

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO VI EM
*ACINETOBACTER RADIORESISTENS*IDENTIFICATION OF GENES OF THE TYPE VI SECRETION SYSTEM IN
*ACINETOBACTER RADIORESISTENS*Maurício Mercê da Silva¹Akemi Suzuki Cruzio²Victor Augusto Araújo Barbosa³

RESUMO

Este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar genes do sistema de secreção tipo VI (T6SS) no genoma de *Acinetobacter radioresistens*, uma espécie bacteriana notável por sua persistência em ambientes hospitalares. Utilizando ferramentas bioinformáticas, como o SecReT6 e o BLASTn, foram identificados clusters gênicos associados ao T6SS, pertencentes ao subtipo i4b, amplamente distribuído entre bactérias Gram-negativas e geralmente relacionado à competição interbacteriana e adaptação a ambientes desafiadores. O cluster gênico identificado contém todos os genes essenciais para o funcionamento do T6SS, exceto o gene que codifica a proteína Tssl (VgrG), que foi encontrado em uma região distante do cluster. Esse deslocamento sugere variações estruturais ou funcionais no T6SS de *A. radioresistens* em comparação com o sistema convencional presente em outras espécies. Além disso, análises filogenéticas indicaram que o T6SS em *A. radioresistens* é evolutivamente próximo ao T6SS de *Acinetobacter baumannii* e compartilha homologia com proteínas de outras bactérias, sugerindo a possibilidade de transferência horizontal de genes. Esses achados reforçam a hipótese de que o T6SS pode desempenhar um papel crucial na adaptação e sobrevivência de *A. radioresistens* em ambientes hospitalares, caracterizados por alta pressão seletiva e competição com outras bactérias. O estudo contribui para o entendimento do papel do T6SS na biologia de *A. radioresistens*, fornecendo uma base para investigações futuras sobre a virulência e a resistência dessa espécie, além de possíveis adaptações evolutivas específicas para ambientes hospitalares.

PALAVRAS-CHAVE: *Acinetobacter radioresistens*. Sistema de Secreção do Tipo VI. Patogênese Bacteriana. Transferência Horizontal de Genes.

ABSTRACT

This study aimed to identify and characterize genes of the type VI secretion system (T6SS) in the genome of *Acinetobacter radioresistens*, a bacterial species notable for its persistence in hospital environments. Using bioinformatics tools such as SecReT6 and BLASTn, gene clusters associated with T6SS were identified, belonging to the i4b subtype, widely distributed among Gram-negative bacteria

¹ Graduando do Curso de Farmácia da Faculdade de Tecnologia de Teresina – CET.

² Akemi Suzuki Cruzio, Bacharel em Biomedicina pela Faculdade NOVAFAP, Mestre em Genética e Melhoramento pela UFPI e Docente da Faculdade CET.

³ Victor Augusto Araújo Barbosa, possui graduação em Farmácia (2012), Especialização em Microbiologia aplicada às ciências da saúde (2016) e Mestrado em Ciência Animal na área de Controle de Qualidade Microbiológico (2015) pela Universidade Federal do Piauí - UFPI, Doutorado em Ciências pelo programa de Biologia Computacional e Sistemas na área de Genômica funcional (2019) pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - RJ. Tem experiência em microbiologia, com genômica comparativa, regulação transcricional e biologia molecular. Atuou no setor de tuberculose do Laboratório Central do Estado do Piauí - LACEN-PI. Gerenciou a farmácia do Hospital de Campanha Padre Pedro Balzi, da abertura ao fechamento. Atuou na farmácia covid e na farmácia do pronto atendimento do Hospital de Urgências de Teresina - HUT, bem como na Gerência de Assistência à Farmácia Hospitalar de Teresina - GEAFH. Trabalhou como bioinformata da Organização Pan-Americana de Saúde - OPAS. Atualmente é coordenador da plataforma multiusuário do Centro de Inteligência em Agravos Tropicais, Emergentes e Negligenciados - CIATEN.

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

and generally related to interbacterial competition and adaptation to challenging environments. The identified gene cluster contains all genes essential for T6SS function, except for the gene encoding the TssI protein (VgrG), which was found in a region distant from the cluster. This displacement suggests structural or functional variations in the T6SS of *A. radioresistens* compared to the conventional system present in other species. Furthermore, phylogenetic analyses indicated that the T6SS in *A. radioresistens* is evolutionarily close to the T6SS of *Acinetobacter baumannii* and shares homology with proteins from other bacteria, suggesting the possibility of horizontal gene transfer. These findings reinforce the hypothesis that the T6SS may play a crucial role in the adaptation and survival of *A. radioresistens* in hospital environments, characterized by high selective pressure and competition with other bacteria. The study contributes to the understanding of the role of the T6SS in the biology of *A. radioresistens*, providing a basis for future investigations on the virulence and resistance of this species, as well as possible evolutionary adaptations specific to hospital environments.

KEYWORDS: *Acinetobacter radioresistens*. Type VI Secretion System. Bacterial Pathogenesis. Horizontal Gene Transfer

INTRODUÇÃO

Com o aumento global na incidência de cepas bacterianas resistentes a múltiplas classes de antibióticos, a medicina enfrenta um dos seus maiores desafios: o tratamento de infecções antes controláveis que agora se tornaram virtualmente intratáveis (BLAIR et al., 2014; DERBY et al., 2023; ABBAS et al., 2024). Em cenários hospitalares, onde a pressão seletiva é alta devido ao uso frequente de antimicrobianos, o fenômeno evolutivo da resistência torna-se ainda mais crítico e imediato (MOTA et al., 2018). Um grupo de bactérias que frequentemente causam problemas relacionados a resistência antimicrobiana (RAM), são os patógenos ESKAPE (bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*; e Gram-negativos *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*). Este grupo de bactérias, levou a organização mundial de saúde (OMS) a traçar planos de ação, visando incentivar a pesquisa e desenvolvimento de alternativas terapêuticas contra estas bactérias (WHO, 2001; PENDLETON et al., 2013).

Neste sentido diversas pesquisas têm focado na identificação de genes de resistência, nas mudanças fenotípicas dessas bactérias e nos métodos alternativos de tratamento (JIA-BAO LI et al., 2023; NAGA et al., 2024). No entanto, para que novas abordagens terapêuticas sejam desenvolvidas, lacunas significativas no entendimento do mobiloma - o conjunto de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons que frequentemente carregam genes de resistência e de virulência - precisam ser resolvidas (WANG et al., 2022).

Esses elementos são cruciais para a disseminação rápida de características de resistência entre diferentes linhagens bacterianas, mas sua dinâmica ainda é pouco compreendida, principalmente no ambiente hospitalar, onde a pressão seletiva é intensa (ZHANG et al., 2022; WANG et al., 2022). Um desses elementos é o sistema de secreção do tipo VI (T6SS), descrito pela primeira vez em 2005, quando foi demonstrado que *Vibrio cholerae* O37 exibia atividade citotóxica ao interagir com *Dictyostelium* sp. ou com macrófagos de mamíferos (PUKATZKI et al., 2006). O Sistema de Secreção Tipo VI (T6SS) é um dispositivo de perfuração semelhante a uma estrutura semelhante a uma cauda de bacteriófago ancorada no envelope da célula bacteriana por meio de um complexo associado à membrana que transloca múltiplas proteínas efetoras letais diretamente para células-alvo (eucarióticas ou bacterianas) de maneira dependente do contato (PUKATZKI et al 2007).

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

Esse mecanismo de secreção é relevante não apenas para *Vibrio*, mas também para outras bactérias patogênicas, como as espécies do gênero *Acinetobacter*, que representam uma preocupação crescente tanto em âmbito nacional quanto internacional devido à sua associação com infecções hospitalares e comorbidades (CERCEO et al., 2016).

As espécies de *Acinetobacter* são caracterizadas como cocobacilos Gram-negativos, aeróbios estritos e não fermentativos, sendo ubíquos no meio ambiente. Embora *Acinetobacter baumannii* seja o principal representante do gênero em termos de patogenicidade, outras espécies, como *Acinetobacter radioresistens*, têm se destacado pelo seu potencial de causar infecção em ambientes hospitalares (TINA WANG et al., 2019). *A. radioresistens* é particularmente notável por sua capacidade de adaptação a ambientes com baixa umidade relativa, demonstrando persistência e sobrevivência em superfícies hospitalares (JAWAD et al., 1998).

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo identificar genes que codificam o T6SS no genoma de *Acinetobacter radioresistens*, além de avaliar a organização genômica desses genes, buscando elucidar o papel desse sistema na capacidade de sobrevivência e patogenicidade dessa espécie em ambientes de saúde.

2- MÉTODO

Identificação de genes codificadores do Sistema de Secreção Tipo VI (T6SS)

A sequência de nucleotídeos dos genomas completos e anotação dos cromossomos da cepa de *A. radioresistens* LH6 foram baixadas do projeto NCBI RefSeq, sob o número de acesso NZ_CP027.

A literatura vem reportando a identificação de genes que codificam componentes putativos do T6SS pode ser realizada por três métodos distintos, como a busca de sequências de aminoácidos e nucleotídeos similares a de componentes do T6SS já identificados, por meio da identificação de “ilhas de TssI” (MA et al., 2017), ou ainda através do uso de COGs (*Cluster of Orthologs Groups*), construídos a partir das sequências de aminoácidos dos componentes do T6SS identificados em outros genomas (BOYER et al., 2009). Neste estudo, utilizamos preliminarmente o software T6SS-HMMER3 e o banco de dados SecReT6 (Type VI Secretion system Fonte: <http://db-mml.sjtu.edu.cn/SecReT6/index.php>) (ZHANG et al., 2022) que utiliza a abordagem de predição baseada em comparação de similaridade, análises filogenéticas e proteínas relacionadas para detectar genes codificadores de proteínas do genoma em estudo que correspondam a estes perfis.

Para a pesquisa dos genes que codificam as proteínas do T6SS no genoma em questão utilizamos uma abordagem de adequação dos parâmetros disponíveis na ferramenta. Parâmetros como e-value foi mantido em $10e-4$, Ha-value - valor de corte relacionado da análise que afeta diretamente a sensibilidade e a especificidade da previsão de proteínas relacionadas ao T6SS - $>0,6$. O valor de corte de identidade do BLAST foi maior do que 60%. O intervalo máximo entre dois componentes co-localizados do T6SS foi fixado em 5000 pares de bases e o número de mínimo de 3 componentes do T6SS por região identificada. A busca foi específica para a identificação de genes que codificam efetores, proteínas de imunidade e proteínas acessórias.

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

Identificação do gene *tssI*

Para identificar o gene DOM24_RS00405, anotado como "type VI secretion system Vgr family protein" no genoma de *Acinetobacter radioresistens* LH6, utilizamos a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - nucleotide). Inicialmente, a sequência de aminoácidos da proteína TssI (VgrG) de *Vibrio cholerae* (VC1417) foi obtida de bases de dados públicas, como o NCBI. Em seguida, o genoma completo de *A. radioresistens* LH6, previamente sequenciado e anotado, foi utilizado como alvo para o alinhamento. O genoma foi obtido a partir da plataforma RefSeq do NCBI.

O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta BLASTn, com a sequência da proteína TssI de *Vibrio cholerae* como consulta, e o genoma de *A. radioresistens* LH6 como o banco de dados alvo. Os parâmetros de busca foram configurados para garantir alta sensibilidade na detecção de similaridades, utilizando valores de corte apropriados, como e-value e identidade da sequência. O resultado do BLASTn indicou a presença do gene DOM24_RS00405 no genoma de *A. radioresistens* LH6, anotado como "type VI secretion system Vgr family protein". Esse gene apresentou similaridade significativa com a proteína TssI de *Vibrio cholerae*, sugerindo sua possível associação funcional com o sistema de secreção tipo VI (T6SS).

Classificação do T6SS

Para a classificação dos componentes do sistema de secreção tipo VI (T6SS), utilizamos os esquemas propostos por BARRET et al. (2007, 2013) e RUSSELL et al. (2014) integrados ao Secret6. Esses esquemas classificatórios são baseados em análises filogenéticas de proteínas associadas ao T6SS, particularmente componentes estruturais e funcionais. Essa abordagem foca especificamente na análise filogenética de 825 proteínas atribuídas ao componente TssB (também conhecido como VipA).

Contagem de nucleotídeos

A contagem de nucleotídeos das sequências gênicas foi executada com script próprio, conforme material em anexo.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos anteriores já identificaram genes de sistemas de secreção bacteriano em genomas de *Acinetobacter radioresistens* (SAFFARIAN et al., 2017). WEBER et al. (2016) anotaram genes do T6SS em *A. baumannii* ATCC 17978 totalmente sequenciada. Posteriormente, genes relacionados à estrutura e proteínas acessórias do T6SS foram caracterizados em *A. baumannii* (HAYES et al., 2024; LI Y et al., 2024), bem como testadas para a influência na resposta do hospedeiro em peixe zebra (VIRGO, 2024) e para promover a sobrevivência em nichos bacterianos (SUN et al., 2024). Devido à proximidade filogenética entre os espécimes de *A. baumannii* e *A. radioresistens*, a genômica comparativa pode

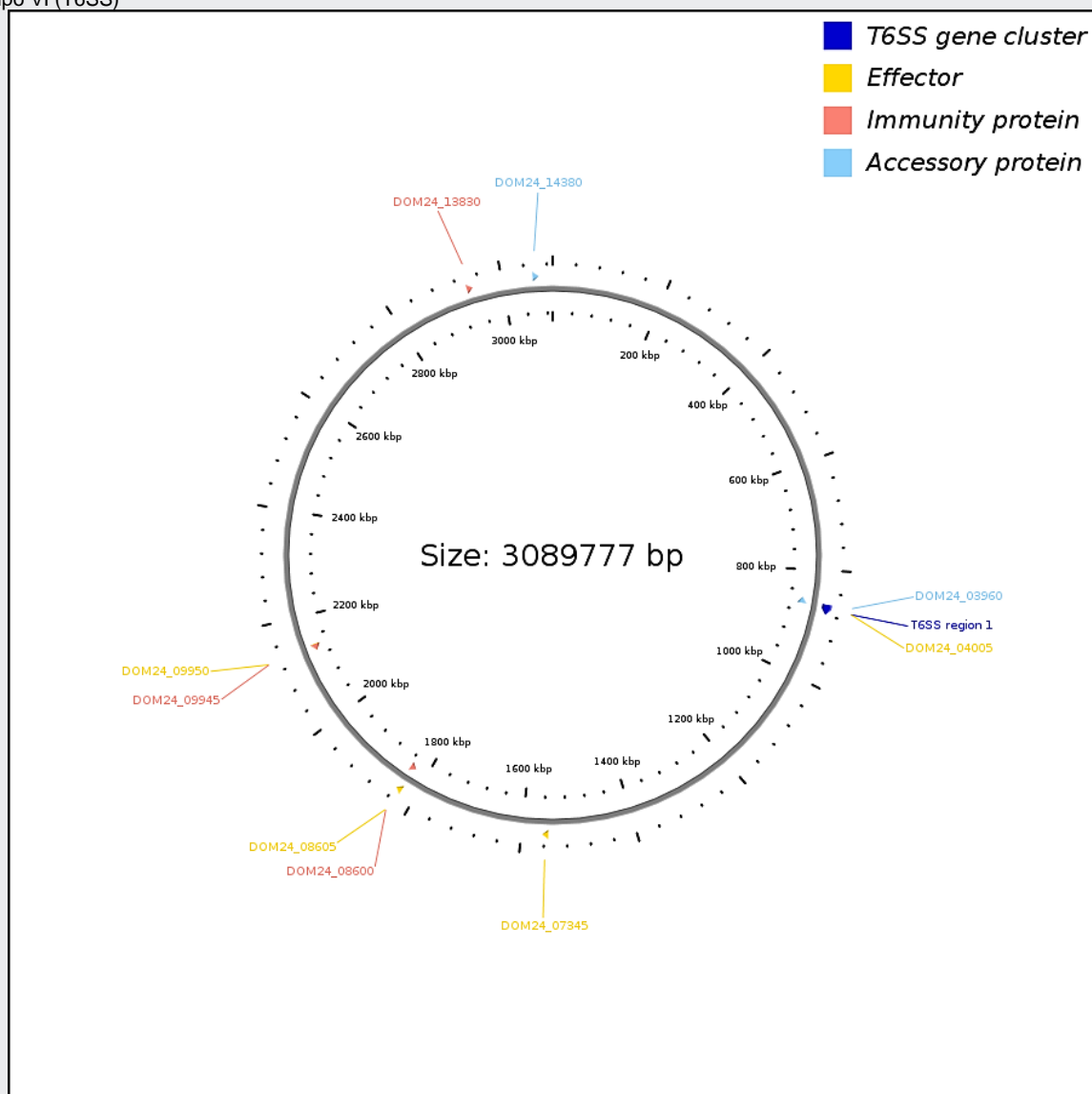
REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

auxiliar o entendimento funcional, por inferência, de diversas estruturas codificadas no genoma, como a própria função do T6SS no gênero *Acinetobacter* sp.

Quando os primeiros genes do T6SS foram identificados em *A. radioresistens*, havia poucos genomas completos dessa espécie disponíveis para comparação. A escassez de dados para comparação pode levar a anotações com nomenclaturas inconsistentes dos componentes genômicos, uma vez que a anotação pode ser parcial e se referir apenas a um domínio específico de uma família. Em outros casos, a anotação é baseada em genes com nomes pouco informativos ou classificados como “putativos” ou “hipotéticos”. Assim, apesar dos estudos prévios, faz-se necessário reanotar os genes e padronizar a nomenclatura desses elementos, com o intuito de fornecer maior precisão da função dos produtos codificados no genoma.

Com a metodologia empregada, foi possível identificar um cluster gênico de T6SS no genoma de *A. radioresistens*, como demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Mapa Genômico Circular de *Acinetobacter radioresistens* Destacando Genes Associados ao Sistema de Secreção Tipo VI (T6SS)



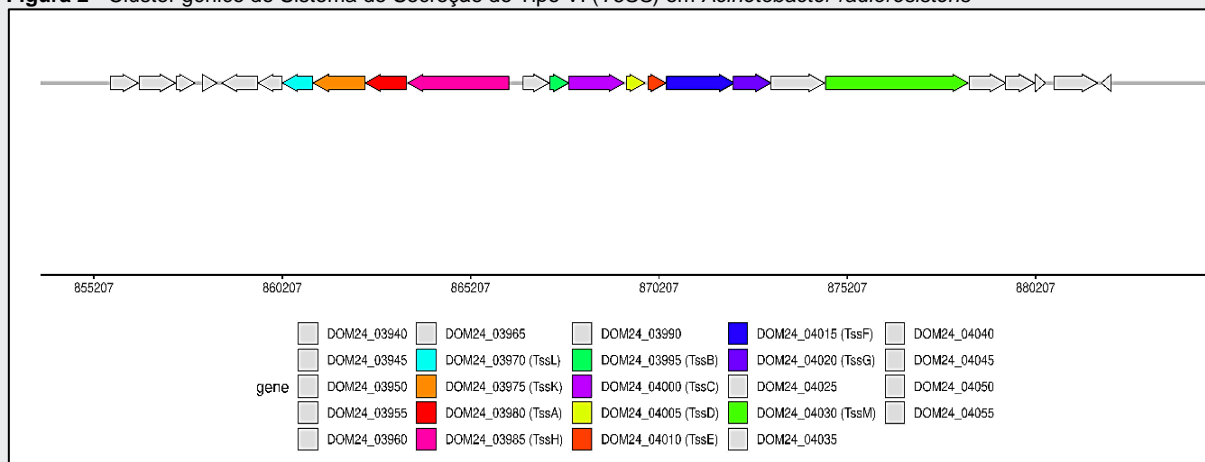
REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

A Figura 1 apresenta um mapa genômico circular de *Acinetobacter radioresistens* com um tamanho total de 3.089.777 pares de bases (bp). Diversas regiões associadas ao sistema de secreção tipo VI (T6SS) e proteínas relacionadas estão indicadas em diferentes pontos do genoma. O mapa destaca os clusters de genes do T6SS (em azul), incluindo a região denominada "T6SS region 1", situada em torno de 1.000 kbp, que representa os principais componentes do sistema de secreção tipo VI. As proteínas efetoras (em amarelo) estão distribuídas em três locais identificados: entre 1.600 kbp (DOM24_07345), 2.200 kbp (DOM24_09550) e 2.600 kbp (DOM24_08605). As proteínas de imunidade (em vermelho) apresentam três pontos de destaque: próximas a 1.600 kbp (DOM24_08600), 2.200 kbp (DOM24_09545) e 2.800 kbp (DOM24_13830). As proteínas acessórias (em azul claro) são representadas por dois locais, um próximo a 1.000 kbp (DOM24_04005) e outro em 3.000 kbp (DOM24_14380).

Este diagrama genômico ilustra a organização espacial dos genes associados ao T6SS no genoma de *A. radioresistens*, evidenciando a distribuição dos clusters e genes relacionados ao sistema, que desempenham um papel crucial na sobrevivência bacteriana e na interação com o ambiente. Entretanto, não é comum as proteínas efetoras, de imunidade e acessórias estarem codificadas distante do cluster genômico do T6SS, o que pode indicar que estes são genes órfãos (SHYNTUM et al., 2014), que codificam proteínas que estejam associadas com outras funções no genoma da bactéria (SI et al., 2017; BARBOSA et al., 2019), ou ainda, serem regulados juntamente com o cluster do T6SS mediante sinais ambientais específicos (SI et al., 2017b). Este achado sugere que mais estudos a cerca destas regiões são necessários.

Os genes T6SS são codificados em um cluster contendo pelo menos 13 genes altamente conservados (*tssA–M*), que codificam os componentes estruturais e acessórios, essenciais para a montagem e regulação adequada do sistema (BOYER et al., 2009; CIANFANELLI et al., 2016). Curiosamente ao avaliar os constituintes do cluster gênico do T6SS identificado (Figura 2), encontramos genes que codificam todas as famílias de proteínas para o funcionamento do sistema de secreção do tipo VI, exceto o gene que codifica o a proteína TssI.

Figura 2 - Cluster gênico do Sistema de Secreção do Tipo VI (T6SS) em *Acinetobacter radioresistens*



Legenda: Organização genômica dos genes relacionados ao sistema de secreção tipo VI (T6SS) no genoma de *Acinetobacter radioresistens*. Cada gene está representado por uma seta colorida, que indica sua orientação e localização no genoma. Os genes são identificados pelos respectivos loci, como DOM24_03940 a DOM24_04055, e suas funções associadas ao T6SS estão indicadas por códigos como TssA, TssB, TssC, entre outros.

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

Na Figura 2, as cores diferentes representam os diferentes componentes funcionais do sistema T6SS, incluindo proteínas estruturais (como TssA, TssB, TssC) e outras proteínas acessórias ou hipotéticas. O cluster começa em torno da posição 855.207 bp e se estende até aproximadamente 880.207 bp. Essa organização linear de genes reflete a arquitetura típica do T6SS, que é essencial para a secreção de proteínas efetoras envolvidas na competição bacteriana e na sobrevivência em ambientes hostis, como hospitais. A legenda abaixo do mapa genômico detalha os *loci* dos genes e suas respectivas cores, facilitando a identificação dos componentes principais do T6SS. Na Tabela 1, os componentes identificados estão descritos, juntamente com suas posições e valor estatístico de confiança.

Tabela 1 - Genes do T6SS em *Acinetobacter radioresistens*

Locus tag (Gene)	Coordenadas (fita)	Tamanho (bp)	Produto	Componente	E-value
DOM24_03970	860207..861016 (-)	810	DotU family type IV/VI secretion system protein	TssL	1.51e-163
DOM24_03975	861028..862392 (-)	1365	type VI secretion system baseplate subunit TssK	TssK	0.0
DOM24_03980	862408..863511 (-)	1104	type VI secretion system protein TssA	TssA	0.0
DOM24_03985	863534..866221 (-)	2688	type VI secretion system ATPase TssH	TssH	0.0
DOM24_03990	866602..867288 (+)	687	hypothetical protein	'-	'-
DOM24_03995	867309..867812 (+)	504	type VI secretion system contractile sheath small subunit	TssB	7.18e-111
DOM24_04000	867805..869286 (+)	1482	type VI secretion system contractile sheath large subunit	TssC	0.0
DOM24_04005	869337..869840 (+)	504	type VI secretion system tube protein Hcp	TssD	7.71e-126
DOM24_04010	869920..870396 (+)	477	type VI secretion system baseplate subunit TssE	TssE	1.90e-97
DOM24_04015	870409..872217 (+)	1809	type VI secretion system baseplate subunit TssF	TssF	0.0
DOM24_04020	872181..873182 (+)	1002	type VI secretion	TssG	8.55e-172

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

DOM24_04025	873176..874597 (+)	1422	system baseplate subunit TssG hypothetical protein	'-	'-
DOM24_04030	874627..878415 (+)	3789	type VI secretion system membrane subunit TssM	TssM	0.0
DOM24_04035	878450..879409 (+)	960	type VI secretion system- associated protein TagF	'-	'-
DOM24_04040	879412..880173 (+)	762	OmpA family protein	'-	'-
DOM24_04045	880203..880469 (+)	267	PAAR domain- containing protein	'-	'-

A proteína TssI, também conhecida como "VgrG", desempenha um papel importante no T6SS, sendo uma das principais proteínas da ponta do complexo de injeção, que facilita a entrega de efetores às células-alvo (SHNEIDER, 2014). A ausência de um gene para TssI, no cluster genômico do T6SS, pode indicar que em *A. radioresistens*, esse sistema de secreção pode apresentar variações estruturais ou funcionais em relação ao T6SS convencional encontrado em outras bactérias.

Essa variação pode sugerir adaptações específicas no mecanismo de secreção da bactéria, ou que outras proteínas poderiam estar compensando a função de TssI. Alternativamente, a ausência pode ser uma consequência da anotação incompleta ou de variações genômicas, que podem estar relacionadas ao contexto ecológico e patogênico particular dessa espécie, como sua capacidade de persistir em ambientes hospitalares (JAWAD et al., 1998) e competir com outras bactérias.

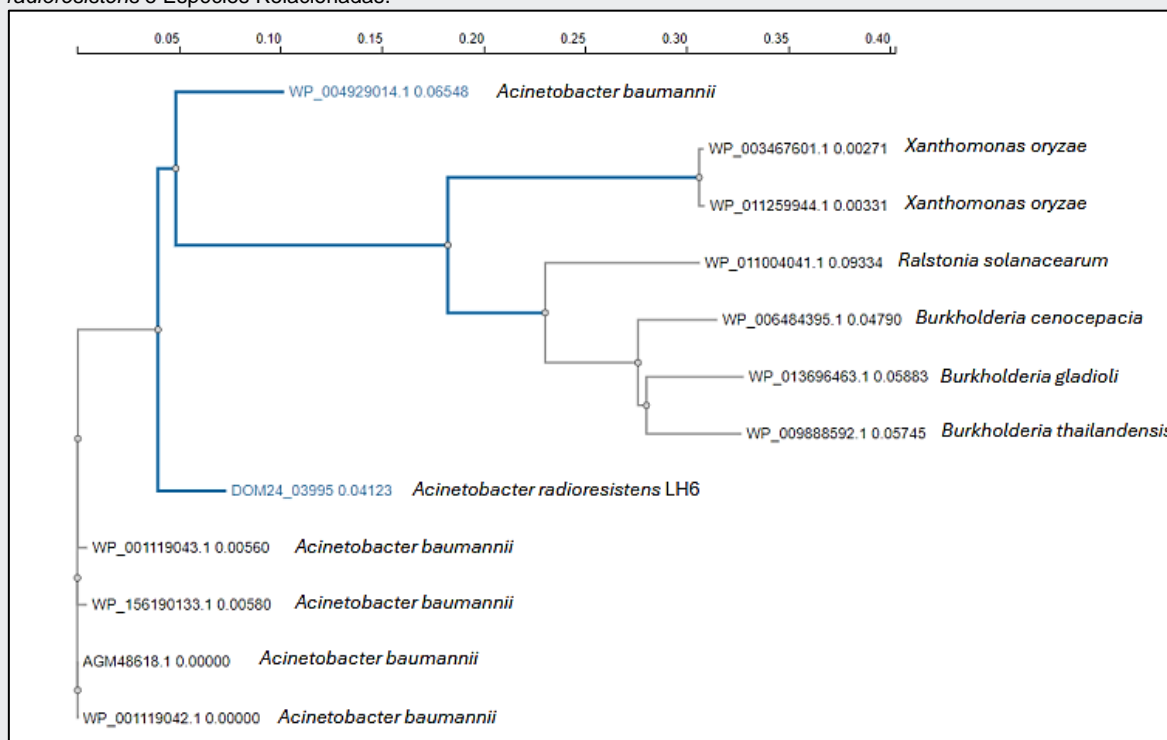
Ao realizar um blastn com a sequência de aminoácidos da proteína TssI de *Vibrio cholerae* contra o genoma de *A. radioresistens* LH6, identificamos que o gene DOM24_RS00405 está anotado como "type VI secretion system Vgr family protein", com 3314 nucleotídeos. Ao avaliarmos o contexto genômico observamos a presença de genes relacionados ao processo de captação de íons Zinco. Em outras genomas bacterianos, como de *Yersinia pseudotuberculosis*, *Burkholderia thailandensis* foi reportada a atividade do T6SS com o transporte de íons metálicos (WANG et al., 2015; SI et al., 2017a; SI et al., 2017b) e em *Klebsiella pneumoniae* foi inferido a possível atividade do T6SS no transporte de íons Ferro (BARBOSA et al., 2019).

Desta forma, este gene pode ser considerado um gene "órfão", que está distante do núcleo genômico, sugerindo que sua função e sua relação com outros genes próximos ainda são pouco compreendidas. A presença de genes órfãos pode indicar eventos de transferência horizontal ou adaptações específicas que conferem vantagens seletivas à bactéria em certos ambientes ou mesmo está associado a patogenicidade bacteriana (ENTWISTLE et al., 2019; FAKHA et al., 2023). Assim, é necessário realizar estudos mais aprofundados sobre esta região para determinar o papel exato deste gene no contexto da biologia de *Acinetobacter radioresistens* e sua interação com o sistema de secreção tipo VI (T6SS).

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

Neste estudo, foi identificado que o cluster gênico do T6SS pertence ao tipo i4b, uma subcategoria específica dos sistemas de secreção tipo VI, caracterizada por sua estrutura genética e composição proteica, Figura 3.

Figura 3 - Árvore Filogenética de Proteínas Relacionadas ao Sistema de Secreção Tipo VI (T6SS) em *Acinetobacter radioresistens* e Espécies Relacionadas.



O subtipo i4b é amplamente distribuído entre bactérias Gram-negativas e geralmente está associado a funções de competição interbacteriana, translocação de efetores, anti-eucariótica, de virulência e aderência (LI et al., 2015; GALLEGOS-MONTEROSA et al., 2021). A classificação desse cluster como tipo i4b reforça a ideia de que *A. radioresistens* utiliza esse sistema para competir com outras bactérias em seu nicho, destacando a importância de estudar sua organização genética e as proteínas envolvidas para entender melhor seus mecanismos de patogenicidade e resistência.

A Figura 3 apresenta uma árvore filogenética que ilustra a relação evolutiva entre as proteínas TssB do sistema de secreção tipo VI (T6SS). A proteína DOM24_03995, encontrada no genoma de *Acinetobacter radioresistens* LH6, está incluída no agrupamento que contém proteínas homólogas de outras espécies bacterianas, como *Acinetobacter baumannii* e várias espécies de *Burkholderia*, *Xanthomonas* e *Ralstonia*.

Ainda, a análise filogenética evidencia que a proteína DOM24_03995 de *A. radioresistens* está mais intimamente relacionada às proteínas de *Acinetobacter baumannii*, sugerindo uma proximidade evolutiva entre essas duas espécies no contexto do sistema de secreção tipo VI. No entanto, ela também compartilha homologia com proteínas de outros gêneros bacterianos, como *Xanthomonas*, *Ralstonia*, e *Burkholderia*, indicando que o sistema T6SS pode ter se dispersado amplamente entre diferentes gêneros bacterianos, provavelmente por transferência horizontal de genes.

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

A divergência das proteínas de *Xanthomonas oryzae* e *Burkholderia* em relação ao clado principal formado por *Acinetobacter* sugere que, embora essas proteínas sejam funcionalmente conservadas, elas passaram por variações evolutivas específicas em seus respectivos gêneros.

Essa árvore filogenética suporta a ideia de que o T6SS em *Acinetobacter radioresistens* compartilha uma base evolutiva com outras bactérias patogênicas, mas pode ter características específicas que diferenciam sua funcionalidade, especialmente em contextos hospitalares onde a pressão seletiva é alta (BAQUERO et al., 1998; EMARA et al., 2023).

A ausência de outros genes efetores, como *tse* ou *tde*, sugere que o sistema de secreção tipo VI nesta espécie pode apresentar uma composição funcional simplificada ou especializada, dependendo de um número limitado de efetores para mediar sua atividade biológica. Estudos funcionais adicionais são necessários para entender melhor como essa proteína efetora contribui para a biologia e sobrevivência da espécie em ambientes competitivos.

4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, foi possível identificar um cluster gênico do sistema de secreção tipo VI (T6SS) no genoma de *Acinetobacter radioresistens*. Esse cluster pertence ao subtipo i4b, uma subcategoria do T6SS amplamente distribuída entre bactérias Gram-negativas, que geralmente está associada a funções de competição interbacteriana e sobrevivência em ambientes desafiadores, como hospitais. A presença desse sistema em *A. radioresistens* reforça a ideia de que ele pode desempenhar um papel crucial na adaptação e persistência dessa espécie em ambientes hospitalares, onde a competição com outras bactérias patogênicas é intensa.

Um dos achados mais notáveis foi a ausência do gene que codifica a proteína TssI (VgrG), um componente chave no cluster gênico do T6SS. Entretanto o gene que codifica esta proteína foi identificado em região oposta ao do seu cluster. Este deslocamento pode indicar uma variação estrutural ou funcional no T6SS de *A. radioresistens*, sugerindo que esse sistema pode ter uma composição simplificada ou especializada em relação ao modelo convencional encontrado em outras espécies bacterianas. Isso aponta para possíveis eventos de transferência horizontal ou adaptações únicas que conferem uma vantagem seletiva à bactéria em ambientes de baixa umidade e alto uso de antimicrobianos, como os encontrados em hospitais.

Portanto, este estudo contribui para o entendimento do papel do T6SS em *A. radioresistens*, oferecendo uma base para futuras pesquisas que visem explorar a função dos genes identificados e o impacto desse sistema na virulência, resistência e adaptação ambiental dessa espécie.

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; BARKHOUSE, A.; HACKENBERGER, D.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance: A key microbial survival mechanism that threatens public health. **Cell Host Microbe**, v. 32, n. 6, p. 837-851, jun. 2024. DOI: 10.1016/j.chom.2024.05.015.
- BAQUERO, F.; NEGRI, M. C.; MOROSINI, M. I.; BLÁZQUEZ, J. Antibiotic-selective environments. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, suppl. 1, p. S5-S11, ago. 1998. DOI: 10.1086/514916.
- BARBOSA, V. A. A.; LERY, L. M. S. Insights into *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system transcriptional regulation. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 506, 18 jun. 2019. DOI: 10.1186/s12864-019-5885-9.
- BARRET, M.; EGAN, F.; FARGIER, E.; MORRISSEY, J. P.; O'GARA, F. Genomic analysis of the type VI secretion systems in *Pseudomonas* spp.: novel clusters and putative effectors uncovered. **Microbiology**, v. 157, n. 6, p. 1726-1739, 2011.
- BARRET, M.; EGAN, F.; O'GARA, F. Distribution and diversity of bacterial secretion systems across metagenomic datasets. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 117-126, 2013.
- BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, jan. 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3380.
- BOYER, F. et al. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome-wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 104, 2009.
- BOYER, F.; FICHANT, G.; BERTHOD, J.; VANDENBROUCK, Y.; ATTREE, I. Dissecando o sistema de secreção bacteriana tipo VI por uma análise in silico de todo o genoma: o que pode ser aprendido com os recursos genômicos microbianos disponíveis? **BMC Genomics**, v. 10, p. 104, 2009. DOI: 10.1186/1471-2164-10-104.
- CERCEO, E.; DEITELZWEIG, S. B.; SHERMAN, B. M.; AMIN, A. N. Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 5, p. 412-431, jul. 2016. DOI: 10.1089/mdr.2015.0220.
- CIANFANELLI, F. R.; MONLEZUN, L.; COULTHURST, S. J. Mirar, carregar, disparar: o sistema de secreção tipo VI, uma nanoarma bacteriana. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 51-62, 2016. DOI: 10.1016/j.tim.2015.10.005.
- DARBY, E. M.; TRAMPARI, E.; SIASAT, P.; GAYA, M. S.; ALAV, I.; WEBBER, M. A.; BLAIR, J. M. A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 280-295, maio 2023. DOI: 10.1038/s41579-022-00820-y. Erratum in: **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 255, abr. 2024. DOI: 10.1038/s41579-024-01014-4.

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

EMARA, Y.; JOLLIET, O.; FINKBEINER, M.; HEß, S.; KOSNIK, M.; SIEGERT, M. W.; FANTKE, P. Comparative selective pressure potential of antibiotics in the environment. **Environmental Pollution**, v. 318, p. 120873, 1 fev. 2023. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.120873.

ENTWISTLE, S.; LI, X.; YIN, Y. Orphan genes shared by pathogenic genomes are more associated with bacterial pathogenicity. **mSystems**, v. 4, n. 1, p. e00290-18, 12 fev. 2019. DOI: 10.1128/mSystems.00290-18.

FAKHAR, A. Z.; LIU, J.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. M.; MUKHTAR, M. S. The lost and found: unraveling the functions of orphan genes. **Journal of Developmental Biology**, v. 11, n. 2, p. 27, 13 jun. 2023. DOI: 10.3390/jdb11020027.

GALLEGOS-MONTERROSA, R.; COULTHURST, S. J. The ecological impact of a bacterial weapon: microbial interactions and the Type VI secretion system. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 6, p. fuab033, 23 nov. 2021. DOI: 10.1093/femsre/fuab033.

HAYES, B. K. et al. Structure of a Rhs effector clade domain provides mechanistic insights into type VI secretion system toxin delivery. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 8709, 2024.

JAWAD, A.; SNELLING, A. M.; HERITAGE, J.; HAWKEY, P. M. Exceptional desiccation tolerance of *Acinetobacter radioresistens*. **Journal of Hospital Infection**, v. 39, n. 3, p. 235-240, jul. 1998. DOI: 10.1016/s0195-6701(98)90263-8.

LI, J. B. et al. Novel pyrimidin-4-one derivatives as potential T3SS inhibitors against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Pest Management Science**, v. 79, n. 10, p. 3666-3675, out. 2023. DOI: 10.1002/ps.7545.

LI, J.; YAO, Y.; XU, H. H.; HAO, L.; DENG, Z.; RAJAKUMAR, K. et al. SecReT6: a web-based resource for type VI secretion systems found in bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 2196-2202, jul. 2015. DOI: 10.1111/1462-2920.12733.

LI, Y. et al. TagP, a PAAR-domain containing protein, plays roles in the fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, p. 1379106, 2024.

MA, J. et al. The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1189-1202, 2017.

MOTA, F. S. da; OLIVEIRA, H. A. de; SOUTO, R. C. F. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, p. 270-277, 2018.

NAGA, N. G.; SHAABAN, M. I.; EL-METWALLY, M. M. An insight on the powerful of bacterial quorum sensing inhibition. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 19 ago. 2024. DOI: 10.1007/s10096-024-04920-w.

PENDLETON, J. N.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 3, p. 297-308, 2013. DOI: 10.1586/eri.13.12.

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

PUKATZKI, S. et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1528-1533, 2006.

PUKATZKI, S. et al. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 39, p. 15508-15513, 2007.

RUSSELL, A. B.; PETERSON, S. B.; MOUGOUS, J. D. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 137-148, 2014.

SHNEIDER, M. M.; BUTH, S. A.; HO, B. T.; BASLER, M.; MEKALANOS, J. J.; LEIMAN, P. G. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. **Nature**, v. 500, n. 7462, p. 350-353, 15 ago. 2013. DOI: 10.1038/nature12453.

SHYNTUM, D.; VENTER, S.; MOLELEKI, L.; TOTH, I.; COUTINHO, T. Comparative genomics of type VI secretion systems in strains of *Pantoea ananatis* from different environments. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 163, 2014.

SI, M.; WANG, Y.; ZHANG, B.; ZHAO, C.; KANG, Y.; BAI, H. et al. The Type VI Secretion System engages a redox-regulated dual-functional heme transporter for zinc acquisition. **Cell Reports**, v. 20, n. 4, p. 949-959, jul. 2017a.

SI, M.; ZHAO, C.; BURKINSHAW, B.; ZHANG, B.; WEI, D.; WANG, Y. et al. Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 11, p. E2233-E2242, 14 mar. 2017b.

SUN, Y. et al. *Acinetobacter nosocomialis* utilizes a unique type VI secretion system to promote its survival in niches with prey bacteria. **mBio**, v. 15, n. 7, p. e01468-24, 2024.

VIRGO, M.; MOSTOWY, S.; HO, B. T. Use of zebrafish to identify host responses specific to type VI secretion system mediated interbacterial antagonism. **PLoS Pathogens**, v. 20, n. 7, p. e1012384, 2024.

WANG, M. et al. VRprofile2: detection of antibiotic resistance-associated mobilome in bacterial pathogens. **Nucleic Acids Research**, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkac321.

WANG, T. et al. *Acinetobacter radioresistens* infection with bacteremia and pneumonia. **IDCases**, v. 15, p. e00495, 2019. DOI: 10.1016/j.idcr.2019.e00495.

WANG, T.; SI, M.; SONG, Y.; ZHU, W.; GAO, F.; WANG, Y. et al. Type VI Secretion System transports Zn²⁺ to combat multiple stresses and host immunity. In: SKAAR, E. P. (Org.). **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1005020, 2 jul. 2015. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005020.

WEBER, B. S. et al. Genetic dissection of the type VI secretion system in *Acinetobacter* and identification of a novel peptidoglycan hydrolase, TagX, required for its biogenesis. **mBio**, v. 7, n. 5, p. e01253-16, 2016.

REVISTA ARTE, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FACULDADE CET

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance**. Geneva: WHO, 2001. p. 1-105.

ZHANG, J. et al. SecReT6 update: a comprehensive resource of bacterial Type VI Secretion Systems. **Science China Life Sciences**, 2022. DOI: 10.1007/s11427-022-2172-x.