

Versão Original

São Paulo

2017

RESUMO

MIGLIORINI, L. B. **Papel dos mecanismos de reparo de DNA na resposta de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos Ciprofloxacina e Ceftazidima.** 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Pseudomonas aeruginosa é um importante patógeno oportunista humano que tem emergido como um dos principais agentes de infecções nosocomiais. A resistência de *P. aeruginosa* aos antibióticos é um problema de saúde pública mundial. As ações diretas ou indiretas provocadas pelos antibióticos, como a formação de espécies reativas de oxigênio, podem levar à ativação de respostas mutagênicas que regulam a expressão de polimerases de baixa fidelidade, que atuam na Síntese Translesão de DNA (TLS). Neste trabalho, nós avaliamos a resposta de *P. aeruginosa*, frente à Ceftazidima (CAZ) e Ciprofloxacina (CIP). Nossos dados demonstram que CAZ, não induz a resposta SOS e nem mutagênese em *P. aeruginosa*, diferentemente de CIP. Demonstramos que as três polimerases de TLS estão envolvidas na mutagênese induzida por CIP e peróxido de hidrogênio. Além disso, observamos que a perda de qualquer uma das polimerases alterou significativamente o espectro de mutações espontâneas e induzidas por CIP. As mutações predominantes são de deleções curtas na cepa selvagem, e a proporção deste tipo de mutação é reduzida nos mutantes de polimerases, sugerindo que essas polimerases são responsáveis pelo surgimento destas deleções, e que possuem funções redundantes neste processo mutagênico. Assim, demonstramos que as polimerases de TLS são importantes para a mutagênese induzida por CIP em *P. aeruginosa*, e podem estar implicadas na mutagênese adaptativa e, consequentemente, na resistência bacteriana.

Palavras-chave: Antibióticos. Resistência bacteriana. Resposta SOS. Lesões oxidativas. *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

MIGLIORINI, L. B. **Role of DNA repair mechanisms in the response of *Pseudomonas aeruginosa* to the antimicrobials Ciprofloxacin and Ceftazidime.** 2017. 77 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Pseudomonas aeruginosa is an important human opportunistic pathogen that has emerged as a major agent of nosocomial infections. *P. aeruginosa* resistance to antibiotics is a worldwide public health problem. The direct or indirect actions caused by antibiotics, such as the formation of reactive oxygen species, may lead to the activation of mutagenic responses that regulate the expression of low fidelity polymerases that act on Translesion DNA Synthesis (TLS). In this work, we evaluated the response of *P. aeruginosa* to Ceftazidime (CAZ) and Ciprofloxacin (CIP). Our data demonstrate that CAZ does not induce neither SOS response nor mutagenesis in *P. aeruginosa*, unlike CIP. We demonstrate that the three TLS polymerases are involved in mutagenesis induced by CIP and hydrogen peroxide, but in the latter, in smaller proportions. In addition, we report that the loss of any of the polymerases significantly altered the spectrum of spontaneous and CIP-induced mutations. The predominant mutations are short deletions in the wild-type strain, and the proportion of this mutation type is reduced in the polymerase mutants, suggesting that these polymerases are responsible for the deletions and that have redundant functions in this mutagenic process. In this sense, we show that the TLS polymerases are important for CIP-induced mutagenesis in *P. aeruginosa*, and may be involved in adaptive mutagenesis and, consequently, in bacterial resistance.

Keywords: Antibiotics. Bacterial resistance. SOS Response. Oxidative lesions. *Pseudomonas aeruginosa*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* pertence à classe das *Gammaproteobacterias*, a qual compreende um grande e diversificado grupo de bactérias ubíquas encontradas no solo, água, plantas e animais, e também conhecidas por apresentarem grande plasticidade genética e versatilidade metabólica (GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003).

Dentre as espécies pertencentes a esta classe, *Pseudomonas aeruginosa* representa um importante patógeno oportunista humano que tem emergido como uma das principais causas de infecções nosocomiais (GOLDBERG, 2010; OSMAN et al., 2010; VINCENT, 2003). Na América Latina, *Pseudomonas* spp. é responsável por 31,2% dos casos de pneumonia, 13,8% das infecções da pele e dos tecidos moles e 7,5% das infecções de corrente sanguínea (GALES et al., 2012).

Em geral, *P. aeruginosa* é responsável por 11,0 a 13,8 % das infecções hospitalares. Sendo que em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) pode chegar a 20%, incluindo a participação de isolados multirresistentes, o que vem dificultando o controle da infecção nesse ambiente (SUAREZ et al., 2011). As taxas de isolados de *P. aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas, por exemplo, já chegam a 30%, segundo dados do SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (SADER et al., 2014)

A alta prevalência de *P. aeruginosa* pode se dar pela capacidade em formar biofilme e manter-se viável por muito tempo em superfícies abióticas, como cateteres e equipamentos hospitalares (EL-KHOLY et al., 2012). Além disso, a alta resistência intrínseca e adquirida a antimicrobianos apresentada por esta bactéria, dificulta a sua erradicação do ambiente hospitalar (WOLTER et al., 2009; YORDANOV; STRATEVA, 2009).

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva que provoca aumento da viscosidade de secreções das vias aéreas inferiores, facilitando infecções crônicas, principalmente por *P. aeruginosa* (FIRMIDA, 2011; LYCZAK; CANNON; PIER, 2002). Dados recentes mostram que 80% dos pacientes com FC não resistem à insuficiência respiratória causada pela infecção crônica por esta bactéria (BHAGIRATH et al., 2016).

Ademais, para sobreviver no ambiente pulmonar, *P. aeruginosa* deve suportar diversos tipos de estresse, como: estresse osmótico, deficiência nutricional, competição com outros microrganismos, estresse oxidativo, etc. Para isso, alterações no perfil de expressão

gênica ocorrem, adaptando essa bactéria as condições de estresse (GOODMAN et al., 2004). Devido à persistência da infecção e à terapia prolongada com antimicrobianos, há relatos de isolados hipermutadores, os quais possuem deficiência em diferentes sistemas de reparo de DNA. Sendo que alguns podem acumular altos níveis de 7,8-dihidro-8-oxodeoxyguanosina (8-oxodG) (CIOFU et al., 2005; FOWLER et al., 2003) tornando-os mais propensas à adquirir mutações, que os deixam adaptados ao estresse e muitas vezes resistentes à terapêutica (DÖRING et al., 2000; OLIVER et al., 2000).

P. aeruginosa possui um genoma de 6,3 Mb e comporta uma grande versatilidade metabólica que permite a rápida adaptação a uma gama de estresses, dentre eles os antimicrobianos (GOH et al., 2002; OLSON et al., 2000).

1.2 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são compostos amplamente utilizados na clínica médica contra infecções bacterianas. Para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, dois antimicrobianos amplamente empregados são: Ciprofloxacina (CIP) e Ceftazidima (CAZ) (HAWKEY, 2003; VAN BAMBEKE et al., 2005).

A CAZ é uma Cefalosporina que pertence à classe dos beta-lactâmicos. Este grupo de antibióticos tem em comum uma estrutura central, o anel beta-lactâmico, que interage com as Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBPs), inibindo a sua função. As PBPs são transpeptidases responsáveis pela ligação cruzada entre as cadeias peptídicas do peptídeoglicano, que confere rigidez a parede celular e protege a bactéria de variações osmóticas do meio. Logo, o efeito bactericida da CAZ se dá pela inibição da síntese e perda de rigidez da parede celular bacteriana (BECEIRO; TOMAS; BOU, 2013; DRAWZ; BONOMO, 2010; GUIMARÃES, 2010).

A CIP pertence à classe das Fluoroquinolonas de segunda geração. É o quimioterápico mais utilizado em todo mundo devido ao seu amplo espectro de atividade (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014; KIFFER et al., 2011). Seu efeito bactericida consiste na interação e consequente inibição da atividade das enzimas DNA girase e DNA topoisomerase IV. Estas são topoisomerase do tipo II, que promovem o superenovelamento do DNA, importante para o desenvolvimento bacteriano (DRLICA; ZHAO, 1997; HAWKEY, 2003). Como consequência desta inibição, quebras duplas na fita de DNA são formadas. Como causadores de danos no DNA, os antimicrobianos desta classe são reconhecidos como

indutores da resposta celular a danos no DNA, a resposta SOS (DRLICA et al., 2008; DRLICA; ZHAO, 1997) que será estudada ao longo deste trabalho.

A medicina veterinária vem utilizando os antimicrobianos para tratamento de infecções, mas também como promotores de crescimento em animais. O aumento do consumo e, conseqüentemente, da eliminação de antimicrobianos no meio tem provocado diversos impactos no ecossistema (GUARDABASSI et al., 2008), já que 30-90% desses fármacos ingeridos por animais e humanos são excretados intactos ao ambiente (Figura 1). Logo concentrações subinibitórias de antimicrobianos são encontradas no solo e água (HUANG et al., 2005; LIU et al., 1999; PLETZ et al., 2004).

Essas concentrações subletais presentes no meio ambiente ou geradas em certos compartimentos do corpo devido a fatores farmacocinéticos da droga, que criam gradientes de concentração, podem promover alterações na fisiologia bacteriana: morfologia, virulência, resistência e habilidade para produzir variações genéticas. Apesar de serem concentrações baixas de antimicrobianos, quando mantidas, podem funcionar como força seletiva selecionando cepas com baixo e alto nível de resistência ou ainda cepas hipermutadoras (BAQUERO; TEDIM; COQUE, 2013; DAVIES; SPIEGELMAN; YIM, 2006; GMLLBERG et al., 2011; LORIAN, 1975).

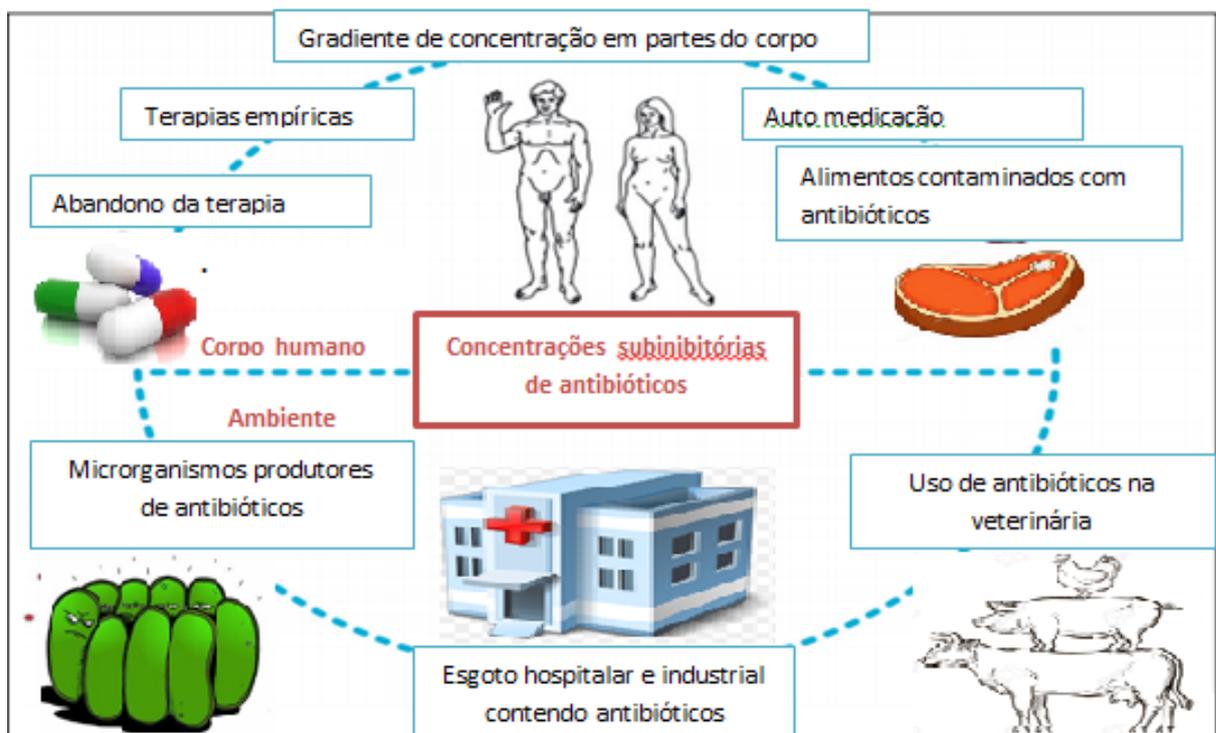


Figura 1 - As diferentes origens das concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos. Dos compartimentos do corpo a resíduos industriais, pecuários e hospitalares. Fonte: modificado de Blázquez, 2012.

1.3 Estresse oxidativo: um mecanismo de ação comum aos antibióticos?

Além do mecanismo de ação específico de cada antimicrobiano, um dos efeitos comuns que podem contribuir para a sua letalidade, é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em bactérias (KOHANSKI et al., 2007). O radical hidroxila é uma espécie reativa de oxigênio extremamente reativa com substratos orgânicos, incluindo a molécula de DNA, resultando principalmente na retirada de átomos de hidrogênio do açúcar desoxirribose e adição de ligações insaturadas em bases nucleotídicas (HALLIWELL, 1999). ROS podem resultar em severos danos à molécula de DNA, dentre eles, quebras nas fitas do DNA e perda de bases, sendo altamente genotóxicos, o que contribui para o potencial mutagênico e efeito citotóxico destes compostos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; IMLAY; CHIN; LINN, 1988). Uma importante lesão no DNA provocada por ROS é a oxidação da guanina, levando à formação de 8-oxoguanina (8-oxoG), que devido a conformação alterada, é capaz de parear-se com resíduos de adenina, resultando em mutações de transversão após a replicação, contribuindo para o aumento da taxa de mutação em bactérias (FRIEDBERG et al., 2006).

Kohanski e colaboradores demonstraram que as três principais classes de antimicrobianos bactericidas (fluoroquinolonas, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos) tem a capacidade de induzir a formação de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) via reação química de Fenton, em *E. coli*. A interação primária sítio específica do antibiótico estimula a oxidação de NADH, via hiperativação da cadeia transportadora de elétrons, levando a formação de superóxidos. Os superóxidos danificam grupamentos ferro-enxofre, liberando o íon Fe^{2+} para oxidação na reação de Fenton. A Reação de Fenton leva à formação de radicais hidroxila que danificam DNA, lipídeos e proteínas contribuindo para a morte celular. Por isso, acredita-se que o estresse oxidativo pode contribuir para o efeito bactericida dos antimicrobianos (DWYER; KOHANSKI; COLLINS, 2009; KOHANSKI, 2007) (Figura 2).

Assim, uma vez que a bactéria possui genes que reparam os danos oxidativos, estes sistemas poderiam eliminar o dano, diminuindo a eficácia do antimicrobiano. Neste sentido, é interessante analisar o comportamento dos mutantes em vias de reparo de estresse oxidativo quanto à sua sensibilidade aos antimicrobianos. Uma vez que estes mutantes não reparam danos oxidativos, em teoria, o acúmulo destes seria altamente letal para as células, tornando-os mais sensíveis.

Cabe ressaltar que o envolvimento do estresse oxidativo na atividade bactericida dos antimicrobianos é um tema controverso. Alguns autores reportaram para *E. coli*, que a atividade bactericida de β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, sob condições

anaeróbicas e aeróbicas, mantiveram-se iguais (KEREN et al., 2013; LIU; IMLAY, 2013). Os mutantes com deficiência em atividades de peroxidase e catalases não apresentaram maior sensibilidade do que a cepa parental. Inclusive mostraram que a atividade respiratória não foi suficientemente alterada para contribuir para a toxicidade via aumento do estresse oxidativo. Assim, suportam a ideia que a letalidade destes compostos é devido ao mecanismo de ação específico de cada antimicrobiano, como inibição da síntese da parede celular, síntese proteica e replicação do DNA e não necessariamente pela produção de ROS testados por eles (LIU; IMLAY, 2013).

Por outro lado, os agentes oxidantes, independente de contribuírem para a ação bactericida de antimicrobianos, podem contribuir para a mutagênese, causando danos às bases de DNA que podem ser pareadas erroneamente com outras bases, ou mesmo promovendo quebras na dupla fita de DNA que é um sinal para a ativação de respostas à danos, como a SOS. Esta por sua vez, compreende polimerases de baixa fidelidade que ignoram a lesão no DNA e dão sequência à replicação de DNA, inserindo aleatoriamente os nucleotídeos à fita nascente. Por isso, torna-se importante conhecer se os antimicrobianos, de uma maneira direta ou indireta, ativam respostas mutagênicas em bactérias, já que as mutações estão associadas à resistência bacteriana.

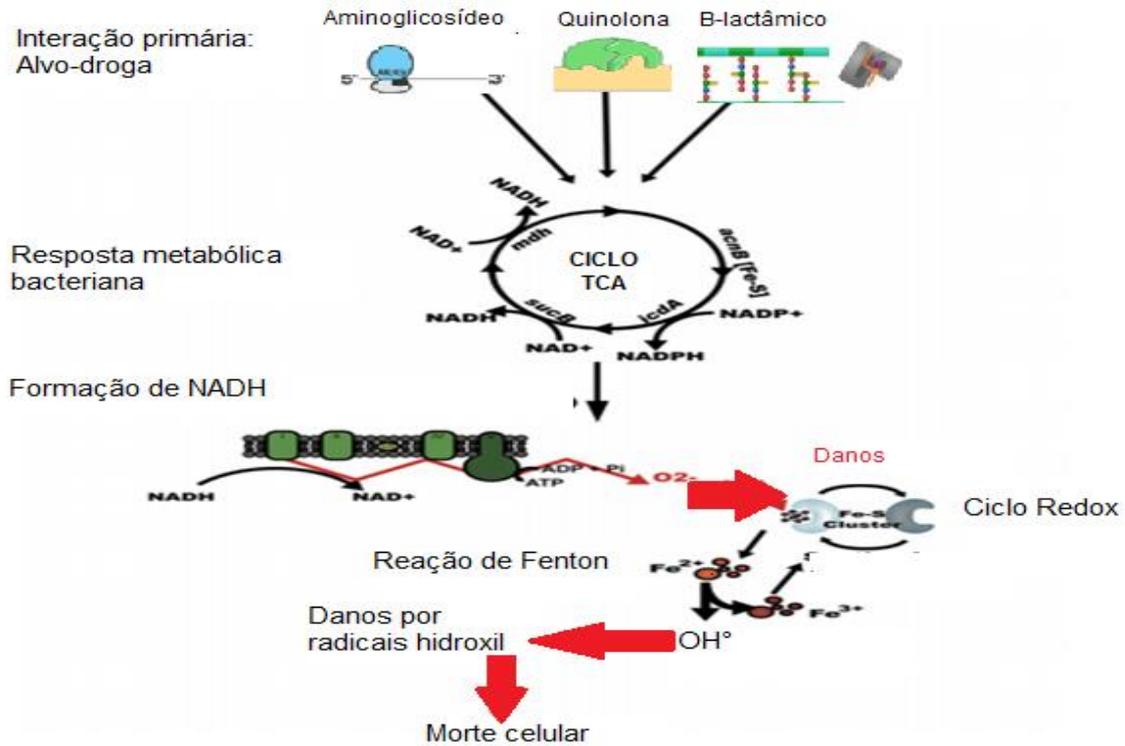


Figura 2 - A interação primária alvo-droga e a produção de ROS. Aminoglicosídeo com o ribossomo, quinolona com DNA girase e beta-lactâmico com PBP podem estimular a oxidação de NADH via cadeia transportadora de elétrons que é dependente do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). A hiperativação da cadeia transportadora de elétrons estimula a formação de superóxidos. Os superóxidos danificam os grupos ferro-enxofre, tornando Fe²⁺ disponível para oxidação via reação de Fenton. Fonte: Modificado de Kohanski, 2007.

Além dos antimicrobianos, que são o foco principal deste trabalho, utilizamos outro agente genotóxico, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), para avaliar o papel das polimerases propensas a erros e comparar a resposta de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos e à ROS.

O peróxido de hidrogênio é um importante composto químico que se difunde facilmente através da membrana celular, e atua como um forte oxidante quando decomposto a radical hidroxila [\cdot OH] por íons Fe²⁺ ou Cu¹⁺ na reação de Fenton (FRIEDBERG et al., 2006). As ROS podem também ser geradas indiretamente através da hidrólise da molécula de água por radiações ionizantes (FRIEDBERG et al., 2006) e através do contato da bactéria com alguns antimicrobianos bactericidas, com beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (DWYER et al., 2007; KOHANSKI et al., 2007, 2008).

1.4 Resposta bacteriana ao estresse

As bactérias respondem diferentemente a estresses letais e subletais (Figura 3). Em *E. coli*, sob concentrações letais de antimicrobianos (ampicilina), peróxido de hidrogênio e choque térmico (45°C), há diminuição do metabolismo energético e da síntese de proteínas não essenciais, supressão do crescimento e divisão celular, redirecionando energia para manutenção e reparo celular (KALDALU et al., 2004; ASAKURA et al., 2009; JOZEF CZUK et al., 2010). Já em concentrações sub-letais de antimicrobianos, não há grande redução do crescimento nem morte celular, demonstrando que as bactérias são capazes de ajustar o perfil de expressão gênica e metabolismo para responder ao estresse induzido e manter o rápido crescimento. A exposição a sub-CIM de antimicrobianos é algo que merece atenção, também por promover a tolerância cruzada a muitos outros tipos de estresse (UV, MMS e outras classes de antibióticos) que não o relacionadas com o estresse indutor, tudo isso sem alterar o metabolismo celular, a ponto da bactéria conseguir se proliferar normalmente carregando todo tipo de mutação (BATTESTI; MAJDALANI; GOTTESMAN, 2011; MATHIEU et al., 2016).

Cirz e colaboradores reportaram também que concentrações subinibitórias de ciprofloxacina promovem mutagênese em *E. coli*, através da mesma via que UV e raios X e gamma, pela indução de polimerases propensas a erros (CIRZ et al., 2005a). Logo, acredita-se em um núcleo geral de resposta bacteriana a estresse a qual é ativada por diferentes indutores, conduzindo a mesma resposta e que podem promover uma tolerância cruzada, inclusive a antimicrobianos (MATHIEU et al., 2016). Na clínica médica isso é relevante, uma vez que a exposição à sub-CIM de um antimicrobiano pode promover a tolerância à outras drogas, já que podem partilhar do mesmo núcleo de respostas.

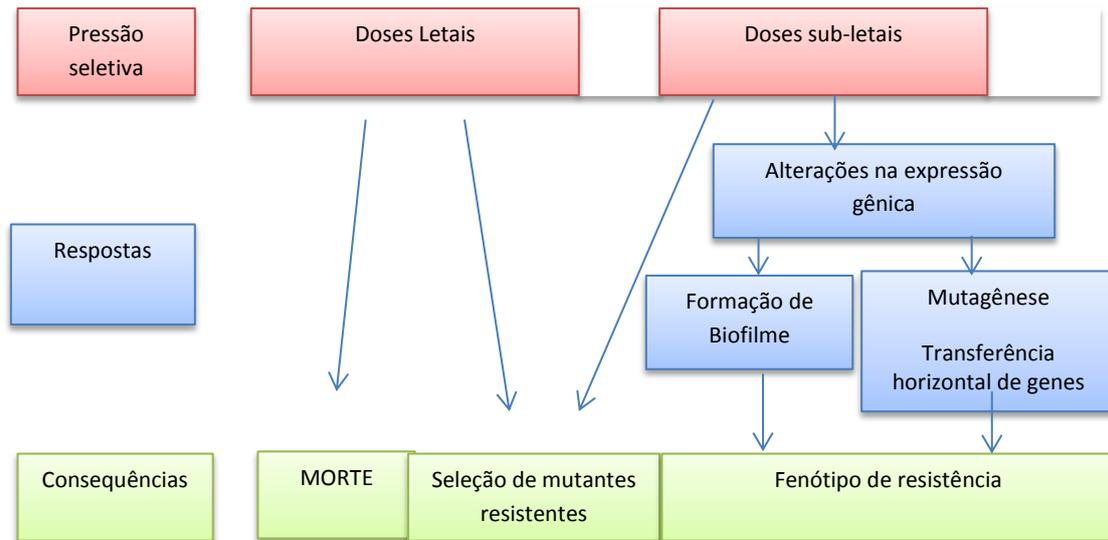


Figura 3 - Impacto dos antibióticos na população bacteriana. Fonte: modificado de Laureti, 2013.

Por muito tempo acreditou-se que a resistência aos antimicrobianos, clinicamente relevante, era consequência da exposição bacteriana a concentrações acima da CIM, a qual poderia selecionar as variantes resistentes pré-existentes na população (MATHIEU et al., 2016; GMLLBERG et al., 2011). Porém, diversos estudos com fusão de gene repórter, estudos genéticos clássicos e análises de transcriptoma tem demonstrado que a exposição a concentrações sub-MIC de antibióticos desencadeiam alterações nos perfis transcricionais e fenótipos de diversas espécies bacterianas, dentre elas *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e que podem desencadear respostas adaptativas que conduzem a resistência aos antimicrobianos (DAVIES; SPIEGELMAN; YIM, 2006; GMLLBERG et al., 2011; GUTIERREZ et al., 2013a; LORIAN, 1975; MATHIEU et al., 2016).

Dentre estas respostas bacterianas que podem ser desencadeadas frente à exposição aos antimicrobianos, estão a indução de estresse oxidativo, respostas de reparo de DNA e mutagênicas, dentre elas, a resposta SOS (BAHAROGLU; MAZEL, 2014; GUTIERREZ et al., 2013).

1.4.1 Reparo de danos oxidativos

Para reparar danos oxidativos, as bactérias detêm mecanismos de reparo, como o sistema de reparo de 8-oxoguanina (Sistema GO). Este sistema tem como função remover danos oxidativos da guanina ou do pool de nucleotídeos, aumentando a fidelidade durante a replicação e diminuindo a ocorrência de mutações (MICHAELS et al., 1992; MICHAELS;

MILLER, 1992; MILLER; MICHAELS, 1996).

O sistema GO é composto por três proteínas MutM, MutY e MutT (Figura 4). Em *E. coli*, a glicosilase MutM atua em 8-oxoG, eliminando-a, caso ela esteja pareada com uma C (citosina). Se não for reparada, em subsequentes eventos de replicação, pode haver pareamento, preferencialmente, com A (adenina), e consequente transversão G·C → T·A, mais comum em mutantes em *mutM*. A proteína MutY também é uma glicosilase, porém atua sobre a adenina erroneamente pareada com a 8-oxoG, eliminando-a. Caso não seja eliminada, ocorre com mais frequência a transversão G·C → T·A, semelhante ao observado mutantes em *mutM*. A proteína MutT tem uma atividade de hidrolase e atua no pool de nucleotídeos, hidrolisando preferencialmente (8-oxodGTP) à sua forma monofosfatada (8-oxodGMP), que não pode ser incorporada durante a replicação pela polimerase replicativa, prevenindo a incorporação desta base oxidada no DNA (FRIEDBERG et al., 2006; NEELEY et al., 2007). Em *E. coli*, a polimerase alfa pode parear 8-oxodGTP com adenina e citosina com a mesma eficiência (MAKI; SEKIGUCHI, 1992). A inativação de *mutT* leva a um aumento do pareamento de A/8-oxodGTP, que no próximo evento de replicação resultará no pareamento de T com a A. Portanto, o evento mais frequente são as transversões A·T → C·G. Estes são considerados mutadores fortes com aumento de até 10.000 vezes as taxas de mutação em *E. coli* (FOWLER et al., 2003; FOWLER; SCHAAPER, 1997; SCHAAPER; BOND; FOWLER, 1989).

P. aeruginosa possui um sistema GO semelhante ao descrito para *E. coli*, porém, a inativação de *mutT* em *P. putida* demonstra um sutil aumento na frequência de mutação espontânea, aproximadamente duas vezes, um fenótipo brando quando comparado a *E. coli* (OLIVER, 2002). Para tentar explicar essa perda da característica de mutador forte, tem sido observado, por anotações de genoma, que *P. putida* e *P. aeruginosa* possuem 12 homólogos de *mutT* que podem atuar na prevenção de danos, semelhantemente à MutT de *E. coli* (FRIEDBERG et al., 2006). Em *P. aeruginosa*, diferentemente de *E. coli*, foram identificados três diferentes tipos de transversões para mutantes em *mutM*: C·G→T·A, A·T→G·C e A·T→T·A. Em cepas mutantes em *mutY* foi observado, principalmente, a transversão G·C→T·A, condizentes com a função da glicosilase de remover a adenina pareada erroneamente com 8-oxodGTP. E, por fim, nas cepas mutantes em *mutT* foi observado unicamente a transição G·C→A·T. Isto é explicado pelo fato que os 12 homólogos de *mutT* podem prevenir as transversões A·T→C·G (SANDERS; SUDHAKARAN; SUTTON, 2009).

Em pacientes com FC, a inflamação crônica pulmonar é decorrente da liberação de proteases e radicais de oxigênio por neutrófilos (ALIPOUR et al., 2009; HMLL et al., 1997). Isto resulta em uma pressão seletiva capaz de selecionar linhagens mutadoras de *P. aeruginosa*, ou seja, com frequência de mutação (FM) aumentada. Estudos demonstraram que isolados hipermutadores possuem maior acúmulo de 8-oxodGTP, devido a mutações de perda de função em genes de reparo GO (CIOFU et al., 2005; FOWLER et al., 2003; MICHAELS et al., 1992). Porém, não apresenta um efeito tão exacerbado na FM, quando comparado com dados de *E. coli* (FOWLER et al., 2003). É importante notar que estes fenótipos hipermutadores tem maior probabilidade de proporcionar o surgimento de isolados resistentes aos antibióticos antipseudomonais, incluindo CAZ e CIP, por aumento de expressão de outros mecanismos de resistência também, como beta-lactamases e bombas de efluxo, respectivamente (HENRICHFREISE et al., 2007; OLIVER et al., 2004; PLASENCIA et al., 2007). Isolados clínicos de *P. aeruginosa* com mutações em genes do sistema GO e, conseqüentemente, fenótipo hipermutador já foram relatados em pacientes com FC (MANDSBERG et al., 2009; POOLE, 2008). Além disso, também foram encontradas linhagens mutadoras com deficiência em genes relacionado ao reparo de bases mal pareadas, que é responsável por corrigir erros de replicação (OLIVER et al., 2000).

Outro mecanismo que também pode estar envolvido no reparo de danos oxidativos é a via de reparo por excisão de bases (BER) (KROKAN; BJORÅS, 2013). Em *E. coli*, esta via desempenha um papel importante na remoção de danos oxidativos, como 8-oxoG, os quais podem causar uma leve distorção na molécula de DNA (DAVID; O'SHEA; KUNDU, 2007). O BER é iniciado por uma DNA glicosilase que reconhece a lesão e remove a base danificada, deixando um sítio abásico,apurínico/apirimidínico (AP). Posteriormente, estes sítios AP são reconhecidos e processados pelas AP endonucleases que cortam a extremidade 5' do esqueleto açúcar-fosfato, deixando a extremidade 3' livre para que a polimerase I e a ligase reparem a lesão. Em *E. coli*, uma das principais AP endonucleases é a exonuclease III codificada pelo gene *xthA*, que é importante para o reparo de lesões oxidativas (HÄRING et al., 1994; HORNBACK; ROOP; II, 2006; SHAFIROVICH et al., 2016).

Em *E. coli*, o sistema GO e BER são amplamente estudados e muito se conhece a desses sistemas em resposta aos antibióticos. Porém, em *P. aeruginosa*, torna-se necessário aprofundar mais no estudo destes mecanismos e como eles interferem na resposta de *P. aeruginosa* frente aos antimicrobianos.

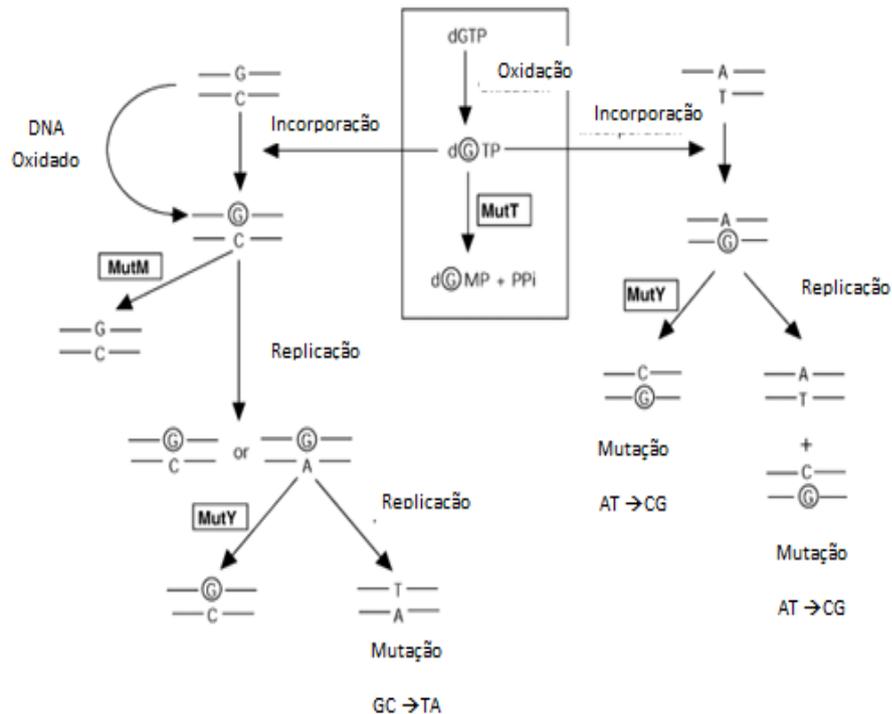


Figura 4 - Sistema GO. Consequências da incorporação e pareamento de 8-oxodGTP com C e A, e o papel dos genes *mutT* ou *mutY* e *mutM* para evitar transversões A · T → C · G e G · C → T · A, respectivamente. O 8-oxoG é representado por um círculo G. Oxidação de G a 8-oxoG enquanto no DNA também ocorre, potencialmente levando a transversão G · C → T · A (lado esquerdo). Fonte: Modificado de Fowler, 2003.

1.4.2 Resposta SOS

É bem conhecido atualmente que o principal mecanismo de indução da resposta SOS é a formação de fita simples de DNA (ssDNA) (KELLEY, 2006; MICHEL, 2005). A formação de ssDNA pode se dar por problemas durante a replicação ou por agentes externos que causam danos, como: UV, radiação gamma, MMS, MMC, ROS e antimicrobianos (DWYER et al., 2007a; FUJII; ISOGAWA; FUCHS, 2006; JENA, 2012; POHLHAUS; KREUZER, 2005; WADHAWAN; GAUTAM; SHARMA, 2013).

A proteína RecA é recrutada a ssDNA pelos complexos RecBCD ou RecFOR. O RecBCD reconhece quebras e extremidades na dupla fita de DNA, e atua na formação de um substrato de ssDNA para RecA. RecFOR reconhece pequenos espaços e lacunas, e recruta RecA para este local de ssDNA. RecA se liga a ssDNA na forma de um nucleofilamento que catalisa a auto-proteólise do repressor LexA. LexA reprime os genes que pertencem ao regulon de SOS, através da ligação em sequência específica de LexA nos promotores dos genes (BAHAROGLU; MAZEL, 2014). A sequência consenso para a ligação de LexA varia

entre as bactérias, em *Beta* e *Gammaproteobacteria* é CTGTN₈ACAG (ERILL et al., 2003), em *P. aeruginosa* a sequência consenso é CTGTATAAATATACAG (CIRZ et al., 2006) e em *E. coli*, TACTGTATATATATACAGTA (WADE et al., 2005).

O número e os tipos de genes regulados pela resposta SOS variam muito entre as bactérias. O regulon SOS de *E. coli* compreende em torno de 40 genes (COURCELLE et al., 2001). Em *Bacillus subtilis*, uma bactéria gram-positiva, o regulon SOS é composto por 33 genes, sendo somente oito homólogos aos de *E. coli* (AU et al., 2005). Em *P. aeruginosa*, o regulon SOS é limitado a 15 genes (CIRZ et al., 2006a).

As três principais vias de reparo ou tolerância aos danos regulados pela resposta SOS em *E. coli* são: recombinação homóloga (HR), reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e síntese translesão (TLS). Em *E. coli*, na HR, RecBCD e RecFOR recrutam RecA, as quais reconhecem a simples fita de DNA. A indução da HR pode levar a rearranjos cromossômicos através da recombinação entre sequências similares. A segunda via, NER, realiza o reparo em dupla fita de DNA por meio do complexo UvrABC. Este complexo reconhece a lesão e recruta a helicase UvrD para remover a sequência de DNA contendo a lesão que será reconstituída pela Polimerase I (KISKER; KUPER; VAN HOUTEN, 2013). A via de NER também é importante para o reparo de lesões oxidativas (SHAFIROVICH et al., 2016).

A TLS é realizada por diferentes DNA polimerases em *E. coli*: PolV (*umuCD*), PolIII (*polB*) e PolIV (*dinB*). Estas polimerases replicam o DNA danificado incorporando uma base aleatória frente à lesão, a qual a DNA polimerase replicativa (Pol III) não pode replicar. São consideradas polimerases propensas a erros, pois não possuem atividade revisora e são altamente mutagênicas. Por isso, a indução da TLS pode levar ao aumento da frequência de mutação como parte da resposta SOS (FIJALKOWSKA; SCHAAPER; JONCZYK, 2012; FRIEDBERG; WAGNER; RADMAN, 2002; NAPOLITANO et al., 2000; NOHMI et al., 1988; PAGÈS; FUCHS, 2003).

Mais especificamente em *P. aeruginosa*, a resposta SOS difere em partes da de *E. coli*, *B. subtilis* e outras Gamma-proteobactérias. Por exemplo, genes importantes para o reparo por excisão de nucleotídeos, como *uvrA* e *uvrB* escapam da regulação por LexA, bem como *ruvA* e *ruvB* importantes para recombinação (AU et al., 2005; CIRZ et al., 2006a; COURCELLE et al., 2001). Além disso, foi demonstrado por Cirz e colaboradores que homólogos de *dinB* de *E. coli*, em *P. aeruginosa*, são induzidos por agentes genotóxicos, como CIP, e participam da TLS, porém de maneira independente de LexA, estando em concordância com o observado em outras bactérias, mostrando que a regulação de *dinB* por LexA é mais uma exceção do que uma regra (BROOKS; MOVAHEDZADEH; DAVIS, 2001; CIRZ et al., 2006b; TEGOVA et

al., 2004). Também em *E. coli*, foi descrito que *polB* é regulado por LexA e foi induzido com CIP ao contrário de *polB* de *P. aeruginosa* onde não foi observado indução pelo mesmo antimicrobiano (ERILL et al., 2003).

P. aeruginosa, assim como várias espécies de bactérias, não possui homólogos de *umuDC*. Em contrapartida, possuem um operon regulado por LexA contendo *imuA*, *imuB* e *dnaE2*, que estão envolvidos em síntese translesão (GALHARDO et al., 2005). Este operon possui papel importante na mutagênese induzida por UV e MMC em *Caulobacter crescentus* e *Mycobacterium tuberculosis* e na mutagênese induzida por UV em *P. aeruginosa* (BOSHOF et al., 2003; CIRZ et al., 2006b; GALHARDO et al., 2005; SANDERS et al., 2006a). Porém, não se conhece o envolvimento desta polimerase codificada pelo operon *imuAB/dnaE2*, na mutagênese induzida por CIP, o que torna interessante tal investigação.

Um estudo recente feito por Jatsenko e colaboradores, revelou o possível papel de DnaE2 (ImuC) e DinB na TLS de bases metiladas e sítios abásicos induzidos por MMS e a consequente mutagênese, em *P. aeruginosa* e *P. putida*. Foi observada a importância de ImuC na proteção contra a citotoxicidade induzida por MMS em *P. aeruginosa*, porém atuando como uma polimerase secundária a DinB, devido maior precisão na replicação de DinB comparada a ImuC. Além disso, foi observado que a integridade dos três produtos do operon *imuAB/dnaE2* (*imuABC*) em *Pseudomonas* sp., da mesma maneira que em *C. crescentus* e *M. tuberculosis* (GALHARDO et al., 2005; WARNER et al., 2010) são essenciais para o apropriado funcionamento do sistema (JATSENKO et al., 2017).

É bem conhecido que os antimicrobianos aumentam a mutagênese em *E. coli* via indução de polimerases propensas a erros (PEREZ-CAPILLA et al., 2005). Seja por danos diretos no DNA, como os causados por CIP ou indiretos, associados à produção de ROS pelos β -lactâmicos, os antimicrobianos são considerados agentes promotores de mutagênese em bactérias, via ativação da resposta SOS. CIP, como já reportado, é um forte indutor da resposta SOS, mesmo em concentrações sub-CIM (THI et al., 2011; YSERN et al., 1990). Para *P. aeruginosa* foi demonstrado a indução desta resposta SOS e mutagênese associada à exposição aos β -lactâmicos e a ciprofloxacina (BLÁZQUEZ et al., 2006; GUTIERREZ et al., 2013).

Em *E. coli*, as polimerases propensas a erros PolII (codificada por *polB*), PolIV (*dinB*) e PolV (*umuC*) são bem caracterizadas quanto o seu envolvimento na mutagênese frente a uma gama de antimicrobianos, inclusive aquela mediada por CIP (CIRZ et al., 2006; NAPOLITANO et al., 2000; POWER; PHILLIPS, 1992). *P. aeruginosa*, por sua vez, possui genes homólogos aos genes *polB* e *dinB* de *E. coli* que codificam essas polimerases propensas

a erros, porém pouco se sabe sobre o envolvimento dessas polimerases na mutagênese induzidas CIP em *P. aeruginosa*. Em particular, o papel do operon *imuAB/dnaE2*, presente em *P. aeruginosa* e outras bactérias, mas ausente em *E. coli*, ainda não foi estudado no que diz respeito à mutagênese induzida por antibióticos. Neste caso, torna-se interessante avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na mutagênese mediado por CIP e compreender o papel das diferentes polimerases de *P. aeruginosa*.

6 CONCLUSÕES

Atualmente, com o aumento resistência bacteriana aliada à falta de opções terapêuticas, torna-se necessário expandir nossos conhecimentos de como os antibióticos atuam nas bactérias, e utilizar estes conhecimentos adquiridos para otimizar o uso dos antibióticos já existentes e/ou auxiliar nas escolhas terapêuticas. *P. aeruginosa*, é um importante patógeno oportunista de difícil tratamento devido a sua alta virulência e capacidade de tornar-se resistente à terapêutica. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ocorre após a exposição das bactérias aos antibióticos, é um mecanismo muito bem estudado em outras bactérias, como *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*. Este efeito secundário dos antibióticos tem sido descrito como um dos ativadores de repostas mutagênicas e adaptativas que podem contribuir para a resistência bacteriana. Em *P. aeruginosa*, foi descrito que Ceftazidima e Ciprofloxacina, ambos muito empregados na terapêutica, induzem a resposta SOS. Uma vez que esta resposta está relacionada com a ativação de genes que codificam para polimerases propensas a erros, buscamos avaliar a resposta de *P. aeruginosa* frente às principais drogas utilizadas para a terapêutica.

Frente a diferentes drogas testadas, os mutantes de reparo de lesões oxidativas não apresentam maior sensibilidade. Por outro lado, alguns apresentaram um perfil de resistência ligeiramente aumentado, sugerindo que a falta destes mecanismos está mais implicada na formação de um fenótipo hipermutador, tornando-os mais tolerantes aos antibióticos, do que a um mecanismo de resistência intrínseco que diminui o efeito bactericida das drogas devido à eliminação do dano oxidativo induzido pelos mesmos.

Nossos resultados com Ceftazidima e outros β -lactâmicos, avaliando a medida de luminescência do gene repórter *luxCDABE* com os promotores *recA* e *lexA*, mostraram que não há indução da resposta SOS, bem como de mutagênese na bactéria em estudo. Contrariamente ao observado em outras bactérias e análises de microarray reportados para *P. aeruginosa*.

No entanto, nos resultados com Ciprofloxacina, observamos que há uma forte indução da resposta SOS e mutagênese em PA14 e PAO1. Quando avaliamos o envolvimento das polimerases propensas a erros na mutagênese induzida por CIP em PA14, nos mutantes nos genes *dinB*, *dnaE2*, *polB*, chegamos à conclusão que todas participam deste processo, sendo que as codificadas pelos genes *dinB* e *polB* parecem serem as mais ativamente envolvidas.

Na avaliação do espectro de mutações que cada uma dessas polimerases provoca, observamos que 100% destas consistem em deleções em células expostas à CIP, sendo que *dinB* é a principal polimerase responsável por este tipo de mutação. Segundo nossos dados, *polB*, pode estar relacionado às mutações de troca de base, já que no mutante deste gene, 100% das mutações foram de deleções/inserções. E em *dnaE2*, foram ocorreram mutações de todos os tipos, o que pode ser explicado pela presença das outras polimerases codificadas por *dinB* e *polB* neste mutante, bem como a redundância de função entre todas elas.

Quanto a avaliação da mutagênese provocada pelo agente oxidante externo H_2O_2 , foi observado um perfil semelhante ao de CIP. Embora essa correlação entre a mutagênese induzida por CIP e H_2O_2 não nos permita afirmar com segurança, porém, pode-se sugerir que o estresse oxidativo causado pela exposição à CIP pode mediar, pelo menos uma parte da mutagênese induzida por este antibiótico. Por outro lado, como exposto acima, claramente este estresse oxidativo não contribui significativamente para a morte de *P. aeruginosa* exposta à CIP e outros antibióticos.

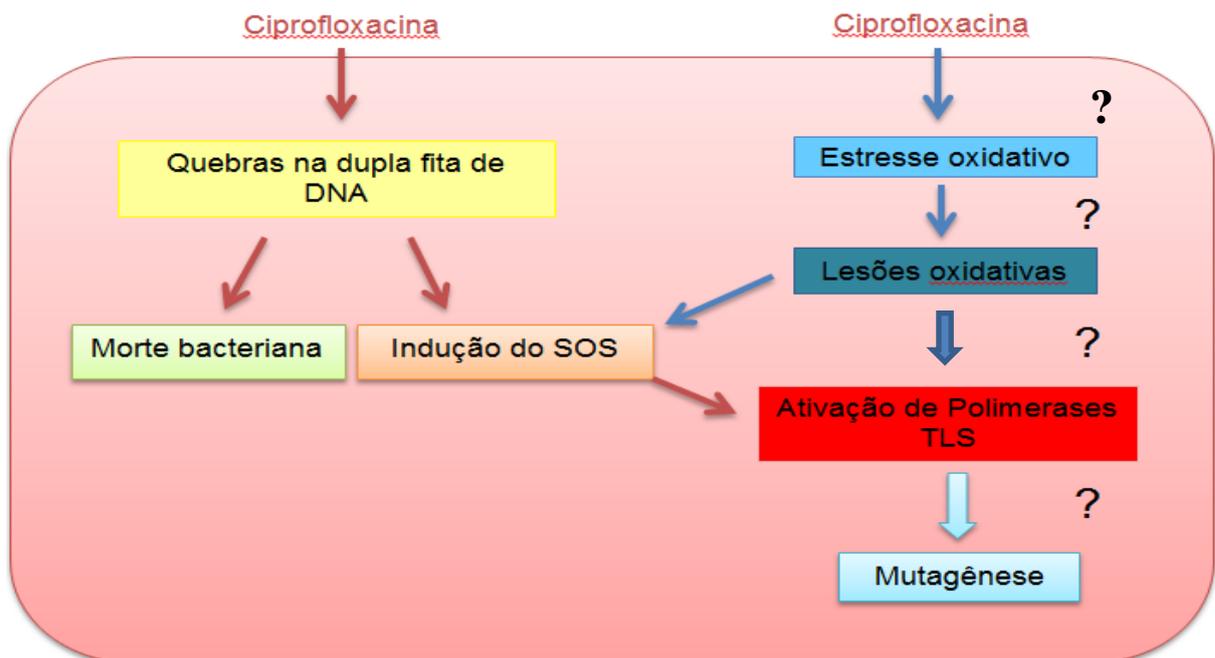


Figura 5 - Hipótese sobre os mecanismos moleculares que levam à mutagênese induzida por CIP. O antimicrobiano CIP atua diretamente no DNA causando quebras na dupla-fita, que pode ocasionar em morte celular ou indução da resposta SOS, principalmente em concentrações subinibitórias. A resposta SOS por si é mutagênica, já que induz a expressão de polimerases de baixa fidelidade. Embora não diretamente demonstrado por nossos dados, o estresse oxidativo resultante do desbalanço metabólico também poderia causar lesões no DNA, que podem contribuir para mutagênese tanto por ativar resposta SOS, como por servir de substrato para polimerases propensas a erro.

REFERÊNCIAS*

- ALIPOUR, M.; SUNTRES, Z. E.; HALWANI, M.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Activity and interactions of liposomal antibiotics in presence of polyanions and sputum of patients with cystic fibrosis. **PloS one**, v. 4, n. 5, p. E5724, 28 maio 2009.
- ALSHALCHI, S. A.; ANDERSON, G. G. Involvement of Stress-Related Genes *polB* and *PA14_46880* in Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 11, p. 4746–4757, 1 nov. 2014.
- ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49–59, 3 mar. 2017.
- ASAKURA, Y.; KOBAYASHI, I. From damaged genome to cell surface: transcriptome changes during bacterial cell death triggered by loss of a restriction-modification gene complex. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 9, p. 3021–3031, maio 2009.
- AU, N.; KUESTER-SCHOECK, E.; MANDAVA, V.; BOTHWELL, L. E.; CANNY, S. P.; CHACHU, K. Genetic Composition of the *Bacillus subtilis* SOS System. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 22, p. 7655–7666, 15 nov. 2005.
- AURÉ LIE MATHIEU, A.; BASTIEN FLEURIER, S.; FRÉ, N. A.; SANCHEZ-VIZUETE, P.; SONG, X. Discovery and Function of a General Core Hormetic Stress Response in *E. coli* Induced by Sublethal Concentrations of Antibiotics. **CellReports**, v. 17, p. 46–57, 2016.
- BAHAROGLU, Z.; MAZEL, D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 6, p. 1126–1145, 1 nov. 2014.
- BAQUERO, F.; TEDIM, A. P.; COQUE, T. M. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 15, 2013.
- BATTESTI, A.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 189–213, 13 out. 2011.
- BECEIRO, A.; TOMAS, M.; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185–230, 1 abr. 2013.
- BERARDINI, M.; FOSTER, P. L.; LOECHLER, E. L. DNA polymerase II (*polB*) is involved in a new DNA repair pathway for DNA interstrand cross-links in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 9, p. 2878–2882, 1 maio 1999.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BHAGIRATH, A.Y.; LI, Y.; SOMAYAJULA, D.; DADASHI, M.; BADR, S.; DUAN, K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 16, n. 1, p. 174, 5 dez. 2016.

BLÁZQUEZ, J.; GÓMEZ-GÓMEZ, J. M.; OLIVER, A.; JUAN, C.; KAPUR, V.; MARTÍN, S. PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 84–99, 2006.

BLÁZQUEZ, J.; COUCE, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; RODRÍGUEZ-ROJAS, A. Antimicrobials as promoters of genetic variation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 561–569, out. 2012.

BOSHOFF, H.; REED, M. B.; BARRY, C. E.; MIZRAHI, V. DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell**, v. 113, n. 2, p. 183–193, 18 abr. 2003.

BROOKS, P. C.; MOVAHEDZADEH, F.; DAVIS, E. O. Identification of Some DNA Damage-Inducible Genes of *Mycobacterium tuberculosis*: Apparent Lack of Correlation with LexA Binding. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 15, p. 4459–4467, 1 ago. 2001.

CASTANEDA-GARCIA, A.; RODRIGUEZ-ROJAS, A.; GUELFO, J. R.; BLAZQUEZ, J. The Glycerol-3-Phosphate Permease GlpT Is the Only Fosfomycin Transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 22, p. 6968–6974, 15 nov. 2009a.

CIOFU, O.; RIIS, B.; PRESSLER, T.; POULSEN, H. E.; HOIBY, N. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2276–2282, jun. 2005.

CIRZ, R. T.; CHIN, J. K.; ANDES, D. R.; DE CRÉCY-LAGARD, V.; CRAIG, W.A.; ROMESBERG, F. E. Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance. **PLoS Biology**, v. 3, n. 6, p. E176, 10 maio 2005a.

CIRZ, R.T.; O'NEILL, B. M.; HAMMOND, J. A.; HEAD, S. R.; ROMESBERG, F. E. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS Response and Its Role in the Global Response to the Antibiotic Ciprofloxacin. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 20, p. 7101–7110, 15 out. 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Ninth six ed. Wayne, PA, USA. 2014: Approved Standard M100-S24. CLSI, 2016.

COUCE, A.; GUELFO, J. R.; BLÁZQUEZ, J.; BLANCHARD, J.; LENSKI, R. Mutational Spectrum Drives the Rise of Mutator Bacteria. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 1, p. E1003167, 10 jan. 2013.

COURCELLE, J.; KHODURSKY, A.; PETER, B.; BROWN, P. O.; HANAWALT, P. C. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. **Genetics**, v. 158, n. 1, p. 41–64, maio 2001.

- DAPA, T.; FLEURIER, S.; BREDECHE, M. F.; MATIC, I. The SOS and RpoS Regulons Contribute to Bacterial Cell Robustness to Genotoxic Stress by Synergistically Regulating DNA Polymerase Pol II. **Genetics**, v. 206, n. 3, 2017.
- DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941–950, 21 jun. 2007.
- DAVIES, J.; SPIEGELMAN, G. B.; YIM, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 445–453, out. 2006.
- DIDIER, J. P.; VILLET, R.; HUGGLER, E.; LEW, D. P.; HOOPER, D.; KELLEY, W. L. Impact of ciprofloxacin exposure on Staphylococcus aureus genomic alterations linked with emergence of rifampin resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 1946–1952, 1 maio 2011.
- DÖRING, G.; CONWAY, S. P.; HEIJERMAN, H. G.; HODSON, M. E.; HOIBY, N.; SMYTH, A. Antibiotic therapy against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: a European consensus. **The European respiratory journal**, v. 16, n. 4, p. 749–767, out. 2000.
- DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 160–201, 1 jan. 2010.
- DRLICA, K.; MALIK, M.; KERNS, R. J.; ZHAO, X. Quinolone-mediated bacterial death. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 385–392, 1 fev. 2008.
- DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 3, p. 377–392, set. 1997.
- DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; HAYETE, B.; COLLINS, J. J. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in Escherichia coli. **Molecular systems biology**, v. 3, p. 91, 13 mar. 2007a.
- DWYER, D. J.; BELENKY, P. A.; YANG, J. H.; MACDONALD, I. C.; MARTELL, J. D.; TAKAHASHI, N. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 20, p. E2100-109, 20 maio 2014.
- DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; COLLINS, J. J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. **Current opinion in microbiology**, v. 12, n. 5, p. 482–489, out. 2009.
- EL-KHOLY, A.; SAIED, T.; GABER, M.; YOUNAN, M. A.; HALEIM, M.; EL-SAYED, H. Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units at Cairo University hospitals: First step toward initiating surveillance programs in a resource-limited country. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 6, p. E216–E220, ago. 2012.
- ERILL, I.; ESCRIBANO, M.; CAMPOY, S.; BARBÉ, J. In silico analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 19, n. 17, p. 2225–2236, 22 nov. 2003.
- ESCARCELLER, M.; HICKS, J.; GUDMUNDSSON, G.; TRUMP, G.; TOUATI, D.; LOVETT, S. Involvement of Escherichia coli DNA polymerase II in response to oxidative damage and adaptive mutation. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 20, p. 6221–6228, 1 out. 1994.

FIJALKOWSKA, I. J.; SCHAAPER, R. M.; JONCZYK, P. DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 6, p. 1105–1121, nov. 2012.

FOWLER, R. G.; WHITE, S. J.; KOYAMA, C.; MOORE, S. C.; DUNN, R. L.; SCHAAPER, R. M. Interactions among the *Escherichia coli* mutT, mutM, and mutY damage prevention pathways. **DNA repair**, v. 2, n. 2, p. 159–173, 3 fev. 2003.

FOWLER, R. G.; SCHAAPER, R. M. The role of the *mutT* gene of *Escherichia coli* in maintaining replication fidelity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 43–54, 1 ago. 1997.

FRIEDBERG, E. C.; FEAVER, W. J.; GERLACH, V. L. The many faces of DNA polymerases: Strategies for mutagenesis and for mutational avoidance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 11, p. 5681–5683, 23 maio 2000.

FRIEDBERG, E. C.; WAGNER, R.; RADMAN, M. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. **Science (New York, N.Y.)**, v. 296, n. 5573, p. 1627–1630, 31 maio 2002.

FRIEDBERG EC, WALKER GC, SIEDE W, WOOD RD, SCHULTZ RA, ELLENBERGER T. **DNA repair and mutagenesis**. Washington, D.C. ASM press, 2006. 1000 p.

FUCHS, R. P.; FUJII, S. Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis in Prokaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 12, p. A012682–A012682, 1 dez. 2013.

FUJII, S.; ISOGAWA, A.; FUCHS, R. P. RecFOR proteins are essential for Pol V-mediated translesion synthesis and mutagenesis. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 24, p. 5754–5763, 13 dez. 2006.

FUNG-TOMC, J.; KOLEK, B.; BONNER, D. P. Ciprofloxacin-induced, low-level resistance to structurally unrelated antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 6, p. 1289–1296, jun. 1993.

GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354–360, ago. 2012.

GALHARDO, R. S.; ROCHA, R. P.; MARQUES, M. V.; MENCK, C.F. M. An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 8, p. 2603–2614, 28 abr. 2005.

GALHARDO, R. S.; DO, R.; YAMADA, M.; FRIEDBERG, E. C.; HASTINGS, P. J.; NOHMI, T. DinB upregulation is the sole role of the SOS response in stress-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. **Genetics**, v. 182, n. 1, p. 55–68, maio 2009.

GIBSON, R. L.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B. W. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 168, n. 8, p. 918–951, 15 out. 2003.

GOH, E. B.; YIM, G.; TSUI, W.; MCCLURE, J.; SURETTE, M. G.; DAVIES, J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of

antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 26, p. 17025–17030, 24 dez. 2002.

GOLDBERG, J. Why is *Pseudomonas aeruginosa* a pathogen? **F1000 Biology Reports**, v. 2, 27 abr. 2010.

GOODMAN, A. L.; KULASEKARA, B.; RIETSCH, A.; BOYD, D.; SMITH, R. S.; LORY, S. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Developmental cell**, v. 7, n. 5, p. 745–754, nov. 2004.

GOODMAN, M. F.; WOODGATE, R. Translesion DNA polymerases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 10, p. A010363, 1 out. 2013.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guide to antimicrobial use in animals**. [s.l.] Blackwell Pub, 2008.

GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, O. G.; ILBÄCK, C.; SANDEGREN, L.; HUGHES, D. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. E1002158, 21 jul. 2011.

GUTIERREZ, A.; LAURETI, L.; CRUSSARD, S.; ABIDA, H.; RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; BLÁZQUEZ, J. β -Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. **Nature communications**, v. 4, p. 1610, 19 mar. 2013.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation research**, v. 443, n. 1–2, p. 37–52, 15 jul. 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 1–85, 1990.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557–80, 5 jun. 1983.

HÄRING, M.; RÜDIGER, H.; DEMPLE, B.; BOITEUX, S.; EPE, B. Recognition of oxidized abasic sites by repair endonucleases. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 11, p. 2010–2015, 11 jun. 1994.

HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 90001, p. 29–35, 1 maio 2003.

HENRICHFREISE, B.; WIEGAND, I.; LUHMER-BECKER, I.; WIEDEMANN, B. Development of resistance in wild-type and hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains exposed to clinical pharmacokinetic profiles of meropenem and ceftazidime simulated in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3642–3649, 1 out. 2007.

HERSHBERG, R.; PETROV, DA.; LEFKOWITZ, E.; ROOS, D.; SCHEUERMANN, R. Evidence That Mutation Is Universally Biased towards AT in Bacteria. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 9, p. E1001115, 9 set. 2010.

HILDEBRAND, F.; MEYER, A.; EYRE-WALKER, A.; BARBE, V.; BAERISWYL, S. Evidence of Selection upon Genomic GC-Content in Bacteria. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 9, p. E1001107, 9 set. 2010.

- HORNBACK, M. L.; ROOP, R. M.; II. The *Brucella abortus* xthA-1 gene product participates in base excision repair and resistance to oxidative killing but is not required for wild-type virulence in the mouse model. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 4, p. 1295–1300, fev. 2006.
- HUANG, C. Z.; FENG, P.; LI, Y. F.; TAN, K. J. Pharmacokinetic detection of penicillin excreted in urine using a totally internally reflected resonance light scattering technique with cetyltrimethylammonium bromide. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 1, p. 85–90, 13 maio 2005.
- HULL, J.; SOUTH, M.; PHELAN, P.; GRIMWOOD, K. Surfactant Composition in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 1, p. 161–165, jul. 1997.
- IMLAY, J. A.; CHIN, S. M.; LINN, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. **Science (New York, N.Y.)**, v. 240, n. 4852, p. 640–642, 29 abr. 1988.
- JACOBY, G. A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 5, out. 2014.
- JATSENKO, T.; SIDORENKO, J.; SAUMAA, S.; KIVISAAR, M. DNA Polymerases ImuC and DinB Are Involved in DNA Alkylation Damage Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. E0170719, 24 jan. 2017.
- JENA, N. R. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. **Journal of biosciences**, v. 37, n. 3, p. 503–517, jul. 2012.
- JEONG, J. Y.; YIM, H. S.; RYU, J. Y.; LEE, H.S.; LEE, J. H.; SEEN, D. S. One-Step Sequence- and Ligation-Independent Cloning as a Rapid and Versatile Cloning Method for Functional Genomics Studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5440–5443, 1 ago. 2012.
- JOZEF CZUK, S.; KLIE, S.; CATCHPOLE, G.; SZYMANSKI, J.; CUADROS-INOSTROZA, A.; STEINHAUSER, D.; SELBIG, J.; WILLMITZER, L. Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. **Molecular Systems Biology**, v. 6, p. 364, 11 maio 2010.
- KALDALU, N.; MEI, R.; LEWIS, K. Killing by ampicillin and ofloxacin induces overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 890–896, mar. 2004.
- KANAFANI, H.; MARTIN, S. E. Catalase and superoxide dismutase activities in virulent and nonvirulent *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 21, n. 4, p. 607–610, abr. 1985.
- KELLEY, W. L. Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. **Molecular microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1228–1238, dez. 2006.
- KEREN, I.; WU, Y.; INOCENCIO, J.; MULCAHY, L. R.; LEWIS, K. Killing by Bactericidal Antibiotics Does Not Depend on Reactive Oxygen Species. **Science**, v. 339, n. 6124, p. 1213–1216, 8 mar. 2013.
- KIFFER, C. R. V.; CAMARGO, E. C.G.; SHIMAKURA, S. E.; RIBEIRO, P. J.; BAILEY, T. C.; PIGNATARI, A. C. C. A spatial approach for the epidemiology of antibiotic use and

resistance in community-based studies: the emergence of urban clusters of *Escherichia coli* quinolone resistance in Sao Paulo, Brasil. **International journal of health geographics**, v. 10, n. 1, p. 17, 28 fev. 2011.

KIM, S. R.; MATSUI, K.; YAMADA, M.; GRUZ, P.; NOHMI, T. Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 266, n. 2, p. 207–215, out. 2001.

KISKER, C.; KUPER, J.; VAN HOUTEN, B. Prokaryotic Nucleotide Excision Repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 3, p. A012591–A012591, 1 mar. 2013.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C. A.; COLLINS, J. J. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797–810, 7 set. 2007.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; WIERZBOWSKI, J.; COTTAREL, G.; COLLINS, J. J. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. **Cell**, v. 135, n. 4, p. 679–690, 14 nov. 2008.

KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 311–320, 12 fev. 2010.

KROKAN, H. E.; BJØRÅS, M. Base excision repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. A012583, 1 abr. 2013.

LIU, Y. C.; HUANG, W. K.; HUANG, T. S.; KUNIN, C, M. Detection of antimicrobial activity in urine for epidemiologic studies of antibiotic use. **Journal of clinical epidemiology**, v. 52, n. 6, p. 539–545, jun. 1999.

LIU, Y.; IMLAY, J. A. Cell Death from Antibiotics Without the Involvement of Reactive Oxygen Species. **Science**, v. 339, n. 6124, 2013.

LORIAN, V. Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 51, n. 9, p. 1046–1055, out. 1975.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Lung infections associated with cystic fibrosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 194–222, abr. 2002.

MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. **Nature**, v. 355, n. 6357, p. 273–275, 16 jan. 1992.

MANDSBERG, L. F.; CIOFU, O.; KIRKBY, N.; CHRISTIANSEN, L. E.; POULSEN, H. E.; HOIBY, N. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2483–2491, 1 jun. 2009.

MICHAELS, M. L.; CRUZ, C.; GROLLMAN, A. P.; MILLER, J. H. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 15, p. 7022–7025, 1 ago. 1992.

MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H. The GO system protects organisms from the mutagenic

effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 20, p. 6321–6325, out. 1992.

MICHEL, B. After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us. **PLoS Biology**, v. 3, n. 7, p. E255, 12 jul. 2005.

MILLER, C.; THOMSEN, L. E.; GAGGERO, C.; MOSSERI, R.; INGMER, H.; COHEN, S. N. SOS Response Induction by β -Lactams and Bacterial Defense Against Antibiotic Lethality. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1629–1631, 10 set. 2004.

MILLER, J. H.; MICHAELS, M. Finding new mutator strains of *Escherichia coli*--a review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 129–132, 7 nov. 1996.

MULLER, F. L.; LIU, Y.; VAN REMMEN, H. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p. 49064–49073, 19 nov. 2004.

NAPOLITANO, R.; JANEL-BINTZ, R.; WAGNER, J.; FUCHS, R. P. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. **The EMBO journal**, v. 19, n. 22, p. 6259–6265, 15 nov. 2000.

NEELEY, W. L.; DELANEY, S.; ALEKSEYEV, Y. O.; JAROSZ, D. F.; DELANEY, J. C.; WALKER, G. C. DNA Polymerase V Allows Bypass of Toxic Guanine Oxidation Products *in Vivo*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 17, p. 12741–12748, 27 abr. 2007.

NOHMI, T.; BATTISTA, J. R.; DODSON, L. A.; WALKER, G. C. RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 6, p. 1816–1820, mar. 1988.

O'SULLIVAN, D. M.; HINDS, J.; BUTCHER, P. D.; GILLESPIE, S. H.; MCHUGH, T. D. Mycobacterium tuberculosis DNA repair in response to subinhibitory concentrations of ciprofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 1199–1202, dez. 2008.

OHMORI, H.; FRIEDBERG, E. C.; FUCHS, R. P.; GOODMAN, M. F.; HANAOKA, F.; HINKLE, D. The Y-family of DNA polymerases. **Molecular cell**, v. 8, n. 1, p. 7–8, jul. 2001.

OLIVER, A.; CANTÓN, R.; CAMPO, P.; BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. **Science**, v. 288, n. 5469, 2000.

OLIVER, A.; LEVIN, B. R.; JUAN, C.; BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4226–4233, 1 nov. 2004.

OLIVER, A.; SÁNCHEZ, J. M.; BLÁZQUEZ, J. Characterization of the GO system of *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 1, p. 31–35, 1 nov. 2002.

OLSON, M. V.; STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959–964, 21 ago. 2000.

OSMAN, K. M.; ALABADY, M. S.; ATA, N.; EZZELDIN, N. A.; ALY, M. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human and animal sources in Egypt. **Zoonoses and public health**, v. 57, n. 5, p. 329–338, ago. 2010.

PÁEZ, P. L.; BECERRA, M. C.; ALBESA, I. Antioxidative mechanisms protect resistant strains of *Staphylococcus aureus* against ciprofloxacin oxidative damage. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 6, p. 771–776, 1 dez. 2010.

PAGÈS, V.; FUCHS, R. P. Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5623, p. 1300–1303, 23 maio 2003.

PEREZ-CAPILLA, T.; BAQUERO, M. R.; GOMEZ-GOMEZ, J. M.; IONEL, A.; MARTIN, S.; BLAZQUEZ, J. SOS-Independent Induction of *dinB* Transcription by β -Lactam-Mediated Inhibition of Cell Wall Synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 4, p. 1515–1518, 15 fev. 2005.

PHILLIPS, I.; CULEBRAS, E.; MORENO, F.; BAQUERO, F. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 20, n. 5, p. 631–638, nov. 1987.

PLASENCIA, V.; BORRELL, N.; MACIÁ, M. D.; MOYA, B.; PÉREZ, J. L.; OLIVER, A. Influence of high mutation rates on the mechanisms and dynamics of in vitro and in vivo resistance development to single or combined antipseudomonal agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2574–2581, 1 jul. 2007.

PLETZ, M. W. R.; RAU, M. B. J.; DE ROUX, A.; BURKHARDT, O.; KRUSE, G. Ertapenem Pharmacokinetics and Impact on Intestinal Microflora, in Comparison to Those of Ceftriaxone, after Multiple Dosing in Male and Female Volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3765–3772, 1 out. 2004.

POHLHAUS, J. R.; KREUZER, K. N. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks, causing double-stranded breaks *in vivo*. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1416–1429, jun. 2005.

POOLE, K. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *Microbe*. **Microbe**, v. 3, p. 179–185, 2008.

POWER, E. G. M.; PHILLIPS, I. Induction of the SOS gene (*umuC*) by 4-quinolone antibacterial drugs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 78–82, 1 fev. 1992.

RANGARAJAN, S.; WOODGATE, R.; GOODMAN, M. F. A phenotype for enigmatic DNA polymerase II: a pivotal role for pol II in replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 16, p. 9224–9229, 3 ago. 1999.

SADER, H. S.; FARRELL, D. J.; FLAMM, R. K.; JONES, R. N.; ANZUETO, A.; MARTIN, C. D. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 78, n. 4, p. 443–448, 1 abr. 2014.

SANDERS, L.H.; ROCKEL, A.; LU, H.; WOZNIAK, D. J.; SUTTON, M. D. Role of *Pseudomonas aeruginosa* *dinB*-encoded DNA polymerase IV in mutagenesis. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8573–8585, 15 dez. 2006a.

SANDERS, L. H.; SUDHAKARAN, J.; SUTTON, M. D. The GO system prevents ROS-induced mutagenesis and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS microbiology letters**, v. 294, n. 1, p. 89–96, maio 2009.

SCHAAPER, R.; BOND, B.; FOWLER, R. AT → CG transversions and their prevention by the *Escherichia coli* mutT and mutHLS pathways. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 219, n. 1–2, p. 256–262, out. 1989.

SHAFIROVICH, V.; KROPACHEV, K.; ANDERSON, T.; LIU, Z.; KOLBANOVSKIY, M.; MARTIN, B. D. Base and Nucleotide Excision Repair of Oxidatively Generated Guanine Lesions in DNA. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 10, p. 5309–5319, 4 mar. 2016.

SONG, L. Y.; GOFF, M.; DAVIDIAN, C.; MAO, Z.; LONDON, M.; LAM, K. Mutational Consequences of Ciprofloxacin in *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6165–6172, out. 2016.

STORVIK, K. A. M.; FOSTER, P. L. RpoS, the stress response sigma factor, plays a dual role in the regulation of *Escherichia coli*'s error-prone DNA polymerase IV. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 14, p. 3639–3644, 15 jul. 2010.

SUAREZ, C.; PEÑA, C.; ARCH, O.; DOMINGUEZ, M. A.; TUBAU, F.; JUAN, C. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 272, 13 out. 2011.

TEGOVA, R.; TOVER, A.; TARASSOVA, K.; TARK, M.; KIVISAAR, M. Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2735–2744, maio 2004.

THI, T. D.; LOPEZ, E.; RODRIGUEZ-ROJAS, A.; RODRIGUEZ-BELTRAN, J.; COUCE, A.; GUELFO, J. R. Effect of recA inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 531–538, 1 mar. 2011.

VALENCIA, E. Y.; ESPOSITO, F.; SPIRA, B.; BLÁZQUEZ, J.; GALHARDO, R. S. Ciprofloxacin-mediated mutagenesis is suppressed by subinhibitory concentrations of amikacin in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, 2017.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. M. Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 4, p. 256–280, abr. 2005.

VINCENT, J. L. Nosocomial infections in adult intensive-care units. **The Lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2068–2077, 14 jun. 2003.

WADE, J. T.; REPPAS, N. B.; CHURCH, G. M.; STRUHL, K. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. **Genes & Development**, v. 19, n. 21, p. 2619–2630, 1 nov. 2005.

WADHAWAN, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. A component of gamma-radiation-induced cell death in *E. coli* is programmed and interlinked with activation of caspase-3 and SOS response. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 8, p. 545–557, 27 ago. 2013.

WARNER, D. F.; NDWANDWE, D. E.; ABRAHAMS, G. L.; KANA, B. D.; MACHOWSKI, E. E.; VENCLOVAS, C. Essential roles for imuA'- and imuB-encoded accessory factors in DnaE2-dependent mutagenesis in Mycobacterium tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 29, p. 13093–13098, 20 jul. 2010.

WOLTER, D. J.; KHALAF, N.; ROBLEDO, I. E.; VAZQUEZ, G. J.; SANTE, M. I.; AQUINO, E. E. Surveillance of Carbapenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: Dissemination of KPC and IMP-18 β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1660–1664, 1 abr. 2009.

YORDANOV, D.; STRATEVA, T. Pseudomonas aeruginosa? a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1133–1148, 1 set. 2009.

YSERN, P.; CLERCH, B.; CASTAÑO, M.; GIBERT, I; BARBÉ, J.; LLAGOSTERA, M. Induction of SOS genes in Escherichia coli and mutagenesis in Salmonella typhimurium by fluoroquinolones. **Mutagenesis**, v. 5, n. 1, p. 63–66, jan. 1990.