RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 10/11/2025.

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

O sensor quinase QseC e a sua função em isolados clínicos de *Escherichia coli* Uropatogênica ST131

Araraquara - SP
2023

BRUNA CARDINALI LUSTRI

O sensor quinase QseC e a sua função em isolados clínicos de *Escherichia coli* Uropatogênica ST131

Tese 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 requisito para a defesa do título de Doutora em Ciência.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira.
Co-orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara - SP
2023

Lustri, Bruna Cardinali.
L972s O sensor quinase QseC e a sua função em isolados clínicos de *Escherichia coli* Uropatugênica ST131 / Bruna Cardinali Lustri. – Araraquara, 2023.
85 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Cristiano Gallina Moreira.
Coorientador: Marlus Chorilli.

1. *Escherichia coli* uropatogênica. 2. Sinalização química. 3. Virulência. 4. ST131. 5. *Galleria mellonella*. I. Moreira, Cristiano Gallina, orient. II. Chorilli, Marlus, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estudo de biomoduladores microencapsulados com atividades antimicrobiana e antivirulência em cepas de Escherichia coli uropatogênica multi-droga resistentes

AUTORA: BRUNA CARDINALI LUSTRI MORGADO
ORIENTADOR: CRISTIANO GALLINA MOREIRA
COORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de conhecimento: Bacteriologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciencias Biologicas / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. ROXANE MARIA FONTES PIAZZA (Participaçao Virtual)
Laboratório de Bacteriologia / Instituto Butantan

Prof. Dr. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES (Participaçao Presencial)
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN (Participaçao Presencial)
Departamento de Ciencias Biologicas / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 10 de novembro de 2023

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 a minha Avó, Dinha, por todo o apoio incondicional que me deu durante todos esses anos.

Dedico aos meus Avós ausentes, Adolpho, Ivani e João por terem feito a diferença com ensinamentos que carrego comigo todos os dias de 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, 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 (*in memoriam*) 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.

À Fapesp (Processos 2019/26696-8) 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.

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, Isa, Lais e Drielle, 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, que mesmo com a distância geográfica, nunca mediu esforços para me auxiliar.

A Isabela, pela amizade, dedicação e por todo o auxílio no desenvolvimento do meu trabalho, compartilhando todos os momentos dessa caminhada.

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.

A todos, meu muito obrigada!

"A alegria que se tem em pensar e aprender

faz-nos pensar e aprender ainda mais"

(Aristóteles)

RESUMO

A *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC) é o patógeno mais comum em infecções do trato urinário (ITU), responsável por 75% desses casos. Bactérias patogênicas realizam comunicação celular com o ambiente externo que se encontram através sistemas de dois componentes (TCS). O sensor quinase QseC regula a virulência em vários patógenos Gram-negativos, controlando a atividade do regulador de resposta QseB, que impede a transcrição de genes de virulência. Estudos demonstraram que a exclusão de QseC leva a atenuação da virulência de diversos patógenos, incluindo as UPECs. O objetivo do presente trabalho foi estudar através da construção de mutantes de genes de TCS já caracterizados, as alterações das características fenotípicas e genotípicas, além de analisar a patogenicidade em modelo in vivo de *Galleria mellonella.* Os resultados obtidos com a análise da expressão gênica em cepas mutantes em *qseC* demonstraram aumento de 6x na expressão do gene *fimH* na cepa EC958Δ*qseC* em relação a linhagem parental. A mesma mutação levou a redução na formação de biofilme em superfície abiótica para as cepas EC958Δ*qseC* e BR43::*qseC* em relação as respectivas cepas não mutadas, e redução na capacidade de ligação em receptores de manose, evidenciados no ensaio de aglutinação em levedura. Na presença de metil-α-D-manopiranosídeo, um análogo da manose, houve redução da capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica para todas as cepas testadas e seus respectivos mutantes *qseC*. Entretanto, a ausência de *qseC* não foi capaz de afetar significativamente a capacidade de adesão e invasão das cepas de UPEC em células T24. Em ensaio in vivo com *G. mellonella,* houve atenuação da virulência dos mutantes em relação a linhagem parental. Com os resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que, embora pertencentes ao mesmo *Sequence type,* as cepas de UPEC apresentam características distintas, que não permitem estabelecer um padrão fenotípico para as cepas de UPEC ST131. Com relação ao ensaio in vivo em *G. mellonella*, os mutantes apresentaram atenuação da virulência no modelo estudado, o que abre perspectiva para continuidade de estudos de biomoduladores de QseC para aplicação terapêutica.

Palavras-chave: *Escherichia coli* uropatogênica; sinalização química; virulência; ST131; *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the most common pathogen in urinary tract infections (UTI), responsible for 75% of these cases. Pathogenic bacteria carry out cellular communication with the external environment through two-component systems (TCS). The sensor kinase QseC regulates virulence in several Gram-negative pathogens by controlling the activity of the response regulator QseB, responsible to virulence transcription gene activation. Studies have demonstrated that deletion of QseC leads to attenuation of the virulence of several pathogens, including UPECs. The aim of this work was study, through the construction of mutants of TCS genes already characterized, the changes in the phenotypic and genotypic characteristics of these pathogens, and analyze the pathogenicity in *Galleria mellonella* in vivo model. The results obtained with the analysis of gene expression in *qseC* mutant strains demonstrated an increase of 6-fold in the expression of the *fimH* gene in the EC958Δ*qseC* strain in relation to the parental strain. The same mutation led to a reduction in biofilm formation on the abiotic surface in all *qseC* mutants in relation to the respective non-mutated strains, and decrease the ability bind to mannose receptors, showed in yeast agglutination assay. In the presence of metil-α-D-mannopyranoside, a mannose analogue, there was a reduction in the ability to form biofilm on an abiotic surface for all tested strains and their respective *qseC* mutants. Although, the same mutation was not able to significantly affect the adhesion and invasion capacity of UPEC strains in T24 cells. Studies in vivo with *G. mellonella* showed in *qseC* mutant lower virulence than wildtype. The conclusion obtained in this study reveal that, although belonging to the same *Sequence type,* the UPEC strains present distinct phenotypic characteristics. Regarding the in vivo assay, the *qseC* mutant showed attenuation of virulence in *G. mellonella* model, that promotes perspectives to study new molecules with actuate such as biomodulator of QseC to clinical therapy applications.

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli*; chemical signaling; virulence; mannose; *Galleria mellonella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização genética do cluster de genes da fímbria tipo 1 14

Figura 2 - Esquema representativo de Sistema de Dois-Componentes.....22

Figura 3 - TCS QseBC 24

Figura 4 – Larvas de Galleria mellonella 26

Figura 5 – Representação esquemática das etapas do trabalho 28

Figura 6 - Vetor suicida pJP5603 31

Figura 7 – Vetor plasmidial pBAD33-Gm 32

Figura 8 – Motilidade Swimming 39

Figura 9 – Motilidade Twitching.....40

Figura 10 – Ensaio de resistência ao soro 44

Figura 11 - Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica das cepas ST131 e seus respectivos mutantes e complementados.....45

Figura 12- Expressão de fimH nas cepas mutantes em qseC 47

Figura 13 – Imunoblot α-T1P das cepas EC958 e EC958ΔqseC 49

Figura 14– Motilidade Swimming 24 horas 50

Figura 15 – Percentual de sobrevivência das larvas de G. mellonella 51

Figura 16 – Biofilme 24h em superfície abiótica em diferentes concentrações de αMM 52

Figura 17– Ensaio de adesão e invasão em células T24 53

Figura 18 – Ensaio de adesão e invasão em células T24 na presença de 100mM de metil-α-d-manopiranosídeo 55

Figura 19 – Análise da produção de filamentos curli por coloração de Congo Red ..57

Figura 20 – Expressão gênica de csgB.....59

Figura 21 – Motilidade twitching 61

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

*α*MM	metil-*α*-D-manopiranosídeo molécula análoga a manose
Δ*qseC*	Mutante *knockout* do gene *qseC*
::qseC	Mutante por interrupção do gene *qseC*
::qseC+	Mutante por interrupção do gene *qseC* complementado por construção plasmidial contendo o fene *qseC*
AE	Lesão tipo "pedestal" causada pela EHEC no enterócito – do inglês "***a**ttaching-**e**ffacing*"
AI-3	molécula sinalizadora química produzida por bactérias – do inglês "***a**uto**i**ndutor-**3***"
Amp	ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bla_{KPC-2}	Carbapenemase KPC-2
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
CIP	ciprofloxacino
DO550nm	Densidade óptica 550nm
DO600nm	Densidade óptica 600nm
E. coli	*Escherichia coli*
EHEC	*Escherichia coli* enteroemorrágica
EPEC	*Escherichia coli* enteropatogênica
Epi	Epinefrina
ESBL	Betalactamase de Espectro Estendido
EspA	proteína codificada pela Ilha de Patogenicidade LEE de EHEC
EspB	proteína codificada pela Ilha de Patogenicidade LEE de EHEC
FeaB	enzima aldeído desidrogenase aromática, participa do processo de metabolização da Ne em DHMA
fimH	gene que codifica fimbria tipo-1
FliC	gene que codifica o filamento do flagelo
Gm	gentamicina
IBC	comunidade bacteriana intracelular – do inglês "***I**ntracellular **B**acterial **C**ommunities*"
ITU	infecção do trato urinário

iutA	receptor de aerobactina
Km	Canamicina
LEE	Ilha de Patogenicidade de EHEC – do inglês "***L**ocus **E**nterocyte **E**ffacement*"
Lev	levofloxacino
malX	marcador de ilha de patogenicidade
MDR	multidroga resistente
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 *polymerase chain reaction* quantitative *real time*"
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
qseC	gene da proteína sensora de membrana interna
RR	regulador de resposta
sat	toxina autotransportadora secretada
SESA-SP	Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo
TCS	Sistema de dois Componentes – do inglês "***t**wo-**c**omponents **s**ystem*"
Tet	tetraciclina
TGI	Trato Gastrintestinal
TU	Trato Urinário
TynA	enzima tiramina oxidase periplasmática, participa do processo de metabolização da Ne em DHMA
UPEC	*Escherichia coli* Uropatogênica
usp	proteína específica da uropatogenia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

1.1. *Escherichia coli* uropatogênica 13

1.2. Principais fatores de virulência de UPEC 14

1.2.1. Adesinas 14

1.2.2. Toxinas 17

1.2.3. Sistema de aquisição de ferro 17

1.2.4. Mecanismos de evasão imune 18

1.3. UPECS ST131 18

1.4. Bactérias MDR e a necessidade do desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas 20

1.5. Sistemas de 2-Componentes (TCS) 22

1.5.1. TCS QseBC como alvo terapêutico 23

1.6. *Galleria mellonella* como modelo alternativo in vitro 25

2. HIPÓTESE 27

3. OBJETIVOS 27

3.1. Objetivos gerais 27

3.2. Objetivos específicos 27

4. ORGANOGRAMA DO TRABALHO 28

5. METODOLOGIA 28

5.1. Cultivo e armazenamento das cepas bacterianas 28

5.2. Seleção das cepas bacterianas para obtenção dos mutantes 31

5.3. Construção de mutante de *qseC* nas cepas de UPEC ST131 produtoras de KPC-2 35

5.4. Análise de genes de virulência 35

5.5. Ensaio de resistência sérica 35

5.6. Análise de Curli por coloração por *Congo Red* 36

5.7. Análise da expressão gênica por qRT-PCR 36

5.8. Análise de perfil proteico..... 38

5.9. Aglutinação de células de levedura 39

5.10. Ensaio de motilidade *Swimming* 39

5.11. Ensaio de motilidade *Twitching* 39

5.12. Ensaio *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*..... 40

5.13. Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica..... 41

5.14. Ensaio de adesão e invasão em células T24..... 41

5.13.1 Adesão 41

5.13.2. Invasão..... 41

5.15. Análise dos resultados..... 42

6. RESULTADOS 42

6.1. Obtenção de mutantes *qseC* utilizando a técnica do vetor suicida..... 42

6.2. Análise de genes de virulência 43

6.3. A ausência do sensor quinase QseC não afeta a capacidade de resistência ao soro (sistema complemento) de cepas de UPECs ST131 44

6.4. A ausência do sensor quinase QseC afeta a capacidade de formação de biofilme de cepas de UPEC ST131 44

6.5. A expressão de *fimH* é variada nos mutantes das linhagens ST131..... 45

6.6. A mutação em *qseC* não afeta a produção de fimbria tipo-1 na cepa EC958Δ*qseC*..... 49

6.7. Cepas de UPEC ST131 apresentam diferentes fenótipos de motilidade *swimming* 49

6.8. Características da infecção por UPEC ST131 em modelo de *Galleria mellonella* 50

6.9. A mutação em *qseC* afeta a capacidade de ligação em receptores de D-manose e reduzem a capacidade de formação e biofilme 51

6.10. A mutação em *qseC* não afetou significativamente a capacidade de adesão e invasão de células T24..... 52

6.11. A presença de 100mM de metil-α-d-manopiranosídeo (αMM) afetou a capacidade de adesão em células T24 54

6.12. A produção de filamentos curli é diferente nas cepas de UPEC ST131 57

6.13. A Mutação em *qseC* altera a expressão de *csgB* nas cepas de UPEC ST131 58

6.14. Cepas de UPEC ST131 não apresentam fenótipo de motilidade *Twitching* 61

7. DISCUSSÃO..... 62

8. CONCLUSÃO 67

REFERÊNCIAS..... 68

1. INTRODUÇÃO

1.1. Escherichia coli uropatogênica

As infecções do trato urinário (ITU), são as infecções mais comuns na prática clínica em todo o mundo, e estima-se cerca de 400 milhões de casos e 230.000 óbitos no mundo em 2019. Nos Estados Unidos os custos sociais com o tratamento de ITU chegaram a US$3,5 bilhões em 2015 (FLORES-MIRELES; WALKER; CAPARON; HULTGREN, 2015), no Brasil, o estado de São Paulo registrou no ano de 2014, 94 internações diárias de pacientes apresentando ITU (SESA-SP, 2015), sendo que cerca de 35-45% dos casos de ITU evoluíram para casos de Insuficiência Renal Aguda (IRA), gerando altos custos para o SUS (Sistema Único de Saúde) (BRASIL, 2017). As ITU são mais frequentes no sexo feminino, cerca de 50% das mulheres já tiveram ou terão pelo menos um caso de infecção urinária na vida, sendo a recorrência de casos comum (FOXMAN; BROWN, 2003).

A *Escherichia coli* o agente etiológico mais comum em casos de ITU (ANDERSEN; KHANDIGE; MADELUNG; BREWER *et al.*, 2012; MARTINEZ; MULVEY; SCHILLING; PINKNER *et al.*, 2000), também é o 7º patógeno mais frequente em infecções nosocomiais, apresentando resistência cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, carbapenemas e colistinas (BRASIL, 2017). As *E. coli* Uropatogênicas (UPECs) fazem parte do grupo das *E. coli* extraintestinais (ExPEC), sendo classificadas de acordo com o sítio em que são isoladas, possuem diferentes fatores de virulência que promovem vantagens no estabelecimento de infecções extraintestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MANGES; GEUM; GUO; EDENS *et al.*, 2019; WHELAN; LUCEY; FINN, 2023).

O processo infeccioso pode ocorrer de duas maneiras, por via descendente ou por via ascendente. A via descendente é mais rara, e está associada infecções sistêmicas, em que, o indivíduo com um quadro de bacteremia, têm os rins colonizados pelas bactérias que estão na corrente sanguínea, e posteriormente essas bactérias migram através dos ureteres para a bexiga e a colonizam. Já a via ascendente é a mais comum, nessa via, as bactérias entram através da uretra até a bexiga, onde aderem ao uroepitélio, colonizam, invadem as células uroepiteliais causando lesões esfoliativas, multiplicam-se formando as chamadas comunidades bacterianas intracelulares (IBC, do inglês *Intracellular Bacterial Communities*), migram através dos ureteres até os rins, onde causam danos glomerulares pela liberação de

toxinas, uma vez nos rins, as *E coli* são capazes de cruzar a barreira de células tubulares epiteliais e iniciar o quadro de bacteremia (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Para ocasionar todo o processo infeccioso em ambiente extraintestinal, as UPECs contam com um arsenal de fatores de virulência que permitem a patogênese.

1.2. Principais fatores de virulência de UPEC

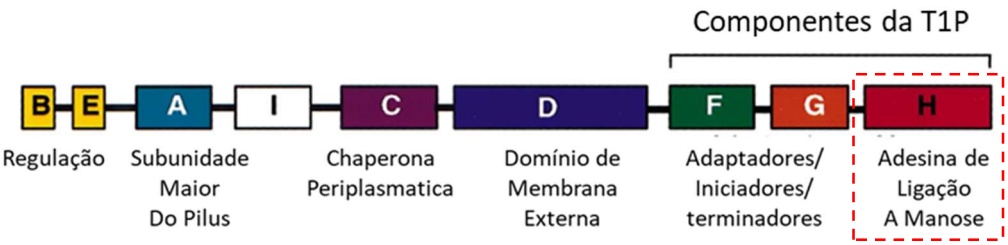
No início da patogênese, a UPEC precisa vencer vários obstáculos para estabelecer o processo infeccioso, como por exemplo, a força mecânica do fluxo urinário, presença de substâncias antimicrobianas produzidas e secretadas pelas células uroepiteliais e presença de neutrófilos, dessa forma, uma adesão firme e irreversível é essencial para o estabelecimento da infecção, seguido da invasão e multiplicação nas células do hospedeiro (JUSTICE; HUNG; THERIOT; FLETCHER *et al.*, 2004).

1.2.1. Adesinas

A capacidade das bactérias em aderir aos tecidos do hospedeiro é pré-requisito para o desenvolvimento da infecção. As bactérias podem aderir às células do hospedeiro através das adesinas, podendo ser essas fimbriais ou afimbriais. As fímbrias são estruturas complexas agrupadas por *clusters* gênicos que codificam as subunidades fimbriais, maquinaria de montagem e secreção (TOTSIKA; BEATSON; SARKAR; PHAN *et al.*, 2011; WELCH; BURLAND; III; REDFORD *et al.*, 2002).

As fímbrias do tipo 1 são encontradas na maioria das espécies de *Enterobacteriaceae* (KJAERGAARD; SCHEMBRI; RAMOS; MOLIN *et al.*, 2000). São manose-específicas e exercem suas propriedades adesivas via adesina FimH, uma proteína menor, localizada na extremidade da estrutura da fimbria (Figura 1).

Figura 1 - Organização genética do cluster de genes da fímbria tipo 1



Fonte: Adaptado de Shilling et al. 2001

Fig. 1 - Organização genética do cluster de genes da fímbria tipo 1. O retângulo pontilhado indica a região da adesina de ligação a manose da fímbria tipo-1.

A adesina FimH reconhece glicoproteínas contendo manose, como por exemplo a uroplaquina, presente nas células uroepiteliais, permitindo a adesão, invasão e colonização do urotélio, além de ser de extrema importância para a formação de estruturas semelhantes a biofilme, denominadas IBCs, exercendo função crucial na colonização bacteriana (SCHEMBRI; BLOM; KROGFELT; KLEMM, 2005). Embora a distribuição genética e a expressão gênica de fimbria tipo 1 em patógenos e cepas comensais intestinais sejam semelhantes às observadas em UPECs in vitro, há diferenças no processo de regulação da expressão de fímbrias tipo 1 que influenciam na virulência bacteriana no trato urinário (JOHNSON; KUSKOWSKI; O'BRYAN; COLODNER *et al.*, 2005; SCHWAN, 2011; SUBASHCHANDRABOSE, 2015). Enquanto a fímbria tipo 1 reconhece receptores manosilados, PapG, adesina das fímbrias P, se liga a glicolipídios contendo Galα1-4Gal na membrana da célula do hospedeiro, e estão classicamente associadas a quadros infecciosos de pielonefrite (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

Outro importante fator de virulência de UPEC são os filamentos amiloidais Curli. São um componente chave na formação da matriz extracelular da formação de biofilme de UPEC (FLOYD; MOORE; EBERLY; GOOD *et al.*, 2015; HADJIFRANGISKOU; GU; PINKNER; KOSTAKIOTI *et al.*, 2012). A produção de Curli ocorre a partir do sistema de secreção do tipo VIII, também conhecida como via de nucleação-precipitação (CHAPMAN; ROBINSON; PINKNER; ROTH *et al.*, 2002) O controle da biossíntese de curli é estreitamente coordenado por um complexo sistema de sinalização rede que envolve CsgD e diversos outros reguladores, e requer a expressão de sete genes de dois operons distintos (*csgBAC* e *csgDEFG*) (CHAPMAN; ROBINSON; PINKNER; ROTH *et al.*, 2002; HAMMAR; ARNQVIST; BIAN; OLSÉN *et al.*, 1995). O operon *csgBAC* codifica a proteína da subunidade principal de curli CsgA, a proteína nucleadora curli CsgB e a chaperona periplasmática CsgC. O operon *csgDEFG* codifica o regulador transcricional CsgD, que controla a transcrição dos genes de curli, CsgG é o poro de secreção da membrana externa essencial para a biogênese de curli e, CsgEF são fatores acessórios (CHORELL; ANDERSSON; EVANS; JAIN *et al.*, 2015; GOYAL; KRASTEVA; VAN GERVEN; GUBELLINI *et al.*, 2014; NHU; PHAN; PETERS; LO *et al.*, 2018). Outro fator associado a produção de curli é a temperatura. A maior parte dos estudos disponíveis na literatura sobre a regulação da biossíntese de curli são em cepas de *E. coli* K12 em temperaturas de crescimento abaixo de 30°C, entretanto, para UPEC, o controle genético para a

produção de curli ocorre a 37°C, que corresponde a temperatura corporal média do hospedeiro humano durante o processo infeccioso (HUNG; MARSCHALL; BURNHAM; BYUN *et al.*, 2014; KAI-LARSEN; LÜTHJE; CHROMEK; PETERS *et al.*, 2010; NHU; PHAN; PETERS; LO *et al.*, 2018).

Além da fimbria tipo 1, P e curli, outras adesinas podem estar associadas ao processo de patogênese em UPEC, como por exemplo as adesinas Afa/Dr que promove a adesão difusa das UPECs. Cepas de UPEC Afa/Dr$^+$ apresentam maior tropismo renal e estão amplamente associadas a ITU em gestantes por serem responsivas a progesterona (ALVAREZ-FRAGA; PHAN; GOH; NHU *et al.*, 2022). As fímbrias F1C e S também são amplamente associadas a uropatógenos, mas são menos frequentes que as fímbrias tipo 1 e P. Embora tenha menor contribuição na formação de biofilme em infecções humanas, cepas produtoras que produzem amplamente F1C apresentam deficiência na produção de fímbrias tipo 1 e P (SUBASHCHANDRABOSE, 2015). As fímbrias S se ligam a receptores dos eritrócitos e de células epiteliais tubulares renais, também estão amplamente associadas a quadros de sepse e meningite baseada na afinidade das fimbrias S a proteína da matriz extracelular de laminina (LÜTHJE; BRAUNER, 2014). As fimbrias tipo 3 e F9 apresentam como característica a formação de biofilme in vitro, que apresenta grande relevância em ITU associadas a cateteres vesicais (ONG; ULETT; MABBETT; BEATSON *et al.*, 2008; WURPEL; TOTSIKA; ALLSOPP; HARTLEY-TASSELL *et al.*, 2014).

Além das adesinas fimbriais, outros importantes fatores de adesão de UPEC são as adesinas não fimbriais como Antígeno 43 e proteínas autotransportadas. A adesina Ag3 do antígeno 43 é a proteína autotransportadora adesiva mais bem caracterizada em *E. coli,* apresenta capacidade de autorreconhecimento que leva à autoagregação das células que a expressam, promovendo a formação de biofilme e adesão às células do hospedeiro (CHARBONNEAU; MOUREZ, 2007; SCHEMBRI; KJAERGAARD; KLEMM, 2003; ULETT; WEBB; SCHEMBRI, 2006). Outra proteína autotransportadora com função adesiva, denominada proteína autotransportadora de *E. coli* uropatogênica (Upa). A caracterização fenotípica de UpaE realizada por Battaglioli e colaboradores (2018) revelou que a proteína está exposta na superfície celular e pode facilitar a formação de biofilme e adesão às proteínas da matriz extracelular humana (BATTAGLIOLI; GOH; ATRUKTSANG; SCHWARTZ *et al.*, 2018).

1.2.2. Toxinas

As toxinas produzidas por bactérias têm várias funções que vão desde auxiliar a disseminação do patógeno por rompimento da integridade celular do hospedeiro, obtenção de nutrientes e evasão ao sistema imune (LÜTHJE; BRAUNER, 2014). Como uma das principais toxinas produzidas por patógenos Gram-negativos, podemos citar a endotoxina LPS, constituído pelo lipídio A, localizado na membrana externa, ancorado a um *core* de polissacarídeos e repetidas subunidades de antígeno-O, constitui o maior complexo imunogênico do patógeno (WANG; QUINN, 2010).

A α-hemolisina (HlyA) é uma toxina secretada e formadora de poros, sendo citotóxica a eritrócitos, vários tipos de células nucleadas, incluindo as células imunológicas, endoteliais e epiteliais do trato urinário, conferindo resistência parcial ao soro e resposta imune do hospedeiro (SUBASHCHANDRABOSE, 2015), além disso, *hlyA* é regulado positivamente dentro das IBC, o que promove a eficiência da multiplicação bacteriana na bexiga e formação de reservatórios persistentes (LÜTHJE; BRAUNER, 2014). O fator citotóxico necrosante 1 (CNF1) apresenta atividade em Rho GTPase, induzindo ao rearranjo dos filamentos de actina das células do hospedeiro, o que promove a internalização bacteriana nas células uroteliais. A expressão de CNF1 promove uma vantagem no processo de colonização inicial da bexiga.(BERRY; KLUMPP; SCHAEFFER, 2009; DORMANESH; SAFARPOOR DEHKORDI; HOSSEINI; MOMTAZ *et al.*, 2014). Além das toxinas citadas anteriormente, existem as serino-proteases autotransportadas de Enterobacteriaceae, denominadas SPATEs. A família SPATE é composta por três toxinas: Sat (do inglês, *secreted autotransporter protein*) (GUYER; HENDERSON; NATARO; MOBLEY, 2000), Pic (do inglês, *protease involved in colonization*) e Vat (do inglês, *vacuolating autotransporter toxin*) (HEIMER; RASKO; LOCKATELL; JOHNSON *et al.*, 2004), sendo essas toxinas amplamente encotradas em cepas isoladas de casos de pielonefrite (GUYER; HENDERSON; NATARO; MOBLEY, 2000).

1.2.3. Sistema de aquisição de ferro

A disponibilidade de ferro no trato urinário é extremamente restrita, por esse motivo, os sistemas de aquisição de ferro são de suma importância para a sobrevivência das UPECs nesse ambiente (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Dentre os sistemas de aquisição de ferro, podemos citar os receptores heme ChuA e Hma, que são receptores de membrana externa que se ligam a subunidade heme após a lise dos eritrócitos, capturam o ferro no periplasma e posteriormente o transporta para o citosol, são regulados positivamente em *E.coli* durante a replicação intracelular nas IBCs no epitélio da bexiga (HAGAN; MOBLEY, 2009). Outro sistema de captação de ferro são os sideróforos. No contexto de infecção, quatro sistemas de sideróforos são investigados em UPECs, são eles a enterobactina (FebA), salmoquelina (IroN), aerobactina (IutA) e yersiniabactina (FyuA) (GARCIA; BRUMBAUGH; MOBLEY, 2011). Os sistemas de aquisição de ferro possuem importância para a persistência de UPEC no trato urinário, esse fato foi observado por Ejrnaes e colaboradores (2011), as cepas que apresentavam maior persistência em comparação aquelas de infecções esporádicas, apresentavam os genes de sideróforos altamente conservados (EJRNÆS; STEGGER; REISNER; FERRY *et al.*, 2011).

1.2.4. Mecanismos de evasão imune

Após o estabelecimento da infecção, o sistema imune do hospedeiro desencadeia uma série de respostas imunológicas contra o agente invasor. Como estratégias para evasão ao sistema imune do hospedeiro, as UPECs utilizam do arsenal de fatores de virulência que permitem a formação das IBCs, produção de cápsula ou ainda a formação de biofilme. A cápsula é formada por exopolissacarídeo que envolve a bactéria, impedindo a resposta imune ao LPS, além de promover a formação sólida das IBCs, dando uma melhor resistência ao ataque de neutrófilos (SARKAR; ULETT; TOTSIKA; PHAN *et al.*, 2014). Já a formação de biofilme promove uma proteção contra condições adversas do ambiente (BENGTSSON-PALME; KRISTIANSSON; LARSSON, 2018; FUX; COSTERTON; STEWART; STOODLEY, 2005). Todos esses fatores associados a virulência e desempenho de sobrevivência exercem papel fundamental para o sucesso da infecção (LÜTHJE; BRAUNER, 2014).

1.3. UPECS ST131

As *E. coli* ST131 são reconhecidas como um dos principais patógenos causadores de ITU e de corrente sanguínea em casos de infecções nosocomiais e de comunidade. Os clones ST131 são comumente identificados entre os demais por produzirem betalactamase de espectro estendido (ESBL) tipo CTX-M-15, sendo a maior linhagem subclonal de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas (FORDE; BEN

ZAKOUR; STANTON-COOK; PHAN *et al.*, 2014; LAU; REDDY; CHEESBROUGH; BOLTON *et al.*, 2008; NICOLAS-CHANOINE; BLANCO; LEFLON-GUIBOUT; DEMARTY *et al.*, 2008).

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

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

Evidências clínicas sugerem que os clones ST131 constituem o grupo mais virulento das UPECs (JOHNSON; ANDERSON; CLABOTS; JOHNSTON *et al.*, 2010). Estudos clínicos reportaram transferência intrafamiliar de cepas ST131, em um deles, uma menina de 8 meses de idade desenvolveu artrite séptica grave e osteomielite, a

mesma cepa foi isolada da mãe e do pai da menina (JOHNSON; ANDERSON; CLABOTS; JOHNSTON *et al.*, 2010). Já, o segundo estudo, um homem de 68 anos foi internado com pielonefrite grave e múltiplos abcessos, 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).

1.4. Bactérias MDR e a necessidade do desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas

A descoberta da penicilina em 1928, por Alexander Fleming, foi o marco histórico da era dos antibacterianos, que desencadeou o estudo e obtenção de novos agentes antibacterianos que foram responsáveis pela redução da mortalidade de indivíduos acometidos por infecções bacterianas (NIKAIDO, 2009). Entretanto, o uso não-racional e indiscriminado desses agentes no tratamento de infecções bacterianas levou a seleção de bactérias capazes de sobreviver a exposição a diferentes classes, denominadas multidroga resistentes (MDR). 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).

Em 2017, 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, incluindo *Mycobacterium* e bactérias Gram-negativas MDR, como *Acinetobacter baumannii, Psedomonas aeruginosa* e várias espécies da família Enterobacteriaceae, resistentes a carbapenêmicos e cefalosporinas de 3ª

geração, como *Klebsiella pneumoniae, E. coli, Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp. que compõem uma ameaça 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). A OMS, em 2018, ressaltou, novamente, o problema mundial sobre a resistência bacteriana a antimicrobianos, chamando a atenção para o risco de morte de pacientes acometidos por infecções causadas por bactérias MDR, destacando as infecções do trato urinário causadas por *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas, como um problema mundial, pois em mais da metade dos casos, a terapia antimicrobiana é inefetiva (WHO | Antimicrobial resistance, 2016). A persistência de órgãos de saúde mundial, como a OMS e a Organização das Nações Unidas (ONU) no tema sobre resistência bacteriana a antimicrobianos vem se repetindo anualmente (WHO | Antimicrobial resistance, 2016; WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017; WHO, 2017).

Em abril de 2019, a ONU publicou um alerta sobre a necessidade de estudo e desenvolvimento de novos antibacterianos capazes de combater as infecções causadas por bactérias MDR, destacando, novamente, a problemática envolvendo as infecções do trato urinário causadas por esses tipos de bactérias sendo cada vez mais comuns. Nesse mesmo alerta, a ONU recomendou priorizar planos de ação nacionais para ampliar os esforços de financiamento e capacitação de pessoas para o controle da disseminação de bactérias; implantação de sistemas regulatórios mais fortes que visam apoiar programas de conscientização para o uso responsável e prudente de antimicrobianos por profissionais em saúde humana, animal e vegetal; urgentemente eliminar o uso de antimicrobianos criticamente importantes como promotores de crescimento na agricultura, além de ressaltar a necessidade de investir em pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias para combater a resistência antimicrobiana.

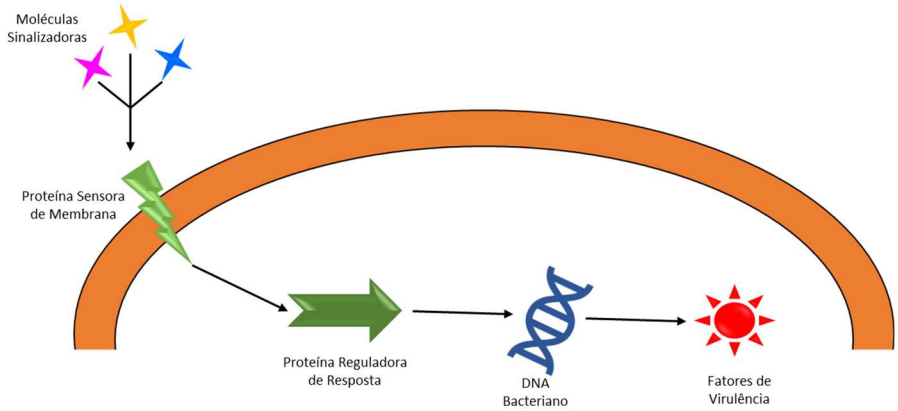
Desde 2017, no mundo, foram aprovados apenas 12 novos medicamentos antibacterianos, mas apenas um, o vaborbactam, é pertencente a uma nova classe de antibacterianos. Para estudos clínicos, havia um total de 76 agentes antimicrobianos em desenvolvimento, mas desses, poucos apresentavam diferenças significativas das classes já existentes no mercado e foram desenvolvidos para o tratamento de infecções pelos patógenos de prioridade crítica (BUTLER; GIGANTE; SATI; PAULIN *et al.*, 2022). O estudo e descoberta de novos antibacterianos ativos

contra bactérias MDR é um grande desafio a comunidade científica, pois são necessárias que as características físico-químicas, farmacocinéticas, farmacodinâmicas e os perfis de toxicidade sejam adequadas e biocompatíveis. Além disso, outro grande desafio a ser superado é a captação de recursos financeiros para financiamento a longo prazo de pesquisas em biotecnologia para o desenvolvimento desses novos candidatos para tratamento de infecções causadas por esses tipos de bactérias (CLANCY; NGUYEN, 2020; DHEMAN; MAHONEY; COX; FARLEY *et al.*, 2020; RAHMAN; LINDAHL; MOREL; HOLLIS, 2021; REX; OUTTERSON, 2020).

1.5. Sistemas de 2-Componentes (TCS)

Os Sistemas de Dois componentes (*Two-Component Systems, TCS*) são um mecanismo regulatório importante que permite que a bactéria identifique alterações no microambiente em que se encontra. Em geral, é composto por uma proteína sensora e outra reguladora de resposta, que na presença de moléculas que atuam como sinalizadoras, elevam a ativação da transcrição de genes de virulência aumentando a capacidade do microrganismo em resistir a condições adversas. Podem ser citados como exemplo de sinalizadores a epinefrina, norepinefrina e auto indutor-3, alteração na concentração de íons (Mg^{2+}, Fe^{2+} etc.), presença de peptídeos antimicrobianos catiônicos (polimixina B), entre outros (Figura 2) (GROISMAN, 2016; SONCINI; GROISMAN, 1996; TIERNEY; RATHER, 2019; VESCOVI; SONCINI; GROISMAN, 1996; WOSTEN; KOX; CHAMNONGPOL; SONCINI *et al.*, 2000).

Figura 2 - Esquema representativo de Sistema de Dois-Componentes



Fonte: O autor.

Fig. 2 - Esquema representativo de Sistema de Dois-Componentes. A proteína sensora de membrana, na presença de moléculas que atuam como sinalizadoras, ativa a proteína reguladora de resposta, que leva a ativação da transcrição de genes de virulência aumentando a capacidade do microrganismo em resistir a condições adversas.

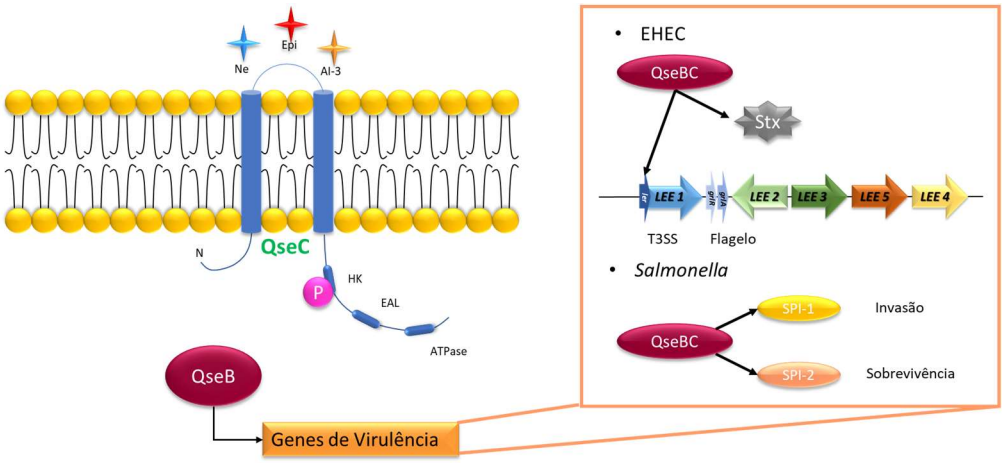
Os TCSs são capazes de responder diretamente a presença de antimicrobianos, que podem atuar como agentes estressores, produzindo um fenótipo resistente. Os mecanismos de resistência a antimicrobianos associados a TCSs podem ser divididos em quatro categorias, conforme revisão de Tierney e Rather (2019): modificação da superfície celular, diminuição do influxo ou aumento do efluxo de drogas, regulação positiva de enzimas degradantes de antibióticos e formas alternativas de resistência a antibióticos, incluindo produção de biofilme e resistência induzida por resposta ao estresse (TIERNEY; RATHER, 2019).

Por consequência do aumento do número de patógenos multidroga-resistentes (MDR) e a associação desses mecanismos estarem envolvidos com TCS, nos últimos anos, diversas pesquisas estão sendo realizadas visando a identificação de drogas que atuem nesses sistemas a fim de driblar a resistência de patógenos às terapias clínicas já existentes (HIRAKAWA; KURUSHIMA; HASHIMOTO; TOMITA, 2020; TIERNEY; RATHER, 2019).

1.5.1. TCS QseBC como alvo terapêutico

O TCS QseBC, foi previamente reportado em cepas de *E. coli* enterrohemorrágica (EHEC) (CLARKE; HUGHES; ZHU; BOEDEKER *et al.*, 2006; SPERANDIO; MELLIES; NGUYEN; SHIN *et al.*, 1999), *Salmonella entérica* sorovariedade 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 (Figura 3). Foram reportados aproximadamente 25 homólogos de QseC em importantes patógenos humanos e vegetais (RASKO; ROSOVITZ; MYERS; MONGODIN *et al.*, 2008) .

Figura 3 - TCS QseBC



Fonte: O autor

Fig. 3 – TCS QseBC - A proteína sensora de membrana QseC sofre auto-fosforilação na presença de norepinefrina (Ne) epinefrina (Epi) e auto indutor-3, moléculas essas que atuam como sinalizadoras, posteriormente transfere o grupamento fosfato ($-PO_4^-$) à proteína reguladora de resposta, que leva a ativação da transcrição de genes de virulência aumentando a capacidade do microrganismo em resistir a condições adversas. Sendo reportado, em EHEC, como responsável pela ativação da ilha de patogenicidade LEE e produção de Toxina de *Shiga* e, em *Salmonella* como ativadora das ilhas de patogenicidade SPI-1 e SPI-2, responsáveis respectivamente pela capacidade de invasão e sobrevivência intracelular.

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 como 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*. Em EHEC, foi observado que, na presença de 5pM de LED209, houve inibição da transcrição de genes de virulência, por inibição da secreção das proteínas EspA e EspB, que codificam a ilha de patogenicidade LEE (*Locus Enterocyte* Effacement) as quais 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.*

Em *S.* Typhimurium foi observada uma deficiência na capacidade de colonização do trato gastrintestinal (GI) e a infecção sistêmica foi atenuada, em modelos de camundongos, demonstrando que o LED209 foi capaz de inibir, *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 promoveu a redução da expressão de genes de virulência, incluindo *qseC,* e a atenuação de processos infecciosos (CURTIS; RUSSELL; MOREIRA; ADEBESIN *et al.*, 2014; RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008).

Em estudo recente realizado pelo nosso grupo, foi demonstrada a efetividade do LED209 na redução da formação de biofilme em superfície abiótica nas cepas protótipo e isolados clínicos de UPEC MDR. Nesse mesmo estudo também foi observada a redução na expressão dos genes de virulência responsáveis pela patogênese dessas cepas (dados não publicados), ressaltando a importância de estudos relacionados à descoberta de novos alvos para ação de moléculas visando o combate a infecções causadas por bactérias MDR.

O LED209 é uma molécula altamente hidrofóbica, o que dificulta a realização de estudos *in vivo* pelo fato de apresentar solubilidade apenas em solventes tóxicos. Em 2008, Rasko e colaboradores utilizaram um veículo contendo 5% DMSO (dimetilsulfóxido), 23% PEG400, 70% bicarbonato de sódio pH9 e 2% tween 80 para administração via oral do LED209 em camundongos (RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008). O DMSO, um solvente orgânico, é reportado na literatura como não tóxico em doses até 10% (GALVAO; DAVIS; TILLEY; NORMANDO *et al.*, 2013). Entretanto, em estudo realizado por Verheijen e colaboradores (2019) (VERHEIJEN; LIENHARD; SCHROODERS; CLAYTON *et al.*, 2019), foi verificado em células cardíacas e hepáticas que a concentração de 0,1% de DMSO foi capaz de alterar a expressão gênica dessas células, além de desregular as vias de metilação do DNA. Os autores concluíram que o uso do DMSO deve ser evitado sempre que possível (VERHEIJEN; LIENHARD; SCHROODERS; CLAYTON *et al.*, 2019). Esse estudo ressalta a inviabilidade da utilização do DMSO em formulações para uso enteral e parenteral, demonstrando a importância do desenvolvimento de sistemas de carreamento, como por exemplo lipossomas, contendo LED209 para posteriores estudos *in vivo*.

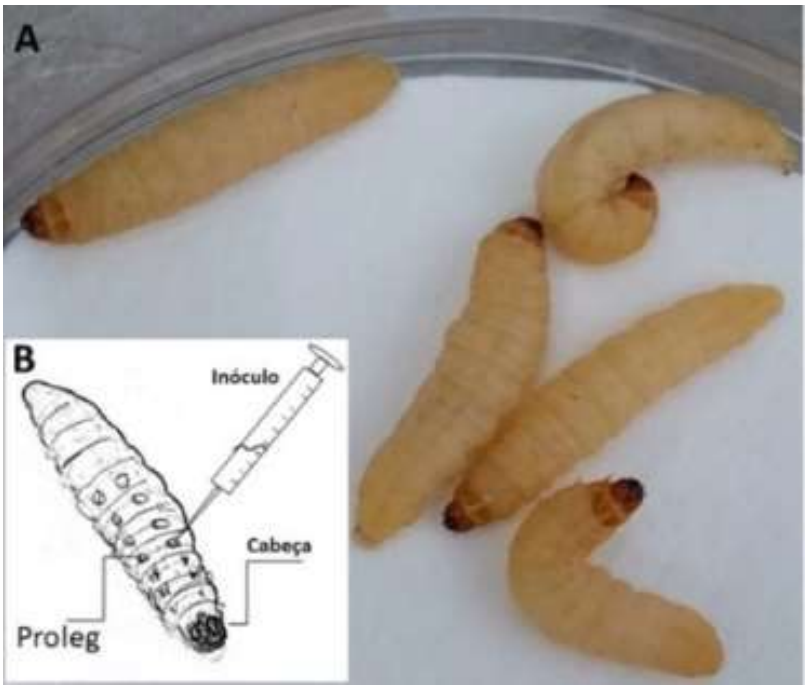
1.6. *Galleria mellonella* como modelo alternativo in vitro

A *Galleria mellonella* (Figura 4), popularmente conhecida como traça do favo de mel, vêm sendo amplamente utilizada como modelo alternativo para estudo de patogenicidade de fungos e bactérias, como por exemplo, estudos envolvendo *Cryptococcus neoformans* (MYLONAKIS; MORENO; EL KHOURY; IDNURM *et al.*, 2005), *Escherichia coli* Enteropatogênica (LEUKO; RAIVIO, 2012), *Klebsiella*

pneumoniae (WAND; MCCOWEN; NUGENT; SUTTON, 2013b)*, Burkholderia pseudomallei, Burkholderia thailandensis* e *Burkholderia oklahomensis* (WAND; MULLER; TITBALL; MICHELL, 2011), *Listeria* (MUKHERJEE; ALTINCICEK; HAIN; DOMANN *et al.*, 2010), *Streptococcus* (OLSEN; WATKINS; CANTU; BERES *et al.*, 2011) e UPEC (ALGHORIBI; GIBREEL; DODGSON; BEATSON *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram uma forte correlação positiva entre a infecção de camundongos e *G. mellonella* para perfil de virulência de patógenos (BRENNAN; THOMAS; WHITEWAY; KAVANAGH, 2002; COTTER; DOYLE; KAVANAGH, 2000; JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000), além de resposta imune semelhante a que ocorre em humanos (CHAMPION; COOPER; JAMES; FORD *et al.*, 2009; WAND; MCCOWEN; NUGENT; SUTTON, 2013a; WAND; MULLER; TITBALL; MICHELL, 2011), colocando tal modelo como uma alternativa para investigação *in vivo* da virulência de isolados clínicos.

Figura 4 – Larvas de *Galleria mellonella*



Fonte: Adaptado de (FRANKEL; SCHROEDER, 2019)

Fig.4 – A. Larvas de *G. mellonella.* B. Esquema de inoculação das larvas na proleg.

8. CONCLUSÃO

- A comparação entre mutantes *qseC* e linhagens parentais demonstraram diferença nas características fenotípicas de motilidade e formação de biofilme, sendo essas reduzidas nos mutantes;
- A análise da capacidade de adesão e invasão de mutantes de *qseC* em relação a linhagem parental demonstrou que a mutação não exerce papel fundamental na adesão e invasão de células T24;
- Na comparação entre a presença de genes de virulência e fenótipo das cepas parentais e mutantes *qseC* em ensaios de resistência ao soro (sistema complemento), demonstrou que a mutação em *qseC* não afeta a capacidade de resistência ao soro;
- Estudo da expressão dos genes de virulência *fimH* e *csgB* dos mutantes, comparados às parentais, demonstraram heterogeneidade na expressão, sendo cepa-dependente;
- A capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica e a capacidade de adesão e invasão em células T24 na presença de 100mM de metil-α-D-manopiranosídeo, um análogo a manose, foi reduzida;
- No estudo da virulência das cepas parentais em relação às mutantes em *qseC,* em modelo in vivo de *G. mellonella,* foi observada a atenuação da virulência nos mutantes *qseC* demonstrada pela maior sobrevivência das larvas de *G. mellonella.*

REFERÊNCIAS

ALGHORIBI, M. F.; GIBREEL, T. M.; DODGSON, A. R.; BEATSON, S. A. *et al.* Galleria mellonella Infection Model Demonstrates High Lethality of ST69 and ST127 Uropathogenic E. coli. **PLoS One**, v. 9, n. 7, 2014.

ALVAREZ-FRAGA, L.; PHAN, M.; GOH, K.; NHU, N. *et al.* Differential Afa/Dr Fimbriae Expression in the Multidrug-Resistant Escherichia coli ST131 Clone. **mBio**, 13, n. 1, 2022.

ANDERSEN, T. E.; KHANDIGE, S.; MADELUNG, M.; BREWER, J. *et al.* Escherichia coli Uropathogenesis In Vitro: Invasion, Cellular Escape, and Secondary Infection Analyzed in a Human Bladder Cell Infection Model. **Infection and Immunity**, 80, n. 5, 2012.

ANDERTON, B. T., RC. New methods of analysing for antigens and glycoproteins in complex mixtures. **Immunology today**, 1, n. 6, 1980.

ANG Q, Z. P., CAO Z, WANG Q, FU S, XIE G AND HUANG J. QseC Inhibition as a Novel Antivirulence Strategy for the Prevention of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)-Causing Vibrio parahaemolyticus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10, 2021.

BATTAGLIOLI, E.; GOH, K.; ATRUKTSANG, T.; SCHWARTZ, K. *et al.* Identification and Characterization of a Phase-Variable Element That Regulates the Autotransporter UpaE in Uropathogenic Escherichia coli. **mBio**, 9, n. 4, 2018.

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. **Microbial Pathogenesis**, 44, n. 4, p. 271-278, 2008.

BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Rev**, 42, n. 1, 2018.

BERRY, R. E.; KLUMPP, D. J.; SCHAEFFER, A. J. Urothelial Cultures Support Intracellular Bacterial Community Formation by Uropathogenic Escherichia coli ▿ . **Infection and Immunity**, 77, n. 7, p. 2762-2772, 2009.

BESSAIAH, H.; ANAMALÉ, C.; SUNG, J.; DOZOIS, C. M. What Flips the Switch? Signals and Stress Regulating Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Type 1 Fimbriae (Pili). **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 5, 2022.

BRADLEY, D. E. A function of Pseudomonas aeruginosa PAO polar pili: twitching motility. **Canadian journal of microbiology**, 26, n. 2, 1980.

BRASIL. **Critérios diagnósticos das infecções relacionadas à assistência à saúde**. ANVISA, 2017. Disponível em: https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/criterios-diagnosticos-das-infeccoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude. Acesso em: 12 Maio 2021.

BRENNAN, M.; THOMAS, D. Y.; WHITEWAY, M.; KAVANAGH, K. Correlation between virulence of Candida albicans mutants in mice and Galleria mellonella larvae. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 34, n. 2, p. 153-157, 2002.

BUTLER, M. S.; GIGANTE, V.; SATI, H.; PAULIN, S. *et al.* Analysis of the Clinical Pipeline of Treatments for Drug-Resistant Bacterial Infections: Despite Progress, More Action Is Needed. **Antimicrob Agents Chemother**, 2022.

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. **Frontiers Microbiology**, 9, p. 243, 2018.

CHAMPION, O. L.; COOPER, I. A.; JAMES, S. L.; FORD, D. *et al.* Galleria mellonella as an alternative infection model for Yersinia pseudotuberculosis. **Microbiology**, 155, n. Pt 5, p. 1516-1522, 2009.

CHAPMAN, M.; ROBINSON, L.; PINKNER, J.; ROTH, R. *et al.* Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. **Science** 295, n. 5556, 2002.

CHARBONNEAU, M.; MOUREZ, M. Functional organization of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. **Journal of Bacteriology**, 189, n. 24, 2007.

CHORELL, E.; ANDERSSON, E.; EVANS, M.; JAIN, N. *et al.* Bacterial Chaperones CsgE and CsgC Differentially Modulate Human α-Synuclein Amyloid Formation via Transient Contacts. **PloS one**, 10, n. 10, 2015.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Buying Time: The AMR Action Fund and the State of Antibiotic Development in the United States 2020. **Open Forum Infectious Diseases**, 7, n. 11, 2020.

CLARKE, M. B.; HUGHES, D. T.; ZHU, C.; BOEDEKER, E. C. *et al.* The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, 103, n. 27, p. 10420-10425, 2006.

CLSI. **M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. CLSI: CLSI, 2020. 978-1-68440-067-6. Disponível em: https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/. Acesso em: 21 Jan 2021.

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). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 66, n. 3, p. 517-526, 2011.

COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, 27, n. 2, p. 163-169, 2000.

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, 2014.

DA SILVA, P.; LUSTRI, B. C.; CASTILHO, I. G.; FERREIRA, A. M. *et al.* Genome profiling of fluoroquinolone-resistant uropathogenic Escherichia coli isolates from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 52, n. 3, p. 1067-1075, 2021.

DEAN, S. N.; VAN HOEK, M. L. Screen of FDA-approved drug library identifies maprotiline, an antibiofilm and antivirulence compound with QseC sensor-kinase dependent activity in Francisella novicida. **Virulence**, 6, n. 5, p. 487-503, 2015.

DHEMAN, N.; MAHONEY, N.; COX, E. M.; FARLEY, J. J. *et al.* An Analysis of Antibacterial Drug Development Trends in the United States, 1980–2019. **Clinical Infectious Diseases**, 73, n. 11, 2020.

DORMANESH, B.; SAFARPOOR DEHKORDI, F.; HOSSEINI, S.; MOMTAZ, H. *et al.* Virulence Factors and O-Serogroups Profiles of Uropathogenic Escherichia Coli Isolated from Iranian Pediatric Patients. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, 16, n. 2, 2014.

EJRNÆS, K.; STEGGER, M.; REISNER, A.; FERRY, S. *et al.* Characteristics of Escherichia coli causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. **Virulence**, 2, n. 6, 2011.

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 ▿ . **Journal of Clinical Microbiology**, 47, n. 11, p. 3780-3782, 2009.

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

FLOYD, K. A.; MOORE, J. L.; EBERLY, A. R.; GOOD, J. A. *et al.* Adhesive fiber stratification in uropathogenic Escherichia coli biofilms unveils oxygen-mediated control of type 1 pili. **PLoS Pathogens**, 11, n. 3, 2015.

FORDE, B. M.; BEN ZAKOUR, N. L.; STANTON-COOK, M.; PHAN, M. D. *et al.* The complete genome sequence of Escherichia coli EC958: a high quality reference sequence for the globally disseminated multidrug resistant E. coli O25b:H4-ST131 clone. **PLoS One**, 9, n. 8, p. e104400, 2014.

FOXMAN, B.; BROWN, P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. **Infectious Disease Clinics of North America**, 17, n. 2, 2003.

FRANKEL, G.; SCHROEDER, G. The Galleria mellonella Infection Model for Investigating the Molecular Mechanisms of Legionella Virulence. **Methods in Molecular Biology** 1921, 2019.

FRANKEL, G., SCHROEDER, G.N. . The Galleria mellonella Infection Model for Investigating the Molecular Mechanisms of Legionella Virulence. . **Methods in Molecular Biology**, 1921, 2019.

FUX, C.; COSTERTON, J.; STEWART, P.; STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in microbiology**, 13, n. 1, 2005.

GALVAO, J.; DAVIS, B.; TILLEY, M.; NORMANDO, E. *et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, 2013.

GARCIA, E.; BRUMBAUGH, A.; MOBLEY, H. Redundancy and specificity of Escherichia coli iron acquisition systems during urinary tract infection. **Infection and Immunity**, 79, n. 3, 2011.

GOYAL, P.; KRASTEVA, P.; VAN GERVEN, N.; GUBELLINI, F. *et al.* Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG. **Nature**, 516, n. 7530, 2014.

GROISMAN, E. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. **Annual Review of Microbiology**, 70, 2016.

GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic Escherichia coli. **Molecular Microbiology**, 38, n. 1, p. 53-66, 2000.

HADJIFRANGISKOU, M.; GU, A. P.; PINKNER, J. S.; KOSTAKIOTI, M. *et al.* Transposon mutagenesis identifies uropathogenic Escherichia coli biofilm factors. **Journal of Bacteriology**, 194, n. 22, 2012.

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

HAGAN, E.; MOBLEY, H. Haem acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic Escherichia coli for kidney infection. **Molecular Microbiology**, 71, n. 1, 2009.

HAMMAR, M.; ARNQVIST, A.; BIAN, Z.; OLSÉN, A. *et al.* Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in Escherichia coli K-12. **Molecular Microbiology**, 18, n. 4, 1995.

HE, L.; DAI, K.; WEN, X.; DING, L. *et al.* QseC Mediates Osmotic Stress Resistance and Biofilm Formation in Haemophilus parasuis. **Frontiers Microbiology**, 9, p. 212, 2018.

HEIMER, S.; RASKO, D.; LOCKATELL, C.; JOHNSON, D. *et al.* Autotransporter genes pic and tsh are associated with Escherichia coli strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. **Infection and Immunity**, 72, n. 1, 2004.

HERNANDES, R. T.; VELSKO, I.; SAMPAIO, S. C. F.; ELIAS, W. P. *et al.* Fimbrial Adhesins Produced by Atypical Enteropathogenic Escherichia coli Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, 77, n. 23, p. 8391-8399, 2011.

HIRAKAWA, H.; KURUSHIMA, J.; HASHIMOTO, Y.; TOMITA, H. Progress Overview of Bacterial Two-Component Regulatory Systems as Potential Targets for Antimicrobial Chemotherapy. **Antibiotics**, 9, n. 10, 2020.

HUNG, C.; MARSCHALL, J.; BURNHAM, C.; BYUN, A. *et al.* The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. **PloS One**, 9, n. 1, 2014.

JANDER, G.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Positive correlation between virulence of Pseudomonas aeruginosa mutants in mice and insects. **Journal of Bacteriology**, 182, n. 13, p. 3843-3845, 2000.

JIMENEZ, N.; LACASTA, A.; VILCHES, S.; REYES, M. *et al.* Genetics and proteomics of Aeromonas salmonicida lipopolysaccharide core biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, 191, n. 7, p. 2228-2236, 2009.

JOHNSON, J.; KUSKOWSKI, M.; O'BRYAN, T.; COLODNER, R. *et al.* Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among Escherichia coli urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49, n. 1, 2005.

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. **Pediatric Infection Disease Journal**, 29, n. 5, p. 473-475, 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. **Clinical Infection Disease**, 51, n. 3, p. 286-294, 2010.

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; GAJEWSKI, A.; SAHM, D. F. *et al.* Virulence Characteristics and Phylogenetic Background of Multidrug-Resistant and Antimicrobial-Susceptible Clinical Isolates of Escherichia coli from across the United States, 2000–2001. **The Journal of Infectious Diseases**, 190, n. 10, p. 1739-1744, 2004.

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 ▿ . **Antimicrob Agents Chemother**, 53, n. 7, p. 2733-2739, 2009.

JUSTICE, S. S.; HUNG, C.; THERIOT, J. A.; FLETCHER, D. A. *et al.* Differentiation and developmental pathways of uropathogenic Escherichia coli in

urinary tract pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101, n. 5, p. 1333-1338., 2004.

KAI-LARSEN, Y.; LÜTHJE, P.; CHROMEK, M.; PETERS, V. *et al.* Uropathogenic Escherichia coli modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. **PLoS pathogens**, 6, n. 7, 2010.

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, 2017.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, 8, n. 9, p. 634-644, 2010.

KJAERGAARD, K.; SCHEMBRI, M. A.; RAMOS, C.; MOLIN, S. *et al.* Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. **Environmental microbiology**, 2, n. 6, 2000.

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. **Infection and Immunity**, 80, n. 8, p. 2826-2834, 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. **Molecular Microbiology**, 73, n. 6, p. 1020-1031, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

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. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, 62, n. 6, p. 1241-1244, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, 46, n. 3, p. 1076-1080, 2008.

LEUKO, S.; RAIVIO, T. L. Mutations that impact the enteropathogenic Escherichia coli Cpx envelope stress response attenuate virulence in Galleria mellonella. **Infection Immunity**, 80, n. 9, p. 3077-3085, 2012.

LÜTHJE, P.; BRAUNER, A. Virulence factors of uropathogenic E. coli and their interaction with the host. **Advances in Microbial Physiology**, 65, 2014.

MANGES, A. R.; GEUM, H. M.; GUO, A.; EDENS, T. J. *et al.* Global Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC) Lineages. **Clinical Microbiology Reviews**, 32, n. 3, 2019.

MARTINEZ, J. J.; MULVEY, M. A.; SCHILLING, J. D.; PINKNER, J. S. *et al.* Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO Journal**, 19, n. 12, p. 2803-2812, 2000.

MERZ, A. J.; SO, M.; SHEETZ, M. P. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. **Nature**, 407, n. 6800, p. 98-102, 2000.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110, n. 4, p. 1470-1475, 2013.

MOREIRA, C. G.; PALMER, K.; WHITELEY, M.; SIRCILI, M. P. *et al.* Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, 188, n. 11, p. 3952-3961, 2006.

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

MUKHERJEE, K.; ALTINCICEK, B.; HAIN, T.; DOMANN, E. *et al.* Galleria mellonella as a Model System for Studying Listeria Pathogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, 76, n. 1, p. 310-317, 2010.

MYLONAKIS, E.; MORENO, R.; EL KHOURY, J. B.; IDNURM, A. *et al.* Galleria mellonella as a model system to study Cryptococcus neoformans pathogenesis. **Infection and Immunity**, 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.

NATIONS, U. **UN, global health agencies sound alarm on drug-resistant infections; new recommendations to reduce 'staggering number' of future deaths**. United Nations, 2019. Disponível em: https://news.un.org/en/story/2019/04/1037471. Acesso em: 24 Maio 2021.

NHU, N. T. K.; PHAN, M. D.; PETERS, K. M.; LO, A. W. *et al.* Discovery of New Genes Involved in Curli Production by a Uropathogenic Escherichia coli Strain from the Highly Virulent O45:K1:H7 Lineage. **MBio**, 9, n. 4, 2018.

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. **Journal of Antimicrobial Chemotherpy**, 61, n. 2, p. 273-281, 2008.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, 78, p. 119-146, 2009.

O'TOOLE, G.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. **Molecular microbiology**, 30, n. 2, 1998.

OLSEN, R. J.; WATKINS, M. E.; CANTU, C. C.; BERES, S. B. *et al.* Virulence of serotype M3 Group A Streptococcus strains in wax worms (Galleria mellonella larvae). **Virulence**, 2, n. 2, p. 111-119, 2011.

ONG, C.; ULETT, G.; MABBETT, A.; BEATSON, S. *et al.* Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic Escherichia coli reveals a role in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, 190, n. 3, 2008.

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, 1992.

PETTY, N. K.; BEN ZAKOUR, N. L.; STANTON-COOK, M.; SKIPPINGTON, E. *et al.* Global dissemination of a multidrug resistant Escherichia coli clone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111, n. 15, p. 5694-5699, 2014.

PIATTI, G.; MANNINI, A.; BALISTRERI, M.; SCHITO, A. Virulence factors in urinary Escherichia coli strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, 46, n. 2, 2008.

RAHMAN, S.; LINDAHL, O.; MOREL, C. M.; HOLLIS, A. Market concentration of new antibiotic sales. **The Journal of Antibiotics**, 74, n. 6, p. 421-423, 2021.

RANJAN, A.; SCHOLZ, J.; SEMMLER, T.; WIELER, L. H. *et al.* ESBL-plasmid carriage in E. coli enhances in vitro bacterial competition fitness and serum resistance in some strains of pandemic sequence types without overall fitness cost. **Gut Pathogens**, 10, n. 1, p. 1-9, 2018.

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, 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. **Journal of Bacteriology**, 190, n. 20, p. 6881-6893, 2008.

REX, J. H.; OUTTERSON, K. Antibacterial R&D at a Crossroads: We've Pushed as Hard as We Can … Now We Need to Start Pulling! **Clinical Infectious Diseases**, 73, n. 11, 2020.

RIBEIRO, T. R. M.; LUSTRI, B. C.; ELIAS, W. P.; MOREIRA, C. G. QseC Signaling in the Outbreak O104:H4 Escherichia coli Strain Combines Multiple Factors during Infection. **Journal of Bacteriology**, 201, n. 17, 2019.

RIEDEL, T.; ROHLFS, M.; BUCHHOLZ, I.; WAGNER-DÖBLER, I. *et al.* Complete sequence of the suicide vector pJP5603. **Plasmid**, 69, n. 1, 2013.

ROGERS, B. A.; SIDJABAT, H. E.; PATERSON, D. L. Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 66, n. 1, p. 1-14, 2011.

RRIBEIRO; LUSTRI; ELIAS; MOREIRA. QseC Signaling in the Outbreak O104:H4 Escherichia coli Strain Combines Multiple Factors during Infection. **Journal of bacteriology**, 201, n. 17, 2019.

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

SARKAR, S.; ULETT, G.; TOTSIKA, M.; PHAN, M. *et al.* Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic Escherichia coli. **PloS One**, 9, n. 4, 2014.

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. **Pathogens and Diseases**, 74, n. 3, 2016.

SCHEMBRI, M. A.; BLOM, J.; KROGFELT, K. A.; KLEMM, P. Capsule and Fimbria Interaction in Klebsiella pneumoniae. **Infection and Immunity**, 73, n. 8, p. 4626-4633, 2005.

SCHEMBRI, M. A.; KJAERGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in Escherichia coli biofilms. **Molecular Microbiology**, 48, n. 1, p. 253-267, 2003.

SCHWAN, W. R. Regulation of fim genes in uropathogenic Escherichia coli. **World Journal of Clinical Infections Diseases**, p. 17-25, 2011.

SCHWARTZ, D. J.; KALAS, V.; PINKNER, J. S.; CHEN, S. L. *et al.* Positively selected FimH residues enhance virulence during urinary tract infection by altering FimH conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110, n. 39, p. 15530-15537, 2013.

SESA-SP. **Infecção urinária interna 94 por dia em SP**. SESA-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 Maio 2019.

SHENG, H.; XUE, Y.; ZHAO, W.; HOVDE, C. *et al.* Escherichia coli O157:H7 Curli Fimbriae Promotes Biofilm Formation, Epithelial Cell Invasion, and Persistence in Cattle. **Microorganisms**, 8, n. 4, 2020.

SILVA, G. J. D.; MENDONÇA, N. Association between antimicrobial resistance and virulence in Escherichia coli. **Virulence**, 3, n. 1, p. 18-28, 2012.

SILVA, K. C. D.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

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

SONCINI, F. C.; GROISMAN, E. A. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. **Journal of Bacteriology**, 178, n. 23, p. 6796-6801, 1996.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96, n. 26, p. 15196-15201, 1999.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P. *et al.* Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100, n. 15, p. 8951-8956, 2003.

SUBASHCHANDRABOSE, S. M., H L T. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli. **Microbiology Spectrum**, 3, n. 4, 2015.

TANWAR, J.; DAS, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Multidrug resistance: an emerging crisis. **Interdisciplinal Perspective of Infections Diseases**, 2014, p. 541340, 2014.

TIERNEY, A.; RATHER, P. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance. **Future microbiology**, 14, n. 6, 2019.

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.

TOWBIN, H. S., T. GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 76, n. 9, 1979.

ULETT, G. C.; WEBB, R. I.; SCHEMBRI, M. A. Antigen-43-mediated autoaggregation impairs motility in Escherichia coli. **Microbiology** 152, n. Pt 7, 2006.

VALLE, J.; MABBETT, A. N.; ULETT, G. C.; TOLEDO-ARANA, A. *et al.* UpaG, a New Member of the Trimeric Autotransporter Family of Adhesins in Uropathogenic Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, 2008.

VERHEIJEN, M.; LIENHARD, M.; SCHROODERS, Y.; CLAYTON, O. *et al.* DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

VESCOVI, E. G.; SONCINI, F. C.; GROISMAN, E. A. Mg2+ as an extracellular signal: environmental regulation of Salmonella virulence. **Cell**, 84, n. 1, p. 165-174, 1996.

VOGEL, H.; ALTINCICEK, B.; GLÖCKNER, G.; VILCINSKAS, A. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host Galleria mellonella. **BMC Genomics**, 12, n. 1, p. 1-19, 2011.

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

WAND; MCCOWEN; NUGENT; SUTTON. Complex interactions of Klebsiella pneumoniae with the host immune system in a Galleria mellonella infection model. **Journal of Medical Microbiology**, 62, n. 12, p. 1790-1798, 2013a.

WAND; MCCOWEN; NUGENT; SUTTON. Complex interactions of Klebsiella pneumoniae with the host immune system in a Galleria mellonella infection model. 2013/12/01 2013b. Text.

WAND; MULLER; TITBALL; MICHELL. Macrophage and Galleria mellonella infection models reflect the virulence of naturally occurring isolates of B. pseudomallei, B. thailandensis and B. oklahomensis. **BMC Microbiology**, 11, n. 1, p. 11, 2011.

WANG, X.; QUINN, P. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. **Progress in Lipid Research**, 49, n. 2, 2010.

WELCH, R. A.; BURLAND, V.; III, G. P.; REDFORD, P. *et al.* Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99, n. 26, p. 17020-17024, 2002.

WHELAN, S.; LUCEY, B.; FINN, K. Uropathogenic Escherichia coli (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. **Microorganisms**, 11, n. 9, 2023.

WHO. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.** World Health Organization, 2017. Disponível em: https://remed.org/wp-content/uploads/2017/03/lobal-priority-list-of-antibiotic-resistant-bacteria-2017.pdf. Acesso em: 12 Maio 2019.

WHO. **Call to Action on Antimicrobial Resistance 2021**. World Health Organization, https://www.who.int/news/item/30-07-2021-call-to-action-on-antimicrobial-resistance-2021, 2021. Acesso em: 01 Nov 2021.

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.

WOSTEN, M. M.; KOX, L. F.; CHAMNONGPOL, S.; SONCINI, F. C. *et al.* A signal transduction system that responds to extracellular iron. **Cell**, 103, n. 1, p. 113-125, 2000.

WURPEL, D.; TOTSIKA, M.; ALLSOPP, L.; HARTLEY-TASSELL, L. *et al.* F9 fimbriae of uropathogenic Escherichia coli are expressed at low temperature and recognise Galβ1-3GlcNAc-containing glycans. **PloS one**, 9, n. 3, 2014.

YANG, Y.; HU, P.; GAO, L.; YUAN, X. *et al.* Deleting qseC downregulates virulence and promotes cross-protection in Pasteurella multocida. **Veterinary Research**, 52, n. 1, p. 1-13, 2021.

ZOLFAGHAR, I.; EVANS, D.; FLEISZIG, S. Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by Pseudomonas aeruginosa. **Infection and immunity**, 71, n. 9, 2003.