



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 Biociências - 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 $\Delta qseC$ 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 $\Delta qseC$ 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 Antimicrobianos	19
Figura 2 - O Sistema de Dois componentes QseBC.....	21
Figura 4 - Reação de Metabolização da Norepinefrina	24
Figura 5 – Sinalização química, metabolismo da Ne em DHMA e resposta quimiotática	24
Figura 6 - Esquema representando as etapas do ensaio de motilidade swimming.....	30
Figura 7 - Esquema da infecção in vivo com 10^8 UFC.....	32
Figura 8 - Esquema da infecção in vivo com 10^9 UFC	33
Tabela 1 - Perfil de Resistência a Antimicrobianos	37
Tabela 2 - β -Lactamases presentes nos isolados clínicos.....	39
Tabela 3 - Genes de Resistência a Antimicrobianos	40
Figura 9 - Biofilme em diferentes condições de crescimento	41
Figura 10 – Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica em diferentes concentrações de DHMA	43
Figura 11 - Fenótipo de motilidade das amostras clínicas frente aos protótipos e ao mutante.....	44
Figura 12 - Halo de motilidade Swimming em LBA 0,25%.....	46
Figura 13 - Expressão gênica de genes de virulência em UPEC.....	49
Figura 14- Colonização da bexiga após 72h de infecção com 10^8 UFC	50
Figura 15 - Colonização da bexiga após 72h de infecção com 10^9 UFC	51
Tabela 3 - Fatores de Virulência associados a UPEC	53
Tabela 4 - Cepas, mutantes e complementados obtidos	54
Figura 16 - Ensaio de motilidade swimming com 8 horas de incubação a 37°C	55
Figura 17 - Ensaio de formação de Biofilme 24h a 37°C e 5% CO_2	56
Figura 18 - Expressão gênica de fimH nas cepas BR43 e EC958 após tratamento com LED209.	57

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-hidroximandélico
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 “Reverse transcription <i>polymerase chain reaction</i> quantitative <i>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 QseC
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
<i>visP</i>	gene responsável pela Proteína Periplasmática Relacionada a Estresse e Virulência
VisP	Proteína Periplasmática Relacionada a Estresse e Virulência – do inglês “ <i>Virulence and stress-related periplasmic protein</i> ”

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
1.1. A patogênese da Escherichia coli Uropatogênica (UPEC).....	16
1.2. Escherichia coli Uropatogênica – Clones ST131 e sua importância clínica	17
1.3. Bactérias Multi-drogas resistentes (MDR)	18
1.4. Sinalização química	20
1.5. Sistema de 2-componentes QseBC e LED209	22
1.6. Sinalização química via QseBC e Ácido 3,4-di-hidroxi mandélico (DHMA)	23
2. Objetivos	25
2.1. Objetivos gerais	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. Material e Métodos.....	26
3.1. Cultivo e armazenamento de bactérias	26
3.2. Perfil de resistência a antimicrobianos	26
3.3. Sequenciamento Genômico	26
3.4. Identificação de genes de virulência e resistência a antimicrobianos das amostras clínicas sequenciadas	27
3.5. Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica	27
3.6. Ensaio de formação de biofilme 24h em superfície abiótica utilizando LED209	28
3.7. Ensaio de motilidade Swimming	28
3.7.1. Ensaio de motilidade <i>Swimming</i> em condições diferenciadas.....	29
3.7.2. Ensaio de motilidade <i>Swimming</i> utilizando LED209	29
3.8. Extração de RNA	30
3.9. Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	31

3.10. Modelo de infecção in vivo utilizando C57BL/6	31
3.10. Análise da expressão gênica por qRT-PCR na presença e ausência de LED209 ...	34
3.11. Construção de mutante e complementação.....	34
3.12. Análise Estatística dos Resultados.....	35
4. Resultados e Discussão	36
4.1. Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras clínicas	36
4.2. Sequenciamento Genômico	38
4.3. Formação de Biofilme em superfície abiótica	41
4.3.1. Ensaio de formação de biofilme 24h em superfície abiótica em diferentes condições de crescimento e temperatura.....	41
4.3.2. Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica em diferentes concentrações de DHMA	42
4.4. Motilidade mediada por flagelo tipo “swimming”	43
4.5. Motilidade swimming em condições diferenciadas.....	44
4.6. Estudo da expressão gênica das cepas EC958, Δ qseC e BR43 na presença de 10uM de DHMA.....	47
4.7. Infecção in vivo utilizando C57BL/6	50
4.7.1. Infecção <i>in vivo</i> utilizando C57BL/6 – Dose de infecção 10^8 UFC	50
4.7.2. Infecção <i>in vivo</i> utilizando C57BL/6 – Dose de infecção 10^9 UFC	50
4.8. Fatores de virulência associados à UPEC	51
4.9. Mutantes obtidos pela técnica do Vetor Suicida e seus respectivos complementados	54
4.10. Ensaio de motilidade swimming utilizando LED209.....	54
4.11. Ensaio de formação de biofilme 24h utilizando LED209	55
4.12. Análise da expressão gênica de fimH por qRT-PCR nas cepas EC958, BR43 na presença LED209.....	56
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 de 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).

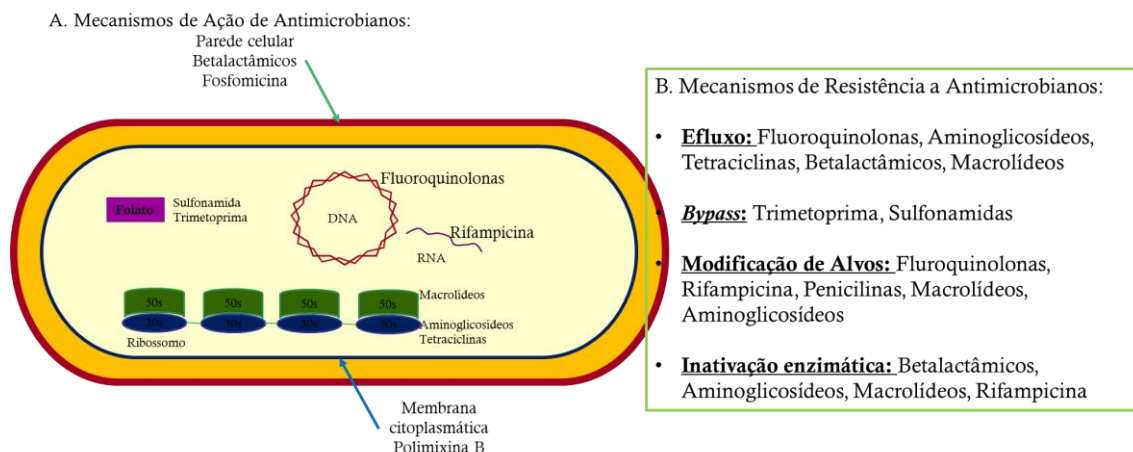
Apenas alguns genes de virulência estão uniformemente conservados nos clones ST131, como fimbria tipo-1 (*fimH*), toxina autotransportadora secretada (*sat*), receptor de aerobactina (*iutA*), proteína específica da uropatogenia (*usp*) e marcador de ilha de patogenicidade (*malX*)(COELHO; MORA; MAMANI; 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).

Figura 1 - Mecanismos de Ação e Mecanismos de Resistência de Antimicrobianos



Fonte: O autor.

Figura 1 – A. Principais mecanismos de Ação de Antimicrobianos. inibição de síntese de parede por interferir na síntese de peptideoglicano: 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).

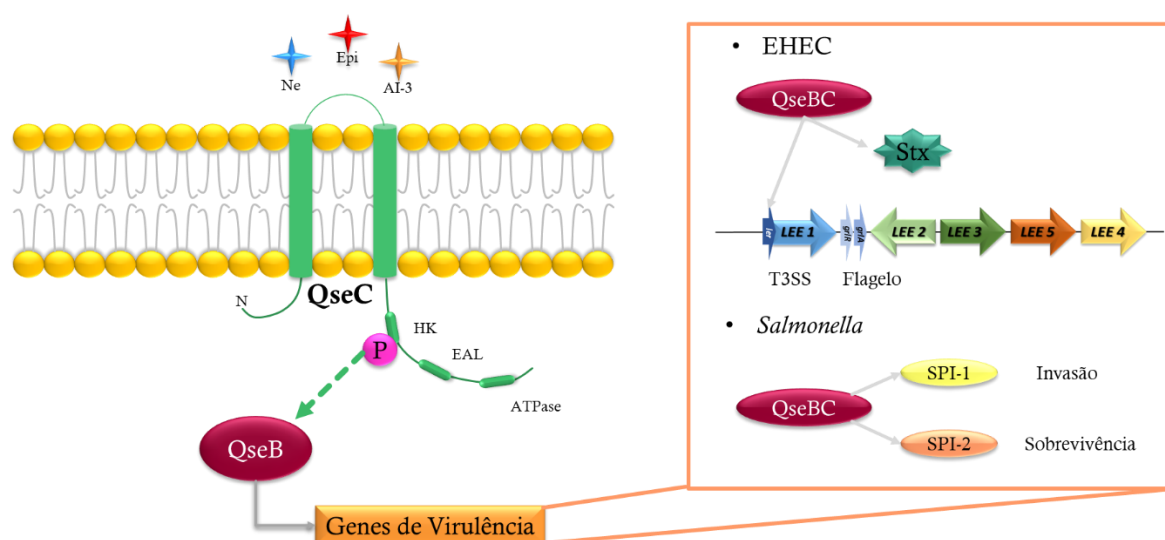
A sinalização química em seres vivos é responsável pela comunicação intercelular e permeia a comunicação inter e intraespecífica, além da comunicação inter-reinos (SPERANDIO; LI; KAPER, 2002; SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003). Os hormônios adrenérgicos de estresse produzidos pelo hospedeiro, 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.

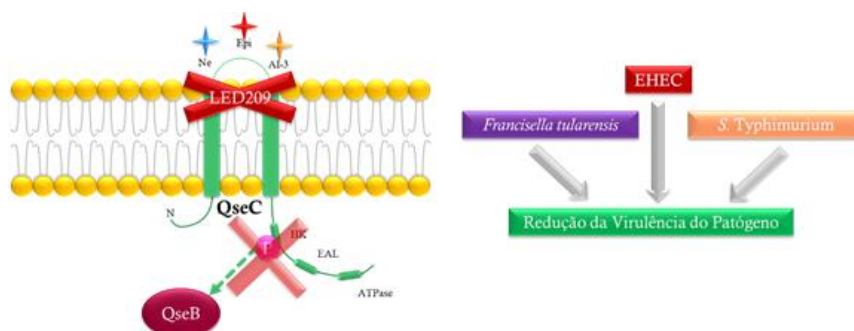
1.5. Sistema de 2-componentes QseBC e LED209

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 gastrointestinal (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).

Figura 3 - Mecanismo de Ação do LED209



Fonte: O autor.

Figura 3 – Mecanismo de Ação do LED209. O LED 209 atua bloqueando o sensor QseC, impedindo a autofosforilação do resíduo histidina quinase e posterior fosforilação e ativação de QseB, dessa forma, não ocorre a ativação da transcrição de genes de virulência, ocasionando a redução na virulência de patógenos como *F. tularensis*, *S. Typhimurium* e EHEC (RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008).

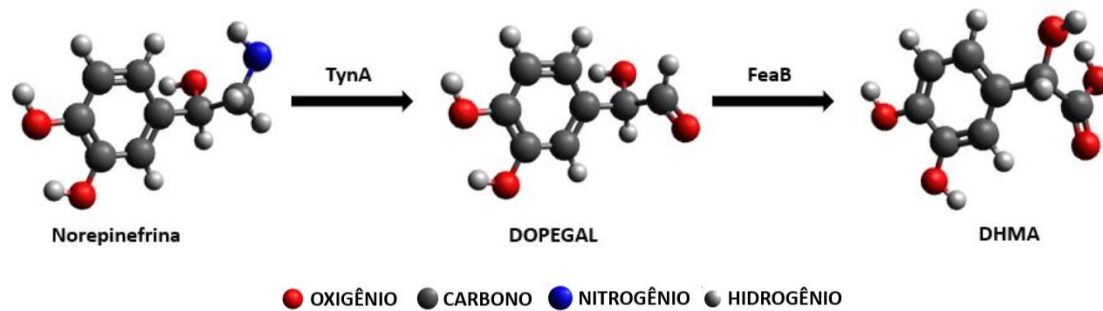
Também foi reportada a redução da virulência para cepa de UPEC UTI89 mutante em $\Delta qseC$ (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; PINKNER; HULTGREN, 2009).

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).

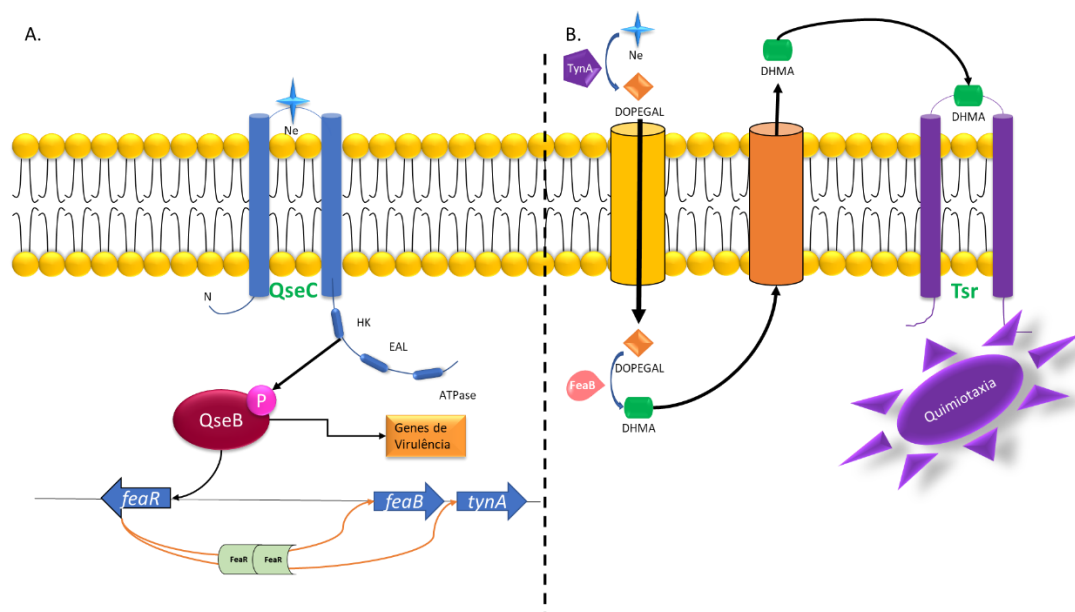
Figura 4 - Reação de Metabolização da Norepinefrina



Fonte: O autor.

Figura 4 – Reação de metabolismo da Ne em DHMA. A primeira reação é catabolizada pela TynA que converte a Ne em DOPEGAL. A segunda reação é catabolizada pela FeaB, que converte o DOPEGAL em DHMA.

Figura 5 – Sinalização química, metabolismo da Ne em DHMA e resposta quimiotática



Fonte: O autor.

Figura 5 – A. A Ne ativa QseC que então transfere o grupamento fosfato para QseB. QseB ativado induz a transcrição de *feaR* que leva a formação do dímero FeaR que induz a transcrição de *tynA* e *feaB*. B. A proteína TynA é exportada para o periplasma e catalisa a conversão de Ne em DOPEGAL, que é importado para o citoplasma, onde FeaB age convertendo-o em DHMA. O DHMA é então exportado para o espaço periplasmático e se liga ao receptor Tsr, que quando ativo, promove resposta quimiotática

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos, a caracterização de cepas de UPECs, submetidas a sequenciamento genômico completo, 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, com o uso do composto LED209 *in vitro* para estudo da atenuação da virulência desses patógenos, também constituiu o objetivo, o uso do ácido 3,4-di-hidroximandélico (DHMA), metabólito intermediário da norepinefrina, como quimioatrativo.

2.2. Objetivos específicos

- Análise do perfil de resistência a antimicrobianos e genes de virulência associados a UPECs das amostras clínicas submetidas a sequenciamento genômico
- Estudo das características fenotípicas, motilidade, adesão e formação de biofilme em superfície abiótica com e sem a utilização de DHMA
- Análise do potencial de formações de biofilme em diferentes condições físicas (temperatura 30°C e 37°C) e químicas (presença e ausência de DHMA);
- Estudo do potencial de inibição de formação de biofilme nas cepas EC958, BR43 utilizando LED209 comparando aos mutantes do gene *qseC*
- Verificar a influência do composto LED209 na motilidade das cepas EC958, BR43 comparando aos mutantes do gene *qseC* não tratados
- Definir a melhor dose-resposta de infecção, nos experimentos *in vivo* com camundongos C57BL/6.

3. Material e Métodos

3.1. Cultivo e armazenamento de bactérias

As 77 amostras clínicas de interesse que foram isoladas previamente do Hospital das Clínicas de Botucatu-SP, em colaboração Prof. Dr. Rodrigo T. Hernandez do IB da UNESP Botucatu. As cepas EC958, EC958 Δ qseC foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Mark Schembri da University of Queensland.

As cepas bacterianas protótipos CFT073, UTI89, EC958 e EC958 Δ qseC e os isolados clínicos estão disponíveis na coleção de bactérias do Laboratório de Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana (PASIQUIBAC), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, *campus* de Araraquara.

As cepas bacterianas que ficaram estocadas em ultrafreezer a -80° C, foram cultivadas em condições aeróbicas, de forma estáticas ou sob agitação, a 30°C ou 37°C em meio LB (Luria-Bertani), dependendo da necessidade do estudo.

3.2. Perfil de resistência a antimicrobianos

As amostras clínicas previamente isoladas, foram identificadas utilizando o equipamento VITEK® Biomerieux, o qual também forneceu o perfil de sensibilidade a ciprofloxacino (CIP), ácido nalidíxico (NAL) e levofloxacino (LEV). Para as cepas que apresentaram resistência a CIP, foi realizado o teste suscetibilidade a antimicrobianos pelo Método de Difusão em Disco de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2018), utilizando as cepas *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC25923 como padrão para controle de qualidade. Foi realizado o teste de sensibilidade a gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), cefepime (CPM), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CLO), sulfametoxazol-trimetoprima (SUT).

3.3. Sequenciamento Genômico

A partir das amostras resistentes a CIP, 20 amostras foram selecionadas aleatoriamente e enviadas para sequenciamento. O sequenciamento do genoma das amostras clínicas está sendo realizado em parceria com o Prof. Dr. Mark Schembri da University of Queensland, na Austrália.

Os isolados foram cultivados durante 16-18h, sob agitação, a 37°C em caldo Luria-Bertani (LB), foi realizada a extração de DNA genômico usando o kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). A preparação da

biblioteca de amostras de DNA foi realizada usando o kit de preparação da biblioteca Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EUA), que produz tamanhos de fragmentos variando de 300 pb a 1,5 kb. Após a preparação da biblioteca, o sequenciamento foi realizado no Illumina NextSeq 500 (Centro Australiano de Ecogenômica da Universidade de Queensland), gerando leituras de 150 pb de comprimento. Os dados de sequenciamento Raw Illumina foram filtrados com qualidade para remover sequências de adaptadores e bases de baixa qualidade (qualidade phred <5) e leituras menores que 80 pb.

3.4. Identificação de genes de virulência e resistência a antimicrobianos das amostras clínicas sequenciadas

A análise do genoma de 11 isolados clínicos foi baseada nas sequências depositadas no banco de dados do GenBank (BioProject PRJNA511007). Os protótipos das linhagens EC958, CFT073 e UTI89 foram utilizados como padrão para comparação e identificação de genes relacionados à virulência. A identidade dos genes relacionados a produção de pili (*fim*, *pap*, *sfa* e *foc*), sistema de captação de ferro (*ent*, *iro*, *chu*, *sit*, *iutA* e *fyuA*) além de toxinas (*CNF-1*, *vat* e *sat*) foi verificada utilizando a sequência FASTA dos isolados em comparação com as cepas protótipos utilizando a ferramenta BLASTn (NCBI).

3.5. Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica

O ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica foi adaptado de Allsopp e colaboradores, 2010(ALLSOPP; TOTSIKA; TREE; ULETT *et al.*, 2010). Foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços. As cepas EC958, EC958 *AqseC* e BR43 foram cultivadas em caldo LB (Invitrogen®) por 24 horas a 37°C, de forma estática e sob agitação, dependendo da necessidade do experimento, após esse período foi realizado um novo repique na proporção de 1:100 e incubado a 37°C (16h a 18h), de forma estática e sob agitação, dependendo da necessidade do experimento, na mesma temperatura e período de tempo. A partir desse cultivo foi realizada uma diluição na DO600nm igual a 0,6, dessa diluição, as bactérias foram inoculadas em quantidade suficiente para obter uma diluição de 1:100 na placa contendo DMEM Low Glucose (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Thermo Fisher®).

Para os ensaios em diferentes temperaturas, placas foram incubadas a 30°C e 37°C por 24 horas. Para os ensaios em diferentes concentrações de DHMA, foram adicionados

à microplaca de 96 poços 2 μ M, 10 μ M e 50 μ M do composto, sendo as placas incubadas a 37°C por 24 horas. Para ambos os ensaios, após 24h, o meio foi retirado e os poços lavados 1 vez com PBS para remover as células não aderidas, adicionado 50 μ L de cristal violeta 0,1% incubado em temperatura ambiente por 15 minutos, após esse período, o cristal violeta foi removido e os poços lavados 1 vez com PBS para remover o excesso de cristal violeta. Foi adicionada uma solução de acetona-etanol (20:80) para solubilizar o cristal e foi realizada a medição da DO550nm no equipamento CYTATION IMAGING READER 3 BioTek®. Os resultados obtidos foram plotados em gráficos de barras e expressos em unidades de absorbância em 550nm.

3.6. Ensaio de formação de biofilme 24h em superfície abiótica utilizando LED209

O ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica foi realizado de acordo com o descrito por Curtis e colaboradores (2014)(CURTIS; RUSSELL; MOREIRA; ADEBESIN *et al.*, 2014a). Foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços. As cepas EC958 e EC958 Δ qseC foram cultivadas de forma estática por 24 horas a 37°C, após esse período foi realizado um novo repique na proporção de 1:100 e incubado em estufa a 37°C por 16 horas na presença de 1 μ M de LED209. A partir do cultivo foi realizada uma diluição afim de todas as cepas ficarem na DO600nm igual a 0,6, dessa diluição, as bactérias foram inoculadas em quantidade suficiente para obter uma diluição de 1:100 na placa contendo caldo Luria Bertan (LB Invitrogen®) e contendo a concentração 5nM de LED209 (Cayman Chemical®) solubilizado em DMSO. Nos poços que não receberam o LED209 foi adicionada a mesma concentração de DMSO. As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. Após 24h, o meio foi retirado e os poços lavados 1 vez com PBS para remover as células não aderidas, foi adicionado Triton 0,1%. Foi realizada a diluição seriada (1:100) e posterior plaqueamento. Os resultados obtidos foram expressos em Log10 das UFC/mL.

3.7. Ensaio de motilidade Swimming

Para avaliar o fenótipo de motilidade das cepas protótipos CFT073, UTI89 e EC958 frente as amostras clínicas enviadas para o sequenciamento, foi realizado o teste de motilidade *Swimming*. Foram inoculados 5 μ L de um cultivo em caldo LB *overnight*, cultivados sob agitação, no centro de uma placa de meio LB semi-sólido (0,3% de ágar), perfurando o meio e inoculando em profundidade, as placas foram incubadas a 37°C e os

halos medidos em diferentes períodos de incubação (MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010; SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003). Todo o experimento foi realizado em quintuplicata e os resultados foram calculados a partir da média do diâmetro do halo de deslocamento e expressos em centímetros (cm).

3.7.1. Ensaio de motilidade *Swimming* em condições diferenciadas

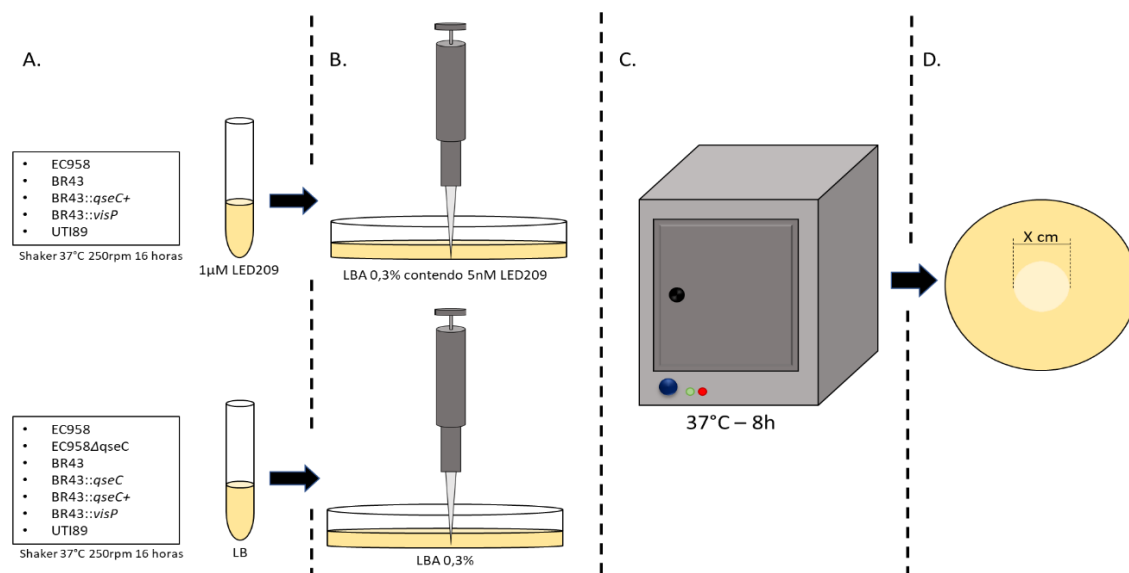
Para avaliar o fenótipo de motilidade das cepas ST131: EC958, EC958 $\Delta qseC$ e BR43 na presença de diferentes concentrações de DHMA um metabólito da norepinefrina, foi realizado o teste de motilidade *Swimming*. Foram inoculados 5 μ L de um cultivo em caldo LB *overnight*, cultivados de forma estática e sob agitação, no centro de uma placa de meio LB semi-sólido (0,25% de ágar), perfurando o meio e inoculando em profundidade, as placas foram incubadas a 37°C e os halos medidos a cada 1 hora até completar 6 horas de incubação (KAKKANAT; TOTSIKA; SCHAALE; DUELL *et al.*, 2015; MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010; SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003). Todo o experimento foi realizado em quintuplicata e os resultados foram calculados a partir da média do diâmetro do halo de deslocamento e expressos em centímetros (cm).

3.7.2. Ensaio de motilidade *Swimming* utilizando LED209

Para avaliar o fenótipo de motilidade das cepas EC958, EC958 $\Delta qseC$, BR43, BR43::*qseC*, BR43::*qseC*+, BR43::*visP* e UTI89, foi realizado o teste de motilidade *Swimming* na presença de 5nM de LED209. As cepas EC958, BR43, BR43::*qseC*+, BR43::*visP* e UTI89 foram incubadas sob agitação na presença e ausência de 1 μ M de LED209 em caldo LB por 16 horas a 37°C, já os mutantes EC958 $\Delta qseC$ e BR43::*qseC* foram cultivados nas mesmas condições na ausência de LED209. Foram inoculados 5 μ L de um cultivo em caldo LB por 16 horas, cultivados sob agitação, no centro de uma placa de meio LB semi-sólido (0,3% de ágar) contendo LED209 (EC958, BR43, BR43::*qseC*+, BR43::*visP* e UTI89) e não contendo LED209 (EC958, EC958 $\Delta qseC$, BR43, BR43::*qseC*, BR43::*qseC*+, BR43::*visP* e UTI89), perfurando o meio e inoculando em profundidade, as placas foram incubadas a 37°C e os halos medidos após 8 de incubação a 37°C (MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010; SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003), conforme a Figura 3. Todo o experimento foi realizado

em quintuplicata e os resultados foram calculados a partir da média do diâmetro do halo de deslocamento e expressos em centímetros (cm).

Figura 6 - Esquema representando as etapas do ensaio de motilidade *swimming*



Fonte: O autor.

Figura 6 - A. Os pré-inóculos das cepas utilizadas para o ensaio foram incubadas a 37°C, sob agitação, na presença ou ausência de 1μM de LED209 por 16h. B. Foi realizado o inóculo de 5μL da cultura crescida na presença de LED209 no centro de uma placa de LBA 0,3% com 5nM de LED209, e para as culturas que não foram expostas ao LED209, foi realizado o mesmo procedimento, porém em LBA 0,3% sem adição de LED209. C. As replicatas foram incubadas em estufa a 37°C por 8 horas. D. Foi realizada a medição do diâmetro do halo de motilidade após 8 horas de incubação em estufa a 37°C.

3.8.Extração de RNA

A técnica de extração de RNA é baseada no uso de desnaturante forte, sendo que o método mais empregado utiliza o TRIzol para tal finalidade. A técnica consiste na utilização de uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, que rompe as células, inativa a enzima RNase e dissolve os componentes celulares, mantendo o RNA intacto. O clorofórmio que é adicionado em seguida, separa a solução anterior em três fases, sendo elas: aquosa (contém RNA); intermediária (DNA); orgânica (proteínas, membranas, organelas). Em seguida, a solução aquosa obtida é extraída e acrescida de etanol 100%, o qual irá solubilizar as moléculas de RNA. Esta solução é posta em uma coluna de separação, que se liga às moléculas de RNA. O eluato é descartado. A coluna é lavada com uma solução de etanol 70%, sendo então removidos os sais remanescentes.

Por fim, o RNA é eluído da coluna, e tratado com DNase para uma maior purificação (RIO; ARES; HANNON; NILSEN, 2010).

3.9. Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Foi utilizada a técnica de qRT-PCR, conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006). O ensaio de qRT-PCR foi realizado em triplicatas biológicas, e cada uma em duplicatas experimentais (sextuplicata). Para cada reação (20 μ L) foram utilizados 100ng de RNA das amostras, Master Mix SYBR[®], Multi-scribe[®] reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) e RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific). As reações foram normalizadas com o emprego do *rpoA* (*RNA polymerase subunit A*) como gene de referência. Foi utilizado o equipamento QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific) para realização das reações. Os resultados obtidos pelo ensaio de qRT-PCR foram analisados pelo método de *Comparative critical threshold* ($\Delta\Delta CT$), conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006). Foi analisada a expressão de importantes genes de sinalização química e virulência, como *visP*, *qseC* e *fimH*.

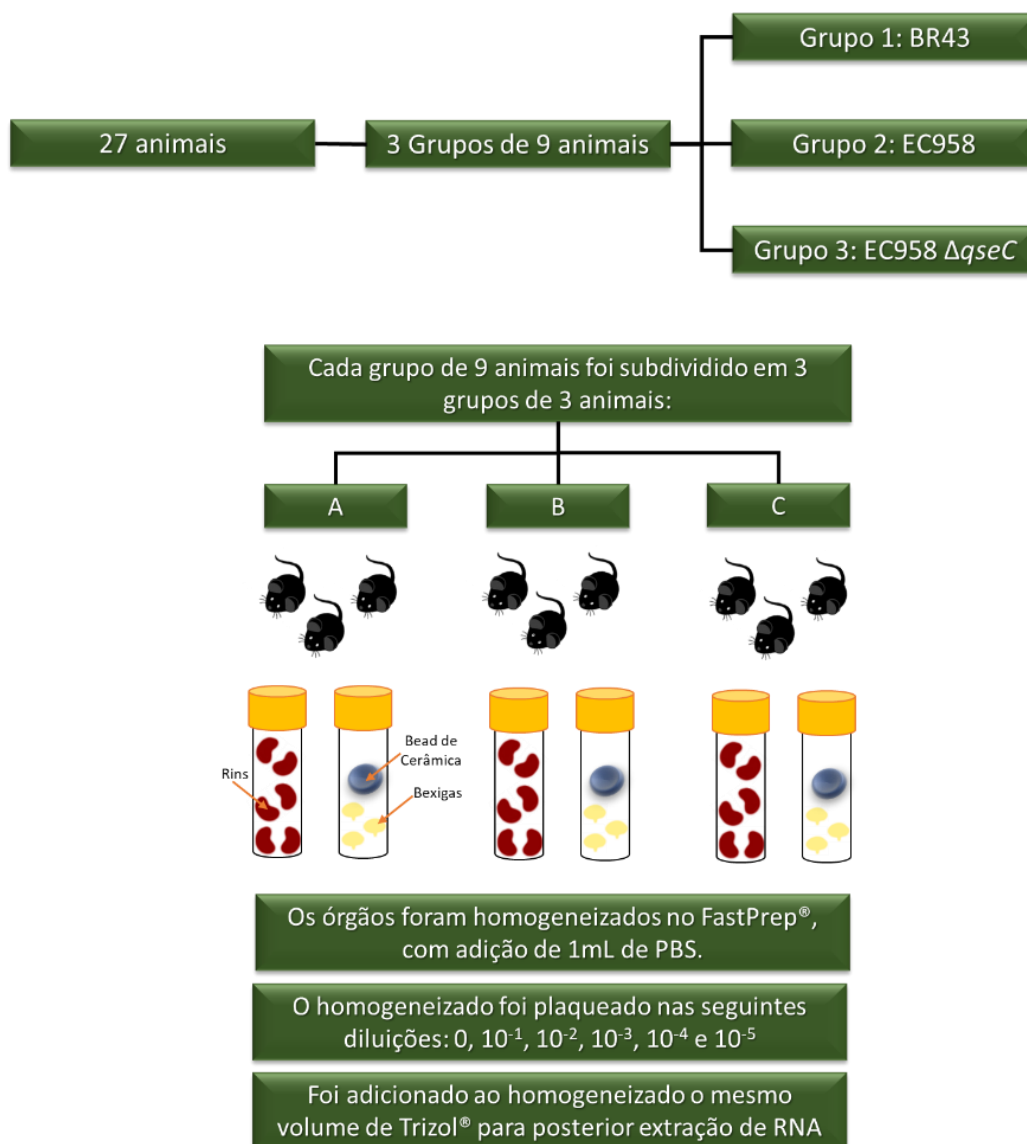
3.10. Modelo de infecção in vivo utilizando C57BL/6

O experimento foi realizado após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (CEUA/FCF/CAR: 23/2016 com vigência até Janeiro de 2020). Todos os procedimentos realizados com os camundongos foram acompanhados pela médica veterinária Isabela Mancini Martins responsável técnica pelo biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Campus Araraquara/SP.

Foram realizados dois experimentos independentes para definição da dose de infecção ideal para o modelo C57BL/6. Foram realizadas infecções utilizando 10^8 (Figura 5) e 10^9 (Figura 6) UFC em 50 μ L de PBS, inoculados diretamente na bexiga através de cateterismo transuretral, com os animais sob sedação com cetamina/xilazina. Foram utilizadas fêmeas de Camundongos C57BL/6 com 6 a 8 semanas de idade com peso aproximado de 16g a 18g (HANNAN; HUNSTAD, 2016; HANNAN; MYSOREKAR; HUNG; ISAACSON-SCHMID *et al.*, 2010; HANNAN; TOTSIKA; MANSFIELD; MOORE *et al.*, 2012). A infecção foi realizada via cateterismo transuretral com microcânulas flexíveis 30G (Fabinject[®]) estéril diretamente na bexiga.

Para o experimento com 10^8 UFC como dose infecciosa, foram utilizados 27 animais, que foram divididos em 3 grupos de 9 animais. Conforme esquema apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Esquema da infecção in vivo com 10^8 UFC

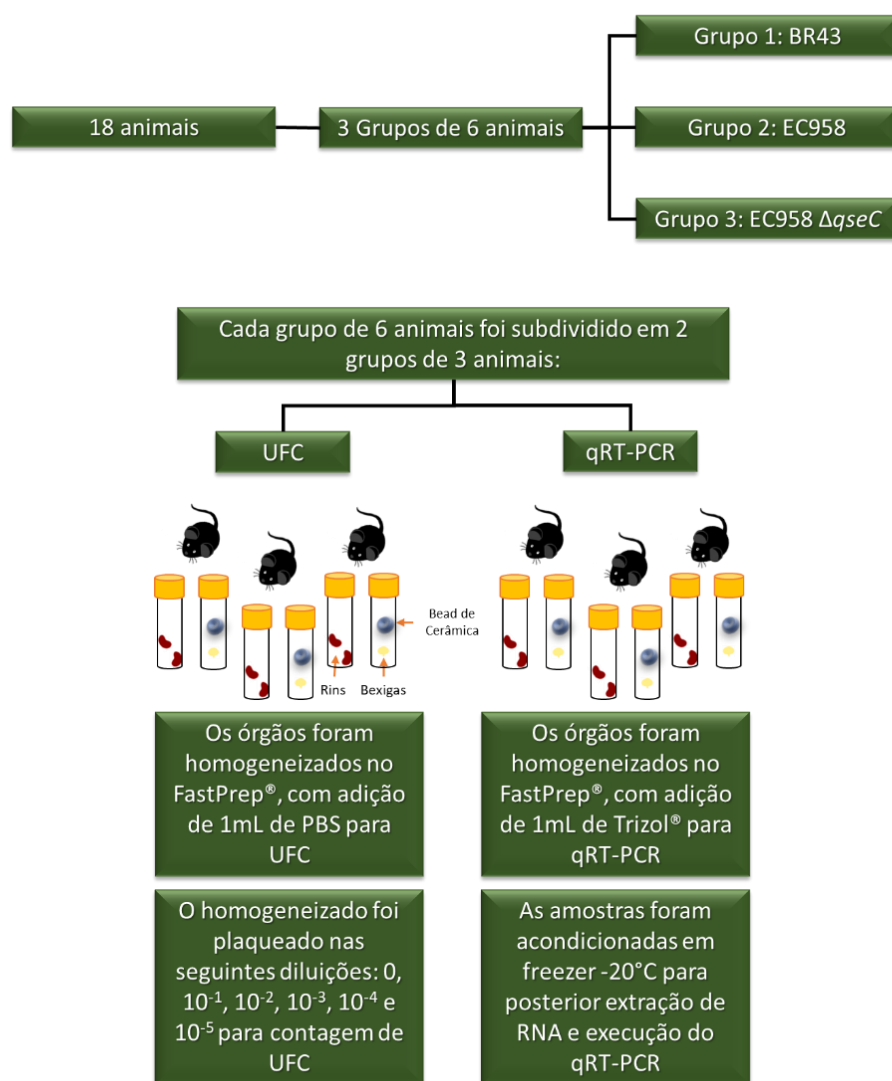


Fonte: O autor.

Figura 7 – Os animais foram divididos em 3 grupos que receberam 10^8 UFC como dose infecciosa. Após 3 dias da infecção, foi realizada a eutanásia em câmara de CO_2 seguindo as recomendações do CEUA (CEUA/FCF/CAR: 23/2016), os órgãos foram homogeneizados no FastPrep® com adição de 1mL de PBS, desse homogeneizado foi realizada a diluição seriada das amostras, que então foram plaqueadas em diferentes concentrações. Foi adicionado Trizol® ao homogeneizado para extração de RNA.

Para esse experimento com 10^9 UFC como dose infecciosa, foram utilizados 18 animais, que foram divididos em 3 grupos de 6 animais. Conforme esquema apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema da infecção in vivo com 10^9 UFC



Fonte: O autor.

Figura 8 – Os animais foram divididos em 3 grupos de 6 animais cada, que receberam 10^9 UFC como dose infecciosa. Após 3 dias da infecção, foi realizada a eutanásia em câmara de CO_2 seguindo as recomendações do CEUA (CEUA/FCF/CAR: 23/2016), os órgãos foram homogeneizados no FastPrep® com adição de 1mL de PBS, nos grupos para contagem de UFC, e 1mL de Trizol® nos grupos para qRT-PCR. Do homogeneizado em PBS foi realizada a diluição seriada das amostras, que então foram plaqueadas em diferentes concentrações e incubadas a 37°C por 16-18h em estufa.

Foi realizada a eutanásia dos animais após 72h de infecção utilizando câmara de CO₂. Os rins e a bexiga foram removidos de forma asséptica. Os órgãos foram homogeneizados em PBS no FastPrep® a partir de configuração pré-definida pelo fabricante. O homogeneizado foi plaqueado nas diluições 0, -1, -2, -3, -4 e -5, as placas foram incubadas a 37°C por 16-18h em estufa (HAGBERG; ENGBERG; FRETER; LAM *et al.*, 1983; JOHNSON; LOCKATELL; RUSSELL; HEBEL *et al.*, 1998; TOTSIKA; KOSTAKIOTI; HANNAN; UPTON *et al.*, 2013; WALTERS; LANE; VIGIL; SMITH *et al.*, 2012).

3.10. Análise da expressão gênica por qRT-PCR na presença e ausência de LED209

Foi utilizada a técnica de qRT-PCR, conforme descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006). Para a extração do grupo tratado com LED209, foi realizada uma pré-incubação dos cultivos por 16h a 37°C, sob agitação, na presença de 1µM de LED209. Posteriormente foi realizada uma diluição de 500µL dessa cultura em 30mL de LB contendo 5nM de LED209. A seguir, foi realizada a extração utilizando TRIzol e o kit RiboPure (Ambion®). O ensaio de qRT-PCR foi realizado em triplicatas biológicas, e, cada uma, em duplicatas experimentais. Para cada reação foram utilizados 100ng de RNA das amostras, acrescidos de Master Mix SYBR®, Multi-scribe® reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) e RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific). As reações foram normalizadas utilizando *rpoA* (*RNA polymerase subunit A*) como gene de referência. As reações foram realizadas utilizando o equipamento QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific) para realização das reações. Os resultados obtidos pelo ensaio de qRT-PCR foram analisados pelo método de *Comparative critical threshold* ($\Delta\Delta CT$) (WALTERS; SPERANDIO, 2006). Foram analisadas as expressões de genes importantes relacionados a sinalização química e virulência, como *visP*, *qseC*, *fimH* e *fliC*.

3.11. Construção de mutante e complementação

Os mutantes não polares *qseC* e *visP* para cepa BR43 foram obtidos via vetor suicida pJP5603 (PENFOLD; PEMBERTON, 1992). Uma porção interna dos genes de interesse foram amplificadas separadamente por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando primers *qseC*-pJP5603. O inserto foi digerido com as enzimas de restrição *KpnI* e *SacI* (New England Biolabs) e depois inserido no sítio correspondente no vetor suicida. O plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* DH5α (*λpir*) e as colônias foram selecionadas em placas contendo canamicina (50µg. mL⁻¹). A cepa de *E. coli* S17 (*λpir*)

foi transformada com plasmídeos selecionados ou vetor de suicídio vazio como controle negativo e conjugada com a cepa BR43 através do acoplamento do filtro em membranas de nitrocelulose. Colônias de transconjugantes foram selecionadas em placas de ágar LB contendo canamicina ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$) e ciprofloxacino ($5\mu\text{g.mL}^{-1}$), e a integração do vetor suicida pJP5603 no gene *qseC* foi confirmada por PCR utilizando os primers M13 (reverso) e *qseC*-pJP5603 (reverso) e a integração no gene *visP* foi confirmada utilizando os primers M13 (reverso) e *visP*-pJP5603 (reverso). O gene *qseC* foi clonado no vetor pBAD33Gm e usado para complementar a linhagem mutante. Todas as reações de PCR foram amplificadas com polimerase de DNA Platinum Taq (Invitrogen) e 1 de cada iniciador.

3.12. Análise Estatística dos Resultados

A análise dos resultados foi realizada através de significância estatística após normalização por Kolmogorov-Smirnov, para os dados que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o *Teste t de Student* e método ANOVA (*One-way analysis of variance* e *Two-way*) com correção de Bonferroni, sendo que os valores de $P < 0,01$ e $P < 0,001$ foram considerados altamente significativos. Para os testes que não apresentaram distribuição normal, foram utilizados os testes Mann Whitney e Kruskal-Wallis. Foram utilizadas as cepas sem tratamento como padrão de comparação.

4. Resultados e Discussão

4.1. Perfil de resistência a antimicrobianos das amostras clínicas

Os ensaios de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo Método de Difusão de Disco seguindo as recomendações do CLSI (CLSI, 2018). Todos os isolados foram resistentes à ciprofloxacino (CIP 10) (100% [11/11]). Foi realizado o teste de sensibilidade a gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), cefepime (CPM), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CLO), sulfametoxazol-trimetoprima (SUT). Os isolados apresentaram diferentes suscetibilidade a diferentes agentes antimicrobianos os quais 54,5% (6/11) foram suscetíveis à GEN, 70% (7 / 10) à CPM, 27,3% (3/11) ao SUT, 9,1% (1/11) à AMP, 22,2% (2/9) ao CLO e 77,8% (7/9) para a TET. Os dados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Perfil de Resistência a Antimicrobianos

Cepas	ST	Método de difusão em Disco						
		GEN 10 (aminoglicosídeo)	CPM 30 (β-lactâmico)	CIP 05 (quinolônico)	SUT 25 (sulfametoxazol/ trimetoprima)	AMP 10 (β-lactâmico)	CLO 30 (cloranfenicol)	TET 30 (tetraciclina)
BR02-DEC	2179	S	S	R	R	R	R	R
BR03-DEC	2179	R	R	R	R	R	*	*
BR07-DEC	2179	I	R	R	R	R	R	R
BR10-DEC	2509	R	S	R	R	R	*	*
BR12-DEC	410	S	S	R	R	I	S	R
BR14-DEC	1193	S	S	R	S	S	S	S
BR25-DEC	641	S	S	R	S	R	I	R
BR29-DEC	224	S	S	R	R	R	R	R
BR32-DEC	617	S	R	R	R	R	R	R
BR43-DEC	131	I	*	R	R	R	R	S
BR64-DEC	224	I	S	R	I	R	I	R

CIP 10 - ciprofloxacino, GEN 10 – gentamicina, CPM 30 - cefepime, SUT 25 - sulfametoxazol trimetoprima, AMP 10 - ampicilina, CLO 30 - cloranfenicol e TET 30 - tetraciclina, * - não testado. **Fonte:** O autor.

4.2. Sequenciamento Genômico

Das 20 amostras estudadas quanto ao perfil de resistência, 11 foram sequenciadas. Análises de sequência genômica permitiram a identificação da presença de 6 variedades de β -lactamases, sendo que 9 dos 11 isolados sequenciados apresentam genes produtores de blaCMY-23, blaCMY-2, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B e blaTEM-1A, conforme a Tabela 2. O isolado ST131 (BR43), apresentou até o momento, apenas a blaTEM-1B, sendo diferente do encontrado na amostra EC958 (ST131) que apresenta blaCTM-M-15 e blaCMY-23 (TOTSIKA; BEATSON; SARKAR; PHAN *et al.*, 2011). Esses genes são os principais responsáveis pela resistência bacteriana aos principais β -lactâmicos utilizados na clínica médica, evidenciando a ameaça que essas bactérias apresentam para a comunidade médica e científica (CASTANHEIRA; FARRELL; DESHPANDE; MENDES *et al.*, 2013), ressaltando a necessidade de novos fármacos para o tratamento a essas infecções(WHO | Antimicrobial resistance, 2016; WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017). Também foi detectada a presença de genes de resistência a aminoglicosídeos (*aadA*, *aph* (3') - *Ia*), cloranfenicol (*catA1*, *cmlA1*, *floR*), trimetoprima (*dfrA*), estreptomicina (*str*), sulfonamida (*sul*), tetraciclina (*tet*), macrolídeos (*mphA*) e quinolônicos (*acrAB*, *tolC*), conforme pode ser observado na Tabela 3. A resistência a antimicrobianos(WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017) vem aumentando constantemente em todo o mundo, o que levou a Organização mundial de Saúde (OMS) a alertar todos os países sobre a necessidade de investimentos na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos(WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017).

Tabela 2 - β -Lactamases presentes nos isolados clínicos

Cepas	β -Lactamase	Grupo Funcional (Bush-Jacoby)(BUSH; JACOBY, 2010)	Classe Molecular (Subclasse)	Substrato distintivo	Características	Referência
BR07-DEC	blaCMY-2	1	C	Cefalosporinas	Hidrólise de cefalosporinas, benzilpenicilina e cefamicina	(BUSH; JACOBY, 2010; JACOBY, 2009)
BR10-DEC	blaTEM-1A	2b	A	Penicilinas e Cefalosporinas	Hidrólise de cefalosporinas, benzilpenicilina	(BUSH; JACOBY, 2010; MATTHEW, 1979)
BR02-DEC; BR03-DEC; BR25-DEC; BR29-DEC; BR32-DEC*; BR43-DEC; BR64-DEC	blaTEM-1B	2b	A	Penicilinas and Cefalosporinas	Hidrólise de cefalosporinas, benzilpenicilina	(BUSH; JACOBY, 2010; MATTHEW, 1979)
BR32-DEC*	CTX-M-15	2be	A	Expectro-estendido cefalosporinas e monobactams	Aumento da hidrólise de oximino- β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam)	(BONNET, 2004; BUSH; JACOBY, 2010)

Fonte: O autor.

Tabela 3 - Genes de Resistência a Antimicrobianos

Cepas	ST	Genes de Resistência a Antimicrobianos								
		β-lactâmicos	Aminoglicosídeos	Cloranfenicol	Trimetoprima	Estreptomicina	Sulfonamidas	Tetraciclinas	Macrolídeos	Quinolônicos
BR02-DEC	2179	blaTEM-1B	<i>aadA5</i>	<i>catA1</i>	<i>dfrA17</i>	<i>strA, strB</i>	<i>sul1, sul2</i>	<i>tet(B)</i>	<i>macA</i>	<i>acrA, tolC</i>
BR03-DEC	2179	blaTEM-1B	<i>aadA5</i>	<i>catA1</i>	<i>dfrA17</i>	<i>strA, strB</i>	<i>sul1, sul2</i>	<i>tet(B)</i>	<i>macB</i>	<i>acrA, tolC</i>
BR07-DEC	2179	blaCMY-2	<i>aadA5</i>	<i>catA1</i>	<i>dfrA17</i>	<i>strA, strB</i>	<i>sul1, sul2</i>	-	<i>macA, macB</i>	<i>acrA, tolC</i>
BR10-DEC	2509	blaTEM-1A	<i>aadA1, aadA2</i>	<i>cmlA1</i>	<i>dfrA12, dfrA8, floR</i>	<i>strA, strB</i>	<i>sul2, sul3</i>	<i>tet(A)</i>	<i>macA, macB</i>	<i>acrA, tolC</i>
BR12-DEC	410	-	<i>aadA5</i>	-	<i>dfrA17</i>	-	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>macA, macB, mph(A)</i>	<i>acrA, tolC</i>
BR14-DEC	1193	-	-	-	-	-	-	-	<i>macA</i>	<i>acrA, tolC</i>
BR25-DEC	641	blaTEM-1B	-	-	-	<i>strA, strB</i>	-	<i>tet(B)</i>	<i>macA, macB</i>	<i>acrA, tolC</i>
BR29-DEC	224	blaTEM-1B	<i>aadA1, aadA2</i>	<i>cmlA1</i>	<i>dfrA12</i>		<i>sul3</i>	<i>tet(A), tet(M)</i>	<i>macA, macB</i>	<i>acrA, tolC</i>
BR32-DEC	617	blaCTX-M-15 blaTEM-1B	<i>aadA2</i>	-	<i>dfrA8, floR</i>	-		<i>tet(A)</i>	<i>macA, macB</i>	<i>acrA, tolC</i>
BR43-DEC	131	blaTEM-1B	-	-	-	-	-	-	<i>macA, macB</i>	<i>acrA, tolC</i>
BR64-DEC	224	blaTEM-1B	<i>aadA1, aadA2</i>	<i>cmlA1</i>	<i>dfrA12</i>	-	<i>sul3</i>	<i>tet(A), tet(M)</i>	<i>macA, macB</i>	<i>acrA, tolC</i>

Fonte: O autor.

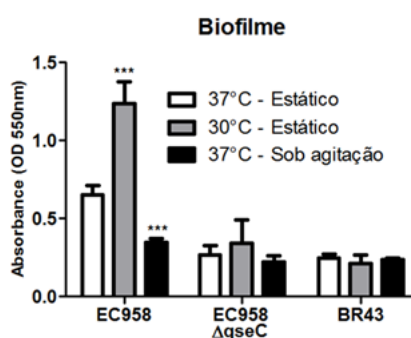
4.3. Formação de Biofilme em superfície abiótica

4.3.1. Ensaio de formação de biofilme 24h em superfície abiótica em diferentes condições de crescimento e temperatura

Com o objetivo de analisar a influência da temperatura de incubação e condições de crescimento do pré-inóculo, sob agitação ou estático, foi realizado o experimento conforme descrito no material e métodos. Os resultados obtidos demonstraram uma influência tanto da temperatura quanto da condição de crescimento do pré-inóculo na capacidade da cepa EC958 em formar biofilme, formando um biofilme mais denso quando incubada a 30°C a partir de um pré-inóculo de crescimento estático, também foi observado um biofilme menos denso a 37°C com o pré-inóculo cultivado sob agitação em relação ao pré-inóculo estático nas mesmas condições de temperatura, sendo possível inferir que as condições de crescimento podem favorecer a expressão de determinados genes e desvio de rotas metabólicas, que necessitam de estudos mais aprofundados para determinar as alterações de expressão de genes que levam a esses fenótipos observados (Figura 9). O mutante EC958 $\Delta qseC$, apresentou uma capacidade de produção de biofilme reduzida quando comparado a cepa selvagem EC958, corroborando com o que é relatado na literatura para *Pseudomonas aeruginosa*(RASAMIRAVAKA; LABTANI; DUEZ; EL JAZIRI, 2015), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(NOVAK; SHAO; DAEP; DEMUTH, 2010), *Haemophilus influenzae*(UNAL; SINGH; FLEURY; SINGH et al., 2012), *Franciscella novicida*(DURHAM-COLLERAN; VERHOEVEN; VAN HOEK, 2010)e *E. coli*(SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO et al., 2003).

A cepa BR43, embora seja pertencente a ST131, apresenta uma capacidade reduzida de formação de biofilme em comparação com a cepa EC958 (ST131), conforme pode ser observado na Figura 9, não apresentando diferença significativa entre as diferentes condições experimentais.

Figura 9 - Biofilme em diferentes condições de crescimento



Fonte: O autor.

Figura 9 – Biofilme em diferentes condições de crescimento. Houve aumento na formação de biofilme na temperatura de 30°C em crescimento estático para a cepa EC958, não foi observado o mesmo para as cepas EC958 Δ qseC e BR43. As cepas EC958 Δ qseC e BR43 apresentaram menor potencial para formação de biofilme quando comparadas a cepa EC958. Two-way ANOVA com correção de Bonferroni ***p<0,001.

4.3.2. Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica em diferentes concentrações de DHMA

Com o objetivo de analisar a influência da temperatura de incubação e atividade do DHMA na formação do biofilme, foi realizado o experimento descrito no material e métodos. O ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica utilizando diferentes concentrações de DHMA demonstrou diferenças no fenótipo entre as mesmas cepas nas diferentes concentrações e temperaturas testadas. Na temperatura de incubação de 37°C, a presença de 50 μ M de DHMA levou a um ligeiro aumento da formação de biofilme nas cepas BR43, UTI12 e CFT073 quando comparadas ao grupo não tratado (Controle). Para a cepa EC958, a presença de 2 μ M de DHMA levou a redução na formação de biofilme. Para as demais cepas e concentrações de DHMA a 37°C, não houve diferenças significativas na formação de biofilme (Figura 10 - Painel A).

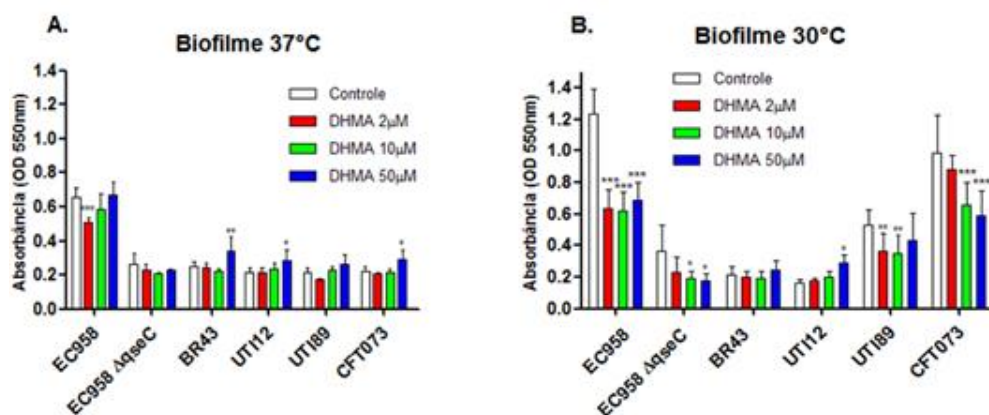
No Painel B (Figura 10) é possível observar o aumento na formação de biofilme a 30°C para todos os controles das cepas testadas, exceto para as cepas BR43 e UTI12. A presença de DHMA e a incubação na temperatura de 30°C não exerceu nenhum efeito significativo na formação de biofilme nas cepas BR43, UTI12, UTI89 e no mutante EC958 Δ qseC. Quando comparada a cepa EC958 selvagem com seu mutante EC958 Δ qseC, pode ser observada uma redução significativa na capacidade de formação de biofilme, demonstrando a importância do gene em questão para a virulência do patógeno.

Para as cepas EC958 e CFT073, a presença de DHMA e a temperatura de 30°C promoveu a redução na formação do biofilme, abrindo perspectivas para o estudo mais detalhado da influência da temperatura e do metabólito da norepinefrina na virulência das cepas em questão.

Estudos recentes têm reportado o uso do DHMA como um potente quimioatrativo para *E. coli* (LOPES; SOURJIK, 2018; PASUPULETI; SULE; COHN; MACKENZIE *et al.*, 2014; PASUPULETI; SULE; MANSON; JAYARAMAN, 2018; SULE; PASUPULETI; KOHLI; MENON *et al.*, 2017), mas ainda pouco se sabe sobre a influência dessa molécula na virulência de cepas patogênicas, sendo necessário estudos

mais aprofundados para entender os diferentes comportamentos das cepas nos resultados obtidos com o uso do DHMA.

Figura 10 – Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica em diferentes concentrações de DHMA



Fonte: O autor.

Figura 10 – Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica em diferentes concentrações de DHMA. É possível observar que a temperatura também exerce um papel muito importante na formação de biofilme no grupo Controle (não tratado) em que 30°C aumentou expressivamente a formação de biofilme para as cepas EC958, UTI89 e CFT073. O DHMA não apresentou influência na formação de biofilme a 37°C, entretanto a 30°C levou a redução na formação de biofilme para as cepas EC958, UTI89 e CFT073. Two-way ANOVA com correção de Bonferroni (* $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

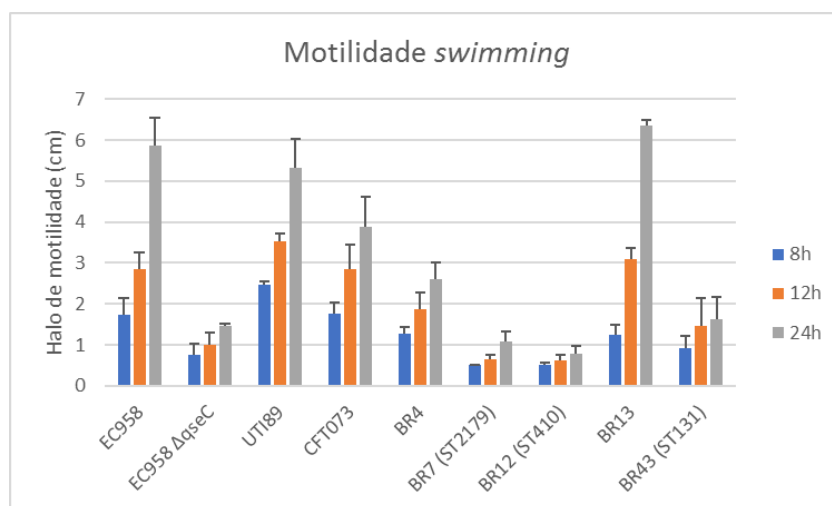
4.4. Motilidade mediada por flagelo tipo “swimming”

Os experimentos de motilidade foram realizados de acordo com a metodologia descrita. Com a finalidade de verificar o fenótipo de motilidade das cepas do presente estudo. Foi disponibilizado pelo grupo do Prof. Dr. Mark Schembri da University of Queensland, Austrália, a cepa EC958 mutante com deleção do gene *qseC*, essa cepa foi incluída no presente experimento fenotípico, identificada como EC958 Δ *qseC*.

Os resultados obtidos demonstraram que o mutante apresentou fenótipo de motilidade reduzido em relação a cepa selvagem EC958, estando de acordo com resultados obtidos pelo nosso grupo em estudos utilizando EHEC e *S. Typhimurium* (MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010; SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002). Também foi observado que a cepa BR43 (ST131) apresenta um perfil de motilidade menor que o protótipo EC958 (ST131). As cepas BR7 e BR12

não apresentaram motilidade durante as 24h de experimentação, nas condições testadas (Figura 11).

Figura 11 - Fenótipo de motilidade das amostras clínicas frente aos protótipos e ao mutante.



Fonte: O autor.

Figura 11 – Fenótipo de motilidade das amostras clínicas frente aos protótipos e ao mutante. As amostras demonstram uma heterogeneidade no fenótipo de motilidade, algumas cepas apresentam-se móveis enquanto outras apresentam-se estáticas.

Os resultados obtidos mostraram uma heterogeneidade no fenótipo de motilidade das amostras clínicas frente as cepas protótipos e ao mutante, conforme o Figura 6, o que abre perspectiva para o estudo de expressão dos genes envolvidos tanto com a motilidade mediada por flagelo, quanto na mediada por outros fatores, como por exemplo as fímbrias (LANE; SIMMS; MOBLEY, 2007).

O resultado obtido com o uso da cepa EC958 $\Delta qseC$ sugere que outros fatores de virulência também podem estar afetados pela mutação, o que motiva mais estudos de expressão gênica tanto na presença quanto na ausência do LED209 sugeridos no presente projeto.

4.5. Motilidade swimming em condições diferenciadas

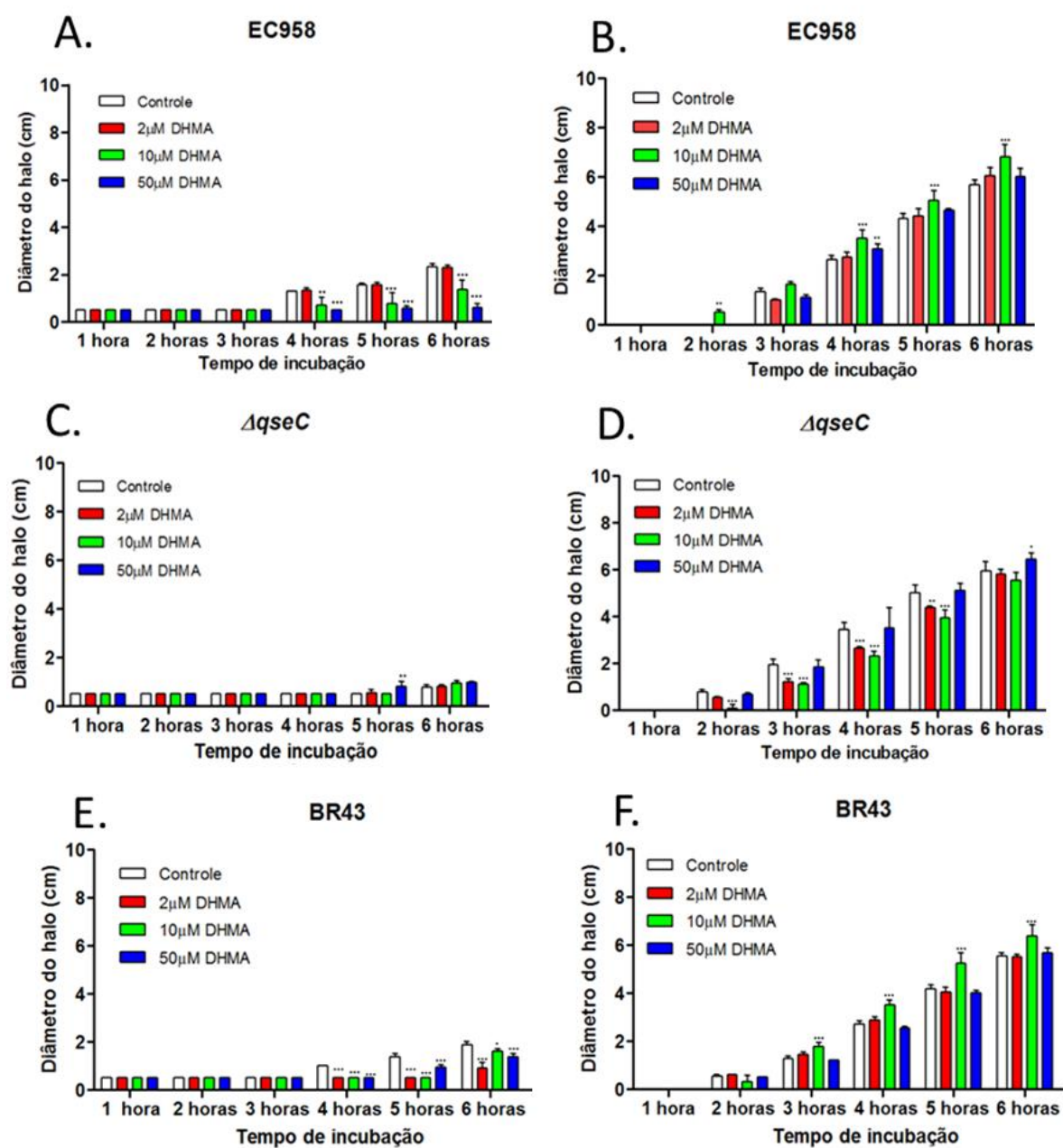
Os experimentos de motilidade foram realizados de acordo com a metodologia descrita no material e métodos com a finalidade de verificar o fenótipo de motilidade das cepas do presente estudo em diferentes condições de crescimento, além de analisar a influência do DHMA nesse fenótipo. Os ensaios de motilidade *swimming* em Ágar LB 0,25%, na presença de diferentes concentrações de DHMA, demonstraram

diferenças no fenótipo de motilidade das cepas tratadas quando comparadas ao Controle (não tratado) (Figura 12). Foi demonstrada por Pasupuleti e colaboradores (PASUPULETI; SULE; COHN; MACKENZIE *et al.*, 2014) que a atividade quimioatrativa da Ne requer indução por duas enzimas, tiramina oxidase periplasmática (TynA) e aldeído desidrogenase aromática (FeaB), por uma via de sinalização que requer a proteína quinase QseC, de forma que a resposta quimiotática mediada por Ne é indireta. Os resultados obtidos no presente trabalho se assemelham aos resultados descritos por esses autores quando consideramos aqueles apresentados nos Painéis B, D e F (Figura 12).

Como pode ser observado no Pannel B e F da Figura 12, houve aumento significativo de motilidade para as cepas selvagens EC958 e BR43 na concentração de 10µM em todos os tempos. Para a cepa EC958 $\Delta qseC$ foi observado o aumento da motilidade na concentração de 50µM, Pannel D (Figura 12). Esses resultados sugerem que o mutante $\Delta qseC$ apresenta menor sensibilidade ao metabólito da Ne, corroborando com o fato da via de ativação da motilidade é dependente da via de sinalização mediada por *qseC*, como descrito por vários autores (CLARKE; SPERANDIO, 2005; LUSTRI; SPERANDIO; MOREIRA, 2017; MOREIRA; SPERANDIO, 2016; SPERANDIO; TORRES; GIRÓN; KAPER, 2001; SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002).

Foram também observadas diferenças significativas na motilidade dos inóculos provenientes do pré-inóculo de cultivo estático em relação ao observado no inóculo proveniente de cultivo sob agitação. Como pode ser observado na Figura 12, a motilidade para os inóculos provenientes do cultivo estático (Painéis B, D e F) foram maiores quando comparados ao cultivo sob agitação (Painéis A, C e E) tanto para o controle quanto para todas as concentrações de DHMA testadas. Segundo dados reportados por Kakkanat e colaboradores (KAKKANAT; TOTSIKA; SCHAALE; DUELL *et al.*, 2015) a motilidade aumentada em cepas sob cultivo estático ocorre devido há um aumento significativo na quantidade de flagelos na superfície bacteriana nessas condições de crescimento, em resposta ao aumento da expressão de outros genes. Experimentos serão realizados para confirmar o envolvimento de outros genes relacionados ao fenótipo de motilidade.

Figura 12 - Halo de motilidade Swimming em LBA 0,25%



Fonte: O autor.

Figura 12 – Halo de motilidade do pré-inóculo cultivado sob agitação e na presença de 2 μM, 10 μM e 50 μM de DHMA (Painéis A, C e E), halo de motilidade do pré-inóculo de cultivo estático e na presença de 2 μM, 10 μM e 50 μM de DHMA (Painéis B, D e F). Two-way ANOVA com correção de Bonferroni *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

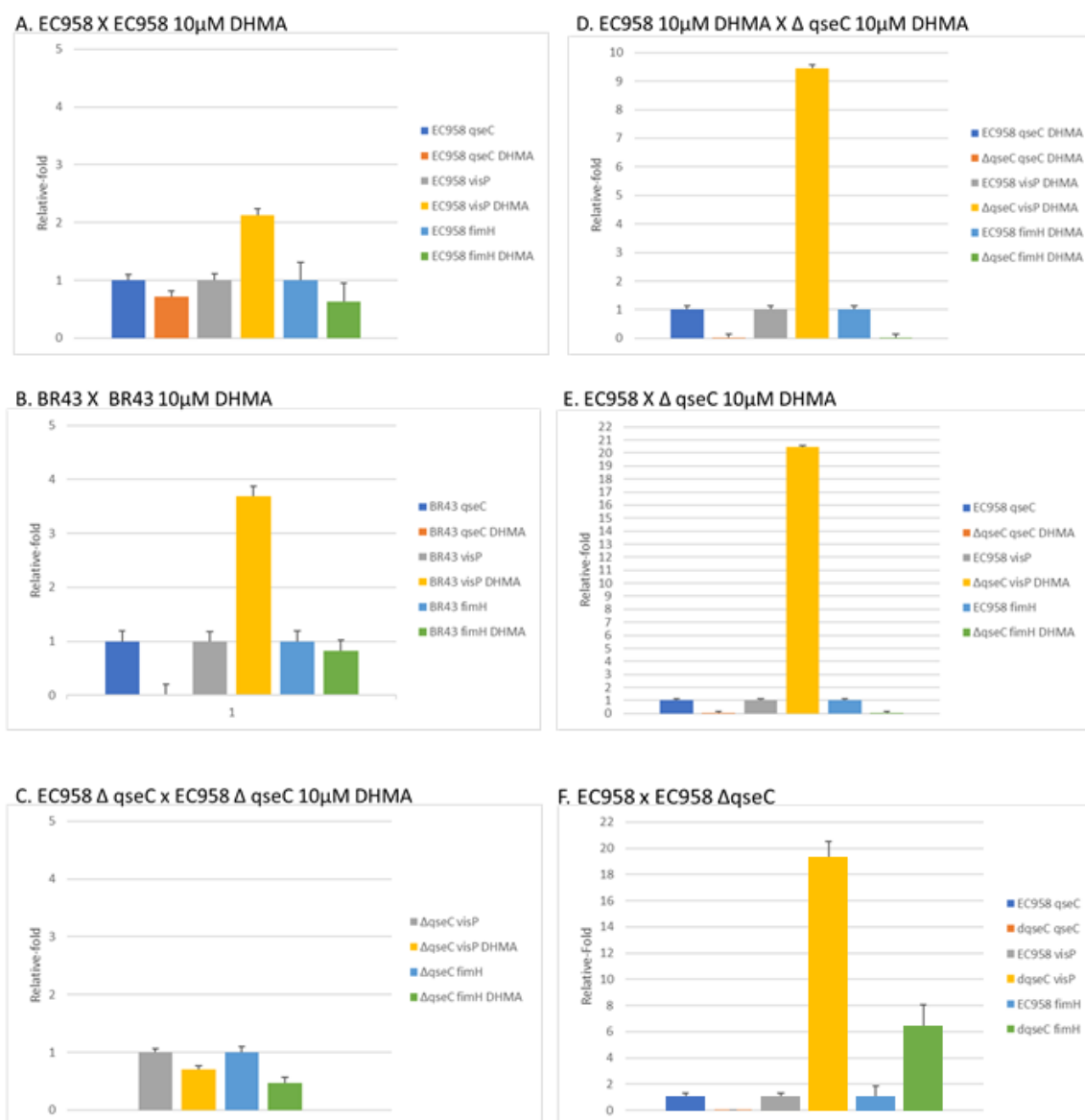
4.6. Estudo da expressão gênica das cepas EC958, $\Delta qseC$ e BR43 na presença de 10 μ M de DHMA

Com o objetivo de avaliar a influência do DHMA na expressão de genes de virulência em UPEC, foi realizado o experimento de qRT-PCR conforme metodologia descrita. Os resultados da análise da expressão gênica demonstraram uma redução acentuada na expressão de *qseC* na presença de 10 μ M de DHMA e uma superexpressão de *visP*, nessas condições para as cepas EC958 e BR43, conforme pode ser observado na Figura 13, painéis A e B. Entretanto, segundo dados apresentados por Sule e colaboradores (SULE; PASUPULETI; KOHLI; MENON *et al.*, 2017), foi verificado que o DHMA induz a expressão de genes de virulência e de adesão a células epiteliais em *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) de maneira dependente de QseC (SULE; PASUPULETI; KOHLI; MENON *et al.*, 2017). Em estudos de expressão gênica em EHEC, foi verificado para o mutante de $\Delta qseC$, que na presença de DHMA, não houve a indução de genes de virulência regulados ou não por LEE, como foi previamente descrito para Epi e Ne (HUGHES; CLARKE; YAMAMOTO; RASKO *et al.*, 2009), o que indica que o DHMA é reconhecido por QseC da mesma maneira que Epi e Ne (SULE; PASUPULETI; KOHLI; MENON *et al.*, 2017). Em estudos anteriores com EHEC e *S. Typhimurium*, apontaram que a superexpressão de *visP*, no mutante $\Delta qseC$, fez com que *visP* estivesse 65 vezes mais expresso no mutante que na selvagem (SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003) (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013). Em *S. Typhimurium*, assim como em EHEC, VisP está associado a fatores de virulência e funções celulares básicas, como metabolismo, estrutura da membrana bacteriana, estresse, e reconhecimento da presença de Epi/Ne/AI-3 via QseBC (SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003).

Para analisar se o aumento na expressão de *visP* ocorria devido ao fato do DHMA induzir diretamente esse aumento, foi analisada a expressão de *visP* no mutante $\Delta qseC$ tratado e não tratado com DHMA. Foi observado que o DHMA não induziu o aumento da expressão de *visP* no mutante, levando a conclusão de que o DHMA não age diretamente em *visP* (Figura 13 painel C), entretanto, quando comparamos o mutante de $\Delta qseC$ tratado com DHMA a cepa selvagem também tratada, observamos um aumento significativo na expressão de *visP* (Figura 13 painel D). Quando a comparação é realizada com a cepa selvagem não tratada e o mutante $\Delta qseC$ tratado com DHMA, pode-se observar a superexpressão de *visP* (Figura 13 painel E).

Quando a expressão gênica de $\Delta qseC$ é comparada apenas com a cepa selvagem, ambas sem tratamento com DHMA, observa-se que *visP* está cerca de 18 vezes mais expresso no mutante que na selvagem, também é possível observar que *fimH*, nessas condições, também encontra-se cerca de 5 vezes mais expresso no mutante que na selvagem (Figura 13 painel F). Estudos realizados com a cepa UTI89, demonstraram que na ausência de $\Delta qseC$ houve uma redução na expressão de *fimH* devido ao promotor de fases *fim* encontrar-se na posição “desligado” para a cepa em questão (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; CUSUMANO; HANNAN *et al.*, 2012; KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; PINKNER; HULTGREN, 2009), entretanto, para o caso da cepa EC958, o mesmo não se observa. Para todas as cepas, nas condições testadas com DHMA, não houve alteração significativa na expressão de *fimH*, exceto nas comparações entre a cepa selvagem tratada e não tratada com DHMA comparada ao mutante $\Delta qseC$ tratado com DHMA, em que não houve expressão desse gene (Figura 13 painéis D e E). Os resultados demonstram a complexidade envolvida na regulação da expressão gênica das bactérias na presença de DHMA, demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para entender como e porque essas alterações ocorrem.

Figura 13 - Expressão gênica de genes de virulência em UPEC



Fonte: O autor.

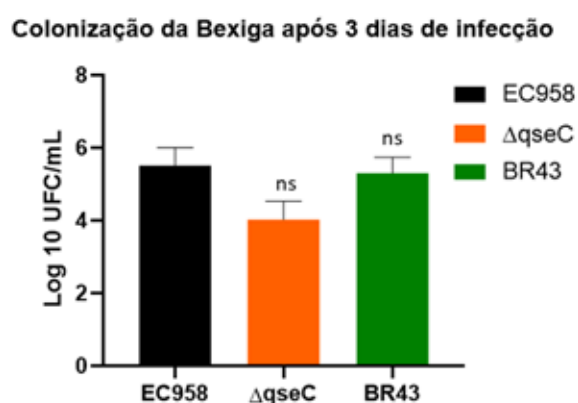
Figura 13 – Os dados demonstram que a presença de DHMA durante o processo de crescimento interfere diretamente na expressão de genes de virulência como *qseC*, *visP* e *fimH*. Os dados também revelam que há uma diferença de expressão gênica nas diferentes cepas testadas, mesmo que na mesma condição.

4.7. Infecção *in vivo* utilizando C57BL/6

4.7.1. Infecção *in vivo* utilizando C57BL/6 – Dose de infecção 10^8 UFC

Os camundongos foram infectados com 10^8 UFC conforme descrito no material e métodos (Figura 7). Os resultados obtidos demonstraram que a colonização da bexiga foi na ordem de 10^5 - 10^6 UFC/mL (Figura 14), mas os resultados obtidos não caracterizam uma infecção aguda, pois o número de UFCs aqui representados, foram obtidos a partir de um *pool* de 3 animais. Para que seja possível caracterizar uma infecção aguda é necessário recuperar $>10^4$ UFC/mL por órgão, por animal, conforme descrito na literatura (FLORES-MIRELES; WALKER; CAPARON; HULTGREN, 2015; HAGBERG; ENGBERG; FRETER; LAM *et al.*, 1983; HANNAN; MYSOREKAR; HUNG; ISAACSON-SCHMID *et al.*, 2010; O'BRIEN; DORSEY; HANNAN; HULTGREN, 2018).

Figura 14- Colonização da bexiga após 72h de infecção com 10^8 UFC



Fonte: O autor.

Figura 14 – Colonização da bexiga após 72h de infecção, os resultados representam a média da triplicata de 3 órgãos por replicata. Análise estatística por Mann Whitney, ns=não significativo

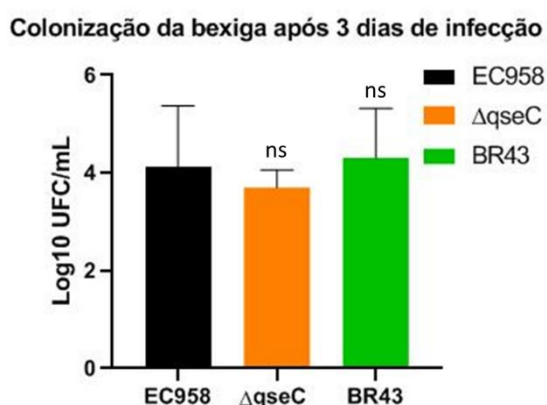
O teste Mann Whitney foi utilizado para a análise estatística dos dados obtidos com a colonização da bexiga, não houve significância estatística para a diferença de colonização entre as cepas analisadas. Embora o mutante $\Delta qseC$ colonize menos a bexiga que a cepa EC958, essa diferença não foi estatisticamente relevante.

4.7.2. Infecção *in vivo* utilizando C57BL/6 – Dose de infecção 10^9 UFC

Para contornar o problema de baixa colonização nos camundongos ($<10^4$ UFC/mL), um segundo experimento foi realizado aumentando a dose infecciosa para 10^9 UFC, conforme metodologia descrita no material e métodos (Figura 8). Os

resultados obtidos demonstraram uma colonização em torno de 10^4 UFC (Figura 15), caracterizando uma infecção aguda (FLORES-MIRELES; WALKER; CAPARON; HULTGREN, 2015; HAGBERG; ENGBERG; FRETER; LAM *et al.*, 1983; HANNAN; MYSOREKAR; HUNG; ISAACSON-SCHMID *et al.*, 2010; O'BRIEN; DORSEY; HANNAN; HULTGREN, 2018).

Figura 15 - Colonização da bexiga após 72h de infecção com 10^9 UFC



Fonte: O autor.

Figura 15 – Colonização da bexiga após 72h de infecção, os resultados representam a média da triplicata de animais. Análise estatística por Mann Whitney, ns=não significativo

Pode-se observar que o mutante $\Delta qseC$ apresentou uma colonização um pouco menor que a cepa EC958, entretanto, a diferença não foi significativa, necessitando de estudos mais aprofundados sobre o papel desempenhado por QseC no processo infeccioso *in vivo* para UPECs.

4.8. Fatores de virulência associados à UPEC

O sistema de aquisição de ferro é um fator de virulência muito importante para UPEC. A análise genômica permitiu a identificação de alguns desses sistemas nos isolados clínicos aqui apresentados. Todos os isolados apresentaram pelo menos um dos 6 genes analisados relacionados ao sistema de aquisição de ferro. A maioria dos isolados apresenta o gene *sit* (81,8% [9/11]), *ent* (72,7% [8/11]), *iro* e *chu* (18,2% [2/11]) Tabela 3. Para aderir as células uroepiteliais e iniciar o processo infeccioso, o UPEC utiliza adesinas fimbriais. Todos os isolados clínicos apresentaram gene *fim* (100% [11/11]), o gene *foc* está presente em 90,9% (10/11) dos isolados e *pap* em 18,2% (2/11). Nenhum dos isolados apresentou o gene *sfa*. Tabela 3. A produção de toxinas é outro fator de

virulência associado à UPEC, neste estudo foram analisados quatro genes relacionados à produção de toxinas. O gene *sat* estava presente em 18,2% (2/11), *vat* em 9,1% (1/11) e *cnf1* não foi identificado nos isolados Tabela 3.

Tabela 3 - Fatores de Virulência associados a UPEC

Categoria/Gene(s)	BR02- DEC	BR03- DEC	BR07- DEC	BR10- DEC	BR12- DEC	BR14- DEC	BR25- DEC	BR29- DEC	BR32- DEC	BR43- DEC	BR64- DEC	UTI89	CFT073	EC958
<i>Sequence Type (ST)</i>	2179	2179	2179	2509	410	1193	641	224	617	131	224	95	73	131
Sistema de Aquisição de Ferro														
<i>ent</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>iro</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>chu</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>sit</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>iutA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>fyuA</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Pili														
<i>fim</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>pap</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>sfa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>foc</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Toxinas														
<i>CNF1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>vat</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>sat</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+

Fonte: O autor.

4.9. Mutantes obtidos pela técnica do Vetor Suicida e seus respectivos complementados

Foram obtidos mutantes para os genes *qseC* e *visP* para a cepa BR43 através da técnica de mutação utilizando vetor suicida. O mutante BR43::*qseC* obtido foi complementado com o plasmídeo pBAD33Gm contendo o gene *qseC*, que foi denominado BR43::*qseC*⁺ (Tabela 4).

Tabela 4 - Cepas, mutantes e complementados obtidos

Cepa ou plasmídeo	Descrição
BR43:: <i>qseC</i>	mutante em <i>qseC</i>
BR43:: <i>visP</i>	mutante em <i>visP</i>
pBAD33Gm+ <i>qseC</i>	plasmídeo contendo <i>qseC</i> e resistência a gentamicina
BR43:: <i>qseC</i> ⁺	mutante em <i>qseC</i> contendo plasmídeo pBAD33Gm+ <i>qseC</i>

Fonte: O autor

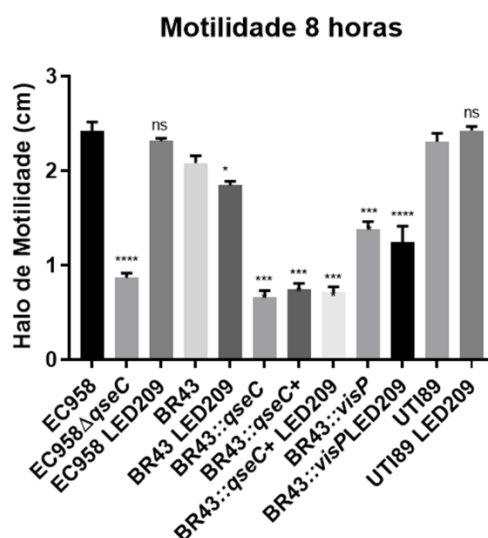
Os mutantes obtidos e seus respectivos complementados foram feitos com o objetivo de estudar as funções desempenhadas por esses genes na patogênese e na virulência das UPECs. Foram utilizados com o objetivo de comparar genotípica e fenotipicamente a influência da ausência do gene *qseC* com as cepas tratadas com o composto LED209 para bloquear o sensor QseC.

4.10. Ensaio de motilidade swimming utilizando LED209

Para avaliar o fenótipo de motilidade das cepas EC958, EC958Δ*qseC*, BR43, BR43::*qseC*, BR43::*qseC*⁺, BR43::*visP* e UTI89, foi realizado o teste de motilidade *Swimming* na ausência e presença de 5nM de LED209. Foi verificado que houve redução no fenótipo de motilidade nas cepas mutantes EC958Δ*qseC* e BR43::*qseC*, entretanto, nas cepas selvagens tratadas com o LED209 com a finalidade de bloquear QseC, não houve redução significativa no fenótipo de motilidade em nenhuma das cepas tratadas em relação a selvagem. A cepa complementada BR43::*qseC*⁺ não recuperou o fenótipo da selvagem, conforme era esperado. O mutante BR43::*visP* apresentou redução no fenótipo de motilidade quando comparada a cepa BR43. Também não foi observada a redução da motilidade na para a cepa UTI89 tratada com LED209 quando comparada a cepa selvagem (Figura 16). O composto LED209 foi desenvolvido com a finalidade de bloquear o sensor QseC(RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008), no entanto, a utilização do composto LED209 da empresa Cayman

Chemical, não apresentou a eficiência esperada para alteração do fenótipo de motilidade, como foi observado para os mutantes de *qseC*. Até o presente momento não há dados na literatura sobre alteração de fenótipo de motilidade em cepas de UPEC tratadas com o composto LED209.

Figura 16 - Ensaio de motilidade swimming com 8 horas de incubação a 37°C



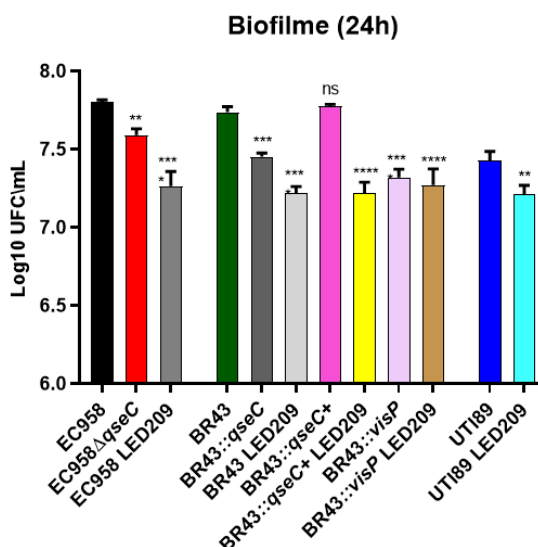
Fonte: O autor.

Figura 16 – Os mutantes no gene *qseC* (por deleção e por interrupção do gene) apresentaram redução no fenótipo de motilidade em comparação a selvagem. O mutante BR43::*qseC*+ complementado não recuperou o fenótipo da cepa selvagem. Todos os grupos tratados com LED209 não apresentaram redução no fenótipo motilidade. Two-way ANOVA com correção de Bonferroni * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$, ns = não significativo.

4.11. Ensaio de formação de biofilme 24h utilizando LED209

O ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica foi realizado de acordo com o descrito por Curtis e colaboradores (CURTIS; RUSSELL; MOREIRA; ADEBESIN *et al.*, 2014a). Foi verificada a redução na formação de biofilme em todos os grupos tratados com o LED209 em comparação aos grupos não tratados (Figura 17). Também foi observada a redução na formação de biofilme nos mutantes EC958Δ*qseC* e BR43::*qseC* em comparação às respectivas selvagens. Para a cepa UT189, foi observada a redução na formação de biofilme na cepa tratada com LED209 conforme já descrito na literatura (CURTIS; RUSSELL; MOREIRA; ADEBESIN *et al.*, 2014b). Os resultados obtidos para a formação de biofilme demonstram que o sensor QseC exerce uma função importante na regulação desse fator de virulência de UPEC, necessitando de estudos mais aprofundados para compreender como esse sensor atua na regulação dessa via.

Figura 17 - Ensaio de formação de Biofilme 24h a 37°C e 5%CO₂.



Fonte: O autor.

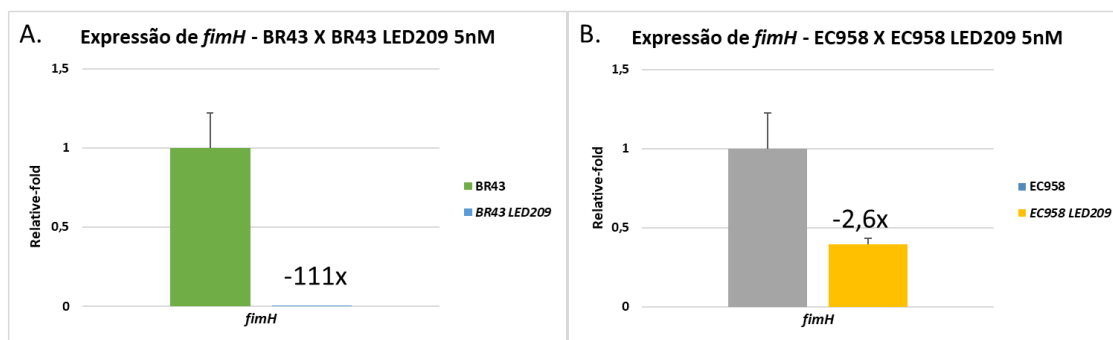
Figura 17 – Ensaio de formação de Biofilme 24h a 37°C e 5%CO₂. Foi verificado que houve redução significativa na formação de biofilme tanto nos mutantes do gene *qseC* quanto na cepas tratadas com o composto LED209. A cepa complementada BR43::*qseC*⁺ apresentou capacidade de formação de biofilme semelhante a selvagem, além da redução na capacidade de formação do mesmo quando tratada com LED209. O LED209 não alterou o fenótipo de formação de biofilme para o mutante BR43::*visP*, em ambos os casos (tratado e não tratado com LED209) o fenótipo foi reduzido em relação a BR43. A cepa UTI89 apresentou redução na formação de biofilme no grupo tratado, semelhante ao já reportado na literatura. Two-way ANOVA com correção de Bonferroni **p<0,05; ***p<0,01; ****p<0,001, ns = não significativo.

4.12. Análise da expressão gênica de *fimH* por qRT-PCR nas cepas EC958, BR43 na presença LED209

Com o objetivo de avaliar a influência do LED209 na expressão *fimH*, gene responsável pela fímbria tipo-1, necessária para adesão a formação de biofilme, foi realizado o experimento de qRT-PCR. Os resultados da análise da expressão gênica demonstraram redução na expressão de *fimH* tanto para a cepa BR43 (redução de 11,1x, Figura 18, Painel A), quanto para EC958 (redução de 2,6x, Figura 18, Painel B), na presença de LED209, conforme pode ser observado na figura 18. A redução na expressão de diversos genes de virulência em cepas tratadas com o composto LED209 vem sendo relatada na literatura para *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* entero-hemorrágica e *Francisella tularensis*(RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008), entretanto, até o momento, o uso do LED209 para UPEC só havia sido reportado em ensaio fenotípico para formação de biofilme(CURTIS; RUSSELL; MOREIRA; ADEBESIN *et al.*, 2014b), sendo os resultados aqui obtidos, promissores para estudos mais detalhados dessa

molécula na atenuação da virulência de patógenos, especialmente MDR, como é o caso da cepa EC958.

Figura 18 - Expressão gênica de *fimH* nas cepas BR43 e EC958 após tratamento com LED209.



Fonte: O autor.

Figura 18 – Expressão gênica de *fimH* nas cepas BR43 e EC958 após tratamento com LED209. A. Foi observado que após tratamento com 5nM de LED209 a cepa BR43 apresentou redução de 11,1x na expressão do gene *fimH*. B. Foi observado que após tratamento com 5nM de LED209 a cepa EC958 apresentou redução de 2,6x na expressão do gene *fimH*. Os resultados de expressão gênica relativa obtidos pela técnica de qRT-PCR foram analisados pelo método de *Comparative Critical threshold* ($\Delta\Delta C_t$).

5. *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.

6. *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.

7. *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.; SCHOBEL, 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 Transurethrally 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.; SCHAALE, 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. Lustri,^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 Lustri 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 Lustril,^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 Lustril 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