

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta será disponibilizado somente a partir de 27/08/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia

BRUNA CARDINALI LUSTRI

**Caracterização da patogenicidade e sinalização química de cepas
protótipo e amostras clínicas de *Escherichia coli* uropatogênica
frente ao composto LED209**

Araraquara - SP

2019

BRUNA CARDINALI LUSTRI

Caracterização da patogenicidade e sinalização química de cepas protótipo e amostras clínicas de *Escherichia coli* uropatogênica frente ao composto LED209

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira.

Araraquara - SP

2019

L972c Lustri, Bruna Cardinali.
Caracterização da patogenicidade e sinalização química de cepas protótipo e amostras clínicas de *Escherichia coli* uropatogênica frente ao composto LED209 / Bruna Cardinali Lustri. – Araraquara: [s.n.], 2019.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Microbiologia.

Orientador: Cristiano Gallina Moreira.

1. UPEC. 2. Infecção do trato urinário. 3. Sinalização química. 4. LED209. I. Moreira, Cristiano Gallina, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Caracterização da patogenicidade e sinalização química de cepas protótipo e amostras clínicas de *Escherichia coli* uropatogênica frente ao composto LED209

AUTORA: BRUNA CARDINALI LUSTRI

ORIENTADOR: CRISTIANO GALLINA MOREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

Depto. de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biotecnologias - UNESP - Botucatu

Profa. Dra. PAULA ABOUD BARBUGLI

Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia - UNESP - Araraquara

Araraquara, 27 de agosto de 2019

Dedico essa conquista aos meus pais que sempre me incentivaram a ir em busca dos meus sonhos e dos meus ideais, que nunca mediram esforços em me auxiliar para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, que sempre me apoiaram e me deram forças para continuar.

Dedico também ao meu irmão Igor, que sempre esteve ao meu lado durante toda essa caminhada, sempre me dando motivos para continuar.

Dedico aos meus Avós presentes, Dinha e João, aos meus Avós ausentes, Adolpho e Ivani por terem feito a diferença em minha vida.

Dedico ao meu marido Alder, por todo o apoio, por toda paciência, por sempre me incentivar a buscar os meus sonhos, pelo ombro amigo nas horas que mais precisei, por estar ao meu lado sempre me apoiando durante toda essa caminhada.

Dedico ao meu filho Heitor, ainda que dentro do meu ventre, nos últimos 8 meses tem compartilhado comigo intimamente todos os sentimentos, emoções, crises de ansiedade, alegrias e conquistas, cada pedacinho do meu dia e dessa minha caminhada, que nos meus momentos de fraqueza, sempre me dá forças e motivos para continuar.

Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus, por ser a base das minhas conquistas.

Aos meus pais Kátia e Rogério, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada, me dando todo o apoio necessário para eu chegar até aqui.

Ao meu irmão Igor, pelos momentos de distração que me proporcionou, além de estar ao meu lado me ajudando sempre que eu precisava.

Aos meus avós Dinha, Adolpho (*in memoriam*), Ivani (*in memoriam*) e João por terem dado início a essa jornada.

Ao meu marido Alder, por compreender as minhas loucuras no final dessa caminhada e sempre procurar me tranquilizar nos meus momentos de ansiedade, por sempre estar ao meu lado me dando todo apoio necessário para superar os obstáculos e chegar até aqui.

Àqueles que estiveram presentes durante toda essa caminhada e que fazem a diferença em minha vida, minha madrinha Denise, Mário, minha prima-irmã Gabi, Pedro, minha sobrinha Natália.

Ao Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira pela orientação, por todo o incentivo e confiança, para que fosse possível o sucesso na execução desse trabalho.

Ao pessoal do laboratório Tamara, Karine, Fernanda, Patrick, Vânia, Luana, por todos os momentos divertidos que vivenciamos, além de toda ajuda e apoio nos momentos que mais precisei.

Ao meu Minion de estimação (Tamara), pela amizade, por todas as conversas, desabafos e ajuda que me deu durante essa caminhada, nunca medindo esforços para me auxiliar, principalmente na reta final!

A Isabela, pela amizade, dedicação e por todo o auxílio no desenvolvimento dos experimentos *in vivo*.

Ao apoio técnico da Débora, por todo o auxílio durante esses anos.

A todos os meus amigos que souberam compreender a minha ausência durante toda essa caminhada.

Àqueles que de alguma forma passaram por minha vida nesses anos, e contribuíram para a minha formação tanto pessoal quanto profissional.

À Fapesp (Processos 2014/06779-2 e 2017/19243-1) por ter financiado esse trabalho, tornando possível a realização de um sonho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos, meu muito obrigada!

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
volta ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

Resumo

As infecções do trato urinário são frequentes no mundo todo, sendo a *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC) o patógeno responsável pela maior parte dos casos de cistite e pielonefrite aguda. A patogenicidade das UPECs está relacionada a expressão de diversos fatores de virulência, sendo a regulação da expressão desses fatores mediada por moléculas sinalizadoras químicas que permitem a comunicação célula-célula inter e intra-reinos, o que facilita o processo de colonização e estabelecimento da patogênese. Um dos sistemas responsáveis por essas cascatas de sinalização é composto por uma proteína sensora de membrana (QseC) e outra reguladora de resposta citoplasmática (QseB), constituindo o sistema de dois componentes QseBC, capaz de reconhecer sinais produzidos pelo hospedeiro e por outras bactérias, levando a regulação da expressão de genes de virulência do patógeno. Estudos realizados pelo nosso grupo, evidenciaram atenuação da virulência de patógenos Gram-negativos na ausência do gene *qseC*, levando ao desenvolvimento de moléculas que atuassem inibindo essa via como o LED209. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar cepas multi-droga resistentes (MDR) de UPECs obtidas a partir de isolados clínicos, além de investigar, *in vitro* e *in vivo*, a participação da via QseBC na patogênese e na virulência de cepas de UPECs e isolados clínicos MDR, com o uso do composto LED209 na atenuação da virulência frente a esses patógenos. Também constituiu o objetivo, o uso do ácido 3,4-di-hidroxi mandélico (DHMA), metabólito intermediário da norepinefrina, como quimioatrativo. Os resultados obtidos demonstraram uma elevada quantidade de isolados clínicos MDR produtores β -lactamases. O fenótipo de motilidade das cepas selvagens de UPEC foi influenciado pelo DHMA, sendo que o mesmo não foi observado para o mutante $\Delta qseC$. Também foi verificado por qRT-PCR que na presença de DHMA, houve redução na expressão gênica de *qseC*, super expressão de *visP* e *fimH* nas cepas de UPEC. O DHMA apresentou efeito de inibição na formação de biofilme a 30°C e 37°C para todas as cepas. O uso do LED209 demonstrou efeito significativo na redução da formação de biofilme nas cepas testadas, embora não tenha afetado a motilidade dessas cepas. Os resultados dos experimentos *in vivo* não demonstraram diferenças significativas de colonização da bexiga entre as cepas de UPECs testadas e o mutante $\Delta qseC$. Os resultados obtidos abrem perspectiva para o estudo mais aprofundado da influência do DHMA e do LED209 na expressão de genes de virulência em UPECs, além da necessidade de compreender o papel desempenhado por QseC para o processo infeccioso desses patógenos.

Palavras-chave: UPEC, infecção do trato urinário, sinalização química, LED209

Abstract

Urinary tract infections are found commonly worldwide, whereas Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the most prevalent pathogen, responsible for utmost cases of cystitis and acute pyelonephritis. The pathogenicity of UPECs is related to the expression of several virulence factors, and the regulation of the expression of these factors is mediated by chemical signaling molecules. The communication allow inter-intra-kingdom and cell-to-cell facilitates the process of colonization and establishment of pathogenesis. QseBC two-component system is capable of recognizing signals produced by the host leading to regulation of pathogen virulence gene expression. This system consists of membrane sensing protein (QseC) and a cytoplasmic response regulator (QseB) that mediate the entire cascade of virulence genes. Studies conducted by our group showed attenuation of the virulence of Gram-negative pathogens in the absence of the *qseC* gene, leading to the development of molecules that act by inhibiting this pathway such as LED209. The aim of the present study was to characterize UPEC multidrug-resistant strains (MDR) from clinical isolates. Investigate, *in vitro* and *in vivo*, the involvement of the QseBC pathway in the pathogenesis and virulence of UPEC strains and clinical isolates. The use of LED209 and the 3,4-dihydroximandelic acid (DHMA), norepinephrine intermediate metabolite, as chemoattractant, were employed to attenuate of virulence against these pathogens. The results showed a high level of β -lactamases produced by clinical isolates. The motility phenotype of wild UPEC strains was influenced by DHMA at 10 μ M concentration, which was not observed for the Δ *qseC* mutant. It was also verified by qRT-PCR that at 10 μ M DHMA concentration, there was a reduction in *qseC* gene expression, overexpression of *visP* and *fimH* in UPEC strains. DHMA showed inhibitory effect on biofilm formation at 30 ° C and 37 ° C for all strains. Experiments with LED209 showed significant effect on reducing biofilm formation in the tested strains, however, showed no significant effect on motility swimming test. The results of the *in vivo* experiments showed no significant differences in bladder colonization between the UPEC strains and the Δ *qseC* mutant. These results have opened perspectives to further study the influence of DHMA and LED209 on virulence gene expression of UPEC, as well as point out the need to understand the role played by QseC in these worrisome bacterial pathogens infection.

Keywords: UPEC, urinary tract infection, chemical signaling, LED209

Lista de Figuras

- Figura 1 - Mecanismos de Ação e Mecanismos de Resistência de Antimicrobianos20
- Figura 2 - O Sistema de Dois componentes QseBC.....23
- Figura 4 - Reação de Metabolização da Norepinefrina **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5 – Sinalização química, metabolismo da Ne em DHMA e resposta quimiotática **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6 - Esquema representando as etapas do ensaio de motilidade swimming **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7 - Esquema da infecção in vivo com 10^8 UFC..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8 - Esquema da infecção in vivo com 10^9 UFC **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 1 - Perfil de Resistência a Antimicrobianos **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 2 - β -Lactamases presentes nos isolados clínicos **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 3 - Genes de Resistência a Antimicrobianos **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9 - Biofilme em diferentes condições de crescimento ... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10 – Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica em diferentes concentrações de DHMA **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 11 - Fenótipo de motilidade das amostras clínicas frente aos protótipos e ao mutante. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12 - Halo de motilidade Swimming em LBA 0,25% **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13 - Expressão gênica de genes de virulência em UPEC**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 14- Colonização da bexiga após 72h de infecção com 10^8 UFCE**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 15 - Colonização da bexiga após 72h de infecção com 10^9 UFCE**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 3 - Fatores de Virulência associados a UPEC **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 4 - Cepas, mutantes e complementados obtidos **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 16 - Ensaio de motilidade swimming com 8 horas de incubação a 37°C **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 17 - Ensaio de formação de Biofilme 24h a 37°C e 5% CO_2 .**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 18 - Expressão gênica de fimH nas cepas BR43 e EC958 após tratamento com LED209. **Erro! Indicador não definido.**

Lista de abreviatura e siglas

$\Delta qseC$	Mutante <i>knockout</i> do gene <i>qseC</i>
:: <i>qseC</i>	Mutante por interrupção do gene <i>qseC</i>
:: <i>visP</i>	Mutante por interrupção do gene <i>visP</i>
:: <i>qseC+</i>	Mutante por interrupção do gene <i>qseC</i> complementado por construção plasmidial contendo o gene <i>qseC</i>
AE	Lesão tipo “pedestal” causada pela EHEC no enterócito – do inglês “ <i>attaching-effacing</i> ”
AI-3	molécula sinalizadora química produzida por bactérias – do inglês “ <i>autoindutor-3</i> ”
Amp	ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
CIP	ciprofloxacino
DHMA	ácido 3,4-di-hidroxi mandélico
DO550nm	Densidade óptica 550nm
DO600nm	Densidade óptica 600nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enteroemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
Epi	Epinefrina
ESBL	Betalactamase de Espectro Estendido
EspA	proteína que codifica a Ilha de Patogenicidade LEE de EHEC
EspB	proteína que codifica a Ilha de Patogenicidade LEE de EHEC
FeaB	enzima aldeído desidrogenase aromática, participa do processo de metabolização da Ne em DHMA

<i>fimH</i>	gene que codifica fimbria tipo-1
<i>FliC</i>	gene que codifica o filamento do flagelo
Gm	gentamicina
IBC	comunidade bacteriana intracelular – do inglês “ <i>Intracellular Bacterial Communities</i> ”
ITU	infecção do trato urinário
<i>iutA</i>	receptor de aerobactina
Km	Canamicina
LEE	Ilha de Patogenicidade de EHEC – do inglês “ <i>Locus Enterocyte Effacement</i> ”
Lev	levofloxacino
<i>malX</i>	marcador de ilha de patogenicidade
NAL	ácido nalidíxico
Ne	norepinefrina
PAI	Ilha de patogenicidade de UPEC
PBS	tampão fosfato-salino
qRT-PCR	Reação Quantitativa da Cadeia de Polimerase com Transcriptase Reversa – do inglês “ <i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i> ”
QseB	Proteína Reguladora de Resposta
QseBC	Sistema de dois componentes composto por uma proteína sensora QseC e uma proteína reguladora de resposta QseB
QseC	Proteína sensora de membrana interna
<i>qseC</i>	gene da proteína sensora de membrana interna
RR	regulador de resposta
<i>sat</i>	toxina autotransportadora secretada
SESA-SP	Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo
TCS	Sistema de dois Componentes – do inglês “ <i>two-components system</i> ”
Tet	tetraciclina
TGI	Trato Gastrintestinal
TU	Trato Urinário
TynA	enzima tiramina oxidase periplasmática, participa do processo de metabolização da Ne em DHMA
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica
<i>usp</i>	proteína específica da uropatogenia

visP gene responsável pela Proteína Periplasmática Relacionada a Estresse e Virulência

VisP Proteína Periplasmática Relacionada a Estresse e Virulência – do inglês “*Virulence and stress-related periplasmic protein*”

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1. A patogênese da Escherichia coli Uropatogênica (UPEC).....	18
1.2. Escherichia coli Uropatogênica – Clones ST131 e sua importância clínica	18
1.3. Bactérias Multi-drogas resistentes (MDR)	20
1.4. Sinalização química	22
1.5. Sistema de 2-componentes QseBC e LED209	23
1.6. Sinalização química via QseBC e Ácido 3,4-di-hidroxi mandélico (DHMA)	25
2. Objetivos	Erro! Indicador não definido.
2.1. Objetivos gerais	Erro! Indicador não definido.
2.2. Objetivos específicos	Erro! Indicador não definido.
3. Material e Métodos.....	Erro! Indicador não definido.
3.1. Cultivo e armazenamento de bactérias	Erro! Indicador não definido.
3.2. Perfil de resistência a antimicrobianos	Erro! Indicador não definido.
3.3. Sequenciamento Genômico	Erro! Indicador não definido.
3.4. Identificação de genes de virulência e resistência a antimicrobianos das amostras clínicas sequenciadas	Erro! Indicador não definido.
3.5. Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica.....	Erro! Indicador não definido.
3.6. Ensaio de formação de biofilme 24h em superfície abiótica utilizando LED209	Erro! Indicador não definido.
3.7. Ensaio de motilidade Swimming	Erro! Indicador não definido.
3.7.1. Ensaio de motilidade <i>Swimming</i> em condições diferenciadas	Erro! Indicador não definido.

- 3.7.2. Ensaio de motilidade *Swimming* utilizando LED209**Erro! Indicador não definido.**
- 3.8. Extração de RNA**Erro! Indicador não definido.**
- 3.9. Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....**Erro! Indicador não definido.**
- 3.10. Modelo de infecção in vivo utilizando C57BL/6**Erro! Indicador não definido.**
- 3.10. Análise da expressão gênica por qRT-PCR na presença e ausência se LED209
Erro! Indicador não definido.
- 3.11. Construção de mutante e complementação.....**Erro! Indicador não definido.**
- 3.12. Análise Estatística dos Resultados.....**Erro! Indicador não definido.**
4. Resultados e Discussão**Erro! Indicador não definido.**
- 4.1. Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras clínicas**Erro! Indicador não definido.**
- 4.2. Sequenciamento Genômico**Erro! Indicador não definido.**
- 4.3. Formação de Biofilme em superfície abiótica**Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.1. Ensaio de formação de biofilme 24h em superfície abiótica em diferentes condições de crescimento e temperatura**Erro! Indicador não definido.**
- 4.3.2. Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica em diferentes concentrações de DHMA**Erro! Indicador não definido.**
- 4.4. Motilidade mediada por flagelo tipo “swimming” .**Erro! Indicador não definido.**
- 4.5. Motilidade swimming em condições diferenciadas**Erro! Indicador não definido.**
- 4.6. Estudo da expressão gênica das cepas EC958, Δ qseC e BR43 na presença de 10uM de DHMA.....**Erro! Indicador não definido.**
- 4.7. Infecção in vivo utilizando C57BL/6**Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.1. Infecção *in vivo* utilizando C57BL/6 – Dose de infecção 10^8 UFC**Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.2. Infecção *in vivo* utilizando C57BL/6 – Dose de infecção 10^9 UFC**Erro! Indicador não definido.**
- 4.8. Fatores de virulência associados à UPEC**Erro! Indicador não definido.**

4.9. Mutantes obtidos pela técnica do Vetor Suicida e seus respectivos complementados	Erro! Indicador não definido.
4.10. Ensaio de motilidade swimming utilizando LED209	Erro! Indicador não definido.
4.11. Ensaio de formação de biofilme 24h utilizando LED209	Erro! Indicador não definido.
4.12. Análise da expressão gênica de fimH por qRT-PCR nas cepas EC958, BR43 na presença LED209.....	Erro! Indicador não definido.
5. Conclusões	58
6. Perspectivas.....	59
7. Referências Bibliográficas	60
ANEXO I - Artigos Publicados	70

1. Introdução

1.1.A patogênese da *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC)

As infecções do trato urinário são frequentes em diversos países incluindo o Brasil. Segundo a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SESA-SP), em 2014 foram registradas 34.343 internações decorrentes de infecção do trato urinário (ITU), o que corresponde a uma média de 94 pessoas internadas diariamente em hospitais públicos do Estado devido a sintomas de ITU (SESA-SP, 2015).

Responsáveis por cerca de 75% dos casos de ITU não complicadas (cistites agudas) e 65% dos casos complicados (pielonefrites e sepse) (BECKNELL; SCHOBER; KORBEL; SPENCER, 2015; FOXMAN, 2014; STAMM; NORRBY, 2001), as *Escherichia coli* uropatogênicas (UPECs) são de extrema importância em saúde pública global pois, além de ser um dos patógenos mais envolvidos em infecções humanas, estão envolvidos no expressivo aumento de resistência bacteriana a diversos antimicrobianos (LO; MORIEL; PHAN; SCHULZ *et al.*, 2017).

O início do processo de patogênese de UPEC pode ocorrer por via descendente, quando a bactéria atinge o trato urinário (TU) por via hematogênica ou, mais comumente, por via ascendente, quando a bactéria atinge o TU via uretra (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MOBLEY; DONNENBERG; HAGAN, 2009).

O processo infeccioso por via ascendente ocorre devido a presença de adesinas específicas (fímbria P e fímbria tipo-1), que permitem a adesão da bactéria às células do TU permitindo a colonização e invasão do epitélio formando as chamadas comunidades bacterianas intracelulares (IBCs). Além da função de adesão, a fímbria tipo-1 também auxilia na seleção de colônias de *E. coli* em baixas concentrações de O₂ e permite a migração da mesma através dos ureteres até os rins. Com auxílio das fímbrias P as bactérias se aderem às células epiteliais tubulares dos rins induzindo a produção de citocinas, o que promove o quadro inflamatório. As oscilações na concentração de Ca²⁺ nas células renais promove a ativação da transcrição de genes responsáveis pela produção da toxina hemolisina pela bactéria. Em casos mais graves, a *E. coli* pode atingir a corrente sanguínea, através dos rins, levando o paciente a quadros de bacteremia e sepse. Esses fatores de virulência são codificados nas chamadas Ilhas de Patogenicidade (PAIs) e fornecem as UPECs vantagens para o estabelecimento de infecções extra intestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.2. *Escherichia coli* Uropatogênica – Clones ST131 e sua importância clínica

Relatos de *E. coli*, classificadas de acordo com vários *loci* gênicos, comuns em diferentes cepas, designados por *sequence type* (ST), dos quais se destaca o ST131 que vem sendo reportado há mais de 10 anos no mundo todo (CAMPOS; ANDRADE; FERDOUS; CHLEBOWICZ *et al.*, 2018; KAKKANAT; PHAN; LO; BEATSON *et al.*, 2017; LAU; KAUFMANN; LIVERMORE; WOODFORD *et al.*, 2008; LAU; REDDY; CHEESBROUGH; BOLTON *et al.*, 2008; NICOLAS-CHANOINE; BLANCO; LEFLON-GUIBOUT; DEMARTY *et al.*, 2008; PETTY; BEN ZAKOUR; STANTON-COOK; SKIPPINGTON *et al.*, 2014; ROGERS; SIDJABAT; PATERSON, 2011; SARKAR; HUTTON; VAGENAS; RUTER *et al.*, 2018; SARKAR; VAGENAS; SCHEMBRI; TOTSIKA, 2016; TOTSIKA; BEATSON; SARKAR; PHAN *et al.*, 2011). Os clones ST131 apresentam grande interesse em medicina por serem produtores de uma β -lactamase de espectro estendido (ESBL) conhecida como CTX-M-15, que promove resistência a betalactâmicos (NICOLAS-CHANOINE; BLANCO; LEFLON-GUIBOUT; DEMARTY *et al.*, 2008), além da resistência a fluoroquinolonas (LAU; REDDY; CHEESBROUGH; BOLTON *et al.*, 2008).

No Brasil, o aumento no número de isolados produtores de ESBL e carbapenemases em meados de 2000, foi associado ao uso empírico irracional de antimicrobianos, principalmente cefalosporinas e carbapenemas. Para contornar essa situação, em 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a venda de antimicrobianos sem prescrição médica. Mesmo assim, ainda é alto o número de isolados ESBL em infecções de comunidade e hospitalar, o que demonstra a complexidade envolvida no controle e na disseminação de bactérias ESBL no Brasil e no mundo (PEIRANO; ASENSI; PITONDO-SILVA; PITOUT, 2011; SILVA; LINCOPAN, 2012). O número casos de ITU causadas por UPECs produtoras de ESBL tem aumentado no Brasil, entretanto, ainda pouco se sabe sobre a prevalência de clones ST131 (CAMPOS; ANDRADE; FERDOUS; CHLEBOWICZ *et al.*, 2018; ROGERS; SIDJABAT; PATERSON, 2011).

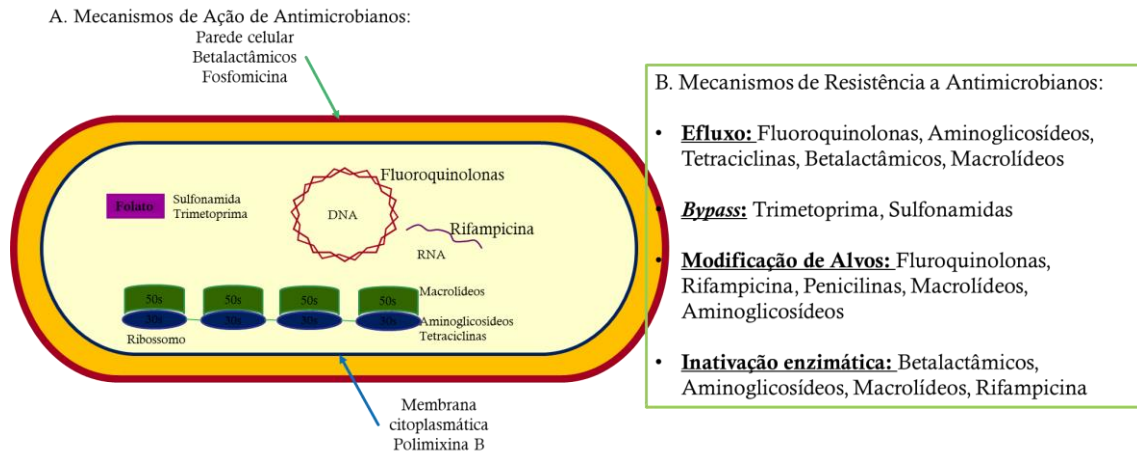
Evidências clínicas sugerem que os clones ST131 constituem o grupo mais virulento das UPECs (JOHNSON; ANDERSON; CLABOTS; JOHNSTON *et al.*, 2010). Estudos clínicos reportaram transferência intrafamiliar de cepas ST131, em um deles, uma menina de 8 meses de idade desenvolveu artrite séptica grave e osteomielite, a mesma cepa foi isolada da mãe e do pai da menina (JOHNSON; ANDERSON; CLABOTS; JOHNSTON *et al.*, 2010). Já, o segundo estudo, um homem de 68 anos foi internado com pielonefrite grave e múltiplos abscessos, pouco tempo depois, a filha de 42 anos, foi internada com choque séptico, bacteremia e extensa pielonefrite enfisematosa ambos com infecção causada pela mesma bactéria (ENDER; GAJANANA; JOHNSTON; CLABOTS *et al.*, 2009).

Apenas alguns genes de virulência estão uniformemente conservados nos clones ST131, como fimbria tipo-1 (*fimH*), toxina autotransportadora secretada (*sat*), receptor de aerobactina (*iutA*), proteína específica da uropatogenia (*usp*) e marcador de ilha de patogenicidade (*malX*)(COELHO; MORA; MAMANI; LOPEZ *et al.*, 2011; JOHNSON; JOHNSTON; CLABOTS; KUSKOWSKI *et al.*, 2010; JOHNSON; MENARD; JOHNSTON; KUSKOWSKI *et al.*, 2009; NICOLAS-CHANOINE; BLANCO; LEFLON-GUIBOUT; DEMARTY *et al.*, 2008).

1.3. Bactérias Multi-drogas resistentes (MDR)

A descoberta da penicilina em 1928, por Alexander Fleming, foi o marco histórico da era dos antibióticos, levando a produção e comercialização de muitos outros compostos antimicrobianos, que levaram a redução da mortalidade de indivíduos acometidos por infecções bacterianas(NIKAIDO, 2009). Entretanto, o uso irracional e indiscriminado desses antimicrobianos contra infecções bacterianas levou a seleção de bactérias, denominadas multidroga resistentes (MDR), ou seja, bactérias capazes de sobreviver a exposição a diferentes classes de agentes antimicrobianos. O aumento de isolados com essas características vem se tornando uma crescente ameaça à saúde pública global devido à escassez de recursos para tratamento dessas infecções, tendo como consequência a alta taxa de mortalidade e altos custos com tratamentos médicos (TANWAR; DAS; FATIMA; HAMEED, 2014).

Os mecanismos que tornam a bactéria resistente aos mais diversos antimicrobianos estão associados a capacidade de inativar ou degradar o antimicrobiano por ação enzimática, presença de bombas de efluxo que promovem a saída do antimicrobiano da célula bacteriana, alteração de permeabilidade de membrana, mutação no sítio de ligação do fármaco, mutações cromossômicas ou genes de resistência contidos em plasmídeos (provenientes de transferência horizontal) (ALEKSHUN; LEVY, 2007)(Figura 1).



Fonte: O autor.

Figura 1 – A. Principais mecanismos de Ação de Antimicrobianos. inibição de síntese de parede por interferir na síntese de peptidoglicano: betalactâmicos e fosfomicina; desestabilização de membrana citoplasmática: polimixinas; inibição de síntese proteica: aminoglicosídeos, tetraciclina (subunidade 30s do ribossomo) e macrolídeos (subunidade 50s do ribossomo); inibição da DNA girase ou topoisomerase II e topoisomerase IV: fluoroquinolonas; inibição da síntese de RNA mensageiro: rifampicina; inibidores de síntese de ácido fólico: sulfonamida (inibição da diidropteroato sintetase) e trimetoprima (inibição da diidrofolato redutase). B. Mecanismos de resistência de antimicrobianos. Bombas de efluxo: fluoroquinolonas, tetraciclina, betalactâmicos, macrolídeos; *by-pass*: trimetoprima e sulfonamidas; modificação de alvos: fluoroquinolonas, rifampicina, penicilinas, macrolídeos, aminoglicosídeos; inativação enzimática: betalactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos e rifampicina.

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de patógenos prioritários globais, solicitando a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos efetivos para o tratamento das principais infecções causadas por bactérias MDR dentro de três níveis prioritários: Crítico, Alta Prioridade e Média Prioridade. O grupo Crítico, ou seja, aquele considerado o de mais alta prioridade, inclui *Mycobacteria* e bactérias Gram-negativas MDR, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e várias Enterobacteriaceae resistentes a carbapenemas e cefalosporinas de 3ª geração, como *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* (que inclui as UPECs ST131), *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp. que compõem uma ameaça particular em hospitais, lares de idosos e principalmente entre aqueles pacientes que necessitam de ventilação mecânica, cateteres venosos e sondas vesicais (WHO | Antimicrobial resistance, 2016; WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017; WHO, 2017), ressaltando a importância do desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas que apresentem novos mecanismos de ação.

1.4. Sinalização química

Para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, diversos alvos bioquímicos e moleculares devem ser estudados, de forma a compreender a função de cada um deles na sobrevivência e patogênese bacteriana. Além dos fatores de virulência característicos e amplamente disseminados entre as UPECs, como adesinas fimbriais, toxinas, sideróforos, antígenos-O, cápsula e resistência ao soro (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), outros mecanismos podem levar ao aumento da virulência dos microrganismos e serem possíveis alvos de ação de novos fármacos. O estudo da sinalização química e da regulação de expressão gênica em bactérias constitui uma importante etapa para o desenvolvimento racional de novas moléculas que atuem no combate a infecções por patógenos bacterianos, especialmente os MDR (TOTSIKA; KOSTAKIOTI; HANNAN; UPTON *et al.*, 2013).

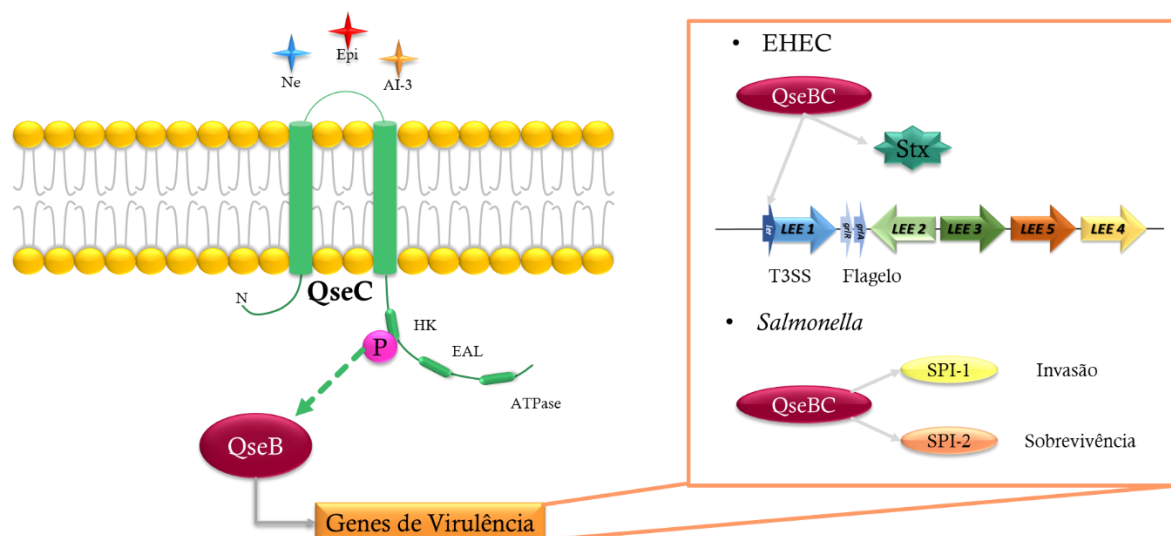
A sinalização química em seres vivos é responsável pela comunicação intercelular e permeia a comunicação inter e intraespecífica, além da comunicação inter-reinos (SPERANDIO; LI; KAPER, 2002; SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003). Os hormônios adrenérgicos de estresse produzidos pelo hospedeiro, como epinefrina (Epi) e norepinefrina (Ne), e produzido pela microbiota intestinal, como o autoindutor-3 (AI-3) constituem moléculas sinalizadoras químicas que apresentam um papel importante na virulência bacteriana (CLARKE; HUGHES; ZHU; BOEDEKER *et al.*, 2006; HUGHES; CLARKE; YAMAMOTO; RASKO *et al.*, 2009; HUGHES; SPERANDIO, 2008; MOREIRA; SPERANDIO, 2016).

Patógenos como a *E. coli*, são capazes de reconhecer a presença de hormônios adrenérgicos, por meio de sensores de membrana interna, como por exemplo QseC. O sensor QseC é uma proteína de membrana interna da bactéria Gram-negativa, que tem função histidina quinase. Na presença de Epi, Ne ou AI-3, QseC autofosforila seu resíduo de histidina e transfere o grupamento fosfato ao seu regulador de resposta (RR) cognato QseB, que leva a ativação de uma cascata de regulação responsável pela expressão de genes de virulência do patógeno. Esse sistema caracterizado por uma proteína sensora e um regulador de resposta é conhecido como o sistema de dois-componentes (TCS) e denominado QseBC (MOREIRA; SPERANDIO, 2012; SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003; SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002) (Figura 2).

O TCS QseBC foi previamente reportado em cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (CLARKE; HUGHES; ZHU; BOEDEKER *et al.*, 2006; SPERANDIO; MELLIES; NGUYEN; SHIN *et al.*, 1999), *S. Typhimurium*, *Francisella tularensis* (BEARSON; BEARSON, 2008; MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010; RASKO;

ROSOVITZ; MYERS; MONGODIN *et al.*, 2008), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (SIRCILI; WALTERS; TRABULSI; SPERANDIO, 2004), *E. coli* Uropatogênica (UPEC) (HADJIFRANGISKOU; KOSTAKIOTI; CHEN; HENDERSON *et al.*, 2011) como sendo responsável pelo aumento da virulência desses patógenos. Foram reportados aproximadamente 25 homólogos de QseC em importantes patógenos humanos e vegetais (RASKO; ROSOVITZ; MYERS; MONGODIN *et al.*, 2008).

Figura 2 - O Sistema de Dois componentes QseBC



Fonte: O autor.

Figura 2 – O Sistema de Dois componentes QseBC. Na presença de Ne, Epi ou AI-3, o resíduo histidina quinase é autofosforilado e o grupamento fosfato é transferido para o regulador de resposta cognato QseB. A fosforilação de QseB ativa a transcrição de genes de virulência. Esse sistema descrito em EHEC, como ativador da produção de toxina de Shiga e da transcrição da ilha de patogenicidade LEE, responsável entre outros fatores pela montagem do Sistema de Secreção do tipo-3 (T3SS) e flagelo. Em *S. Typhimurium*, esse sistema é responsável pela ativação das Ilhas de Patogenicidade 1 e 2 de *Salmonella*, responsáveis respectivamente pela invasão e sobrevivência.

1.5.Sistema de 2-componentes QseBC e LED209

Em estudo realizado por nosso grupo em 2008(RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008), a molécula LED209 foi selecionada a partir de uma biblioteca de 150 mil moléculas, essa molécula apresenta com atividade a inibição do sensor quinase QseC, promovendo a inibição de fatores de virulência bacterianos sem afetar o crescimento de bactérias como EHEC, *S. Typhimurium* e *F. tularensis* (RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008).

Em EHEC, foi observado que, na presença de 5pM de LED209, houve a inibição de genes de virulência por inibição da secreção das proteínas EspA e EspB que codificam a ilha de patogenicidade LEE (*Locus Enterocyte Effacement*) e são requeridas para que a EHEC injete proteínas efetoras que causam a lesão *attaching-effacing* (AE), nessas mesmas concentrações, o LED209 não promoveu a expressão de toxina de Shiga(RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008).

Em *S. Typhimurium* foi observada uma deficiência na capacidade de colonização do trato gastrintestinal (GI) e a infecção sistêmica foi atenuada em camundongos, demonstrando que o LED209 inibiu *in vivo*, a expressão de genes de virulência dessa bactéria necessários para sobrevivência e patogênese no hospedeiro. Em *F. tularensis*, assim como em EHEC e *S. Typhimurium*, o uso do LED209 também levou a redução de genes de virulência, incluindo *qseC*, levando a atenuação de processos infecciosos (CURTIS; RUSSELL; MOREIRA; ADEBESIN *et al.*, 2014a; RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008)(Figura 3).

Por atuar em receptores bacterianos que respondem a Epi e Ne, havia uma preocupação do LED209 atuar nos receptores adrenérgicos do hospedeiro, no entanto, estudos farmacocinéticos demonstraram que o LED209 não apresenta atividade em receptores de células eucarióticas(RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008). O que abriu perspectivas para sua utilização na clínica levando ao controle da disseminação desses microrganismos MDR, podendo ser uma alternativa de terapia, por se tratar de uma molécula que não seleciona nem induz resistência devido ao seu mecanismo de ação (RASKO;

MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008) (CURTIS; RUSSELL; MOREIRA; ADEBESIN *et al.*, 2014a; GLOVER; MOREIRA; SPERANDIO; ZIMMERN, 2014).

1.6.Sinalização química via QseBC e Ácido 3,4-di-hidroximandélico (DHMA)

O ácido 3,4-di-hidroximandélico (DHMA), um intermediário do metabolismo da Ne, tem sido reportado como um importante quimioatrativo para patógenos (LOPES; SOURJIK, 2018; PASUPULETI; SULE; COHN; MACKENZIE *et al.*, 2014; PASUPULETI; SULE; MANSON; JAYARAMAN, 2018; SULE; PASUPULETI; KOHLI; MENON *et al.*, 2017). Pasupuleti e colaboradores propuseram um modelo para metabolizar a Ne em DHMA (Figura 4) envolvendo a sinalização química via QseBC (PASUPULETI; SULE; MANSON; JAYARAMAN, 2018). Na presença de Ne, QseC fosforila QseB que induz a transcrição do gene *feaR*. O dímero de FeaR induz a transcrição de *tynA* e *feaB*. A proteína TynA é exportada para o espaço periplasmático e age convertendo Ne em 3,4-di-hidroxifenilglicol-aldeído (DOPEGAL), o DOPEGAL é então transportado para o citoplasma por um transportador não caracterizado, e FeaB oxida o DOPEGAL em DHMA, que é exportado para o espaço periplasmático por outro transportador não caracterizado, e se liga ao quimiorreceptor Tsr, responsável pela resposta de quimiotaxia (PASUPULETI; SULE; COHN; MACKENZIE *et al.*, 2014; PASUPULETI; SULE; MANSON; JAYARAMAN, 2018) (Figura 5).

4. Conclusões

- Sequenciamento genômico e teste de sensibilidade a antimicrobianos demonstraram uma elevada quantidade de cepas de UPEC multidroga-resistentes;
- O Sequenciamento Genômico completo demonstrou que várias dessas cepas isoladas apresentam o mesmo *Sequence Type* e características fenotípicas diversas, como o caso do isolado ST131 BR43 em relação à cepa protótipo EC958;
- As cepas estudadas apresentam diferenças nas formações de biofilme dependentes das condições físicas (temperatura 30°C e 37°C) e químicas (presença e ausência de DHMA);
- A motilidade foi afetada na presença de DHMA;
- O DHMA promoveu alteração na expressão de genes de virulência em UPEC;
- Não houve melhor dose-resposta de infecção nos experimentos *in vivo*
- O LED209 apresentou atividade satisfatória na inibição de formação de biofilme, entretanto, não afetou a motilidade das cepas testadas.

5. *Perspectivas*

Considerando os resultados promissores obtidos até o momento, o presente trabalho abriu perspectiva para novos estudos envolvendo o uso do DHMA visando a compreensão da atividade dessa molécula sinalizadora na patogênese de UPEC em projetos futuros. A obtenção dos mutantes descrito no presente trabalho, bem como seus complementados, permitem estudos mais aprofundados sobre a regulação da expressão de genes de virulência e da patogenia para as cepas de UPEC. A utilização do LED209 para bloquear o sensor QseC não foi satisfatório no ensaio de motilidade, entretanto, para inibição da formação de biofilme, o composto apresentou uma atividade satisfatória, além de reduzir a expressão de *fimH*, um dos genes necessários para o processo, abrindo perspectiva para novos estudos sobre a influência dessa molécula em atenuar a virulência de cepas de UPEC MDR. Os resultados obtidos com o sequenciamento permitem estudos mais aprofundados sobre os genes de virulência e de resistência a antimicrobianos presentes nessas cepas estudadas, bem como estudo de novos alvos moleculares para síntese racional de novos compostos antimicrobianos.

6. *Referências Bibliográficas*

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, 128, n. 6, p. 1037-1050, Mar 23 2007.

ALLSOPP, L. P.; TOTSIKA, M.; TREE, J. J.; ULETT, G. C. *et al.* UpaH is a newly identified autotransporter protein that contributes to biofilm formation and bladder colonization by uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. **Infect Immun**, 78, n. 4, p. 1659-1669, Apr 2010.

BEARSON, B. L.; BEARSON, S. M. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microb Pathog**, 44, n. 4, p. 271-278, Apr 2008.

BECKNELL, B.; SCHOBER, M.; KORBEL, L.; SPENCER, J. D. The Diagnosis, Evaluation and Treatment of Acute and Recurrent Pediatric Urinary Tract Infections. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 13, n. 1, p. 81-90, Jan 2015.

BONNET, R. Growing group of Extended-spectrum betalactamases : the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, 48, p. 1-14, 2004 2004.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, 54, n. 3, p. 969-976, Mar 2010.

CAMPOS, A. C. C.; ANDRADE, N. L.; FERDOUS, M.; CHLEBOWICZ, M. A. *et al.* Comprehensive Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Urine Samples of Hospitalized Patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Front Microbiol**, 9, p. 243, 2018.

CASTANHEIRA, M.; FARRELL, S. E.; DESHPANDE, L. M.; MENDES, R. E. *et al.* Prevalence of beta-lactamase-encoding genes among Enterobacteriaceae bacteremia isolates collected in 26 U.S. hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010). **Antimicrob Agents Chemother**, 57, n. 7, p. 3012-3020, Jul 2013.

CLARKE, M. B.; HUGHES, D. T.; ZHU, C.; BOEDEKER, E. C. *et al.* The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 27, p. 10420-10425, Jul 2006.

CLARKE, M. B.; SPERANDIO, V. Transcriptional regulation of flhDC by QseBC and sigma (FliA) in enterohaemorrhagic Escherichia coli. **Mol Microbiol**, 57, n. 6, p. 1734-1749, Sep 2005.

CLSI. **M100Ed28 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition.** 2018. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>.

COELHO, A.; MORA, A.; MAMANI, R.; LOPEZ, C. *et al.* Spread of Escherichia coli O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). **J Antimicrob Chemother**, 66, n. 3, p. 517-526, Mar 2011.

CURTIS, M. M.; RUSSELL, R.; MOREIRA, C. G.; ADEBESIN, A. M. *et al.* QseC inhibitors as an antivirulence approach for Gram-negative pathogens. **MBio**, 5, n. 6, p. e02165, Nov 11 2014a.

CURTIS, M. M.; RUSSELL, R.; MOREIRA, C. G.; ADEBESIN, A. M. *et al.* QseC Inhibitors as an Antivirulence Approach for Gram-Negative Pathogens. *In: mBio*, 2014b. v. 5.

DURHAM-COLLERAN, M. W.; VERHOEVEN, A. B.; VAN HOEK, M. L. Francisella novicida forms in vitro biofilms mediated by an orphan response regulator. **Microb Ecol**, 59, n. 3, p. 457-465, Apr 2010.

ENDER, P. T.; GAJANANA, D.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C. *et al.* Transmission of an Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli (Sequence Type ST131) Strain between a Father and Daughter Resulting in Septic Shock and Emphysematous Pyelonephritis ▽. *In: J Clin Microbiol*, 2009. v. 47, p. 3780-3782.

FLORES-MIRELES, A. L.; WALKER, J. N.; CAPARON, M.; HULTGREN, S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat Rev Microbiol**, 13, n. 5, p. 269-284, May 2015.

FOXMAN, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infect Dis Clin North Am**, 28, n. 1, p. 1-13, Mar 2014.

GLOVER, M.; MOREIRA, C. G.; SPERANDIO, V.; ZIMMERN, P. Recurrent urinary tract infections in healthy and nonpregnant women☆. **Urol Sci**, 25, n. 1, p. 1-8, Mar 2014.

HADJIFRANGISKOU, M.; KOSTAKIOTI, M.; CHEN, S. L.; HENDERSON, J. P. *et al.* A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, 80, n. 6, p. 1516-1529, Jun 2011.

HAGBERG, L.; ENGBERG, I.; FRETER, R.; LAM, J. *et al.* Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. **Infect Immun**, 40, n. 1, p. 273-283, Apr 1983.

HANNAN, T. J.; HUNSTAD, D. A. A Murine Model for *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. **Methods Mol Biol**, 1333, p. 159-175, 2016.

HANNAN, T. J.; MYSOREKAR, I. U.; HUNG, C. S.; ISAACSON-SCHMID, M. L. *et al.* Early severe inflammatory responses to uropathogenic *E. coli* predispose to chronic and recurrent urinary tract infection. **PLoS Pathog**, 6, n. 8, p. e1001042, Aug 12 2010.

HANNAN, T. J.; TOTSIKA, M.; MANSFIELD, K. J.; MOORE, K. H. *et al.* Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. **FEMS Microbiol Rev**, 36, n. 3, p. 616-648, May 2012.

HUGHES, D. T.; CLARKE, M. B.; YAMAMOTO, K.; RASKO, D. A. *et al.* The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic E. coli (EHEC). **PLoS Pathog**, 5, n. 8, p. e1000553, Aug 2009.

HUGHES, D. T.; SPERANDIO, V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. **Nat Rev Microbiol**, 6, n. 2, p. 111-120, Feb 2008.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, 22, n. 1, p. 161-182, Table of Contents, Jan 2009.

JOHNSON, D. E.; LOCKATELL, C. V.; RUSSELL, R. G.; HEBEL, J. R. *et al.* Comparison of Escherichia coli Strains Recovered from Human Cystitis and Pyelonephritis Infections in Transurethraly Challenged Mice. *In: Infect Immun*, 1998. v. 66, p. 3059-3065.

JOHNSON, J. R.; ANDERSON, J. T.; CLABOTS, C.; JOHNSTON, B. *et al.* Within-household sharing of a fluoroquinolone-resistant Escherichia coli sequence type ST131 strain causing pediatric osteoarticular infection. **Pediatr Infect Dis J**, 29, n. 5, p. 473-475, May 2010.

JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; KUSKOWSKI, M. A. *et al.* Escherichia coli sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant E. coli infections in the United States. **Clin Infect Dis**, 51, n. 3, p. 286-294, Aug 1 2010.

JOHNSON, J. R.; MENARD, M.; JOHNSTON, B.; KUSKOWSKI, M. A. *et al.* Epidemic Clonal Groups of Escherichia coli as a Cause of Antimicrobial-Resistant Urinary Tract Infections in Canada, 2002 to 2004 ▽. *In: Antimicrob Agents Chemother*, 2009. v. 53, p. 2733-2739.

KAKKANAT, A.; PHAN, M. D.; LO, A. W.; BEATSON, S. A. *et al.* Novel genes associated with enhanced motility of Escherichia coli ST131. **PLoS One**, 12, n. 5, p. e0176290, 2017.

KAKKANAT, A.; TOTSIKA, M.; SCHAAL, K.; DUELL, B. L. *et al.* The role of H4 flagella in. **Scientific Reports**, 5, p. 16149, 2015-11-09 2015. Research.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic Escherichia coli. **Nat Rev Microbiol**, 2, n. 2, p. 123-140, Feb 2004.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; CUSUMANO, C. K.; HANNAN, T. J. *et al.* Distinguishing the contribution of type 1 pili from that of other QseB-misregulated factors when QseC is absent during urinary tract infection. **Infect Immun**, 80, n. 8, p. 2826-2834, Aug 2012.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J. QseC-mediated dephosphorylation of QseB is required for expression of genes associated with virulence in uropathogenic Escherichia coli. **Mol Microbiol**, 73, n. 6, p. 1020-1031, Sep 2009.

LANE, M. C.; SIMMS, A. N.; MOBLEY, H. L. complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic Escherichia coli. **J Bacteriol**, 189, n. 15, p. 5523-5533, Aug 2007.

LAU, S. H.; KAUFMANN, M. E.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. *et al.* UK epidemic Escherichia coli strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. **J Antimicrob Chemother**, 62, n. 6, p. 1241-1244, Dec 2008.

LAU, S. H.; REDDY, S.; CHEESBROUGH, J.; BOLTON, F. J. *et al.* Major uropathogenic Escherichia coli strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol**, 46, n. 3, p. 1076-1080, Mar 2008.

LO, A. W.; MORIEL, D. G.; PHAN, M. D.; SCHULZ, B. L. *et al.* 'Omic' Approaches to Study Uropathogenic Escherichia coli Virulence. **Trends Microbiol**, 25, n. 9, p. 729-740, Sep 2017.

LOPES, J. G.; SOURJIK, V. Chemotaxis of *Escherichia coli* to major hormones and polyamines present in human gut. **The ISME Journal**, 12, n. 11, p. 2736, 2018-07-11 2018. OriginalPaper.

LUSTRI, B. C.; SPERANDIO, V.; MOREIRA, C. G. Bacterial Chat: Intestinal Metabolites and Signals in Host-Microbiota-Pathogen Interactions. **Infect Immun**, 85, n. 12, Dec 2017.

MATTHEW, M. Plasmid-mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. **J Antimicrob Chemother**, 5, n. 4, p. 349-358, Jul 1979.

MOBLEY, H. L.; DONNENBERG, M. S.; HAGAN, E. C. Uropathogenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, 3, n. 2, Aug 2009.

MOREIRA, C. G.; HERRERA, C. M.; NEEDHAM, B. D.; PARKER, C. T. *et al.* Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 4, p. 1470-1475, Jan 2013.

MOREIRA, C. G.; SPERANDIO, V. Interplay between the QseC and QseE bacterial adrenergic sensor kinases in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. **Infect Immun**, 80, n. 12, p. 4344-4353, Dec 2012.

MOREIRA, C. G.; SPERANDIO, V. The Epinephrine/Norepinephrine/Autoinducer-3 Interkingdom Signaling System in *Escherichia coli* O157:H7. **Adv Exp Med Biol**, 874, p. 247-261, 2016.

MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence in vitro and in vivo. **Infect Immun**, 78, n. 3, p. 914-926, Mar 2010.

NICOLAS-CHANOINE, M. H.; BLANCO, J.; LEFLON-GUIBOUT, V.; DEMARTY, R. *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. **J Antimicrob Chemother**, 61, n. 2, p. 273-281, Feb 2008.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annu Rev Biochem**, 78, p. 119-146, 2009.

NOVAK, E. A.; SHAO, H.; DAEP, C. A.; DEMUTH, D. R. Autoinducer-2 and QseC control biofilm formation and in vivo virulence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Infect Immun**, 78, n. 7, p. 2919-2926, Jul 2010.

O'BRIEN, V. P.; DORSEY, D. A.; HANNAN, T. J.; HULTGREN, S. J. Host restriction of *Escherichia coli* recurrent urinary tract infection occurs in a bacterial strain-specific manner. *In: PLoS Pathog*, 2018. v. 14.

PASUPULETI, S.; SULE, N.; COHN, W. B.; MACKENZIE, D. S. *et al.* Chemotaxis of *Escherichia coli* to norepinephrine (NE) requires conversion of NE to 3,4-dihydroxymandelic acid. **J Bacteriol**, 196, n. 23, p. 3992-4000, Dec 2014.

PASUPULETI, S.; SULE, N.; MANSON, M. D.; JAYARAMAN, A. Conversion of Norepinephrine to 3,4-Dihydroxymandelic Acid in *Escherichia coli* Requires the QseBC Quorum-Sensing System and the FeaR Transcription Factor. **J Bacteriol**, 200, n. 1, Jan 1 2018.

PEIRANO, G.; ASENSI, M. D.; PITONDO-SILVA, A.; PITOUT, J. D. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clin Microbiol Infect**, 17, n. 7, p. 1039-1043, Jul 2011.

PENFOLD, R. J.; PEMBERTON, J. M. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. **Gene**, 118, n. 1, p. 145-146, Sep 1 1992.

PETTY, N. K.; BEN ZAKOUR, N. L.; STANTON-COOK, M.; SKIPPINGTON, E. *et al.* Global dissemination of a multidrug resistant Escherichia coli clone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 15, p. 5694-5699, Apr 15 2014.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; EL JAZIRI, M. The Formation of Biofilms by Pseudomonas aeruginosa: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. **Biomed Res Int**, 2015, 2015.

RASKO, D. A.; MOREIRA, C. G.; LI, D. R.; READING, N. C. *et al.* Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science**, 321, n. 5892, p. 1078-1080, Aug 2008.

RASKO, D. A.; ROSOVITZ, M. J.; MYERS, G. S.; MONGODIN, E. F. *et al.* The pangenome structure of Escherichia coli: comparative genomic analysis of E. coli commensal and pathogenic isolates. **J Bacteriol**, 190, n. 20, p. 6881-6893, Oct 2008.

RIO, D. C.; ARES, M., JR.; HANNON, G. J.; NILSEN, T. W. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). **Cold Spring Harb Protoc**, 2010, n. 6, p. pdb.prot5439, Jun 2010.

ROGERS, B. A.; SIDJABAT, H. E.; PATERSON, D. L. Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. **J Antimicrob Chemother**, 66, n. 1, p. 1-14, Jan 2011.

SARKAR, S.; HUTTON, M. L.; VAGENAS, D.; RUTER, R. *et al.* Intestinal Colonization Traits of Pandemic Multidrug-Resistant Escherichia coli ST131. **J Infect Dis**, 218, n. 6, p. 979-990, Aug 14 2018.

SARKAR, S.; VAGENAS, D.; SCHEMBRI, M. A.; TOTSIKA, M. Biofilm formation by multidrug resistant Escherichia coli ST131 is dependent on type 1 fimbriae and assay conditions. **Pathog Dis**, 74, n. 3, Apr 2016.

SESA-SP. **Infecção urinária interna 94 por dia em SP.** 2015. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/ses/perfil/cidadao/homepage/destaques/infeccao-urinaria-interna-94-por-dia-em-sp>. Acesso em: 12/05/2016.

SILVA, K. C. D.; LINCOPAN, N. **Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio.** http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442012000200004&lng=en&nrm=iso, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442012000200004&lng=en&nrm=iso.

SIRCILI, M. P.; WALTERS, M.; TRABULSI, L. R.; SPERANDIO, V. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. **Infect Immun**, 72, n. 4, p. 2329-2337, Apr 2004.

SPERANDIO, V.; LI, C. C.; KAPER, J. B. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. **Infect Immun**, 70, n. 6, p. 3085-3093, Jun 2002.

SPERANDIO, V.; MELLIES, J. L.; NGUYEN, W.; SHIN, S. *et al.* Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96, n. 26, p. 15196-15201, Dec 21 1999.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; GIRÓN, J. A.; KAPER, J. B. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J Bacteriol**, 183, n. 17, p. 5187-5197, Sep 2001.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P. *et al.* Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 15, p. 8951-8956, Jul 2003.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Quorum sensing Escherichia coli regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in E. coli. **Mol Microbiol**, 43, n. 3, p. 809-821, Feb 2002.

STAMM, W. E.; NORRBY, S. R. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. **J Infect Dis**, 183 Suppl 1, p. S1-4, Mar 1 2001.

SULE, N.; PASUPULETI, S.; KOHLI, N.; MENON, R. *et al.* The Norepinephrine Metabolite 3,4-Dihydroxymandelic Acid Is Produced by the Commensal Microbiota and Promotes Chemotaxis and Virulence Gene Expression in Enterohemorrhagic Escherichia coli. **Infect Immun**, 85, n. 10, Oct 2017.

TANWAR, J.; DAS, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Multidrug resistance: an emerging crisis. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, 2014, p. 541340, 2014.

TOTSIKA, M.; BEATSON, S. A.; SARKAR, S.; PHAN, M. D. *et al.* Insights into a multidrug resistant Escherichia coli pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. **PLoS One**, 6, n. 10, p. e26578, 2011.

TOTSIKA, M.; KOSTAKIOTI, M.; HANNAN, T. J.; UPTON, M. *et al.* A FimH inhibitor prevents acute bladder infection and treats chronic cystitis caused by multidrug-resistant uropathogenic Escherichia coli ST131. **J Infect Dis**, 208, n. 6, p. 921-928, Sep 2013.

UNAL, C. M.; SINGH, B.; FLEURY, C.; SINGH, K. *et al.* QseC controls biofilm formation of non-typeable Haemophilus influenzae in addition to an AI-2-dependent mechanism. **Int J Med Microbiol**, 302, n. 6, p. 261-269, Nov 2012.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, 74, n. 10, p. 5445-5455, Oct 2006.

WALTERS, M. S.; LANE, M. C.; VIGIL, P. D.; SMITH, S. N. *et al.* Kinetics of Uropathogenic *Escherichia coli* Metapopulation Movement during Urinary Tract Infection. *In: mBio*, 2012. v. 3.

WHO, W. H. O. GLOBAL P R I O R I T Y L I S T O F A N T I B I O T I C - R E S I S T A N T B A C T E R I A T O G U I D E R E S E A R C H, D I S C O V E R Y, A N D D E V E L O P M E N T O F N E W A N T I B I O T I C S. **World Health Organization**, 2017.

WHO | Antimicrobial resistance. **WHO**, 2016-09-16 09:39:19 2016.

WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. **WHO**, 2017-02-28 13:30:04 2017.

ANEXO I - Artigos Publicados



Bacterial Chat: Intestinal Metabolites and Signals in Host-Microbiota-Pathogen Interactions

Bruna C. Lustrig,^a Vanessa Sperandio,^b Cristiano G. Moreira^a

Department of Biological Sciences, São Paulo State University, UNESP, Araraquara, SP, Brazil;^a Departments of Microbiology and Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA^b

ABSTRACT Intestinal bacteria employ microbial metabolites from the microbiota and chemical signaling during cell-to-cell communication to regulate several cellular functions. Pathogenic bacteria are extremely efficient in orchestrating their response to these signals through complex signaling transduction systems. Precise coordination and interpretation of these multiple chemical cues is important within the gastrointestinal (GI) tract. Enteric foodborne pathogens, such as enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, or the surrogate murine infection model for EHEC, *Citrobacter rodentium*, are all examples of microorganisms that modulate the expression of their virulence repertoire in response to signals from the microbiota or the host, such as autoinducer-3 (AI-3), epinephrine (Epi), and norepinephrine (NE). The QseBC and QseEF two-component systems, shared by these pathogens, are involved in sensing these signals. We review how these signaling systems sense and relay these signals to drive bacterial gene expression; specifically, to modulate virulence. We also review how bacteria chat via chemical signals integrated with metabolite recognition and utilization to promote successful associations among enteric pathogens, the microbiota, and the host.

KEYWORDS chemical signaling, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia*, *Salmonella*, intestinal metabolites

COMMENSALS AND PATHOGENS IN THE GUT

The large and diverse bacterial community in the human gut also has important functions in the physiology of the intestine. The intestinal mucosa forms a physical barrier that keeps the microbiota on the luminal side. The mucus layer is composed of mucin, glycoproteins, trefoil peptides, and surfactant phospholipids (Fig. 1). Altogether, they constitute a nutrient-rich mucus layer, which has an important role as a protective barrier against microorganisms (1). The biogeography of the gastrointestinal (GI) tract is diverse in its composition and density and its distinct chemical and physical features (2). The density and composition of bacterial communities change according to their location in the gut. Throughout the GI tract, there is significant variation in the physicochemical conditions and substrate availability that impact bacterial growth, differentially promoting or hampering the colonization of certain niches by various species. In the proximal colon, the high concentration of sugar substrates in the mucus allows the expansion of the saccharolytic members of the microbiota (Table 1). Inversely, the lower availability of sugar substrates in the distal colon triggers proteolysis, which decreases the bacterial growth rate and the diversity of the microbiota (1, 3). The resident microbiota, together with all chemical and physical features of the intestine, contribute to shape the metabolic landscape within the gut, producing a multitude of characterized and as-yet-unknown intestinal metabolites. Moreover, the microbial composition of the human GI tract varies with age, diet, host genetics, and external insults like antibiotic treatments (4, 5).

Accepted manuscript posted online 25 September 2017

Citation Lustrig BC, Sperandio V, Moreira CG. 2017. Bacterial chat: intestinal metabolites and signals in host-microbiota-pathogen interactions. *Infect Immun* 85:e00476-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00476-17>.

Editor Helene L. Andrews-Polymeris, Texas A&M University Health Science Center

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Cristiano G. Moreira, crismoreira@icfcar.unesp.br.



QseC Signaling in the Outbreak O104:H4 *Escherichia coli* Strain Combines Multiple Factors during Infection

Tamara Renata Machado Ribeiro,^a Bruna Cardinali Lustrj,^a Waldir P. Elias,^b Cristiano Gallina Moreira^a

^aUNESP-São Paulo State University, Araraquara, Brazil

^bLaboratory of Bacteriology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

ABSTRACT Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) from the O104:H4 specific serotype caused a large outbreak of bloody diarrhea with some complicated cases of hemolytic-uremic syndrome (HUS) in Europe in 2011. The outbreak strain consisted in an EAEC capable to produce the Shiga toxin (Stx) subtype 2a, a characteristic from enterohemorrhagic *E. coli*. QseBC two-component system detects AI-3/Epi/NE and mediates the chemical signaling between pathogen and mammalian host. This system coordinates a cascade of virulence genes expression in important human enteropathogens. The blocking of QseC of EAEC C227-11 (Stx⁺) strain by *N*-phenyl-4-[[[(phenylamino)thioxomethyl]amino]-benzenesulfonamide (also known as LED209) *in vivo* demonstrated a lower efficiency of colonization. The periplasmic protein VisP, which is related to survival mechanisms in a colitis model of infection, bacterial membrane maintenance, and stress resistance, here presented high levels of expression during the initial infection within the host. Under acid stress conditions, *visP* expression levels were differentiated in an Stx-dependent way. Together, these results emphasize the important role of VisP and the histidine kinase sensor QseC in the C227-11 (Stx⁺) outbreak strain for the establishment of the infectious niche process in the C57BL/6 mouse model and of LED209 as a promising antivirulence drug strategy against these enteric pathogens.

IMPORTANCE EAEC is a remarkable etiologic agent of acute and persistent diarrhea worldwide. The isolates harbor specific subsets of virulence genes and their pathogenesis needs to be better understood. Chemical signaling via histidine kinase sensor QseC has been shown as a potential target to elucidate the orchestration of the regulatory cascade of virulence factors.

KEYWORDS EAEC, *Escherichia coli*, O104:H4, QseC, Shiga toxin, VisP, chemical signaling

Some strains of *Escherichia coli* belonging to the O104:H4 serotype may be classified as members of the enteroaggregative *E. coli* (EAEC) pathovar, which was first described in the mid-1980s and has been recognized as an important cause of diarrheagenic diseases in children and adults in both developed and developing countries (1–4).

In 2011, a large outbreak of foodborne bloody diarrhea and hemolytic-uremic syndrome (HUS) began in Germany and spread throughout other countries; the outbreak was triggered by EAEC serotype O104:H4 lysogenized with Shiga toxin 2a-encoding phage, a common feature related to enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) or Shiga toxin *E. coli*. This outbreak emerged with more than 3,800 individuals affected, including primary and secondary cases, leading to 54 reported deaths. Moreover, the HUS cases of this outbreak occurred at a much higher rate than frequently observed for EHEC (5), i.e., approximately 22% of the cases (6, 7).

Previously, *E. coli* strains O104:H4 (Stx⁺) have been reported in Europe in sporadic cases of hemorrhagic colitis and HUS (6, 8–11). However, the 2011 outbreak strain is

Citation Machado Ribeiro TR, Cardinali Lustrj B, Elias WP, Moreira CG. 2019. QseC signaling in the outbreak O104:H4 *Escherichia coli* strain combines multiple factors during infection. *J Bacteriol* 201:e00203-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00203-19>.

Editor Thomas J. Silhavy, Princeton University

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Cristiano Gallina Moreira, cg.moreira@unesp.br.

Received 15 March 2019

Accepted 8 June 2019

Accepted manuscript posted online 24 June 2019

Published 8 August 2019