

XU Congresso
Fluminense
de Iniciação
Científica e Tecnológica

28^o

Encontro de
Iniciação
Científica
da UENF

20^o

Circuito de
Iniciação
Científica do
IFFluminense

16^a

Jornada de
Iniciação
Científica
da UFF



U III Congresso
Fluminense de
Pós-Graduação

23^a

Mostra de
Pós-Graduação
da UENF

8^a

Mostra de
Pós-Graduação
do IFFluminense

8^a

Mostra de
Pós-Graduação
da UFF

Padronização de ensaios de infecção em *Galleria mellonella* para investigar o papel das peroxirredoxinas, Tiol peroxidase (Tpx) e Peroxiredoxina Q (PrxQ) na virulência de *Pseudomonas aeruginosa*

Rafaela Pinheiro Coelho¹, Júlia Mello da Silva¹, Luis Eduardo Soares Netto², Diogo de Abreu Meireles¹

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, UENF ²Instituto de Biociências, USP

A *G. mellonella* é um inseto lepidóptero amplamente utilizado como modelo na pesquisa da interação patógeno-hospedeiro devido às semelhanças compartilhadas com o sistema imune inato de mamíferos que inclui a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em seus hemócitos. Entre as EROs geradas no fagossomo destes hemócitos, estão o radical ânion superóxido (O₂⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). *P. aeruginosa*, é uma bactéria gram-negativa, ubíqua que se comporta como um patógeno oportunista em humanos, que conta com um robusto repertório de enzimas antioxidantes dedicadas à remoção das EROs. O presente estudo tem como objetivo geral compreender o papel dos sistemas enzimáticos antioxidantes presentes em *P. aeruginosa* durante a infecção. Neste projeto, será estudado o papel de duas peroxirredoxinas, Tpx e PrxQ, usando como modelo de infecção larvas *G. mellonella*. Para alcançar nossos objetivos, foram criados dois mutantes nulos nos genes que codificam as duas peroxirredoxinas, denominados Δtpx e $\Delta prxQ$. As deleções no cromossomo das linhagens mutantes serão confirmadas pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Também será realizada a caracterização fenotípica destas linhagens quanto à sensibilidade aos hidroperóxidos H₂O₂ e tBOOH e análise do seu crescimento em meio rico e em meio mínimo. Para análise do perfil de crescimento em meio rico, foi realizada uma curva em meio LB (Lysogenic Broth). Os frascos, inoculados com as linhagens selvagem (*wt*), Δtpx , $\Delta prxQ$ ou *MAR2xT7::gacA* (controle) em meio LB, foram incubados sob agitação constante (175 rpm) na temperatura de 37°C. O crescimento foi acompanhado pela determinação da DO_{600nm} medida em intervalos de tempo regulares. Os resultados iniciais mostraram que não foram observados defeitos no crescimento nos mutantes testados em relação à linhagem selvagem. O perfil de crescimento destas linhagens será monitorado em meio mínimo M9 suplementado com diferentes fontes de C. As condições de cultivo das larvas de *G. mellonella* foram otimizadas em ambiente controlado quanto à temperatura, umidade e dieta. Inicialmente, as condições para execução dos ensaios de infecção estão sendo otimizadas para assegurar a precisão dos instrumentos de inoculação. Neste sentido, foram testados diferentes aparatos usados na inoculação das larvas: seringa de insulina de 1 mL (agulha 30 G), agulha (30 G) acoplada a uma micropipeta de 20 μ L e uma seringa Hamilton de 50 μ L com agulha em bisel de 22s G. Deste modo, a otimização de todas as etapas dos ensaios de infecção será fundamental para garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

Instituição do Programa de IC: UENF

Eixo Temático: Biociências

Fomento da Bolsa: FAPERJ

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:



XU Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

28^o

Encontro de Iniciação Científica da UENF

20^o

Circuito de Iniciação Científica do IFFluminense

16^a

Jornada de Iniciação Científica da UFF



UIII Congresso Fluminense de Pós-Graduação

23^a

Mostra de Pós-Graduação da UENF

8^a

Mostra de Pós-Graduação do IFFluminense

8^a

Mostra de Pós-Graduação da UFF

Standardization of infection assays in *Galleria mellonella* to investigate the role of peroxiredoxins, Thiol peroxidase (Tpx) and Peroxiredoxin Q (PrxQ) in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*

Rafaela Pinheiro Coelho¹, Júlia Mello da Silva¹, Luis Eduardo Soares Netto², Diogo de Abreu Meireles¹

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, UENF ²Instituto de Biociências, USP

G. mellonella is a lepidopteran insect widely used as a model in scientific research for the study of host-pathogen interactions due to the shared similarities with the innate immune system of mammals, which includes the production of Reactive Oxygen Species (ROS) in their hemocytes. Among the ROS generated in the phagosome of these hemocytes are the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). *P. aeruginosa* is an ubiquitous gram-negative bacterium that behaves as an opportunistic pathogen in humans, which has a robust repertoire of antioxidant enzymes dedicated to the removal of ROS. The present study aims to understand the role of the antioxidant enzymatic systems present in *P. aeruginosa* during infection. In this project, the role of two peroxiredoxins, Tpx and PrxQ, will be studied using *G. mellonella* larvae as an infection model. To achieve our goals, two null mutants were created in the genes encoding the two peroxiredoxins, named Δtpx and $\Delta prxQ$. Deletions in the chromosome of these mutant strains will be confirmed by PCR. The phenotypic characterization of these strains will also be performed through H_2O_2 and tBOOH hydroperoxides sensitivity assays and through the analysis of their growth profile in both rich and minimal media. For the analysis of the growth profile in rich medium, a curve was performed in LB (Lysogenic Broth). Flasks containing LB medium were inoculated with the wild-type (*wt*), Δtpx , $\Delta prxQ$, or MAR2xT7::*gacA* (control) strains and incubated under constant agitation (175 rpm) at a temperature of 37°C. Growth curves were obtained by determining the OD_{600nm} measured at regular time intervals. The results showed that no growth defects were observed in the tested mutants when compared to the *wt* strain. The growth profile of these strains will be also monitored in M9 minimal medium supplemented with different C sources. The rearing conditions of *G. mellonella* larvae were optimized in a controlled environment regarding temperature, humidity, and diet. Initially, the infection assays conditions are being optimized to guarantee the accuracy of the inoculation devices. For this purpose, different devices used in the inoculation of larvae were tested: a 1 mL insulin syringe (30 G needle), a 20 μ L micropipette coupled with a 30 G needle, and a 50 μ L Hamilton syringe with a 22s G beveled needle. Thus, the optimization of all steps of infection assays will be critical to certify the reproducibility of the results.

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:

