

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

A TREALASE PERIPLASMÁTICA E O OPERON DE METABOLISMO DE β -
GLICOSÍDEOS AFETAM A VIRULÊNCIA *IN VIVO* NA CEPA *Escherichia coli*
PATOGENICA EXTRAINTESTINAL MT78

Tese de Doutorado

Daniel Brisotto Pavanelo

Porto Alegre, setembro de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

A TREALASE PERIPLASMÁTICA E O OPERON DE METABOLISMO DE β -
GLICOSÍDEOS AFETAM A VIRULÊNCIA *IN VIVO* NA CEPA *Escherichia coli*
PATOGENICA EXTRAINTESTINAL MT78

Daniel Brisotto Pavanelo

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular
da UFRGS, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Doutor em Biologia
Celular e Molecular.

Orientação: Prof. Dra. Fabiana Horn

Porto Alegre, setembro de 2017.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Celular, situado no Departamento de Biofísica da UFRGS, e no Laboratório do professor Charles Dozois, no Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier da cidade de Laval, vinculado à Université du Québec à Montréal, Quebec, Canadá, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Este trabalho é dedicado às pessoas pensantes, que lutam por uma causa, que tem a mente aberta, são livres de amarras e dessa forma ajudam o mundo a se tornar um lugar mais leve.

AGRADECIMENTOS

Aos ex-presidentes da República, Luiz Inácio Lula da Silva, por ter investido pesadamente em educação superior de qualidade e facilitado o acesso de pessoas pobres à universidade, e Dilma Vana Rousseff, por ter criado o Programa Ciência sem Fronteiras, uma fonte de motivação para essa tese de doutorado;

Aos ex-membros do Laboratório de Microbiologia Celular, Nicolle de Lima Barbieri, Letícia Beatriz Matter, Naíta Roman Bohn, Aline Luiza de Oliveira, Roberta Souza dos Reis, Michelle Stumpf Viegas e todos os alunos de iniciação científica que passaram ao longo dos 10 anos em que estive aqui;

To the members of Charles Dozois Lab in 2015 / Aux membres du Labo Charles Dozois à l'année 2015, Hajer Habouria, Julie Buron, Joseph Saoud, Gaëlle Porcheron, Ségolène Maris, and specially to / et spécialement à Sébastien Houle, thank you all so much / merci beaucoup à tous;

Aos meus amigos Daniel Chamorro Darde, Rafael Camargo Jardim, Pedro Henrique Reinhardt da Rosa, Lucas Tonieto Biavatti, Leonardo Souza Severo, Marina de Lima Marcolin, Susana de Oliveira Elias, Mariane da Cunha Jaeger, Carla Gottschald Chiodi, Andressa Grazziotin Mondadori, Káren Regina Silva de Souza, Cícero Rafael Leão Garcia e Gabriel Silveira D'Almeida, por estarem disponíveis, dentro das possibilidades, nesses tempos difíceis;

Aos meus queridos colegas de laboratório, Vivian Souza Klemberg, João Pedro Stepan Wagner, Rosana Thalia Meregalli, Tobias Weber Martins, Patrícia de Alcântara Gomes, Simone Iahnig Jaques e Karen Amaro;

Aos meus pais, Saul Pedro Pavanelo e Luciane de Fatima Rotth Brisotto, pelo incentivo a estudar sempre, e à minha irmã, Luiza Brisotto Pavanelo;

Ao meu namorado, Rodrigo Pigozzi Bernardi, que me acompanhou durante todo o doutorado;

À Odete Souza Soares, por tornar toda a minha formação mais fácil;

To Charles Martin Dozois, for all the opportunities and teachings;

À Fabiana Horn, pela oportunidade, confiança, dedicação e ótima convivência.

Muito obrigado!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. <i>Escherichia coli</i>	16
1.2. Produção avícola no Brasil	17
1.3. <i>E. coli</i> patogênicas aviárias	18
1.4. <i>E. coli</i> uropatogênicas e Infecções do trato urinário	20
1.5. NMEC e meningites neonatais	21
1.6. Fatores de virulência associados a ExPEC	24
1.6.1 Adesinas	24
1.6.1.1. Adesinas fimbriais.....	25
1.6.1.1.1. Fímbria do tipo 1	25
1.6.1.1.2. Outras fímbrias	29
1.6.1.2. Adesinas afimbriais.....	29
1.6.2. Fatores de resistência ao soro (protectinas)	30
1.6.3. Fatores de aquisição de ferro (sistemas sideróforos)..	31
1.6.4. Invasinas	33
1.6.5. Toxinas.....	34
1.7. Metabolismo de trealose em <i>E. coli</i>	35
1.8. Metabolismo de β -glicosídeos em <i>E. coli</i>	38
1.9. A cepa MT78	39
1.10. A técnica de mutagênese marcada com assinatura	40
2. OBJETIVOS	43
2.1. Objetivos específicos	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44

3.1. Cepas, plasmídeos, condições de crescimento e conservação..	44
3.2. Amplificação da região de inserção do transposon nos mutantes STM	47
3.3. Geração de mutantes específicos	50
3.4. Complementação plasmidial do gene <i>treA</i>	51
3.5. Complementação cromossômica do gene <i>treA</i>	51
3.6. Determinação da expressão da fímbria do tipo 1 por aglutinação de leveduras	54
3.7. Determinação da orientação da região <i>fimS</i>	54
3.8. Cultura de fibroblastos	54
3.9. Cultura de células uroteliais.....	55
3.10. Ensaios de adesão e invasão	55
3.11. Crescimento em diferentes osmolaridades	57
3.12. Ensaios <i>in vivo</i>	57
3.13. Análise da fermentação de β -glicosídeos	58
3.14. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína FimH.	58
4. RESULTADOS	59
4.1. Sete de 27 mutantes testados individualmente foram confirmados como atenuados para invasão	59
4.2. Identificação dos genes responsáveis pela atenuação da capacidade invasiva dos mutantes	61
4.3. O mutante MT78 Δ <i>treA</i> cresce em diferentes concentrações de sal	63

4.4. O mutante MT78 Δ <i>treA</i> não cresce em meio mínimo M9 com trealose como única fonte de carbono	65
4.5. O mutante MT78 Δ <i>treA</i> apresenta menor adesão e invasão a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32 que a cepa selvagem	65
4.6. A deleção de <i>treA</i> diminui o título de aglutinação de leveduras..	68
4.7. A diminuição da expressão da fímbria do tipo 1 pelo mutante MT78 Δ <i>treA</i> não é explicada pelo acúmulo de trealose no periplasma	71
4.8. O mutante MT78 Δ <i>treA</i> colonizou menos a bexiga de camundongos em modelo de infecção urinária em relação à cepa selvagem	73
4.9. A complementação plasmidial não recuperou todos os fenótipos do mutante <i>treA</i>	75
4.10. O mutante MT78 Δ <i>treA</i> tem a mesma capacidade de aderir células de bexiga da linhagem 5637 que a cepa selvagem.....	77
4.11. A mutação em <i>treA</i> não teve efeito na expressão da fímbria do tipo 1 na cepa CFT073	79
4.12. A adesina FimH da cepa MT78 é idêntica à de cepas não-invasivas	79
4.13. Os mutantes <i>bglB</i> e do operon <i>bgl</i> não fermentam os β -glicosídeos arbutina e salicina	81
4.14. Os mutantes <i>bglB</i> e do operon <i>bgl</i> não apresentaram variação no título de aglutinação de leveduras em relação à cepa selvagem	83

4.15. Os mutantes MT78 Δ <i>bgI</i> B e MT78 Δ <i>bgI</i> apresentaram menor adesão e invasão a fibroblastos aviários em relação à cepa selvagem	83
4.16. O mutante MT78 Δ <i>bgI</i> colonizou menos a bexiga de camundongos em modelo de infecção urinária em relação à cepa selvagem	85
5. DISCUSSÃO	87
6. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS.....	97
CURRICULUM VITÆ	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fímbria do tipo 1 em <i>E. coli</i>	28
Figura 2. Vias metabólicas da trealose em <i>E. coli</i>	37
Figura 3. Esquema da complementação cromossômica do gene <i>treA</i>	53
Figura 4. Adesão e invasão de fibroblastos aviários da linhagem CEC-32 por mutantes STM possivelmente atenuados	60
Figura 5. Curvas de crescimento em caldo LB contendo diferentes concentrações de NaCl	64
Figura 6. Adesão e invasão a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32.	67
Figura 7. Aglutinação de leveduras	69
Figura 8. Verificação da orientação de <i>fimS</i>	70
Figura 9. Aglutinação de leveduras pelos mutantes da rota de síntese e degradação periplasmática de trealose.....	72
Figura 10. Infecção <i>in vivo</i> do trato urinário de camundongos	74
Figura 11. Efeito da complementação plasmidial no mutante <i>treA</i> na aglutinação de leveduras e ensaios em fibroblastos aviários da linhagem CEC-32	76
Figura 12. Adesão às células uroteliais da linhagem 5637.....	78
Figura 13. Alinhamento dos aminoácidos de FimH	80
Figura 14. Crescimento em ágar contendo azul de bromotimol com os β -glicosídeos salicina ou arbutina.....	82
Figura 15. Adesão e invasão dos mutantes MT78 Δ <i>bglB</i> , MT78 Δ <i>bgl</i> e MT78 <i>bglB</i> ::Tn5 a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32	84
Figura 16. Infecção <i>in vivo</i> do trato urinário de camundongos	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas e plasmídeos utilizados nesse estudo.	45
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados nesse estudo.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AIEC	<i>Escherichia coli</i> aderente e invasiva
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
BHI	Meio <i>brain-heart infusion</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CEC-32	linhagem celular de fibroblastos aviários
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênicas extraintestinais
Fig	Figura
h	hora(s)
kb	mil pares de bases
LB	Luria Bertani
LCR	líquido céfalo-raquidiano (líquor)
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
µg	micrograma
mid-log	metade da fase exponencial do crescimento bacteriano
µL	microlitro
mL	mililitro
µm	micrômetro
MOI	multiplicidade de infecção
NCBI	Centro Nacional para Informações Biotecnológicas

nm	nanômetro
NMEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de meningite neonatal
nt	nuclueotídeos
OD	densidade óptica
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato-salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
PTS	sistema fosfo-transferase
rpm	rotações por minuto
RPMI	meio Roswell Park Memorial Institute 1640
STM	mutagênese marcada por assinatura
UFC	unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
US\$	dólar americano
v/v	volume por volume
WT	<i>wild type</i> (tipo selvagem)

RESUMO

Escherichia coli patogênicas extraintestinais (ExPEC) causam colibacilose aviária, infecções do trato urinário e meningite neonatal em humanos. A cepa ExPEC MT78 é virulenta *in vitro* e *in vivo*, e possui a habilidade de invadir células eucarióticas. Para melhor entender o fenótipo invasivo dessa cepa, foi criada uma biblioteca de mutantes aleatórios pela técnica de mutagênese marcada com assinatura, e os mutantes foram selecionados negativamente em ensaio de invasão a fibroblastos aviários. Mutantes atenuados apresentaram mutação em genes do operon da fímbria do tipo 1 e nos genes de metabolismo de açúcares *treA* e *bgI/B*. Foram feitos mutantes específicos para o gene que codifica a enzima trealase periplasmática (TreA) e para o operon de metabolismo de β -glicosídeos (*bgI*). O mutante MT78 Δ *treA* apresentou, frente à cepa selvagem, diminuição na capacidade de adesão e invasão a fibroblastos aviários, na expressão da fímbria do tipo 1 e na capacidade de colonizar a bexiga de camundongos em modelo de infecção urinária. O mutante MT78 Δ *bgI* também apresentou, frente à cepa selvagem, diminuição na capacidade de adesão e invasão a fibroblastos aviários e na capacidade de colonizar a bexiga de camundongos em modelo de infecção urinária, mas não mostrou alteração na expressão da fímbria do tipo 1, medida por aglutinação de leveduras. Os resultados deste trabalho mostraram que a trealase periplasmática afeta a expressão da fímbria do tipo 1 e a virulência *in vivo* da cepa ExPEC MT78, enquanto o operon do metabolismo de β -glicosídeos afeta a virulência *in vivo* da cepa ExPEC MT78 por um mecanismo ainda não-elucidado.

Palavras-chave: *Escherichia coli* patogênica extraintestinal; mutagênese marcada com assinatura; fímbria do tipo 1; trealose; β -glicosídeos

ABSTRACT

Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) cause colibacillosis in birds, urinary tract infections and neonatal meningitis in humans. The ExPEC strain MT78 is virulent *in vitro* and *in vivo*, and is able to invade eukaryotic cells. In order to better understand the invasive phenotype of this strain, a library of random mutants was made using the signature-tagged mutagenesis approach. The mutants were negatively selected in invasion assays of avian fibroblasts. Attenuated mutants presented mutation in the type 1 fimbria operon and in the genes of sugar metabolism *treA* and *bglB*. Specific mutants were created for the periplasmic trehalase (TreA) gene and for the β -glycosides metabolism operon (*bgl*). The MT78 Δ *treA* mutant displayed, in comparison with the wild type strain, a reduction on the capacity of adhesion and invasion to avian fibroblasts, on type 1 fimbriae expression and on the capacity to colonize the bladder in a murine model of urinary tract infection. The MT78 Δ *bgl* mutant, compared to the wild type strain, also displayed a reduction on the capacity of adhesion and invasion to avian fibroblasts and on the capacity to colonize the bladder in a murine model of urinary tract infection, but did not show any difference on type 1 fimbriae expression as detected by yeast agglutination. Taken together, our results show that the periplasmic trehalase affects type 1 expression and *in vivo* virulence of the ExPEC strain MT78, and the operon for β -glycosides metabolism affects *in vivo* virulence by an as yet unidentified mechanism.

Keywords: Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*; signature-tagged mutagenesis; type 1 fimbriae; trehalose; β -glycosides

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Foi descrita pela primeira vez em 1885, por Theodor von Escherich, possui formato de bacilo, é um organismo anaeróbico facultativo não-esporulado e é comensal do homem e de outros animais de sangue quente.

A maioria das cepas de *E. coli* não é patogênica, mas há um versátil conjunto causador de infecções responsável por mortalidade e alto custo para os sistemas de saúde (Kaper et al., 2004, Klemm et al., 2010). Essas linhagens são altamente adaptadas e adquiriram atributos de virulência específicos que lhes conferiram habilidade de se adaptar a novos nichos e colonizar novos hospedeiros (Kaper et al., 2004). Tais atributos podem ser encontrados em elementos genéticos, podendo estar presentes em diferentes combinações, como plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade e bacteriófagos (Kaper et al., 2004). Para que um patógeno cause doença em um indivíduo saudável, é necessário que (1) se adapte e colonize o hospedeiro; (2) sobreviva no seu interior e se multiplique; (3) evada do seu sistema imunológico e (4) se dissemine a outros hospedeiros (Falkow, 1991). Isso é possível graças aos fatores associados à virulência e ao *fitness* bacteriano, que permitem à bactéria cumprir todas as etapas da infecção.

É possível dividir as *E. coli* patogênicas em dois grandes grupos, as patogênicas intestinais e as patogênicas extraintestinais (ExPEC, de Extraintestinal Pathogenic E. coli). As *E. coli* patogênicas intestinais são responsáveis pelas diarreias e podem apresentar diversas estratégias para invadir

as células intestinais (Reis and Horn, 2010, Klemm et al., 2010). Esse grupo está dividido em subgrupos como EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), DAEC (*E. coli* difusamente aderente) e AIEC (*E. coli* aderente e invasiva). As ExPEC, por sua vez, são classificadas em três subgrupos: as causadoras de infecção do trato urinário (UPEC, de UroPathogenic E. coli); as causadoras de meningite no neonato (NMEC, de Newborn Meningitis-associated E. coli); e as que causam colibacilose em aves (APEC, de Avian Pathogenic E. coli) (Kaper et al., 2004). Apesar de colonizarem diferentes nichos e apresentarem estratégias de patogenicidade distintas, as *E. coli* patogênicas podem compartilhar genes de virulência.

1.2. Produção avícola no Brasil

A produção de carne de frango no Brasil foi de 12,9 milhões de toneladas em 2016, número que confere ao Brasil o segundo lugar no mundo em produção de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos da América (18,26 milhões de toneladas). Cerca de 66% dessa produção foi destinada ao consumo pelo mercado interno, atingindo uma média de 41,1 kg de carne de frango por pessoa. Os estados da região Sul do Brasil são os principais responsáveis por essa produção, contribuindo com 63,62% da produção nacional (ABPA, 2017).

As exportações de carne de frango atingiram 4,38 milhões de toneladas em 2016, número que mantém o Brasil como maior exportador mundial de carne de frango. Os estados da região Sul são responsáveis por 76,29% das exportações. Os principais países importadores da carne de frango brasileira são a Arábia Saudita (746 mil ton), a China (485 mil ton), o Japão (397 mil ton), os Emirados

Árabes Unidos (302 mil ton) e Hong Kong (249 mil ton). O valor total da receita cambial, se somadas todas as formas de exportação (cortes, frango inteiro, frango industrializado e outras formas), foi de US\$ 6,85 bilhões de dólares (ABPA, 2017).

O fato de a produção avícola no Brasil ser a de mais baixo custo do mundo (ALVES et al., 2006) e de os animais terem atingido um alto padrão de evolução genética faz com que as melhorias na cadeia produtiva estejam voltadas à saúde e à nutrição das aves, já que a seleção de aves com alta taxa de crescimento a partir de uma menor quantidade de alimentos têm tornado os animais mais suscetíveis a infecções por microrganismos (Swaggerty et al., 2009), como o vírus Influenza, espécies de *Salmonella* e *E. coli*.

De acordo com a Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998, “Qualquer órgão ou outra parte da carcaça que estiver afetado por um processo inflamatório deverá ser condenado e, se existir evidência de caráter sistêmico do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade deverão ser condenadas.” (Brasil, 1998). Baseado nas estimativas feitas por Fallavena e colaboradores (Fallavena et al., 2000) e na produção brasileira de frango em 2016, a condenação de carcaças infectadas com *E. coli* teria sido de aproximadamente 27 mil toneladas de carne, o que corresponderia a quase US\$ 12 milhões (ALVES et al., 2006). Nesse sentido, este trabalho estuda uma cepa *E. coli* patogênica aviária, um dos principais agentes causadores de doenças infecciosas em aves.

1.3. *E. coli* patogênicas aviárias

A infecção de aves por *E. coli* foi descrita em 1894, por Lignieres. A bactéria *E. coli* foi isolada dos sacos aéreos de aves com doença respiratória em 1954 e 1955, por Wassermann *et al.* e Fahey, respectivamente (La Ragione and

Woodward, 2002). Tratava-se da colibacilose, a infecção bacteriana mais comum em aves, que se manifesta de várias formas, como peritonite do ovo, onfalite (infecção do embrião), salpingite (infecção do oviduto) síndrome da cabeça inchada, celulite (dermatite necrótica) e colissepticemia, sendo a última a mais grave forma de manifestação (La Ragione and Woodward, 2002). A colissepticemia afeta galinhas, perus e patos de 2 a 12 semanas, e é caracterizada por pericardite, peri-hepatite, aerossaculite, sinovite, peritonite, conjuntivite e enterite (La Ragione and Woodward, 2002, Allan et al., 1993, Cheville and Arp, 1978). Aves selvagens, domésticas e ornamentais podem ser afetadas, normalmente após uma infecção bacteriana (por *Mycoplasma sp.*) ou viral (pelo vírus da doença de Newcastle ou da bronquite infecciosa, por exemplo) (La Ragione and Woodward, 2002, Barnes et al., 2003). Devido aos prejuízos significativos à avicultura mundial causados pela colibacilose (Dziva and Stevens, 2008), vários grupos de pesquisa vêm investigando as bases moleculares da colibacilose aviária, bem como a interação patógeno-hospedeiro entre as aves e as cepas APEC e os perfis patogênicos, fenotípicos e genotípicos dessas bactérias.

As cepas de *E. coli* podem ser classificadas de diversas formas, sendo uma delas a determinação do sorogrupo. Para isso, é utilizada a identificação de antígenos somáticos (O, *Öhne*, LPS), capsulares (K, *Kapsel*), flagelares (H, *Hauch*) e fimbriais (F, *Fimbriae*), presentes na superfície bacteriana. Algumas cepas não podem ser sorotipadas, devido à perda parcial ou total da cadeia lipopolissacarídica (Ferreira and Knöbl, 2000). Entre as APEC, os sorotipos mais comuns no hemisfério Norte são O1, O2, O8, O35 e O78 (La Ragione and

Woodward, 2002). No Brasil, os sorotipos mais frequentes são O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152 (Ferreira and Knöbl, 2000). Entretanto, em um trabalho recente, outros sorotipos considerados incomuns em APEC, como O6, O25, O46, O106, O111 e O143, mostraram-se mais prevalentes que os comuns. Esses sorotipos estão mais associados a ExPEC humanas, o que pode indicar uma capacidade das cepas humanas de colonizar aves (Knobl et al., 2012).

1.4. *E. coli* uropatogênicas e infecções do trato urinário

Infecções do trato urinário estão entre as infecções mais comuns em humanos, e mais da metade das mulheres terão ao menos uma infecção urinária ao longo da vida (Foxman, 2014). A maioria (cerca de 75%) das infecções urinárias são causadas por *E. coli* uropatogênica (UPEC), e o trato urinário é a principal fonte de bacteremia por *E. coli* (Foxman, 2014). Cerca de 150 milhões de pessoas são diagnosticadas com infecção do trato urinário anualmente em todo o mundo (Stamm and Norrby, 2001). Somente nos Estados Unidos, o custo dessas infecções, entre tratamento e tempo perdido de trabalho, está estimado em 3,5 bilhões de dólares por ano (Flores-Mireles et al., 2015).

Após a introdução da bactéria na uretra, o primeiro passo no estabelecimento da infecção do trato urinário é a adesão e a invasão das células epiteliais da bexiga pela UPEC. Esses processos são dependentes da interação da fímbria do tipo 1 na bactéria com a proteína uroplaquina na superfície da célula epitelial (Mulvey et al., 1998, Martinez et al., 2000, Thumbikat et al., 2009); caso a bactéria não possua fímbria, ela poderá crescer na urina mas não causará doença, quadro conhecido como bacteriúria assintomática (Hunstad and Justice, 2010). Uma fração das UPEC internalizadas escapa do endossomo para o citosol

e ali estabelece um biofilme bacteriano intracelular (Anderson et al., 2003), cujo crescimento acaba por lisar a célula epitelial e liberar bactérias que invadirão outras células epiteliais (revisado em Hunstad and Justice, 2010). A colonização bacteriana causa exfoliação das células epiteliais superficiais, mas permite que as UPEC invadam a camada epitelial subjacente. A habilidade de crescer na urina e a aquisição de ferro também são fundamentais à sobrevivência bacteriana.

Cepas UPEC que expressam a fímbria do tipo P serão capazes de colonizar o epitélio renal, e a cistite poderá evoluir para uma pielonefrite (revisado em Kaper et al., 2004). A expressão de hemolisina e de outras citotoxinas acarreta dano epitelial renal e, se a bactéria cruzar a barreira epitelial, poderá causar uma bacteremia.

1.5. NMEC e meningites neonatais

Meningites bacterianas afetam crianças e adultos, mas são particularmente graves em recém-nascidos. A meningite neonatal exige rápido diagnóstico e tratamento para minimizar os riscos para o bebê (Ku et al., 2015). A incidência de meningite neonatal varia de acordo com o nível de desenvolvimento dos países. No Reino Unido, na Holanda, na Suécia e nos Estados Unidos a incidência é de cerca de 0,3 casos para cada 1000 nascimentos (de crianças vivas); no Paquistão, cerca de 0,9; na Turquia, cerca de 2,8; na Índia, cerca de 5 e na Guatemala, cerca de 6. O Brasil apresenta a incidência de 4 casos de meningite a cada 1000 nascimentos (Ku et al., 2015), um número preocupante dada a gravidade da doença.

Para causar meningite, a bactéria precisa penetrar a barreira hematoencefálica (BHE), de modo que uma alta bacteremia facilita essa penetração. Por

essa razão, em 33% dos casos de sepse neonatal ocorre também meningite, e 62% dos casos de meningite neonatal ocorrem em decorrência de sepse (Polin and Comm Fetus, 2012).

A meningite neonatal é dividida em dois tipos, de acordo com o período de manifestação da doença: (1) início precoce, com aparecimento de bactérias no líquido céfalo-raquidiano (LCR) em até 72 h após o nascimento; e (2) início tardio, com aparecimento de bactérias no LCR entre 3 e 28 dias (Barichello et al., 2013, Ku et al., 2015). A meningite neonatal de início precoce está associada à aspiração, pelo bebê, de líquido amniótico contaminado pela microbiota vaginal da mãe, ou ainda à sepse causada por bactérias desta microbiota após contato com a pele ou com mucosas do recém-nascido (Polin and Comm Fetus, 2012). A de início tardio pode ser causada tanto por contaminação pela microbiota vaginal materna como por outras fontes, principalmente do ambiente hospitalar, como cateteres e má-higiene das mãos, por exemplo (Ku et al., 2015).

Cerca de 15% dos casos de meningite neonatal levam a criança a óbito em países desenvolvidos (Gaschignard et al., 2011, Heath et al., 2011). Este valor varia entre 40 e 58% nos países em desenvolvimento (Thaver and Zaidi, 2009, Furyk et al., 2011). Acredita-se que esses números estão subestimados, já que nem todos os bebês com suspeita de meningite são submetidos à coleta de líquido (Furyk et al., 2011), ou essa coleta é realizada apenas após o início do tratamento com antibióticos, apresentando um resultado falso-negativo (Stoll et al., 2011).

Apesar da diminuição da mortalidade nos últimos anos, a morbidade associada à meningite neonatal mantém-se praticamente inalterada (Heath et al., 2011). Até 50% das crianças com histórico da doença apresentam problemas

neurológicos, sendo 25% problemas severos (Heath et al., 2011, Galiza and Heath, 2009, Gaschignard et al., 2011). Entre as sequelas mais frequentes estão perda auditiva neurossensorial, convulsões, desordens motoras, retardo mental e problemas comportamentais (Gaschignard et al., 2011, Tan et al., 2015).

As principais bactérias causadoras de meningite em crianças e adultos são *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* do tipo B (Kim, 2003). Meningite neonatal, entretanto, é causada principalmente por *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* K1, responsáveis por pelo menos dois terços de todas as mortes por meningite neonatal da Europa, além de espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia*, *Streptococcus pneumoniae* e *Listeria monocytogenes* (Barichello et al., 2013). Desde os anos 1990, *E. coli* K1 emergiu como o principal agente causador da sepse precoce, uma condição que precede a meningite de início precoce, entre recém-nascidos de muito baixo peso corporal (até 1,5 kg) (Stoll et al., 2002, Ku et al., 2015). NMEC são responsáveis por 30% dos casos de meningite neonatal, sendo a principal causa da doença em recém-nascidos prematuros que apresentam muito baixo peso corporal (Ku et al., 2015). Cerca de 80% das cepas NMEC possuem o antígeno capsular K1, que confere à bactéria resistência ao soro do hospedeiro, facilitando quadros de sepse e meningite (Kim, 2003).

Para causar meningite é necessário que a bactéria colonize a mucosa do hospedeiro, atravesse a superfície epitelial e atinja a corrente sanguínea, seja capaz de sobreviver e se multiplicar no sangue, atravesse a barreira hematoencefálica e seja capaz de colonizar o sistema nervoso central. Para tanto, a

bactéria deve possuir genes que codificam proteínas que desempenhem estas funções.

1.6. Fatores associados à virulência de ExPEC

Apesar de colonizarem nichos diferentes, APEC, UPEC e NMEC compartilham genes e estratégias de virulência (Ewers et al., 2007). Para que possam causar doença, as cepas ExPEC necessitam, essencialmente, aderirem-se ao tecido que será colonizado, por meio de adesinas; sobreviverem ao efeito do soro do hospedeiro, por meio de protectinas; e serem capazes de se multiplicar em seus líquidos biológicos, seja sangue, urina ou líquor, pobres em ferro livre, possuindo sistemas sideróforos (Barbieri et al., 2013, Horn et al., 2012). ExPEC podem apresentar, adicionalmente, invasinas e toxinas.

A mera presença de genes associados à virulência no genoma de uma bactéria, entretanto, não garante que a proteína seja, de fato, expressa. As bactérias usam mecanismos específicos para mediar respostas adaptativas aos diferentes ambientes e condições de estresse encontradas no hospedeiro (Mekalanos, 1992). Sistemas reguladores podem atuar em todas as funções fisiológicas da bactéria, desde o metabolismo até expressão de genes de virulência (Zhou et al., 2003). Boa parte do que se sabe sobre a regulação dos genes de virulência de ExPEC é baseada em análise de sequência de DNA, na qual sítios conhecidos de reguladores são identificados, mas estudos experimentais de regulação de virulência vêm ganhando a atenção (Cortes et al., 2008, Crepin et al., 2012b, Barbieri et al., 2013). A seguir, serão discutidos os principais genes associados à virulência de ExPEC e um pouco de sua regulação.

1.6.1. Adesinas

Os pulmões e os sacos aéreos são as principais portas de entrada de patógenos em aves (Gross, 1961); a uretra é a principal porta de entrada para UPEC (Kaper et al., 2004); as mucosas do recém-nascido são a principal porta de entrada para NMEC (Kim, 2003), e o trato gastrintestinal é um reservatório de cepas de *E. coli* não-patogênicas e patogênicas extraintestinais, devido ao comensalismo dessa bactéria com aves e humanos (Ewers et al., 2009). A expressão de adesinas é uma forma de facilitar a passagem da bactéria do intestino para a corrente sanguínea, bem como a colonização dos tecidos específicos do hospedeiro (Stordeur et al., 2002).

1.6.1.1. Adesinas fimbriais

As adesinas mais estudadas e mais bem caracterizadas são as adesinas fimbriais. As fímbrias são filamentos ou apêndices de proteínas expressos na superfície celular das bactérias, de 1 µm de comprimento e 7 nm de largura, formadas por cerca de 1000 subunidades proteicas (Klemm et al., 2010) e podem ser de diferentes tipos (Dziva and Stevens, 2008).

1.6.1.1.1. Fímbria do tipo 1

A fímbria mais comum em ExPEC é a fímbria do tipo 1 (*fim*), codificada por um operon de nove genes (Fig. 1) (Klemm et al., 2010). A proteína FimA é a principal estrutura formadora da fímbria do tipo 1, responsável pelo “corpo” da fímbria, com cerca de mil proteínas repetidas interligadas. As proteínas FimF, FimG e FimH, com uma unidade de cada em uma fímbria, formam a estrutura da “ponta”, sendo FimH, dimérica, a mais externa e responsável pelo reconhecimento de moléculas de manose, que promove a aderência da bactéria às superfícies mucosas (Arné et al., 2000). As proteínas FimC e FimD são o

sistema “chaperona/usher”, FimC funcionando como chaperona e auxiliando no dobramento e direcionamento de todas as demais proteínas pelo periplasma, e FimD sendo ancorada à membrana externa e servindo como base para a montagem da fímbria. As recombinases FimB e FimE fazem a regulação da expressão da fímbria. FimI não possui função conhecida. Entre os genes de *fimE* e *fimA* está a região conhecida como *fimS*. Essa região possui diversos sítios de ligação de reguladores globais e o promotor do operon *fim* dentro de duas sequências inversíveis (Fig.1), que funcionam como reguladores da expressão da fímbria. Orientada pelas recombinases FimE e FimB, a mudança de fase da região *fimS* entre as sequências inversíveis vai determinar se a bactéria está no estado ON – fimbriado, ou OFF – não-fimbriado (Fig. 1) (Klemm et al., 2010, Hung et al., 2009, Kuwahara et al., 2010).

A função da fímbria do tipo 1 está bem elucidada na patogênese da infecção urinária por UPEC. A presença da fímbria do tipo 1 é essencial para que a bactéria colonize e invada células do epitélio da bexiga (Martinez et al., 2000, Mulvey et al., 1998); caso a bactéria não possua fímbria, ela poderá crescer na urina, mas não causará doença (Hunstad and Justice, 2010).

Em APEC, a função da fímbria do tipo 1 na patogênese da colibacilose aviária não está elucidada. Marc e colaboradores (Marc et al., 1998) não observaram diminuição na infecção de aves com um mutante nulo para o operon *fim* comparado ao selvagem (MT78), sugerindo que, ao contrário de UPEC, a presença da fímbria não seria determinante para a colonização bacteriana. Por outro lado, em mutantes nulos para os mais variados genes associados à virulência em APEC e cuja deleção acarreta diminuição da virulência, tem-se

frequentemente observado uma diminuição na expressão da fímbria do tipo 1. A redução da capacidade invasiva da MT78 em mutantes nulos para as supostas invasinas IbeA e IbeT pode ser consequência da redução da expressão da fímbria do tipo 1 (Cortes et al., 2008), e não pela ausência da invasina em si, como originalmente pensado (Germon et al., 2005). A redução na virulência observada em mutantes nulos para os genes do sistema de secreção do tipo VI *hcp* e *clpV* pode ser atribuída à diminuição da expressão da fímbria do tipo 1 (de Pace et al., 2010), e a deleção do gene *yadC*, do operon que codifica uma fímbria, também causou redução da expressão da fímbria do tipo 1 (Verma et al., 2015). Assim, apesar do trabalho de Marc e colaboradores (Marc et al., 1998), a fímbria do tipo 1 parece ser central na virulência de APEC.

Em NMEC, a fímbria do tipo 1 é essencial para a adesão em todas as etapas do estabelecimento da infecção, desde as mucosas até a barreira hematoencefálica (Kim, 2003).

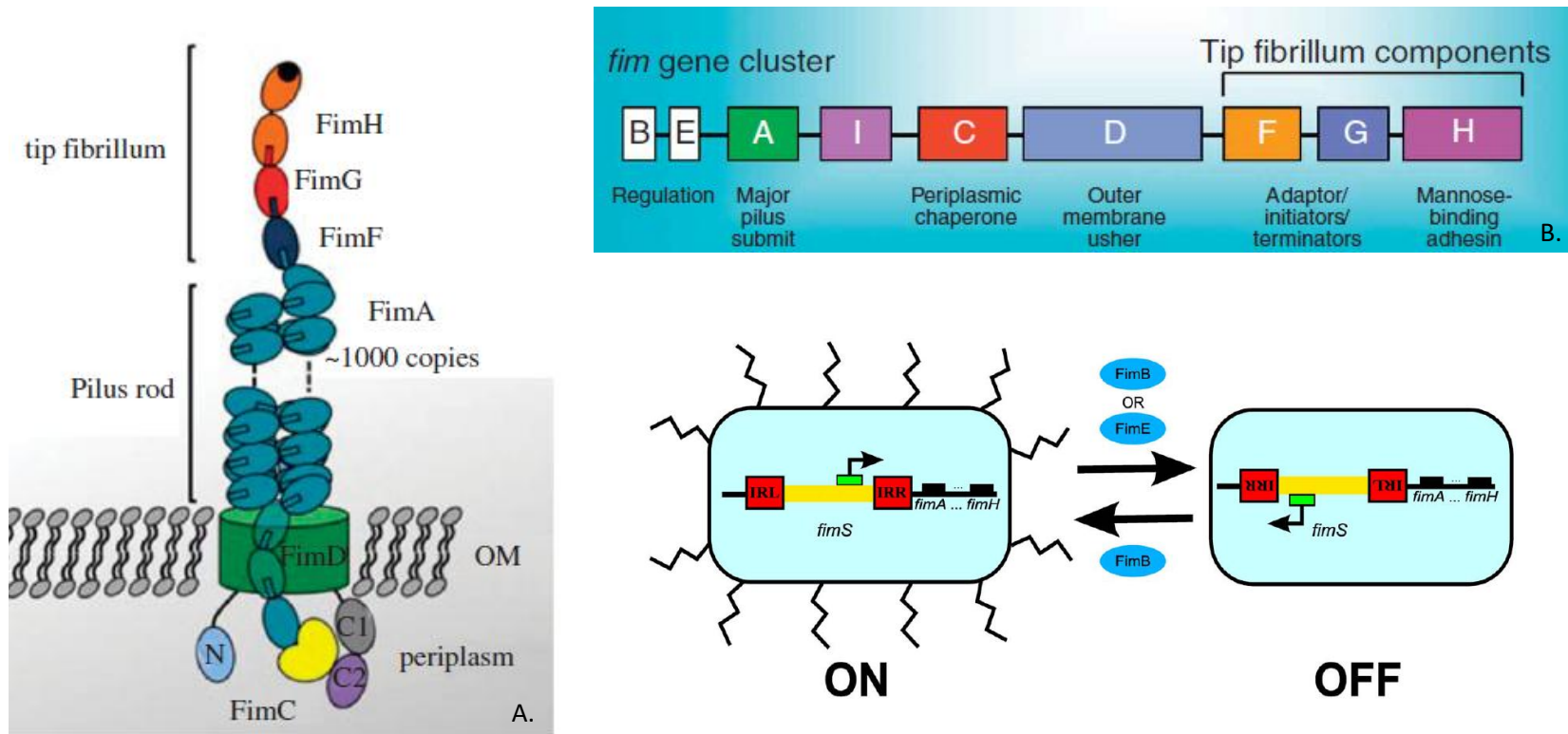


Figura 1. Fímbria do tipo 1 de *E. coli*. A. Estrutura da fímbria do tipo 1 montada na membrana externa (OM) bacteriana. Figura extraída de Busch and Waksman, 2012. B. Esquema do operon *fim*, fora de escala. Figura extraída de Hung et al., 2009. C. Região inversível de *fimS*, nas orientações ON (esquerda) e OFF (direita). Promotor do operon *fim* em verde. IRL: sequência inversível da esquerda; IRR: sequência inversível da direita. Figura extraída de Kuwahara et al., 2010.

1.6.1.1.2. Outras fímbrias

Outra fímbria importante para ExPEC, especialmente para UPEC, é a fímbria P, codificada pelo operon *pap*. Em humanos, a fímbria P está associada à pielonefrite (Sauer et al., 2000); em aves, estaria associada à colonização dos órgãos internos depois do estabelecimento da infecção inicial (Pourbakhsh et al., 1997, La Ragione and Woodward, 2002). A fímbria F1C é uma estrutura semelhante à fímbria do tipo 1; é codificada pelo operon *foc*, e sua maior subunidade é a proteína FocA (Klemm et al., 2010). A fímbria S é outra estrutura encontrada em ExPEC, sendo mais associada a NMEC (Antão et al., 2009). É codificada pelo operon *sfa* e pode ser associada à fímbria F1C no operon *sfa/foc*. Outra fímbria, presente em todas as APEC, é Curli (Ewers et al., 2007, Barbieri et al., 2013), uma estrutura fina e enrolada. É codificada pelo operon *csg* e sua maior subunidade é a proteína CsgA (Klemm et al., 2010).

1.6.1.2. Adesinas afimbriais

A adesina afimbriada Tsh (temperature-sensitive haemagglutinin), da família dos autotransportadores secretados por bactérias Gram-negativas (Stathopoulos et al., 1999), é importante para APEC por contribuir para as primeiras etapas da infecção, incluindo a colonização dos sacos aéreos (Dozois et al., 2000). Além disso, Tsh é responsável pela aglutinação de hemácias em temperaturas inferiores a 26° C (Provence and Curtiss, 1994). Outra adesina afimbriada é Afa, codificada pelo cluster gênico *afa-8*, uma das adesinas afimbriais mais frequentes em *E. coli* patogênicas humanas, e está associada a cepas ExPEC *pap*-negativas (Stordeur et al., 2002, Dziva and Stevens, 2008). Essa adesina contribui para a virulência a pintos de um dia e para a indução de

colibacilose clássica da mesma maneira que as cepas *pap*-positivas (Stordeur et al., 2004).

1.6.2. Fatores de resistência ao soro (protectinas)

ExPEC têm sua virulência aumentada devido a fatores que oferecem resistência à ação do sistema complemento e à fagocitose mediada por opsonização (Nolan et al., 2003). O plasmídeo *colV*, associado a APEC, é importante para a resistência ao soro, pois codifica o gene da colicina V - uma proteína importante na infecção de pintos de um dia (Zhao et al., 2009) -, *traT* e *iss*, cujas proteínas supostamente protegem a membrana bacteriana do ataque do sistema complemento (Dziva and Stevens, 2008). Acredita-se que a proteína TraT antagoniza a deposição de C3 (Agüero et al., 1984) e inibe a formação do complexo C5b6 (Pramoonjago et al., 1992). A proteína Iss desempenha um papel importante na resistência de APEC ao soro (Mellata et al., 2003a), e sua presença é necessária para a virulência como um todo (Tivendale et al., 2004). Entretanto, em estudo de transcriptoma realizado com a cepa APEC O1, comparando os genes expressos em caldo LB e em soro de galinha, o gene *iss* não mostrou diferença na expressão entre as duas condições (Li et al., 2011).

Outro fator de virulência bastante prevalente em cepas ExPEC é a cápsula K1 (La Ragione and Woodward, 2002). A cápsula K1 é um polissacarídeo que contém ácido polissialílico e está associado a infecções extraintestinais (Bliss et al., 1996). Além disso, esse fator de virulência possui propriedade anti-fagocítica (Van Dijk et al., 1979), pode estar envolvido na resistência ao soro (Stawski et al., 1990) e é essencial para a penetração da barreira hemato-encefálica (Kim, 2008). Os genes envolvidos na síntese e na exportação da cápsula K1 são *neuC* e

kpsMTII (Bree et al., 1989, Arrecubieta et al., 2001). Um estudo realizado pelo nosso grupo correlaciona a presença do gene *kpsMTII* a índices mais altos de patogenicidade em pintos de um dia (Barbieri et al., 2013).

A proteína OmpA, presente na maioria das cepas APEC (Barbieri et al., 2013) e essencial para a virulência de NMEC (Mittal et al., 2011), faz parte da membrana externa de *E. coli* e outras enterobactérias. Desempenha função de adesina, invasina e serve, ao mesmo tempo, como alvo do sistema imunológico do hospedeiro e como fator de resistência ao soro (Wooster et al., 2006). OmpA é sítio de reconhecimento por vários bacteriófagos (Smith et al., 2007) e está envolvida na invasão da barreira hemato-encefálica por NMEC (Kim, 2003).

1.6.3. Fatores de aquisição de ferro (sistemas sideróforos)

A habilidade de sequestrar ferro dos tecidos corporais desempenhada pelas bactérias patogênicas é essencial para sua virulência, pois o ferro é utilizado na cadeia respiratória e está em baixas concentrações nos tecidos do hospedeiro. Em APEC, essa característica está associada à letalidade de pintos de um dia (Dho and Lafont, 1984, de Brito et al., 2003). Entre os sistemas sideróforos, o sistema da aerobactina é o mais bem caracterizado e foi descrito em uma ilha de patogenicidade de *Shigella* (Vokes et al., 1999). Um estudo mostrou que o sistema da aerobactina é codificado também em uma região conservada de virulência de um plasmídeo do tipo ColV, pAPEC-O2-ColV (Johnson et al., 2006). O sistema da aerobactina é composto pelo operon *iucABCD* e pelo gene *iut*, que codificam um sideróforo hidroxamato e o receptor férrico da aerobactina (La Ragione and Woodward, 2002, Dziva and Stevens, 2008). A transformação de uma *E. coli* comensal com o plasmídeo contendo o

sistema da aerobactina aumentou a letalidade da cepa para embriões aviários e a capacidade de colonização renal em camundongos (Skyberg et al., 2006), demonstrando a importância desse sistema para a virulência. Outro fator de aquisição de ferro, também encontrado em plasmídeos do tipo ColV, é a salmoquelina, codificada pelo operon *iroBCDEN* e necessária para a virulência *in vivo* de APEC (Caza et al., 2008). A deleção simultânea de aerobactina e salmoquelina de uma cepa UPEC causou modificações abruptas no perfil do metaboloma da cepa quando crescida em urina humana, o que mostra a importância desses sistemas para UPEC (Su et al., 2016). O sistema salmoquelina também está relacionado à virulência de NMEC (Bonacorsi et al., 2003). Da mesma família da salmoquelina (sideróforos catecolatos), a enterobactina é outro sistema de aquisição de ferro, codificado pelo operon *entABCDEF* e cuja secreção pode ser essencial para a virulência de APEC, caso não haja nenhum outro sideróforo expresso pela cepa (Caza et al., 2011).

Outro sideróforo é o sistema transportador de ferro codificado pelo operon *sitABCD*. O sistema é composto por permeases, que aumentam a captura de ferro e manganês, contribuindo com a multiplicação bacteriana. Juntamente com a proteína MntH, o sistema medeia a resistência ao estresse oxidativo (Sabri et al., 2008). Outros fatores sideróforos, como *fyuA* e *irp2*, foram primeiramente descritos em *Yersinia enterocolitica*, mas também são encontrados em *E. coli* patogênicas intestinais, APEC (La Ragione and Woodward, 2002) e UPEC (Khasheii et al., 2016). O gene *ireA*, que codifica outro fator associado à captação de ferro, foi descrito em cepa UPEC e contribui para aumentar a invasão em bexiga de camundongos (Russo et al., 2001). O gene *chuA*, receptor e utilizador

de ferro heme em *E. coli*, foi descrito em APEC através de experimento por mutagênese marcada com assinatura (STM, do inglês *signature-tagged mutagenesis*) *in vivo* (Li et al., 2005), sugerindo seu papel na virulência.

O fato de as ExPEC apresentarem sistemas de aquisição de ferro com funções redundantes em seu genoma reforça a importância desses sistemas para a virulência dessas bactérias. É necessário que ao menos um sistema sideróforo esteja funcional para que a bactéria consiga sobreviver às baixas concentrações de ferro disponível nos líquidos biológicos do hospedeiro.

1.6.4. Invasinas

A invasão às células do hospedeiro permite que a bactéria se multiplique ou permaneça em estado quiescente no interior das células (Falkow, 1991). A invasão de UPEC às células de bexiga é mediada pela fímbria do tipo 1 (Kaper et al., 2004). Até o momento, não foi elucidado o processo pelo qual APEC chega à circulação sanguínea (Dziva and Stevens, 2008), mas experimentos *in vitro* e *in vivo* mostram que cepas APEC são capazes de sobreviver à ação de macrófagos (Pourbakhsh et al., 1997, Mellata et al., 2003b) e experimentos *in vitro* demonstram que pelo menos uma cepa APEC é capaz de invadir fibroblastos aviários (Matter et al., 2011).

Entre os fatores de virulência envolvidos no processo de invasão por APEC e NMEC a células de seus hospedeiros estão a proteína IbeA e o homólogo da proteína Tia, bem como os genes presentes na ilha de patogenicidade *gimB*. A proteína IbeA auxilia NMEC na invasão da barreira hemato-encefálica (Kim, 2001). Em APEC a frequência desse gene é cerca de 20% (Ewers et al., 2007, Barbieri et al., 2013), e sua provável função é auxiliar na colonização do epitélio

pulmonar (Germon et al., 2005, Moulin-Schouleur et al., 2006, Cortes et al., 2008). A expressão do gene *ibeA* também está relacionada a um aumento da expressão da fímbria do tipo 1 e à formação de biofilmes (Cortes et al., 2008, Wang et al., 2011).

A proteína Tia foi descrita na *E. coli* enterotoxigênica, desempenhando o papel de aderência e invasão de células humanas íleo-cecais e epiteliais colônicas em cultura (Fleckenstein et al., 1996). Em APEC, a proteína homóloga à Tia é codificada pelo gene *tia*, localizado em uma ilha de patogenicidade de 56 kb, a mesma que codifica o operon *pap* e outros fatores de virulência (Kariyawasam et al., 2006).

A ilha de patogenicidade *gimB*, que é característica de NMEC, está associada à manutenção dos níveis de bacteremia característicos da meningite (Bonacorsi et al., 2003). Apesar de *ibeA* e *gimB* aparecerem em baixas frequências em isolados de APEC, sua presença está correlacionada a índices mais altos de patogenicidade em pintos de um dia (Barbieri et al., 2013).

1.6.5. Toxinas

Bactérias patogênicas são capazes de produzir substâncias que, *per se*, são tóxicas ao hospedeiro. A proteína Vat (Ewers et al., 2007, Barbieri et al., 2013), codificada pelo gene *vat* em uma ilha de patogenicidade, é uma toxina característica de APEC. Essa toxina gera vacúolos na célula do hospedeiro, levando a um efeito citotóxico semelhante ao observado pela toxina VacA, de *Helicobacter pylori* (Parreira and Gyles, 2003).

Em UPEC, as toxinas mais importantes são α -hemolisina, codificada pelo gene *hlyA*, que causa hemólise no hospedeiro e é secretada por um sistema de

secreção do tipo I (Nagai et al., 1998, Finlay and Falkow, 1997), e a serino-protease codificada pelo gene *sat* (Guyer et al., 2000), que causa vacúolos nas células epiteliais do glomérulo (Kaper et al., 2004). O fator de citotoxicidade necrosante, codificado pelo gene *Cnf1/2* (De Ricke et al., 1999), é uma toxina importante para NMEC, contribuindo para o dano à barreira hemato-encefálica (Kim, 2003).

1.7. Metabolismo de trealose em *E. coli*

Trealose é um $\alpha(1\rightarrow1)$ -dímero de glicose que desempenha um papel duplo em *E. coli* e muitas outras espécies bacterianas. Esse açúcar pode ser metabolizado e usado diretamente como fonte de carbono ou, sob condições de estresse osmótico, trealose funciona como um agente osmoprotetor (Styrvoid and Strom, 1991). A enzima trealase periplasmática, TreA, degrada trealose em duas moléculas de glicose e sua expressão é induzida sob condições de osmolaridade aumentada na cepa *E. coli* K-12 (Boos et al., 1987). Sob condições de estresse osmótico, trealose pode ser sintetizada *de novo* a partir de duas moléculas de glicose pelas enzimas trealose-6-fosfato sintase (OtsA) e trealose-6-fosfato fosfatase (OtsB) no citoplasma (Giaever et al., 1988), podendo então ser novamente transladada ao periplasma, onde pode ser mantida na forma de trealose ou convertida de volta em duas glicoses por TreA, em um ciclo que regula o nível de trealose na célula (revisado em Strom and Kaasen, 1993); ou ainda pode ser utilizada como fonte de carbono, sendo degradada pela enzima trealase citoplasmática (TreF) (Horlacher et al., 1996). Em condições de isotonicidade, a cepa K-12 utiliza trealose como fonte de carbono, convertendo-a em glicose no citoplasma pela enzima trealose-6-fosfato hidrolase (TreC)

(Rimmele and Boos, 1994). A Figura 2 mostra a rota de biossíntese e degradação de trealose na cepa K-12 sob condições de estresse osmótico e isotonicidade.

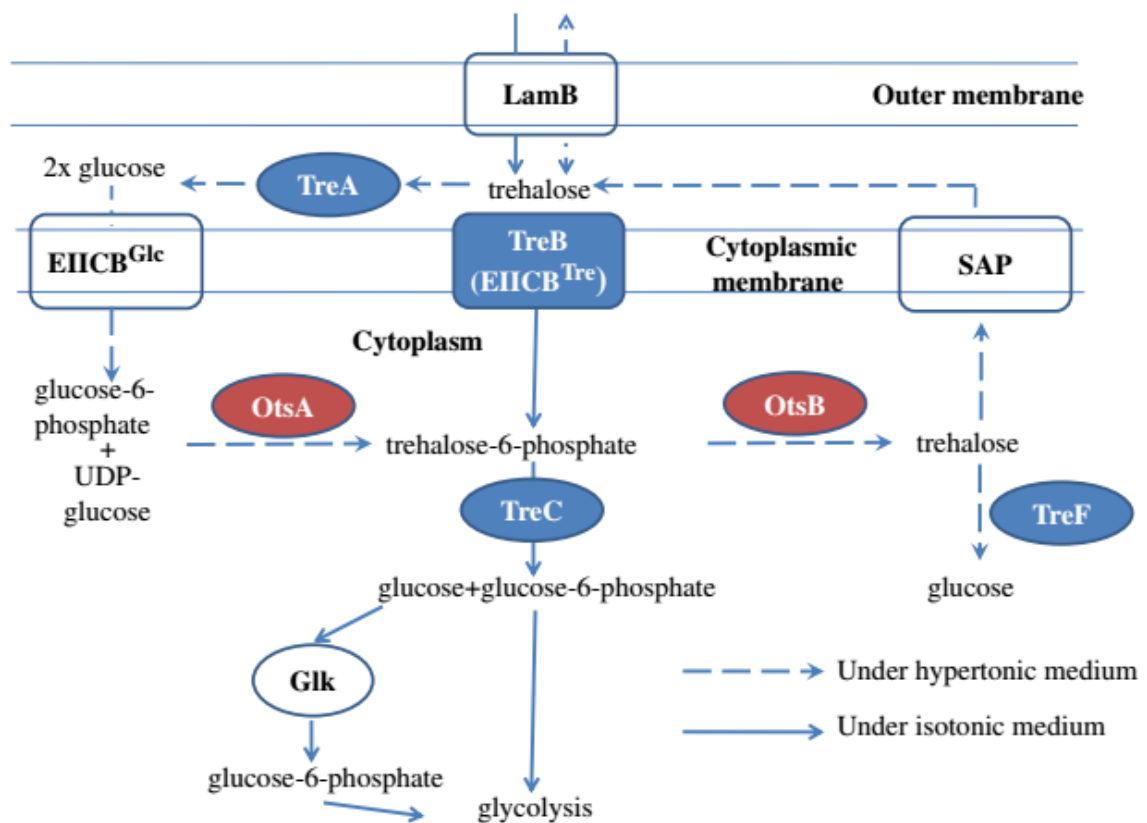


Figura 2. Vias metabólicas da trealose em *E. coli*. A glicose é transportada para as células pelo sistema glicose-fosfotransferase (EIIA^{Glc}). Sob condições hipertônicas, trealose é sintetizada pelas enzimas trealose-6-fosfato sintase (OtsA) e trealose-6-fosfatase (OtsB), usando glicose-6-fosfato e UDP-glicose como substratos. Entretanto, trealose é degradada por ambas as enzimas trealases periplasmática (TreA) e citoplasmática (TreF). A excreção de trealose é facilitada pelas proteínas ativadas por esticamento (*stretch-activated proteins* – SAP) na membrana plasmática. Sob condições isotônicas, trealose é transportada para dentro da célula pela enzima EIIcB^{Tre} (TreB) do sistema fosfotransferase. Trealose-6-fosfato é hidrolizada em glicose e glicose-6-fosfato pela enzima trealose-6-fosfato hidrolase (TreC). Glicose livre é fosforilada pela glicocinase (GK). Figura extraída e legenda traduzida de Li et al., 2012.

1.8. Metabolismo de β -glicosídeos em *E. coli*

Os açúcares β -glicosídeos são compostos de origem vegetal que consistem em uma molécula de glicose ligada por uma ligação β -1,4 a um grupamento alifático ou aromático. Os principais β -glicosídeos são arbutina e salicina, cujos grupamentos laterais são 2-hidroximetilfenil e 4-hidroxifenil, respectivamente (Harwani, 2014). Em *E. coli*, o operon *bgl* codifica as enzimas necessárias para captação e utilização de açúcares β -glicosídeos; porém a maioria das *E. coli* são incapazes de fermentar β -glicosídeos porque esse operon encontra-se silenciado (críptico) pela proteína histona H-NS (Schaeffler, 1967, Schnetz, 1995), um regulador de transcrição global em bactérias gram-negativas (Dorman, 2007). O operon *bgl* pode ser ativado por mutações no gene *hns* ou por mutações na vizinhança do promotor do *bgl* que prejudiquem a repressão pela H-NS (Schnetz, 1995). Alternativamente, o operon *bgl* pode ser transcrito se o ativador BglJ-RscB estiver ativo e inibindo H-NS (Salscheider et al., 2014).

O operon *bgl* é composto pelos genes *bglG*, *bglF*, *bglB*, *bglH*, *yieL* (*bglI*) e *yieK* (*bglK*). O gene *bglG* codifica um antiterminador que age em dois terminadores *rho* independentes que flanqueiam *bglG* (Mahadevan et al., 1987, Schnetz and Rak, 1988). *bglF* codifica uma permease PTS que fosforila e transporta arbutina e salicina. Na ausência de um indutor, BglF fosforila BglG, impedindo sua função como antiterminador (Amster-Choder et al., 1989, Schnetz and Rak, 1990). *bglB* codifica uma fosfo- β -glicosidase, que cliva salicina e arbutina fosforiladas (Harwani, 2014). A função de *bglH* não é essencial para a utilização de β -glicosídeos; BglH é uma porina de membrana externa específica

para a absorção de carboidratos (Andersen et al., 1999). Não há função descrita para os genes *yieL* e *yieK*.

Uma análise do operon *bgl* em uma coleção de 171 isolados de *E. coli* mostrou que a evolução e estado funcional do operon estão relacionados à filogenia de *E. coli*. Em isolados do grupo filogenético B2, o operon *bgl* é funcional ou apresenta um menor silenciamento pela H-NS. Já nos grupos filogenéticos A e B1, o operon acumula mutações com perda de função, enquanto no grupo filogenético D o operon apresenta perda de genes (Sankar et al., 2009). O grupo B2 concentra isolados ExPEC (Bingen et al., 1998, Picard et al., 1999, Johnson et al., 2001), sugerindo que a funcionalidade do operon *bgl* confere uma vantagem seletiva a esses patógenos.

1.9. A cepa MT78

A cepa MT78 foi isolada na França, em 1982 (Dho and Lafont, 1982), da traqueia de uma galinha com colibacilose associada à infecção por *Mycoplasma* sp. Essa cepa vem sendo estudada pelo nosso grupo e mostrou-se capaz de causar morte celular por apoptose em macrófagos (Horn et al., 2012). Em ensaios *in vivo*, a cepa MT78 foi capaz de matar sete de 18 frangos de três semanas inoculados; nos demais, causou infecção sistêmica e lesão nos órgãos internos. Também foi detectada a presença da bactéria no cérebro de uma dessas aves (dados não publicados).

Em outro estudo do nosso grupo, no qual várias cepas virulentas foram testadas em ensaios de invasão de fibroblastos aviários de linhagem CEC-32, a cepa MT78 foi a única que se mostrou invasiva, superando o controle positivo *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344. Também nesse estudo as

cepas foram genotipadas quanto a 33 genes associados à virulência. A cepa MT78 apresentou 20 deles, sendo ao menos um de cada uma das categorias anteriormente descritas (exceto toxinas) (Matter et al., 2011). Foram eles: adesinas (*crl*, *fimC* e *hrlA/hek*); invasinas (*gimB* e *ibeA*); sistemas de aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *iroN*, *irp2*, *iucD*, *sitD chr* e *sitD ep*); fatores de resistência ao soro (*iss*, *neuC*, *kpsMTII*, *ompA* e *traT*) e outros (*cvi/cva* e *Rpai*).

Analisando-se o perfil de genes de virulência das cepas não-invasivas, não foi possível encontrar diferenças entre a cepa MT78 e a cepa IMT2470 que, além de possuir todos os fatores de virulência presentes na MT78, possui três genes codificadores de adesinas (*papC*, *tsh* e *mat*), um de invasina (*tia*) e dois de toxinas (*astA* e *vat*) adicionais (Matter et al., 2011).

O fato de a MT78 ser a única cepa a apresentar comportamento invasivo, mesmo possuindo os mesmos genes de virulência de uma cepa não-invasiva, indica a possibilidade de que há genes associados à virulência que ainda não foram descritos, ou de que seus genes são regulados de maneira diferente.

Apesar de originalmente ser caracterizada como APEC, por ter sido isolada de uma galinha doente, MT78 possui genes característicos de NMEC, como *ibeA*, *gimB*, os genes que sintetizam a capsula K1, *neuC* e *kpsMTII*, e *ompA*. Apesar de não codificar fímbria do tipo P, α -hemolisina e a toxina *sat*, características de UPEC, será mostrado nesse trabalho que a MT78 é capaz de causar infecção urinária em camundongos. Portanto, a definição de APEC é limitante, e a cepa MT78 será classificada como ExPEC.

1.10. A técnica de Mutagênese Marcada com Assinatura (STM)

A disponibilidade de 16.765 genomas de bactérias sequenciados – sendo 360 sequências completas de *E. coli* (NCBI, 2017), – gerou tantos dados, que requer novas ferramentas e técnicas para analisá-los. É necessário saber o quê e como procurar as informações desejadas. A grande dificuldade é a falta de função atribuída à maioria dos genes (Raskin et al., 2006). Uma das técnicas mais atrativas para estudos genômicos de microrganismos é a Mutagênese Marcada com Assinatura (STM, do inglês Signature-Tagged Mutagenesis) (Mazurkiewicz et al., 2006).

A técnica de STM foi descrita em 1995, por Hensel e colaboradores (Hensel et al., 1995), quando 1152 mutantes de *S. enterica serovar* Typhimurium, carregando sequências únicas de DNA (*tags*), foram divididos em 12 *pools* (conjuntos) e inoculados em camundongos. Quarenta desses mutantes não foram recuperados após a inoculação nos camundongos. A região flanqueadora das *tags* inseridas em 28 desses 40 mutantes foi sequenciada. Foram encontrados genes já descritos para *S. enterica serovar* Typhimurium, genes descritos para *E. coli*, sequências similares a genes descritos para bactérias e sequências desconhecidas (Hensel et al., 1995). Esse estudo foi muito importante por ter desenvolvido uma técnica que permitiu a identificação simultânea de genes de virulência utilizando poucos animais.

A técnica de STM é promissora por permitir uma triagem (*screening*) aleatória e simultânea de todo o genoma de microrganismos, possibilitando a identificação de genes de virulência e podendo ser aplicada de várias maneiras, seja *in vivo* ou *in vitro*.

Para melhor compreender o fenótipo invasivo da cepa MT78, criamos uma biblioteca com 1710 mutantes aleatórios dessa cepa. Os mutantes foram selecionados, em pools, em ensaios de invasão a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32. Dos 1710 mutantes testados, 68 apresentaram redução na invasão (Pavanelo, 2013). Esse trabalho foi desenvolvido a partir desses mutantes potencialmente atenuados.

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo é a caracterização de mutantes com virulência atenuada selecionados de uma biblioteca de mutantes aleatórios da cepa ExPEC MT78, a fim de melhor compreender o fenótipo invasivo dessa cepa.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Descobrir quais genes da cepa MT78 estão envolvidos em seu fenótipo invasivo.

2.1.2. Verificar de que modo esses genes afetam o fenótipo invasivo da cepa MT78.

2.1.3. Determinar se esses genes afetam a virulência *in vivo* da cepa MT78.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas, plasmídeos, condições de crescimento e conservação

As cepas utilizadas neste trabalho foram os isolados clínicos de ExPEC MT78 (O2:K1), CFT073 (O6:K2:H1), isolada de pielonefrite humana nos Estados Unidos, em 1990 (Mobley et al., 1990), e seus mutantes derivados, bem como a cepa laboratorial K-12 e seus mutantes derivados. A lista completa de cepas e plasmídeos utilizados é apresentada na Tabela 1.

O crescimento das bactérias ocorreu em meio Luria-Bertani (LB), caldo BHI, meio mínimo M9 com trealose como fonte única de carbono, meio indicador com azul de bromotimol e arbutina ou salicina como fontes únicas de carbono, ou urina humana, a 30 °C ou 37 °C. A urina utilizada foi uma mistura da urina doada por três mulheres que não estavam em período menstrual nem fazendo uso de antimicrobianos, filtrada em filtros de 0,2 µm de poro e armazenada a 4 °C. Todos os experimentos foram realizados com a mesma urina. Os antibióticos utilizados foram ampicilina (100 µg/mL), canamicina (50 µg/mL), ácido nalidíxico (30 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL). Os estoques das cepas foram conservados em caldo LB em 20% de glicerol a -80 °C.

Tabela 1. Cepas e plasmídeos utilizados nesse estudo.

Cepa/plasmídeo	Característica	Resistência	Referência/fonte
MT78	Cepa selvagem ExPEC	Ácido nalidíxico (intrínseca)	(Dho and Lafont, 1982)
MT78ΔtreA	Mutante <i>treA::Km</i>	Ácido nalidíxico e canamicina	Esse estudo
MT78ΔtreA/treA⁺	Mutante <i>treA::Km</i> complementado <i>treA+cat</i>	Ácido nalidíxico, canamicina e cloranfenicol	Esse estudo
MT78ΔtreA/pWSK29-treA	Mutante <i>treA::Km</i> complementado com plasmídeo pWSK29 + <i>treA</i>	Ácido nalidíxico, canamicina e ampicilina	Esse estudo
MT78ΔotsBA	Mutante <i>otsBA::cat</i>	Ácido nalidíxico e cloranfenicol	Esse estudo
MT78ΔtreAΔotsBA	Mutante <i>treA::Km otsBA::cat</i>	Ácido nalidíxico, canamicina e cloranfenicol	Esse estudo
MT78ΔbglB	Mutante <i>bglB::Km</i>	Ácido nalidíxico e canamicina	Esse estudo
MT78Δbgl	Mutante <i>bgl::Km</i> (Δ <i>bglGFBHΔyeLK</i>)	Ácido nalidíxico e canamicina	Esse estudo
Mutante MT78 7A2	Mutante STM <i>fimA::Tn5</i>	Ácido nalidíxico e canamicina	Esse estudo
Mutante MT78 8C6	Mutante STM <i>fimI::Tn5</i>	Ácido nalidíxico e canamicina	Esse estudo
Mutante MT78 8C11	Mutante STM <i>ydeO::Tn5</i>	Ácido nalidíxico e canamicina	Esse estudo
Mutante MT78 8E12	Mutante STM <i>ibeR::Tn5</i>	Ácido nalidíxico e canamicina	Esse estudo
Mutante MT78 8F1	Mutante STM <i>yngF::Tn5</i>	Ácido nalidíxico e canamicina	Esse estudo
Mutante MT78 8G4	Mutante STM <i>treA::Tn5</i>	Ácido nalidíxico e canamicina	Esse estudo
Mutante MT78 20E12	Mutante STM <i>bglB::Tn5</i>	Ácido nalidíxico e canamicina	Esse estudo

CFT073	Cepa selvagem UPEC	Nenhuma	(Mobley et al., 1990)
CFT073ΔtreA	Mutante <i>treA</i> ::Km	Canamicina	Esse estudo
CFT073ΔbglB	Mutante <i>bglB</i> ::Km	Canamicina	Esse estudo
CFT073Δbgl	Mutante <i>bgl</i> ::Km (Δ <i>bglGFBH</i> Δ <i>yieLK</i>)	Canamicina	Esse estudo
S17-1 λ pir	Cepa conjugativa para a criação da biblioteca de mutantes; derivada da K-12	Nenhuma	(Li et al., 2005)
DH5α	Cepa-vetor; derivada da K-12	Nenhuma	Bathesta Laboratories
pWSK29	Plasmídeo de baixo número de cópias para complementação plasmidial de <i>treA</i>	Ampicilina	(Wang and Kushner, 1991)
pUT-mini-Tn5$km2$	Plasmídeo usado para a criação da biblioteca de mutantes (90 diferentes <i>tags</i> no transposon)	Ampicilina e canamicina	(De Lorenzo et al., 1990, Hensel et al., 1995, Li et al., 2005)
pKD46	Plasmídeo que codifica a recombinase, usado para mutação não-polar e complementação	Ampicilina	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD3	Plasmídeo usado como molde para amplificação do cassete de cloranfenicol	cloranfenicol	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD4	Plasmídeo usado como molde para amplificação do cassete de canamicina	Canamicina	(Datsenko and Wanner, 2000)
pGPTn7-Cm	Plasmídeo usado na complementação	Ampicilina e cloranfenicol	(Crepin et al., 2012a)

3.2. Amplificação da região de inserção do transposon nos mutantes STM

A biblioteca de mutantes foi confeccionada em meu trabalho de mestrado (Pavanelo, 2013). Para determinar a região na qual o transposon Tn5km2 inseriu-se aleatoriamente nos mutantes STM atenuados, foram feitas reações de *Nested* PCR. Primeiramente, foram feitas quatro reações (reação 1) com o mesmo oligonucleotídeo iniciador (daqui em diante chamado de *primer*) *forward*, que contém a mesma sequência da extremidade O do transposon (P9), e quatro *primers reverse* compostos por uma sequência aleatória e uma sequência determinada (Arbi 1, 3, 4 e 5). Após, os produtos das quatro reações anteriores foram usados como molde e amplificados (reação 2) com os *primers* P6, específico do transposon, e Arbi 2, que possui a mesma sequência determinada dos *primers* Arbi 1, 3, 4 e 5, excluindo a região aleatória (ver Tabela 2) (Li et al., 2005). A cepa MT78 selvagem foi usada como controle. Uma banda de DNA exclusiva para cada mutante foi purificada do gel de agarose com kit adequado (Gel Extraction kit, Mobil) e os fragmentos foram sequenciados por Sanger no centro de Sequenciamento Génome Québec, McGill University, Montreal. Condições da PCR: Reação 1 – seis ciclos de 95 °C por 30 s, 30 °C por 40 s e 72 °C por 90 s (aumento de 5 s a cada repetição); 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 45 °C por 40 s e 72 °C por 2 min (aumento de 5 s a cada repetição). Reação 2 – 35 ciclos de 95 °C por 45 s, 45 °C por 45 s e 72 °C por 90 s (aumento de 5 s a cada repetição).

As sequências geradas pelo sequenciamento foram analisadas no programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) e comparadas com o

genoma de outras *E. coli*. Todos os *primers* utilizados no trabalho estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados nesse estudo.

Nome	Sequência 5'-3'	Função	Referência
P6	CCT AGG CGG CCA GAT CTG AT	Amplificação da região de inserção do transposon	(Li et al., 2005)
P9	CGC AGG GCT TTA TTG ATT C	Amplificação da região de inserção do transposon	(Li et al., 2005)
Arbi 1	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN GAT AT	Amplificação da região de inserção do transposon	(Li et al., 2005)
Arbi 2	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	Amplificação da região de inserção do transposon	(Li et al., 2005)
Arbi 3	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN TGA CG	Amplificação da região de inserção do transposon	(Li et al., 2005)
Arbi 4	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN ACG CC	Amplificação da região de inserção do transposon	(Li et al., 2005)
Arbi 5	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN TAC NG	Amplificação da região de inserção do transposon	(Li et al., 2005)
treA_F	CGT AAT CGG CAT ACC AGC CT	Verificação da presença do gene <i>treA</i>	Esse estudo
treA_R	TGT TGA AAA CCT GCA AGC CG	Verificação da presença do gene <i>treA</i> e da complementação cromossômica de <i>treA</i>	Esse estudo
treAKO_F	ATG AAA TCC CCC GCA CCT TCT CGC CCG CAA AAA ATG GCG TTA ATT CCA GCG TGT AGG CTG GAG C TG CTT C	Mutação do gene <i>treA</i>	Esse estudo
treAKO_R	GGA CGC GTC GCC GGA ACA TTG TCA CAC GGT TGC TCT TTC GGG CAG ATC AAA TGG GAA TTA GCC ATG GTC C	Mutação do gene <i>treA</i>	Esse estudo
KOotsA_F	TAG TTC CAC TTA CGG GAG ATT AAC CGC TCC TAC GCA AGC TTT GGA AAG GTA TGG GAA TTA GCC ATG GTC C	Mutação dos genes <i>otsBA</i>	Esse estudo
KOotsB_R	AGC GCG TTC TGC GCA ACA CAA TAA GAA AAG AGA AGG AGG AGA ACC GGG TGG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	Mutação dos genes <i>otsBA</i>	Esse estudo
bgIBKO_F	CAT CCA GAC TGT TCT GAA TGC GAC GAT AAT TAA GGT GCT TTA TTG GTT ATG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	Mutação do gene <i>bgIB</i>	Esse estudo

bglBKO_R	GTG AGC CGC TGT TAT CCA TCA TTC GCT AAC GAT AAA AGG AGT TAA TTA TGA TGG GAA TTA GCC ATG GTC C	Mutação do gene <i>bglB</i>	Esse estudo
bglGKO_F	AAT ACT GGT GAA GTC GGG TTT TTT TGT TTA TAA AAA AGG TCC TTG CTA TGA TGG GAA TTA GCC ATG GTC C	Mutação do operon <i>bgl</i>	Esse estudo
yleKKO_R	ATT CAC ACA TCC GGC CTT ATT TTT AAG CTT AAC CGA GCG CTA ATT CTG CGG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	Mutação do operon <i>bgl</i>	Esse estudo
QFtreApWSK29compl_F	GTA CCG GGC CCC CCC TCG AGT CCG GCA ATT TAC TCT GCA CT	Clonagem do gene <i>treA</i> no plasmídeo pWSK29	Esse estudo
QFtreApWSK29compl_R	TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC AGG GAG AAT GGG GAG TGG GGG	Clonagem do gene <i>treA</i> no plasmídeo pWSK29	Esse estudo
QFtreAcompl_F	CCG GGC CCA AGC TTC TCG AGT CCG GCA ATT TAC TCT GCA CT	Clonagem do gene <i>treA</i> no plasmídeo pGPTn7Cm e amplificação do fragmento <i>treA-cat</i> para complementação cromossômica	Esse estudo
QFtreATn7compl_R	CCC CGG GCT GCA GGA ATT CAG GGA GAA TGG GGA GTG GGG G	Clonagem do gene <i>treA</i> no plasmídeo pGPTn7Cm	Esse estudo
Dat_treA_compl_R	CGG CGA AAT AGA GTG ATA AAA TAA CAT CTG TTT ATT AGT CAG CCA GCG ACA AGC TTT CAG AAC GCT CGG TTG CCG C	Amplificação do fragmento <i>treA-cat</i> para complementação cromossômica	Esse estudo
screening_otsAB_F	TGC AAA TGG CGA CCC CCG TC	Conferência da mutação de <i>otsBA</i>	Esse estudo
screening_otsAB_R	AGC TGC GCC GAT GCT TGA AGA	Conferência da mutação de <i>otsBA</i>	Esse estudo
screen_bglB_R	CGA TTC ACC GTC GCT GGC GT	Conferência da mutação de <i>bglB</i>	Esse estudo
screen_bgl_R	TGG AGA ACA GGC CGG AGC GT	Conferência da mutação do operon <i>bgl</i>	Esse estudo
screening_treAKO_F	ACC GTT CGG ATG GCA TCA TT	Conferência da mutação de <i>treA</i>	Esse estudo
K1	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	Conferência da mutação dos genes <i>treA</i> , <i>bglB</i> e do operon <i>bgl</i> e da complementação	Esse estudo

cromossômica de <i>treA</i>			
Pri3	TCG TTT TGC CGG ATT ATG GG	Verificação da orientação de <i>fimS</i>	(Crepin et al., 2012b)
Pri4	AGT GAA CGG TCC CAC CAT TAA CC	Verificação da orientação de <i>fimS</i>	(Crepin et al., 2012b)

3.3. Geração de mutantes específicos

Os mutantes específicos foram gerados pela técnica de lambda red (Datsenko and Wanner, 2000). Os *primers* foram desenhados com a porção 5' contendo 50 nt de homologia com as regiões inicial (*primers forward*) e final (*primers reverse*) do gene a ser mutado e a porção 3' contendo 20 nt para amplificar o cassete de resistência à canamicina ou ao cloranfenicol. Os cassetes foram amplificados a partir dos plasmídeos pKD3 (cloranfenicol) ou pKD4 (canamicina) e os fragmentos gerados possuíam, além do cassete de resistência, 50 pb de homologia com o gene a ser mutado nas duas extremidades do cassete. O plasmídeo pKD46, que codifica a enzima recombinase sob expressão de um promotor sensível a arabinose, foi usado para transformar as cepas a serem mutadas por eletroporação. A cepa a ser mutada transformada, contendo o plasmídeo pKD46, foi novamente tornada eletrocompetente agora na presença de arabinose (100 mM), de modo a expressar a enzima recombinase. O fragmento contendo o cassete de resistência mais as regiões de homologia com o gene a ser mutado foi inserido por eletroporação na cepa a ser mutada. A enzima recombinase fez a troca do gene a ser mutado pelo cassete de resistência, por reconhecimento de homologia de sequência. O mutante é, então, crescido na presença do antibiótico para o qual o cassete confere resistência e o plasmídeo pKD46, que é sensível à temperatura, é perdido. Os *primers* utilizados para a

geração dos mutantes específicos estão descritos na Tabela 2. As mutações para os genes *treA*, *bglB* e para o operon *bgl* (*bglGFBHyieLK*) foram feitas com o cassete de canamicina; para os genes *otsBA*, com o de cloranfenicol.

3.4. Complementação plasmidial do gene *treA*

O gene *treA* junto com sua região promotora foi amplificado a partir do DNA da cepa MT78 WT com *primers* contendo sítios para as enzimas de restrição XhoI e EcoRI. O fragmento gerado e o plasmídeo de baixo número de cópias pWSK29 foram digeridos com essas enzimas e ligados com a enzima T4 DNA-ligase. O plasmídeo pWSK29 contendo o fragmento *treA* foi usado para transformar, por choque térmico, a cepa DH5 α . Foi feita a extração de plasmídeo da cepa DH5 α contendo o plasmídeo pWSK29-*treA* e este foi usado para transformar o mutante MT78 Δ *treA* por eletroporação. A presença do gene foi confirmada por PCR (*primers treA_F* e *treA_R*) e pela presença do plasmídeo na cepa.

3.5. Complementação cromossômica do gene *treA*

O gene *treA* junto com sua região promotora foi amplificado a partir do DNA da cepa MT78 WT com *primers* contendo sítios para as enzimas de restrição XhoI e EcoRI. O fragmento gerado e o plasmídeo pGPTn7Cm foram digeridos com essas enzimas e ligados com a enzima T4 DNA ligase. O plasmídeo pGPTn7Cm contém um cassete de resistência ao cloranfenicol (*cat*) à jusante de sua região de clonagem (Fig. 3A). O plasmídeo pGPTn7Cm contendo o fragmento *treA* (promotor + gene) foi usado para transformar, por choque térmico, a cepa DH5 α . Foi feita a extração de plasmídeo da cepa DH5 α contendo o plasmídeo pGPTn7Cm-*treA* e este foi usado como molde para a amplificação do fragmento *treA-cat* (Fig. 3AB), utilizando o primer QF*treA*compl_F (Tabela 2) e o *primer*

reverse (Dat_treA_compl_R), que contém, em sua região 5', 50 nt de homologia com a região final do promotor do gene *treA* (Fig. 3B). O fragmento *treA-cat* possui, portanto, homologia com a porção inicial do promotor de *treA* na sua região 5' e com a final na sua região 3' (Fig. 3B). Esse fragmento foi usado para transformar o mutante MT78 Δ *treA* – contendo o plasmídeo pKD46 e tornado eletrocompetente na presença de arabinose – por eletroporação, da mesma forma como os mutantes específicos foram gerados. O mutante com complementação cromossômica possui os cassetes de resistência ao cloranfenicol e à canamicina (oriundo da mutação específica) à jusante do gene *treA* reinserido (Fig. 3C). A complementação cromossômica está esquematizada na Figura 3.

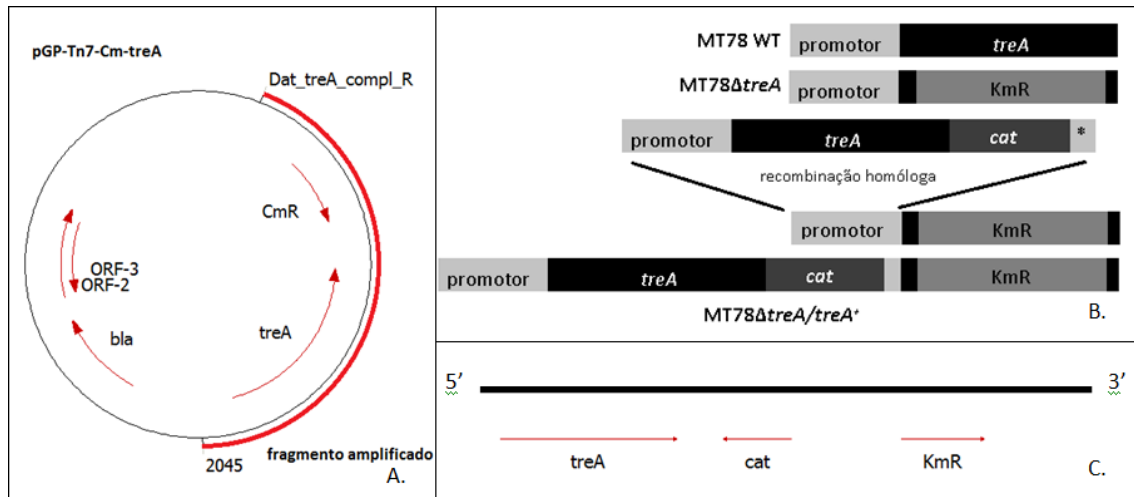


Figura 3. Esquema da complementação cromossômica do gene *treA*. A. Plasmídeo pGPTn7Cm com o fragmento *treA* clonado. O gene *cat* está indicado (CmR) à jusante do gene *treA*. A linha vermelha externa ao plasmídeo indica o fragmento *treA-cat*, amplificado com os *primers* *Dat_treA_compl_R* e *QFtreA_compl_F* (2045). B. Representação, fora de escala, do gene *treA* e seu promotor na cepa selvagem; inserção do cassete de canamicina (KmR) no lugar do gene *treA* no mutante *MT78ΔtreA*; e complementação do mutante *MT78ΔtreA* com a inserção do fragmento *treA+cat*, por recombinação homóloga, no promotor original de *treA*. *: sequência de 50 pb de homologia com o final do promotor de *treA*. C. Esquema da região após mutação e complementação. O gene *treA* original encontrava-se onde está o cassete de resistência à canamicina (KmR); no lugar do promotor original de *treA* foram inseridos um novo promotor, com a mesma sequência, seguido do gene *treA* e do cassete de resistência ao cloranfenicol. As setas indicam a orientação dos genes e estão todas em escala.

3.6. Determinação da expressão da fímbria do tipo 1 por aglutinação de levedura

As culturas bacterianas foram crescidas durante 24 h estaticamente, ou até a fase mid-log ($OD_{600} \sim 0,6$) em agitação, em meio LB, ou durante 24 h sob agitação em urina humana. Uma suspensão inicial de aproximadamente 10^{11} bactérias em PBS foi diluída serialmente 1:2 em poços de microtitulação, aos quais foram adicionados volumes iguais de uma solução de 1,5% de levedura comercial (naturalmente recobertas de manose) em PBS. Após 30 minutos no gelo, a aglutinação foi monitorada visualmente e o título mais diluído apresentando aglutinação foi determinado (Crepin et al., 2012b).

3.7. Determinação da orientação da região *fimS*

Para determinar a orientação da região *fimS*, que contém o promotor do operon da fímbria do tipo 1, as bactérias foram crescidas em caldo LB estaticamente por 24 h e 48 h, ou sob agitação até a fase mid-log. Um volume de 125 μ L de cada cultura foi centrifugado por 5 min a 12000 x *g*, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi utilizado para extração de DNA por lise alcalina. A região *fimS* foi amplificada com os *primers* Pri3 e Pri4 (Tabela 2), gerando um fragmento de 650 pb. Este fragmento foi purificado e digerido com a enzima Hinfl (ThermoScientific, Sinapse Biotecnologia, São Paulo) por 4 horas. Os fragmentos gerados pela digestão foram submetidos a eletroforese com gel de agarose a 2%. Para orientação “ON”, são observados fragmentos de 522 pb e 128 pb, para “OFF”, 411 pb e 139 pb (Crepin et al., 2012b).

3.8. Cultura de fibroblastos

Foi cultivada, *in vitro*, uma linhagem transfectada estável de fibroblastos embrionários aviários, CEC-32 (Kaaden et al., 1982) – doados pelo Prof. Bernd Kaspers (Universidade de Munique, Munique, Alemanha) – para uso nos ensaios de invasão. Essas células foram usadas como um modelo de células não-fagocitárias (Matter et al., 2011). As células foram mantidas em estufa úmida, a 37 °C com 5% de CO₂, em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. O cultivo se deu em garrafas de cultura com superfície de 75 cm². Para os experimentos, foram plaqueadas 5 x 10⁴ células por poço, em placas de 96 poços (Matter et al., 2011).

3.9. Cultura de células uroteliais

As células uroteliais humanas da linhagem 5637 (American Type Culture Collection HTB-9) foram utilizadas como modelo de infecção urinária *in vitro*. O cultivo foi feito em RPMI com 10% de soro fetal bovino em garrafas de cultura com superfície de 75 cm². Para os experimentos, foram plaqueadas 5 x 10⁴ células por poço, em placas de 96 poços.

3.10. Ensaios de adesão e invasão

Para os ensaios com as células CEC-32, as bactérias foram crescidas em 5 mL de caldo LB estaticamente durante a noite a 37 °C. A partir de 1% (v/v) desse pré-inóculo, as bactérias foram crescidas sob agitação de 240 rpm em 10 ou 20 mL de caldo LB em Erlenmeyer a 37 °C até o meio da fase exponencial (densidade óptica de aproximadamente 0,6 em $\lambda = 600$ nm), quando o número de bactérias por mL de inóculo é de aproximadamente 2,4 x 10⁸.

As células foram infectadas em uma multiplicidade de infecção (MOI, do inglês *multiplicity of infection*) de 10 bactérias por célula. O volume desejado de

bactérias foi centrifugado a 4.000 x g por 10 minutos, e o sedimento foi ressuspenso em um determinado volume de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, de modo que cada poço de células fosse infectado com 20 µL da suspensão. As células foram lavadas com PBS e infectadas com um total de 200 µL de meio, com ou sem bactérias (controles), e incubadas por 1 hora em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂. Após, as células foram lavadas três vezes com PBS e as destinadas ao ensaio de adesão foram lisadas com 20 µL de Triton X-100 (Sigma, Streinheim, Alemanha) 1% (v/v) por 5 minutos à temperatura ambiente, seguido de diluição com 180 µL de PBS, diluição seriada e plaqueamento para a determinação do número de UFC.

As células destinadas ao ensaio de invasão foram reincubadas com 200 µL de meio e 50 µg/mL de gentamicina – para matar qualquer bactéria que tenha permanecido extracelular – por mais 3 horas e então lisadas, diluídas e plaqueadas para determinação do número de UFC.

Para os ensaios com as células uroteliais 5637, as bactérias foram crescidas em urina humana sob agitação de 240 rpm durante a noite a 37 °C. Após a determinação do volume necessário de bactérias para uma MOI de 10 UFC/célula, as bactérias foram centrifugadas por 10 min a 4000 x g e ressuspendidas em uma quantidade de meio (RPMI + 10% de soro fetal bovino) suficiente para que cada poço fosse infectado com 20 µL. Após a infecção, a placa com as células foi centrifugada a 500 x g por 5 minutos para sincronizar a adesão das bactérias e manter o efeito do crescimento em urina. Apenas o ensaio de adesão foi realizado com essas células uma vez que as cepas MT78 e CFT073 não são capazes de invadi-las.

Os ensaios de adesão foram realizados em presença e ausência de 3% de D-manose ou D-manopiranosose para a observação da adesão independente de fímbria do tipo 1.

Para a determinação da MOI exata, parte do inóculo utilizado foi diluída serialmente e plaqueada. Foi feita uma razão entre o número de bactérias recuperadas dos ensaios de adesão ou invasão com o número de bactérias da MOI exata para expressar a percentagem de inóculo que aderiu ou invadiu as células.

3.11. Crescimento em diferentes osmolaridades

O crescimento da cepa MT78 WT e do mutante MT78 Δ treA foi testado em caldo LB com diferentes concentrações de NaCl. Em uma microplaca, as cepas foram inoculadas 1:100 em 200 μ L de caldo LB (apenas peptona e extrato de levedura) contendo 0; 0,01; 0,1; 0,3; 0,5 e 1 M de NaCl e incubadas por 19 h a 37 °C sob agitação média em um BioscreenC™ (Growth Curves USA, Piscataway, NJ, USA). A OD₆₀₀ foi medida a cada 15 minutos. As curvas de crescimento foram geradas a partir dos valores de densidade óptica.

3.12. Ensaio *in vivo*

Camundongos-fêmea da linhagem CBA/J, com cinco semanas de idade, foram infectados via uretra com um inóculo de 20 μ L contendo $\sim 2 \times 10^9$ UFC. As bactérias foram crescidas em caldo BHI por 6 h em 5 mL e inoculadas 1:100 em 250 mL seguido de crescimento por 18 h, sempre sob agitação de 240 rpm. Após, o inóculo foi concentrado por sucessivas centrifugações a 4000 x g e congelado. Antes da infecção, uma alíquota foi descongelada, diluída e plaqueada para determinar o número de UFC, de modo a garantir que no momento da infecção os

animais infectados com as diferentes cepas recebessem a mesma quantidade de bactérias. Foram usados dez animais para cada cepa. Após 48 h, os animais foram sacrificados e os rins e a bexiga homogeneizados e plaqueados em ágar MacConkey para a determinação do número de colônias (Crepin et al., 2012b). Os ensaios *in vivo* foram realizados no centro de experimentação animal do Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), com aprovação do comitê de ética dessa instituição.

3.13. Análise da fermentação dos β -glicosídeos

Para a análise da fermentação dos β -glicosídeos, as cepas MT78 WT, CFT073 WT e os mutantes MT78 Δ *bglB*, MT78 Δ *bgl*, CFT073 Δ *bglB*, CFT073 Δ *bgl* e o mutante STM 20E12 (*bglB*::Tn5) foram plaqueados em placas de azul de bromotimol na presença dos açúcares salicina ou arbutina (Schnetz et al., 1987). A funcionalidade do operon *bgl* e o aparecimento de papilas nas colônias, indicativas de um operon funcional porém silenciado, foram analisadas após 4 dias de incubação a 37° C e 28° C.

3.14. Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína FimH

As sequências de aminoácidos da proteína FimH das cepas CFT073 (Genbank: AE014075.1), IMT5155 (Genbank: CP005930.1) e MT78 (não tornada pública) foram alinhadas no servidor Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (Sievers et al., 2011).

4. RESULTADOS

4.1. Sete de 27 mutantes testados individualmente foram confirmados como atenuados para invasão

A partir de uma biblioteca de mutantes criada pela técnica de mutagênese marcada com assinatura, 1710 mutantes foram testados em grupos de 90 para sua capacidade de invasão a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32 (Pavanelo, 2013). Vinte e sete mutantes possivelmente atenuados foram testados individualmente para suas capacidades de adesão e invasão aos fibroblastos aviários da linhagem CEC-32. Conforme mostrado na Figura 4, três mutantes se mostraram atenuados para adesão e sete para invasão, três dos quais não foram sequer capazes de invadir as células. Estes sete mutantes, 7A2, 8C6, 8C11, 8E12, 8F1, 8G4 e 20E12 tiveram a região de inserção do transposon sequenciada e o gene responsável pela atenuação identificado.

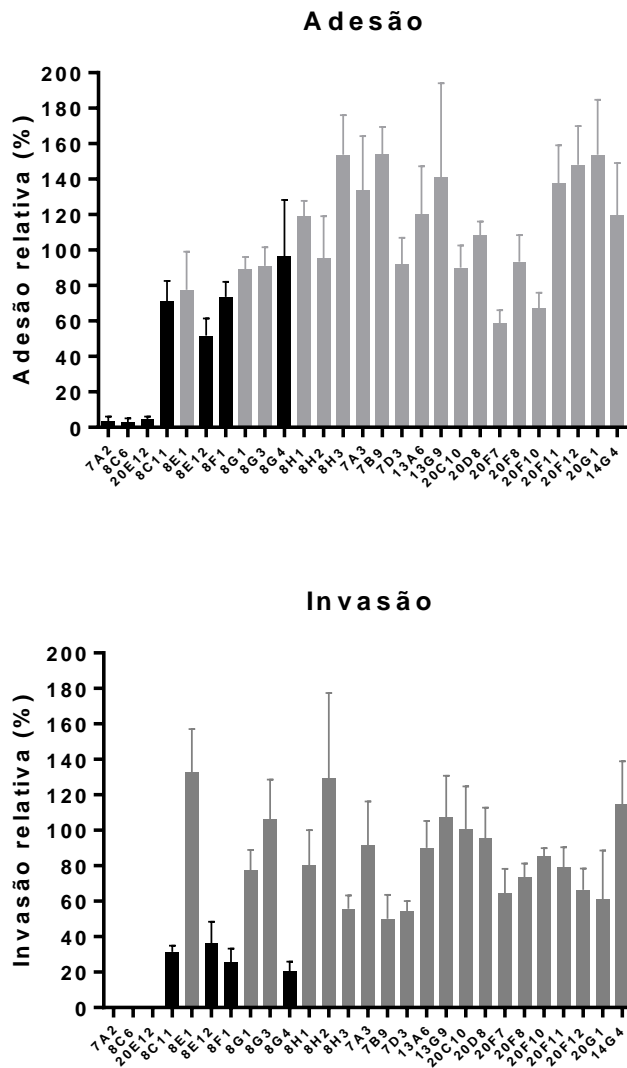


Figura 4. Adesão e invasão de fibroblastos aviários da linhagem CEC-32 por mutantes STM possivelmente atenuados. Adesão (superior) e invasão (inferior) dos mutantes STM testados individualmente, em relação à cepa MT78 WT (100%). Em preto os sete mutantes que tiveram a região de inserção do transposon sequenciada. Média \pm erro padrão de pelo menos três replicatas biológicas.

4.2. Identificação dos genes responsáveis pela atenuação da capacidade de invasão dos mutantes

A região de inserção do transposon foi sequenciada conforme descrito no item 3.2, e a sequência gerada foi analisada em bancos de dados para a determinação do gene responsável pela atenuação dos mutantes.

4.2.1. Mutante 7A2

O transposon do mutante 7A2 inseriu-se no gene *fimA*, que codifica a proteína estrutural e mais abundante da fímbria do tipo 1 (Orndorff and Falkow, 1985).

4.2.2. Mutante 8C6

O transposon do mutante 8C6 inseriu-se no gene *fimI*. Apesar de ter sua função desconhecida, esse gene faz parte do operon da fímbria do tipo 1 e sua ausência gera uma bactéria não-fimbriada (Valenski et al., 2003).

4.2.3. Mutante 8C11

O transposon do mutante 8C11 inseriu-se no gene *ydeO*, um regulador de transcrição que regula a resposta celular ao estresse ácido (Masuda and Church, 2002).

4.2.4. Mutante 8E12

O transposon do mutante 8E12 inseriu-se no gene *ibeR*, regulador do gene *ibeA*. O gene *ibeA* está envolvido com a expressão da fímbria do tipo 1 (Cortes et al., 2008), com a invasão do microendotélio cerebral (Maruvada and Kim, 2012) e com a

resistência ao estresse causado pelo peróxido de hidrogênio (Flechard et al., 2012).

4.2.5. Mutante 8F1

O transposon do mutante 8F1 inseriu-se no gene *ymgF*, que codifica uma proteína envolvida na maquinaria de divisão celular em *E. coli* (Karimova et al., 2009).

4.2.6. Mutante 8G4

O transposon do mutante 8G4 inseriu-se no gene *treA*, que codifica a trealase periplasmática (Boos et al., 1987).

4.2.7. Mutante 20E12

O transposon do mutante 20E12 inseriu-se no gene *bglB*, que codifica a enzima fosfo- β -glicosidase B (Schnetzer et al., 1987).

Três mutantes, 7A2, 8C6 e 8E12, apresentaram inserções em genes relacionados à expressão da fímbria do tipo 1, sendo dois componentes do próprio operon da fímbria e um relacionado à sua regulação. Como a fímbria do tipo I é uma estrutura bacteriana essencial à adesão e conseqüentemente invasão celular, a identificação desses mutantes serve para validar a seleção dos mutantes.

Os mutantes 8G4 (atenuado para invasão) e 20E12 (atenuado para adesão e invasão) apresentaram inserções em genes de metabolismo de carboidratos. Esses mutantes foram escolhidos para serem caracterizados neste trabalho, já que o metabolismo de carboidratos está envolvido na bioquímica básica dos microrganismos, em sua adaptação ao meio e, conforme indicou a seleção dos mutantes atenuados, na invasão de células do hospedeiro. Esses mutantes foram

escolhidos para serem caracterizados neste trabalho, pois embora as rotas metabólicas dos carboidratos trealose e β -glicosídeos e a vantagem adaptativa conferida por elas estejam elucidadas em *E. coli*, não se sabe como essas rotas interfeririam na capacidade de invasão de células do hospedeiro, conforme indicou a seleção dos mutantes atenuados. Os mutantes 8C11 e 8F1 não foram caracterizados nesse trabalho.

4.3. O mutante MT78 Δ *treA* cresceu em diferentes concentrações de sal

O metabolismo de trealose é um dos sistemas que responde ao estresse osmótico e foi caracterizado na *E. coli* de laboratório K-12 (Styvold and Strom, 1991, Strom and Kaasen, 1993). Então o crescimento da cepa MT78 WT e do mutante MT78 Δ *treA* (mutante específico, gerado pela técnica de lambda red, conforme descrito em 3.3) foi testado em meio LB modificado, contendo diferentes concentrações de NaCl, ou seja, diferentes osmolaridades, e monitorado a cada 15 minutos durante 19 horas em um leitor de placas BioscreenCTM. No meio LB modificado o mutante apresentou a mesma curva de crescimento que a cepa selvagem em todas as concentrações de NaCl (Fig. 5). Isso indica que a perda de TreA não tem um efeito no crescimento das bactérias em altas concentrações de sal, que causam um grande estresse osmótico.

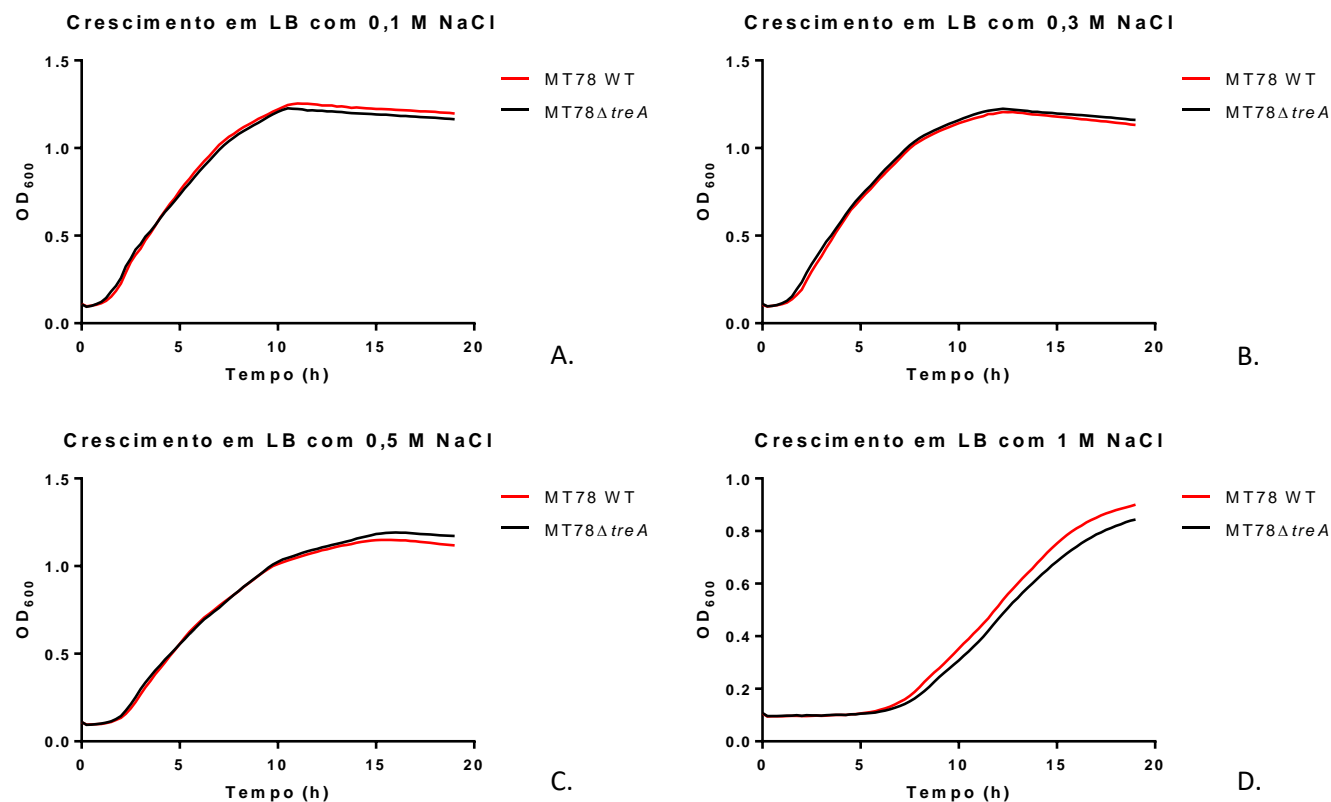


Figura 5. Curvas de crescimento em caldo LB com diferentes concentrações de NaCl. Em uma microplaca, as cepas foram inoculadas (1:100) em 200 μ L de caldo LB (somente bactopectona e extrato de levedura) contendo 0,1 M (A), 0,3 M (B), 0,5 M (C) e 1 M (D) de NaCl e incubadas por 19 h a 37 °C sob agitação em um equipamento BioscreenCTM (Growth Curves USA, Piscataway, NJ, USA). OD₆₀₀ foi medida a cada 15 min.

4.4. O mutante MT78 Δ *treA* não cresceu em meio mínimo M9 com trealose como única fonte de carbono

O crescimento do mutante MT78 Δ *treA* também foi testado em meio mínimo M9 com trealose como única fonte de carbono. A cepa selvagem apresentou crescimento característico, conforme dados anteriores (Chouikha et al., 2006), mas o mutante MT78 Δ *treA* não apresentou crescimento, sugerindo que a TreA é necessária para o catabolismo de trealose.

4.5. O mutante MT78 Δ *treA* apresentou menor adesão e invasão a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32 que a cepa selvagem

A cepa MT78 é altamente aderente e invasiva a diferentes modelos celulares (Germon et al., 2005, Chanteloup et al., 2011, Matter et al., 2011). As capacidades de adesão e invasão do mutante MT78 Δ *treA* foram testadas para a linhagem CEC-32 de fibroblastos aviários. Os resultados são mostrados na Figura 6. Enquanto 28% do inóculo da cepa selvagem foram recuperados após 1 h de interação com as células, apenas 18% de inóculo do mutante MT78 Δ *treA* foram recuperados. A capacidade adesiva do mutante MT78 Δ *treA* foi recuperada pela cepa com complementação cromossômica (Fig. 6A). A adição de D-manose (3%) às culturas, para bloquear o efeito da fímbria do tipo 1, reduziu drasticamente a associação entre bactérias e células para todas as cepas testadas (Fig. 6B) O efeito da deleção de *treA* foi ainda mais pronunciado na capacidade do mutante invadir os fibroblastos aviários: apenas 60% do mutante MT78 Δ *treA* foram recuperados das células quando comparamos ao nível de recuperação da cepa selvagem. A capacidade invasiva do mutante MT78 Δ *treA* foi recuperada na cepa

complementada MT78 Δ *treA*/*treA*⁺ (Fig. 6C). Não foi observada invasão na presença de D-manose (resultado não-mostrado).

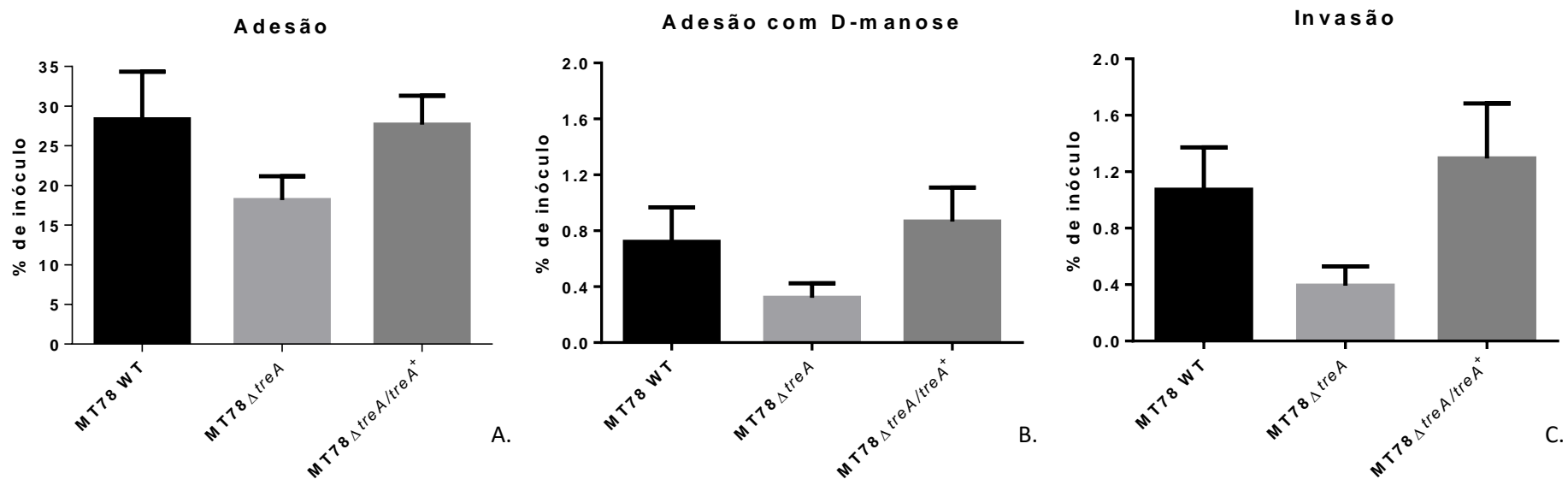


Figura 6. Adesão e invasão a fibroblastos aviário da linhagem CEC-32. As barras representam a porcentagem média \pm erro padrão do número de UFCs recuperadas das células comparado com o inóculo (A) 1 hora pós-infecção (adesão), (B) 1 hora pós-infecção em meio com 3% de D-mannose (obervar que a escala do eixo y está reduzida) e (C) 4 horas pós-infecção, sendo as três últimas na presença de gentamicina 50 μ g/mL (invasão). Resultados de ao menos quatro replicatas biológicas.

4.6. A deleção de *treA* diminuiu o título de aglutinação de leveduras

Aglutinação de leveduras é um ensaio bem estabelecido para testar a expressão da fímbria do tipo 1. Esse teste foi realizado para a cepa MT78 WT, o mutante MT78 Δ *treA* e o complementado MT78 Δ *treA*/*treA*⁺ em diferentes meios e condições. Depois de crescimento estático até a fase estacionária em caldo LB, crescimento sob agitação até a fase mid-log em caldo LB e crescimento durante a noite sob agitação em urina humana, MT78 Δ *treA* apresentou uma redução no título de aglutinação de 22%, 36% e 45% respectivamente, quando comparado à cepa selvagem (Fig. 7). A cepa complementada recuperou o título de aglutinação da selvagem.

Para explicar a diferença na expressão da fímbria do tipo 1, foi feito o teste de verificação da orientação da região *fimS*, que contém o promotor do operon *fim*. As cepas foram crescidas estaticamente por 24 h e sob agitação até a fase mid-log. Como controle da orientação ON, a cepa selvagem foi crescida estaticamente por 96 h, e para orientação OFF, duas passagens em ágar LB foram feitas para a cepa selvagem. Conforme mostrado na Figura 8, não é possível observar diferenças na porcentagem de bactérias com orientação ON ou OFF entre as cepas selvagem, mutante e complementada. Esse resultado sugere que a regulação da expressão da fímbria por *treA* passa por outro mecanismo, que não o de orientação do promotor, para esta cepa.

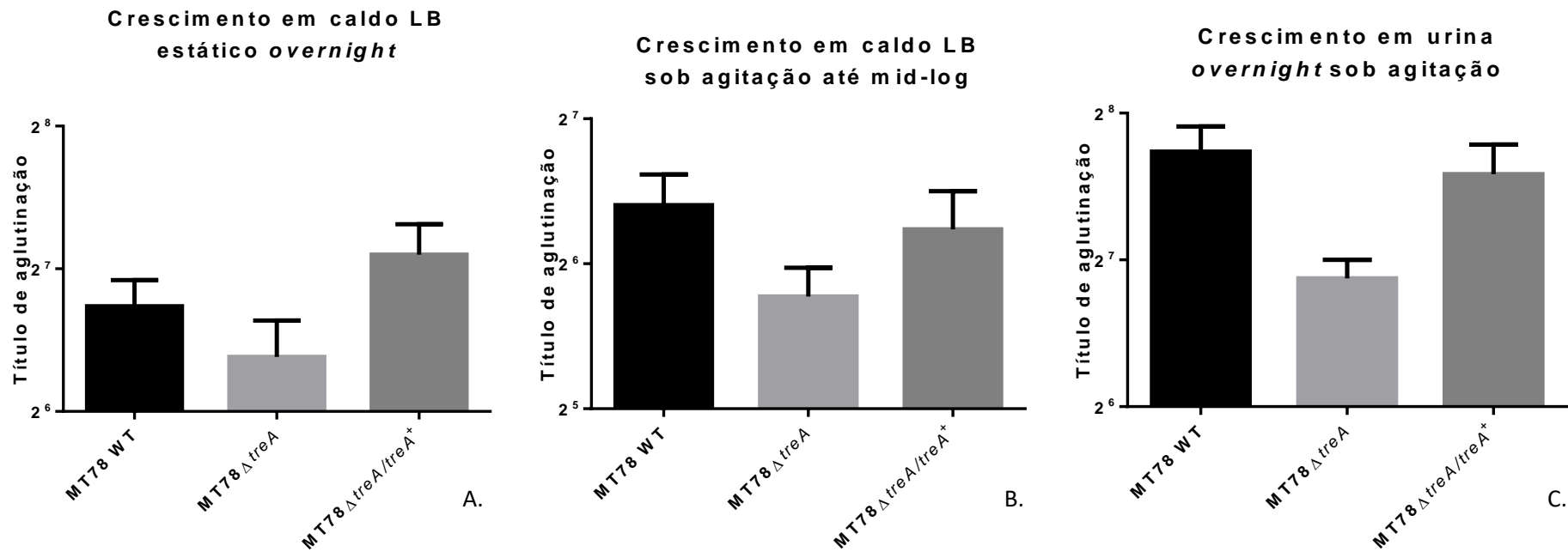


Figura 7. Aglutinação de leveduras. A expressão da fímbria do tipo 1 foi medida em diferentes condições: (A) após crescimento estático durante a noite em caldo LB; (B) após crescimento sob agitação até a fase mid-log em caldo LB; (C) após crescimento durante a noite sob agitação em urina humana.

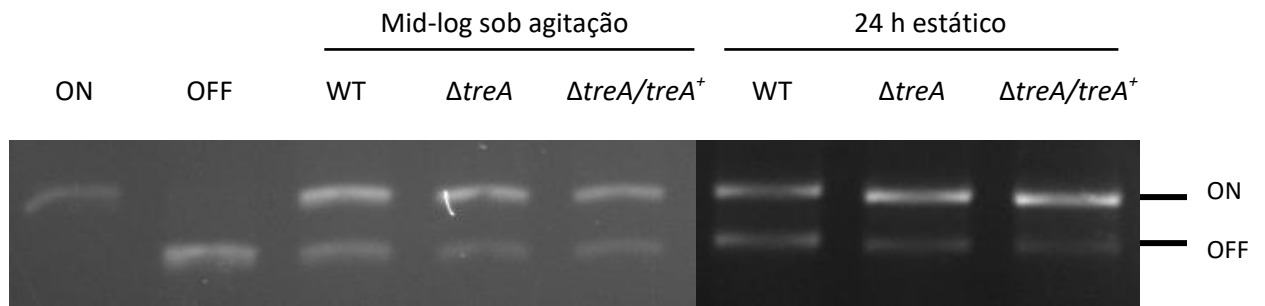
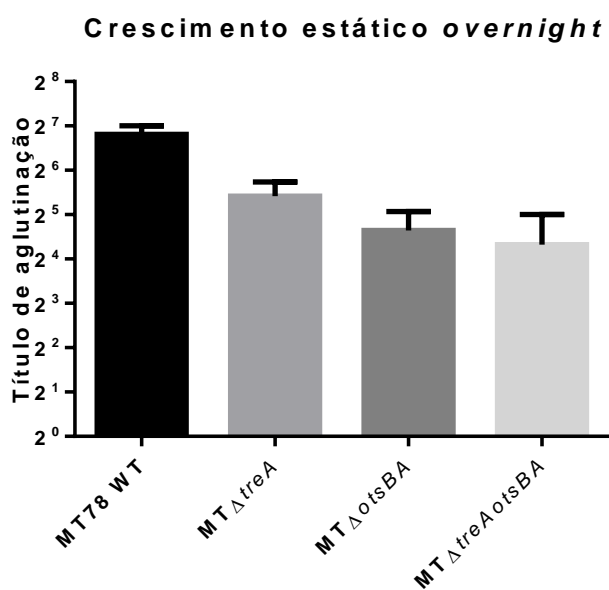


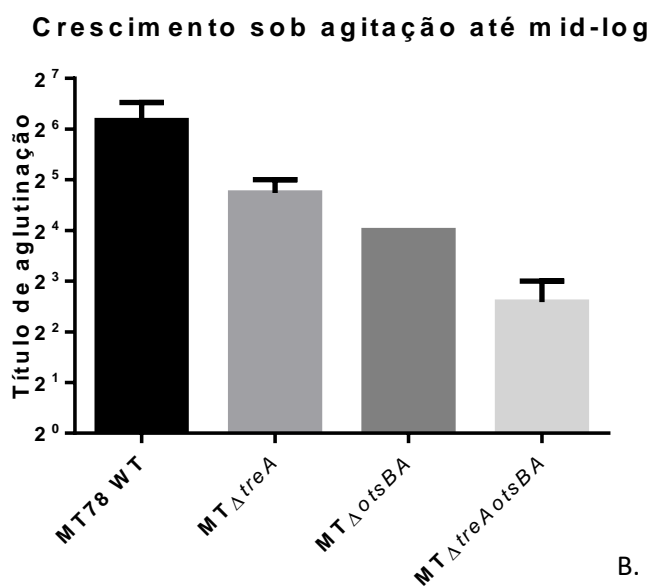
Figura 8. Verificação da orientação de *fimS*. A região *fimS* foi amplificada e digerida com a enzima de restrição HinfI, gerando fragmentos de tamanhos diferentes de acordo com a orientação. Apenas a porção superior do gel é mostrada. Os fragmentos que indicam as posições ON e OFF estão indicados.

4.7. A diminuição da expressão da fímbria do tipo 1 pelo mutante *treA* não é explicada pelo acúmulo de trealose no periplasma

Uma possível explicação para a diminuição da expressão da fímbria do tipo 1 no mutante MT78 Δ *treA* seria o acúmulo de trealose no periplasma bacteriano, já que a enzima responsável pela degradação da molécula em duas moléculas de glicose, a trealase periplasmática, está ausente no mutante. Para testar essa hipótese foram criados mutantes para os genes *otsBA*, que codificam as enzimas trealose-6-fosfato sintase (OtsA) e trealose-6-fosfato fosfatase (OtsB), responsáveis pela síntese de trealose a partir de duas moléculas de glicose, no citoplasma bacteriano, conforme mostrado na Figura 2. Os genes *otsB* e *otsA* estão *em tandem* sob promotores independentes. O duplo mutante MT78 Δ *otsBA* e o triplo mutante MT78 Δ *treAotsBA* foram testados quanto à expressão da fímbria do tipo 1 pelo teste de aglutinação de leveduras. Conforme mostrado na Figura 9, o duplo e o triplo mutantes apresentaram títulos de aglutinação ainda menores que o mutante MT78 Δ *treA*, sugerindo que toda a rota de síntese e degradação periplasmática de trealose está, de certa forma, envolvida na expressão da fímbria do tipo 1, e que a diminuição de sua expressão por parte do mutante MT78 Δ *treA* não pode ser explicada pelo excesso de trealose que se acumula no periplasma na ausência de TreA.



A.



B.

Figura 9. Aglutinação de leveduras pelos mutantes da rota de síntese e degradação periplasmática da trealose. Aglutinação de leveduras após crescimento estático durante a noite (A) ou sob agitação até a fase mid-log (B). Média \pm erro padrão de pelo menos três replicatas biológicas.

4.8. O mutante MT78 Δ *treA* colonizou menos a bexiga de camundongos em modelo de infecção urinária em relação à cepa selvagem

A fímbria do tipo 1 é uma importante estrutura para a colonização da bexiga por ExPEC em infecções do trato urinário (Kaper et al., 2004). Como o mutante MT78 Δ *treA* apresentou uma diminuição no título de aglutinação de leveduras, sua capacidade de causar infecção do trato urinário foi testada em um modelo com camundongos CBA/J. Os animais foram infectados intra-uretra com 2×10^9 UFC e sacrificados após 48 h. A contagem bacteriana da bexiga e dos rins foi determinada. Conforme mostrado na Figura 10, o mutante MT78 Δ *treA* apresentou colonização na bexiga 10 vezes menor que a cepa selvagem ($p < 0.0001$). Em um ensaio independente, a cepa complementada recuperou a capacidade de colonização da bexiga da cepa selvagem ($p < 0.01$). Essa redução na colonização da bexiga apresentada pelo mutante MT78 Δ *treA* pode ser consequência de uma redução na expressão da fímbria do tipo 1. Não foi observada diferença estatística na colonização dos rins.

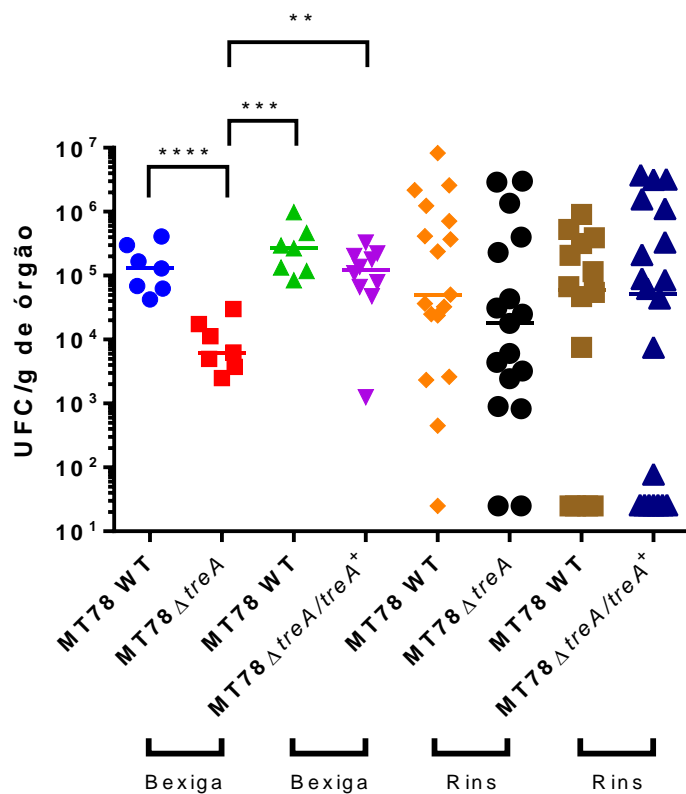


Figura 10. Infecção *in vivo* do trato urinário de camundongos. Cada ponto representa a contagem de um animal. As medianas das contagens estão indicadas pelo traço horizontal. Duas infecções independentes foram realizadas, uma com a cepa selvagem e o mutante, a outra com a cepa selvagem e a complementada. Os rins foram coletados e processados individualmente. O teste Wilcoxon signed-rank (two-tailed) foi usado para determinar significância estatística. O teste Mann-Whitney foi usado para determinar diferenças estatísticas entre a cepa selvagem e o mutante. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

4.9. A complementação plasmidial não recuperou todos os fenótipos do mutante *treA*

Além da complementação cromossômica do mutante *treA*, que gerou uma cepa que recuperou todos os fenótipos atenuados para o mutante (Fig. 6, 7 e 10), foi feita a complementação do gene com um plasmídeo de baixo número de cópias, conforme descrito em 3.4. O mutante com complementação plasmidial recuperou o fenótipo atenuado do mutante *treA* para aglutinação de levedura e adesão a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32 (Fig. 11ABC). No ensaio de invasão, entretanto, o mutante complementado comportou-se como o mutante *treA* (Fig. 11D). Uma possível explicação para esse comportamento é a própria dinâmica do ensaio de invasão, no qual as bactérias são incubadas em contato com as células por 4 h sem o antibiótico cuja resistência está codificada pelo plasmídeo; ou seja, é muito provável que o mutante com complementação plasmidial tenha perdido seu plasmídeo ao longo do ensaio devido à falta de seu antibiótico de seleção. Fenômeno semelhante aconteceria no ensaio *in vivo*, em que as bactérias ficam 48 h dentro dos camundongos sem contato com antibióticos. Por essa razão apenas o mutante com complementação cromossômica foi testado na infecção *in vivo*.

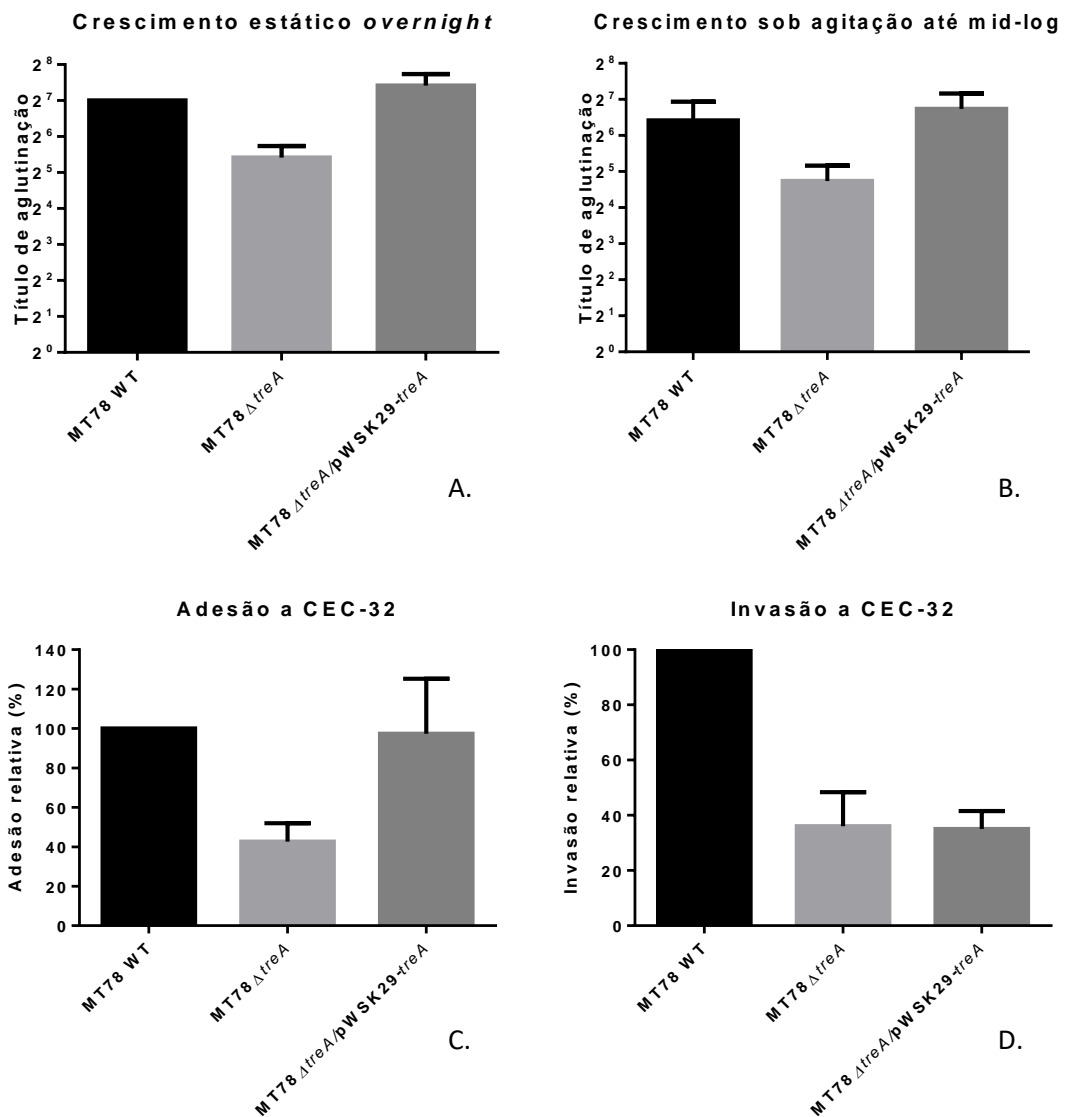


Figura 11. Efeito da complementação plasmidial no mutante *treA* na aglutinação de leveduras e em ensaios em fibroblastos aviários da linhagem CEC-32. A. Aglutinação de leveduras após crescimento estático durante a noite. **B.** Aglutinação de leveduras após crescimento sob agitação até a fase mid-log. **C.** Adesão aos fibroblastos CEC-32. **D.** Invasão aos fibroblastos CEC-32. Média \pm erro padrão de três replicatas biológicas.

4.10. O mutante MT78 Δ *treA* tem a mesma capacidade de adesão a células de bexiga da linhagem 5637 que a cepa selvagem

As células uroteliais da linhagem 5637 foram usadas como modelo de infecção urinária *in vitro*. Para os ensaios de invasão, as bactérias foram inoculadas em urina humana e incubadas sob agitação por 24 h. Os inóculos foram centrifugados, a urina retirada e os sedimentos ressuspensos em meio RPMI com soro fetal bovino para a infecção. Para manter os efeitos da urina sobre as bactérias, as células foram centrifugadas por 5 min e a incubadas por apenas 30 min, em vez de 1 h como no protocolo da linhagem CEC-32. Não foi feito ensaio de invasão porque a cepa selvagem MT78 não é capaz de invadir essa linhagem celular (resultados não-mostrados). Apesar de apresentar diminuição da expressão da fímbria quando crescido em urina (Fig. 7C) e uma forte diminuição na colonização de bexigas de camundongo (Fig. 10), o mutante MT78 Δ *treA* apresentou uma capacidade de adesão similar à da cepa selvagem (Fig. 12).

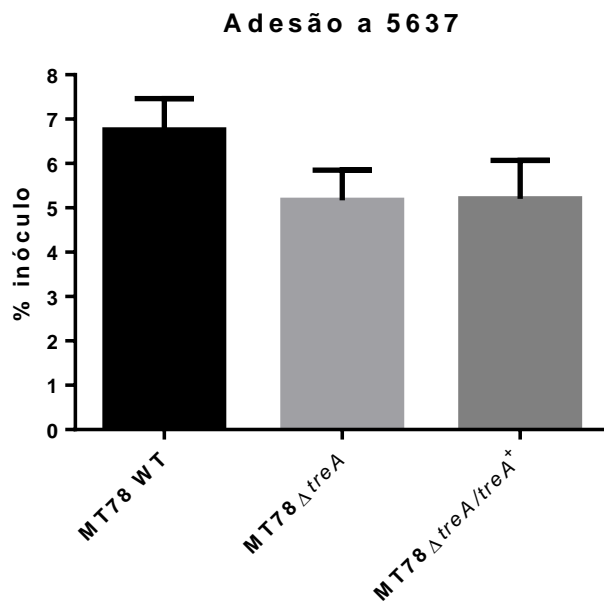


Figura 12. Adesão às células uroteliais da linhagem 5637. Média \pm erro padrão de cinco replicatas biológicas.

4.11. A mutação em *treA* não teve efeito na expressão da fímbria do tipo 1 da cepa CFT073

O mutante CFT073 Δ *treA* foi gerado para que pudesse ser feita uma comparação do efeito deste gene em duas cepas ExPEC de origens diferentes, uma aviária e uma urinária. O teste de aglutinação de leveduras não mostrou qualquer diferença na expressão da fímbria do tipo 1 entre as cepas CFT073 WT e CFT073 Δ *treA*, assim como os ensaios de adesão aos fibroblastos aviários da linhagem CEC-32 (resultados não-mostrados). A cepa CFT073 é incapaz de invadir tais células. Esses dados sugerem que o efeito da rota de síntese e degradação de trealose sobre a expressão da fímbria do tipo 1 podem ser cepa-específicos.

4.12. A adesina FimH da cepa MT78 é idêntica à de cepas não-invasivas

Uma possível explicação para o fenótipo invasivo da cepa MT78 poderia ser diferenças na proteína adesiva de sua fímbria do tipo 1, a proteína FimH. As sequências de aminoácidos das cepas MT78, CFT073 e da cepa filogeneticamente similar APEC IMT5155 foram alinhadas (Fig. 13). As cepas CFT073 e IMT5155 não invadem fibroblastos da linhagem CEC-32 (Daniel Pavanelo, resultados não-publicados; Matter et al., 2011). Conforme mostrado na Figura 13, há apenas duas diferenças entre as cepas: uma substituição G180 por S180, comparado com as duas cepas; e uma substituição A184 por V184, comparado com CFT073. Essas duas diferenças são substituições conservativas, já que alanina e valina são aminoácidos apolares e glicina e serina são polares. Portanto, é improvável que as diferenças apresentadas por essas cepas quanto

às suas capacidades invasivas a células possam ser unicamente atribuídas a diferenças na sequência de aminoácidos de suas adesinas FimH.

```

MT78      MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLS
CFT073    MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLS
5155      MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLS
*****

MT78      TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSFSGTVKYNSSYPFPTTSETPRVVYNSRT
CFT073    TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSFSGTVKYNSSYPFPTTSETPRVVYNSRT
5155      TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSFSGTVKYNSSYPFPTTSETPRVVYNSRT
*****

MT78      DKPWPVALYLTVPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDDVVVPTS
CFT073    DKPWPVALYLTVPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDDVVVPTG
5155      DKPWPVALYLTVPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDDVVVPTG
*****

MT78      GCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQ
CFT073    GCDASARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQ
5155      GCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQ
***_*****

MT78      GVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ
CFT073    GVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ
5155      GVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ
*****

```

Figura 13. Alinhamento dos aminoácidos de FimH. As sequências de aminoácidos da proteína FimH das cepas MT78, CFT073 e IMT5155 foram alinhadas com o servidor Cristal Omega. Somente duas mutações são observadas na cepa MT78, S180G e A184V. Cores diferentes indicam as características dos aminoácidos. Verde: resíduos polares; azul: resíduos carregados negativamente; rosa: resíduos carregados positivamente; vermelho: resíduos apolares.

4.13. Os mutantes *bglB* e do operon *bgl* não fermentam os β -glicosídeos arbutina e salicina

As cepas selvagens MT78 e CFT073, os mutantes para o gene *bglB* MT78 Δ *bglB*, CFT073 Δ *bglB* e MT78 *bglB*::Tn5 (20E12) e os mutantes para o operon *bgl* MT78 Δ *bgl* e CFT073 Δ *bgl* foram testados para a fermentação dos β -glicosídeos salicina e arbutina. O meio com azul de bromotimol, que é um indicador de pH, faz com que as colônias fermentadoras do açúcar apresentem cor de laranja (pH mais ácido, Fig. 14A), ao passo que as não-fermentadoras apresentam cor branca (pH mais alcalino, Fig. 14B). Após 96 h de incubação úmida a 37 °C em meio contendo azul de bromotimol e salicina ou arbutina, apenas as cepas selvagens apresentaram coloração laranja (papilas), tal como na Figura 14A, indicando a funcionalidade do operon *bgl*. Nenhum dos mutantes, seja apenas do gene *bglB* ou de todo o operon *bgl*, foi capaz de fermentar os β -glicosídeos testados.

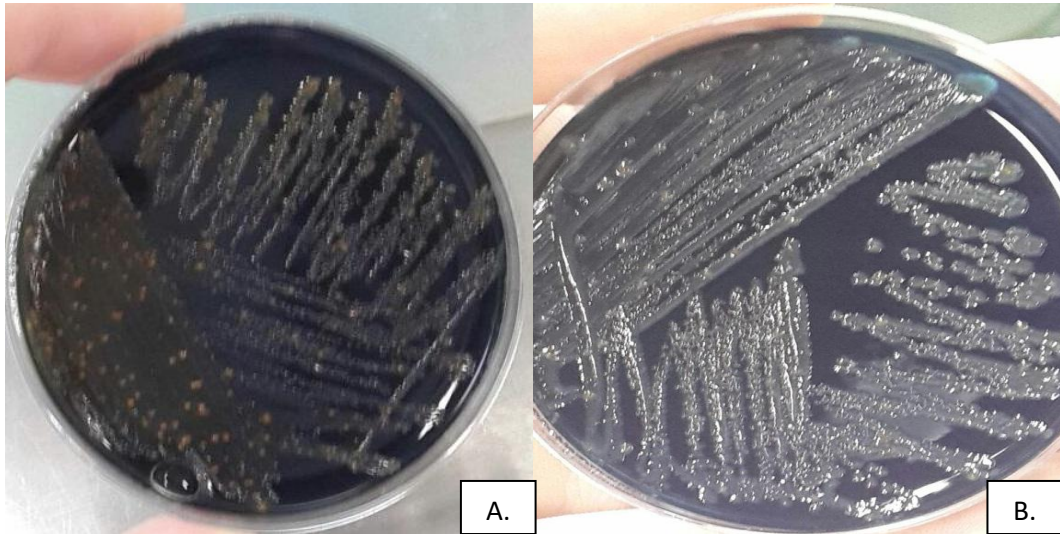


Figura 14. Crescimento em ágar contendo azul de bromotimol com os β -glicosídeos salicina ou arbutina. A. Padrão de crescimento com fermentação dos β -glicosídeos (observar colônias cor de laranja – papilas). Esse padrão foi observado para as cepas selvagens nos dois açúcares. B. Padrão de crescimento sem fermentação dos β -glicosídeos (observar colônias brancas). Esse padrão foi observado para todos os mutantes nos dois açúcares.

4.14. Os mutantes *bgIB* e do operon *bgI* não apresentam variação no título de aglutinação de levedura em relação à cepa selvagem

O mutante 20E12, cuja inserção do transposon foi identificada no gene *bgIB*, foi incapaz de aglutinar leveduras, ou seja, não expressa a fímbria do tipo 1. Esse fenótipo explica o baixo nível de adesão e a invasão nula aos fibroblastos da linhagem CEC-32 (Fig. 4). Surpreendentemente, quando testados para aglutinação de levedura, os mutantes específicos *MT78ΔbgIB* e *MT78ΔbgI* apresentaram o mesmo título de aglutinação da cepa selvagem, assim como os mutantes *CFT073ΔbgIB* e *CFT073ΔbgI* (resultado não-mostrado). Uma possível explicação para essa discrepância de fenótipo entre os mutantes *MT78 bgIB::Tn5* e *MT78ΔbgIB* seria a inserção de um segundo transposon no mutante 20E12, o que seria um artefato no momento da confecção da biblioteca de mutantes STM. Essa hipótese, entretanto, ainda não foi averiguada.

4.15. Os mutantes *MT78ΔbgIB* e *MT78ΔbgI* apresentam menor adesão e invasão a fibroblastos aviários em relação à cepa selvagem

Apesar de não apresentarem redução no título de aglutinação de levedura, os mutantes *MT78ΔbgIB* e *MT78ΔbgI* apresentaram redução na adesão e na invasão aos fibroblastos aviários da linhagem CEC-32. O mutante *MT78 bgIB::Tn5*, usado como controle nesses ensaios, apresenta drástica redução na adesão e na invasão. Os resultados são mostrados na Figura 15. Não foi realizado teste na presença de D-manose, de modo que não é possível atribuir a perda na capacidade de adesão e invasão somente a uma menor expressão da fímbria do tipo 1.

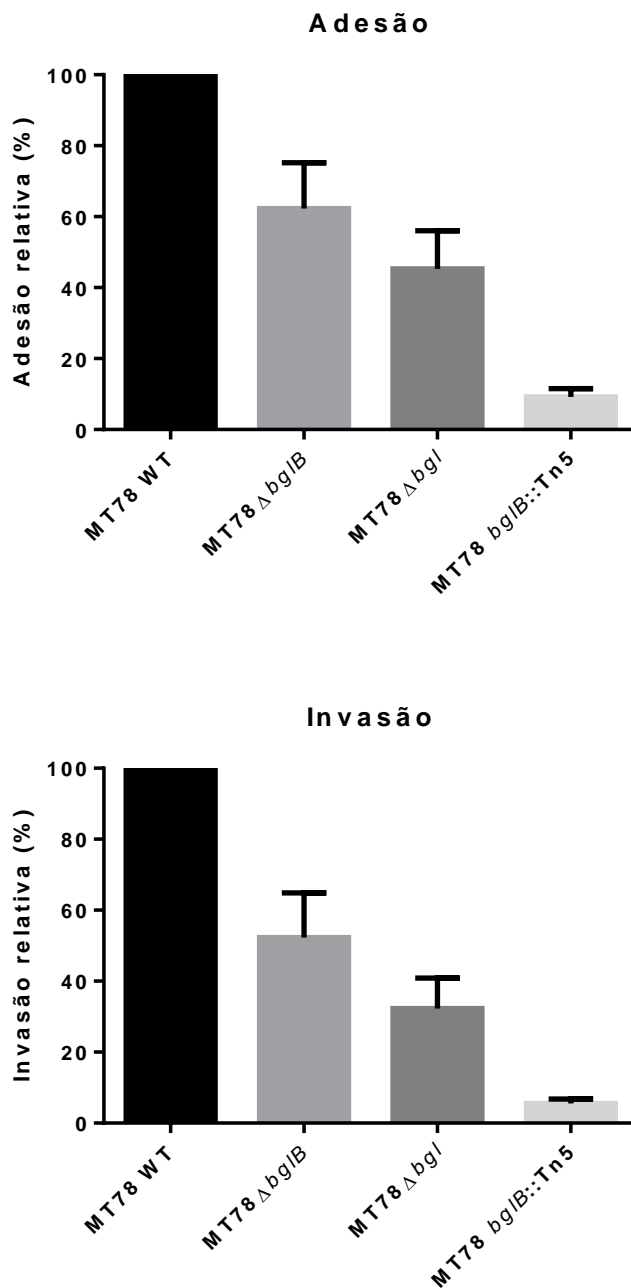


Figura 15. Adesão e invasão dos mutantes *MT78 Δ bgIB*, *MT78 Δ bgl* e *MT78 bgIB::Tn5* a fibroblastos aivários da linhagem CEC-32. Média \pm erro padrão de pelo menos três replicatas biológicas.

4.16. O mutante *MT78Δbgl* colonizou menos a bexiga de camundongos em modelo de infecção urinária em relação à cepa selvagem

Assim como *MT78ΔtreA*, o mutante *MT78Δbgl* foi testado quanto à sua capacidade de colonizar o trato urinário de camundongos CBA/J, já que o mutante *bglB::Tn5* não apresenta fenótipo de expressão de fímbria do tipo 1 e essa é a estrutura mais importante para causar infecção urinária. O teste foi feito apenas com o mutante de todo o operon *bgl* porque, por se tratar de um operon, o promotor encontra-se antes do primeiro gene (*bglG*), de modo que não é possível complementar corretamente o mutante *MT78ΔbglB* uma vez o gene *bglB* não possui promotor próprio. Conforme mostrado na Figura 16, o mutante *MT78Δbgl* apresenta uma contagem bacteriana dez vezes menor que a cepa selvagem na bexiga ($p < 0,001$). Tal efeito não é observado nos rins. Esse resultado sugere que a fímbria do tipo 1 pode estar sendo menos expressa no mutante *MT78Δbgl*, tal como no *MT78ΔtreA*. Um ensaio com o mutante complementado deve ser feito para verificar a restauração do fenótipo selvagem.

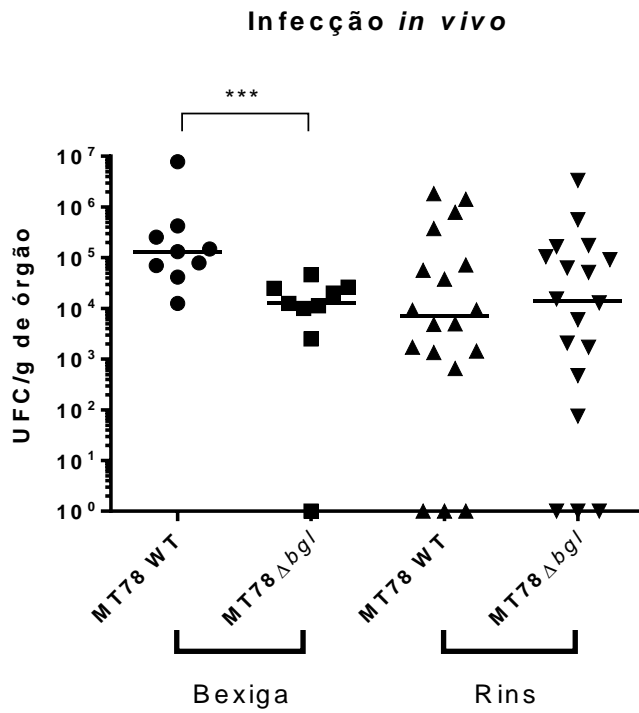


Figura 16. Infeção *in vivo* do trato urinário de camundongos. Cada ponto representa a contagem de um animal. As medianas das contagens estão indicadas pelo traço horizontal. Os rins foram coletados e processados individualmente. O teste Wilcoxon signed-rank (two-tailed) foi usado para determinar significância estatística. O teste Mann-Whitney foi usado para determinar diferenças estatísticas entre a cepa selvagem e o mutante. ***: $p < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

Muitos grupos têm usado a técnica de STM para identificar genes de virulência em uma série de patógenos e modelos (Hensel et al., 1995, Badger et al., 2000, Li et al., 2005, ANTÃO et al., 2009, Dziva et al., 2013). A triagem de mutantes da nossa biblioteca STM resultou na identificação do regulador *ibeR*, que regula a expressão de *ibeA* e acaba por interferir na expressão da fímbria do tipo 1; genes do próprio operon da fímbria do tipo 1, *fimA* e *fimI*; genes cuja função não está associada à expressão da fímbria ou a qualquer outra proteína relacionada à invasão ou à virulência de ExPEC, *ydeO* e *ymgA*; e dois genes relacionados ao metabolismo de açúcares, *treA* e *bglB*. Os três primeiros, *ibeR*, *fimA* e *fimI*, serviram como validadores da seleção dos mutantes; *treA* foi caracterizado nesse trabalho; *bglB* foi parcialmente caracterizado, mostrando-se importante para a virulência *in vitro* e *in vivo*; *ydeO* e *ymgA* ainda não foram caracterizados, assim como parte dos possíveis mutantes atenuados pré-selecionados que não foram testados individualmente. O uso da técnica de STM para gerar uma biblioteca de mutantes mostrou-se, portanto, uma fonte para a descoberta de potenciais genes associados à virulência bacteriana e sua regulação.

Na cepa *E. coli* K-12, a proteína TreA converte trealose em duas moléculas de glicose no periplasma sob estresse osmótico, quando um aumento na osmolaridade é necessário para compensar a pressão osmótica do ambiente externo (Boos et al., 1987). Assim, é lógico esperar que o mutante *treA* seja potencialmente sensível ao estresse osmótico. O mutante MT78 Δ *treA*, entretanto, foi capaz de crescer em diferentes concentrações de cloreto de sódio (Fig. 5),

comportando-se de maneira oposta ao mutante K-12 Δ *treA* (Boos et al., 1987) e sugerindo um papel diferente para esse gene, que não o de resposta ao estresse osmótico, na cepa MT78.

Em um trabalho recente, foi descrito o envolvimento da proteína TreA com a virulência em *Burkholderia pseudomallei* (Vanaporn et al., 2017). Devido ao fato de o mutante MT78 Δ *treA* ter apresentado capacidade atenuada de adesão e invasão a fibroblastos aviários (Fig. 6), foi feito o teste de aglutinação de levedura para verificar se a expressão da fímbria do tipo 1 também estaria afetada. Conforme mostrado na Figura 7, o mutante apresentou uma redução na expressão da fímbria do tipo 1 comparado à cepa selvagem, e essa redução não seria explicada pela orientação da região *fimS*, já que não foram observadas diferenças entre a cepa selvagem e o mutante (Fig. 8).

A expressão da fímbria do tipo 1 de ExPEC é regulada por muitos mecanismos, como os reguladores globais H-NS, Lrp, IHF e FNR (Barbieri et al., 2014, Corcoran and Dorman, 2009), recombinases FimB e FimE, alguns genes associados à virulência, como *ibeA* e *ibeT* (Cortes et al., 2008) em certas cepas e um operon de metabolismo de fosfato, *pst* (Crepin et al., 2012b), entre outros. Nossos resultados mostraram uma redução na aglutinação de levedura mais pronunciada quando as bactérias foram crescidas sob agitação até a fase mid-log do que quando crescidas estaticamente até a fase estacionária (Fig. 7). Nos ensaios de interação com células, a redução das capacidades de adesão e invasão também foram mais claras quando as cepas foram crescidas sob agitação até a fase mid-log (resultado não-mostrado). Esse tipo de regulação é similar à regulação do operon *fim* pelo sensor metabólico CRP-cAMP (CRP:

cAMP receptor protein; cAMP: AMP cíclico) (Muller et al., 2009). Devido ao fato do cAMP ser uma molécula-chave para sinalizar a ausência de glicose em bactérias, o efeito da TreA sobre a expressão da fímbria do tipo 1 poderia estar relacionado a esse regulador de transcrição global. Por outro lado, o CRP-cAMP afetou a orientação da região *fimS*, diferentemente do observado no mutante MT78 Δ *treA*.

Uma possível explicação para a redução na expressão da fímbria do tipo 1 no mutante MT78 Δ *treA* seria o acúmulo de trealose no periplasma bacteriano, que poderia levar a um desequilíbrio estrutural na membrana e, conseqüentemente, uma perturbação na montagem ou na ancoragem das fímbrias, que ocorrem no periplasma e na membrana externa, respectivamente. Para testar essa hipótese, foram criados mutantes para as enzimas da biossíntese de trealose, OtsA e OtsB. Conforme mostrado na Figura 2, essas enzimas sintetizam trealose no citoplasma, a partir de duas moléculas de glicose, e a trealose é exportada para o periplasma, onde vai ser degradada novamente em duas moléculas de glicose pela trealase periplasmática TreA, de acordo com a necessidade osmótica da bactéria (Giaever et al., 1988, Strom and Kaasen, 1993). Conforme mostrado na Figura 9, o duplo mutante MT78 Δ *otsBA* apresentou um título de aglutinação de levedura menor que o do mutante MT78 Δ *treA*, e o triplo mutante MT78 Δ *treAotsBA*, um título ainda menor. Como o efeito na expressão da fímbria do tipo 1 foi somado pela mutação nos genes da biossíntese, e não anulado, a hipótese de que é um acúmulo de trealose no periplasma que causa a redução na expressão da fímbria do tipo 1 foi rejeitada. Ao contrário, esse resultado sugere um envolvimento não só da enzima TreA, mas de toda a rota de biossíntese e degradação de trealose na expressão da

fímbria do tipo 1 na cepa MT78. A falta de trealose intracelular parece ter outros efeitos além de afetar a expressão da fímbria em *E. coli*. Um estudo recente mostrou que o mutante *otsA* para uma cepa *E. coli* tende a ser mais sensível ao estresse oxidativo e a aumentar a sinalização por indol, o que favorece a formação de células *persisters* (Kuczynska-Wisnik et al., 2015).

Não é o primeiro relato que um gene relacionado ao metabolismo de carboidratos estaria envolvido na virulência da cepa MT78. Uma Ilha Genômica associada a *Sel-C*, de nome AGI-3, foi encontrada no genoma da MT78 contendo três genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de açúcares: um regulador transcricional da família *Lacl*, um transportador hexuronato e uma α -glicosidase. Sem esses genes, a cepa MT78 perdeu parte de sua capacidade de metabolizar carboidratos, incluindo trealose, e apresentou menor habilidade de causar bacteremia e de colonizar o fígado de galinhas White-Leghorn de três semanas 24 h e 48 h após a infecção (Chouikha et al., 2006). O operon metabólico *frz* também foi encontrado no genoma da MT78 e, quando deletado, a cepa foi menos capaz de interagir com células pulmonares (A549), hepáticas (LHM) e intestinais (Caco-2), de colonizar o intestino de pintos de um dia White Leghorn axênicos e, assim como em nosso trabalho, de expressar a fímbria do tipo 1 (Rouquet et al., 2009). O mecanismo pelo qual a perda de genes de metabolismo de açúcar afeta a expressão da fímbria do tipo 1, entretanto, ainda precisa ser elucidado.

Além do operon *frz* e dos genes de metabolismo de açúcares da ilha AGI-3, foi descrito para a MT78, também na ilha AGI-3, um operon funcional de metabolismo de frutoligossacarídeos (Schouler et al., 2009). Esse operon, apesar

de não estar envolvido em virulência, confere uma vantagem adaptativa à cepa MT78, permitindo que ela colonize a porção cecal do intestino, onde normalmente não são encontradas cepas de *E. coli* (Porcheron et al., 2012). No que se refere ao metabolismo de açúcares, pode-se dizer que a cepa MT78 não é uma *E. coli* típica, pois possui um arsenal de possibilidades em seu genoma. O operon *bgl* faz parte desse arsenal. Apesar de estar presente também na cepa K-12, encontra-se silenciado (críptico) na maior parte das *E. coli* (filogrupos A e B1) e ausente em outras (filogrupo D), porém funcional nas *E. coli* do filogrupo B2, como a MT78 e a CFT073 (Sankar et al., 2009). Conforme mostrado na Figura 14, as cepas selvagens MT78 e CFT073 foram capazes de fermentar os β -glicosídeos salicina e arbutina, confirmando a funcionalidade do operon *bgl* nessas cepas.

Cepas que possuem o operon *bgl* funcional têm a expressão do gene *oppA* aumentado, e isso lhes confere uma vantagem de crescimento na fase estacionária (Harwani et al., 2012), entretanto não há relatos na literatura sobre o envolvimento do operon *bgl* com virulência de *E. coli*. Nossos dados mostram que o mutante MT78 Δ *bgl* demonstra menor capacidade de adesão e invasão a fibroblastos aviários (Fig. 15) e coloniza menos a bexiga de camundongos que a cepa selvagem (Fig. 16). O fato de o mutante original da biblioteca STM *bglB*:Tn5 não ser capaz de aglutinar leveduras, e de o mutante MT78 Δ *bgl* ter uma diminuição na adesão e invasão de fibroblastos aviários e na capacidade de colonizar a bexiga indicam que o operon *bgl* afeta a expressão da fímbria do tipo 1 na MT78. Essa suposição, porém, não se confirmou quando os mutantes MT78 Δ *bglB* e MT78 Δ *bgl* foram testados para aglutinação de levedura após crescimento em LB estático e sob agitação. Uma possível explicação para a

discrepância entre os fenótipos de aglutinação do *bglB::Tn5* e do *MT78Δbgl* seria uma dupla inserção de transposon no mutante *bglB::Tn5*; alternativamente, seria um efeito polar causado pela inserção do transposon. A complementação dos mutantes *bglB::Tn5* e *MT78Δbgl* pode ajudar a esclarecer tais diferenças fenotípicas. Apesar dessas diferenças, é possível concluir que o operon *bgl* de alguma forma afeta a virulência da cepa MT78.

Conforme mostrado na Figura 11 e comentado na seção 4.9, a complementação plasmidial do mutante *MT78ΔtreA* não foi suficiente para a recuperação de todos os fenótipos do mutante. Para demonstrarmos que todos os fenótipos observados no mutante *MT78ΔtreA* foram devidos somente à ausência do gene *treA*, foi necessária a complementação cromossômica do gene. Primeiramente, foi feita a complementação na região cromossômica *attTn7* (Crepin et al., 2012a). A cepa complementada, porém, além de não recuperar o fenotipo do mutante, apresentou um crescimento mais lento e colônias menores quando crescida em ágar LB (resultados não-mostrados). Uma nova estratégia de complementação foi desenvolvida (Seção 3.5. e Figura 3), utilizando parte da técnica descrita por Crépin e colaboradores (Crepin et al., 2012a) e parte descrita por Datsenko e Wanner (Datsenko and Wanner, 2000).

Uma vez que a expressão de TreA está envolvida na resposta ao estresse osmótico na cepa K-12, e a ausência da TreA causou uma diminuição na expressão da fímbria no mutante *MT78ΔtreA*, seria a expressão da fímbria regulada pelo estresse osmótico? Estudos relatados até o momento são inconclusivos. Em 2002, Schwan e colaboradores mostraram que uma diminuição na expressão da fímbria do tipo 1 aconteceu sob estresse osmótico causado por

NaCl e baixo pH na cepa UPEC NU149 (Schwan et al., 2002). Em 2004, Snyder e colaboradores fizeram um transcriptoma da cepa CFT073 durante uma infecção do trato urinário e a expressão da fímbria do tipo 1 estava aumentada juntamente com genes que são regulados pela resposta ao estresse osmótico (Snyder et al., 2004). Em 2013, Withman e colaboradores mostraram, também para CFT073, que a fímbria do tipo 1 estava mais expressa sob estresse osmótico por aumento de ureia, mas não respondeu a um aumento de NaCl (Withman et al., 2013). Finalmente, em 2015, Greene e colaboradores concluíram que, para a cepa UPEC UTI189, a fímbria do tipo 1 é menos expressa em urina humana (Greene et al., 2015). Nossos resultados mostraram um título de aglutinação de leveduras maior na urina humana do que em LB (Fig. 7), mas a variabilidade da composição da urina poderia explicar essa diferença. Não é possível definir estritamente papéis para o estresse osmótico na regulação da fímbria do tipo 1 em *E. coli*, seja baseando-se em nosso trabalho ou nos supracitados, pois todos foram feitos em cepas *E. coli* diferentes, cada uma delas podendo apresentar um mecanismo diferente de regulação da fímbria do tipo 1. Entretanto, de acordo com os dados do nosso trabalho, é seguro afirmar que TreA tem papel na invasão celular pela cepa MT78 e em seus níveis de produção de fímbria do tipo 1.

A adesina FimH da cepa MT78 é quase idêntica à FimH da CFT073 e da cepa APEC 5155 (Fig. 13). Apesar de essas três cepas apresentarem comportamentos diferentes frente ao contato com células eucarióticas, elas possuem uma FimH de alta afinidade, devido à presença de um resíduo de aspartato na posição 188. Esse aminoácido em particular foi descrito como responsável por aumentar a afinidade de FimH à manose, e cepas com essa

característica tendem a apresentar uma adesão mais focal e a se espalharem menos pelo hospedeiro (Eris et al., 2016). Mutações nas posições 27, 62, 70, 78 e 128 também poderiam explicar diferenças na afinidade FimH-manose (Eris et al., 2016); entretanto, essas três cepas possuem os mesmos resíduos nessas posições, que normalmente variam muito. Como a fímbria do tipo 1 é uma importante adesina e a proteína responsável por fazer propriamente a adesão, FimH, é altamente similar para essas três cepas *E. coli*, apesar de elas demonstrarem diferenças em adesão e invasão celular, outras diferenças entre essas cepas ou uma regulação distinta da fímbria do tipo 1 devem contribuir para a capacidade que a cepa MT78 invada uma ampla variedade de células eucarióticas.

E. coli é um colonizador natural de animais de sangue quente, mas alguns clones tornaram-se patogênicos e podem causar doença em vários nichos. Cepas ExPEC causam doenças em humanos e outros animais e possuem potencial zoonótico. Cepas NMEC foram capazes de colonizar galinhas em um modelo de coliceptissemia de pintos de um dia, assim como cepas APEC foram capazes de causar meningite em um modelo de meningite neonatal de ratos (Tivendale et al., 2010). Além disso, Skyberg e colaboradores mostraram que a introdução dos plasmídeos de uma APEC O2 em uma cepa *E. coli* comensal de galinhas aumentou a capacidade da cepa em colonizar o trato urinário de camundongos (Skyberg et al., 2006). Em nosso trabalho, a cepa APEC MT78, cujo sorotipo é O2 e pertence ao *sequence type* ST95, comum entre cepas ExPEC, mostrou-se capaz de causar infecção urinária em camundongos em níveis comparáveis a

cepas UPEC humanas, como a CFT073. Esse resultado também reforça o potencial zoonótico de certas cepas ExPEC.

Criamos uma biblioteca de mutantes usando a técnica de mutagênese marcada com assinatura para melhor entendermos o fenótipo invasivo da cepa MT78 a células do hospedeiro. Os mutantes atenuados mostraram inserções do transposon em genes do operon *fim* e em genes que afetam a expressão da fímbria do tipo 1. Nossos resultados sugerem fortemente que a fímbria do tipo 1 é uma estrutura essencial para a invasão da cepa MT78 a células eucarióticas. Especificamente, nossos resultados também demonstram que o gene *treA* é necessário para a máxima expressão da fímbria do tipo 1 nessa ExPEC em particular e que a perda desse gene reduz significativamente a capacidade de invasão celular e de colonização da bexiga em um modelo murino de infecção urinária.

6. CONCLUSÕES

6.1. A seleção de mutantes atenuados da biblioteca criada por STM resultou em sete genes potencialmente envolvidos no fenótipo invasivo da cepa MT78.

6.1.1. A fímbria do tipo 1 está diretamente envolvida, uma vez que os mutantes com os genes *fimA* e *fimI* interrompidos mostraram-se incapazes de invadir fibroblastos aviários.

6.1.2. Há envolvimento dos reguladores de transcrição *ibeR*, por meio da expressão da fímbria do tipo 1, e *ydeO*, por mecanismo ainda desconhecido.

6.1.3. O gene *ymgF*, que codifica uma proteína envolvida na divisão celular, está potencialmente envolvido, por mecanismo ainda desconhecido.

6.1.4. Os genes *treA* e *bglB*, que codificam, respectivamente, a trealase periplasmática e a 6-fosfo- β -glicosidase B, estão envolvidos, mostrando que o metabolismo de açúcares pode regular a virulência.

6.2. O gene *treA* é necessário para a máxima expressão da fímbria do tipo 1 na cepa MT78; o gene *bglB* tem efeito no fenótipo invasivo dessa cepa por um mecanismo ainda a ser elucidado.

6.3. Os genes *treA* e *bglB* têm influência na virulência da cepa MT78 em modelo murino de infecção urinária, contribuindo para a máxima colonização da bexiga, mas sem influência na colonização renal.

REFERÊNCIAS

- ABPA (2017) *Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal*, São Paulo, Brasil. Available at: http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf (Accessed: 20/08/2017).
- Agüero, M. E., Aron, L., DeLuca, A. G., Timmis, K. N. and Cabello, F. C. (1984) 'A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis', *Infection and Immunity*, 46, pp. 740-746.
- Allan, B., Vandenhurk, J. and Potter, A. (1993) 'Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis', *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 57(3), pp. 146-151.
- Alves, J. M. D. S., Martinelli, O. and Dewes, H. (2006) 'Dinâmica inovativa no agronegócio: a inovação tecnológica na avicultura industrial por meio da análise de patentes', *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 23, pp. 207-233.
- Amster-Choder, O., Houman, F. and Wright, A. (1989) 'Protein phosphorylation regulates transcription of the beta-glucoside utilization operon in *E. coli*', *Cell*, 58(5), pp. 847-55.
- Andersen, C., Rak, B. and Benz, R. (1999) 'The gene *bglH* present in the *bgl* operon of *Escherichia coli*, responsible for uptake and fermentation of beta-glucosides encodes for a carbohydrate-specific outer membrane porin', *Mol Microbiol*, 31(2), pp. 499-510.

- Anderson, G. G., J. J. Palermo, J. D. Schilling, R. Roth, J. Heuser and S. J. Hultgren (2003) 'Intracellular bacterial biofilm- like pods in urinary tract infections', *Science*, 301(5629), pp. 105–107,.
- Antão, E., Ewers, E., Gurlebeck, D., Preisinger, R., Homeier, T., Li, G. and Wieler, L. (2009) 'Signature-Tagged Mutagenesis in a Chicken Infection Model Leads to the Identification of a Novel Avian Pathogenic *Escherichia coli* Fimbrial Adhesin', *Plos One*, 4(11).
- Antão, E., Wieler, L. and Ewers, C. (2009) 'Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*', *Gut Pathogens*, 1.
- Arné, P., Marc, D., Bree, A., Schouler, C. and Dho-Moulin, M. (2000) 'Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a *fimH* deletion', *Avian Diseases*, 44, pp. 343-355.
- Arrecubieta, C., Hammarton, T., Barrett, B., Chareonsudjai, S., Hodson, N., Rainey, D. and Roberts, I. (2001) 'The transport of group 2 capsular polysaccharides across the periplasmic space in *Escherichia coli* - Roles for the KpsE and KpsD proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), pp. 4245-4250.
- Badger, J., Wass, C., Weissman, S. and Kim, K. (2000) 'Application of signature-tagged mutagenesis for identification of *Escherichia coli* K1 genes that contribute to invasion of human brain microvascular endothelial cells', *Infection and Immunity*, 68(9), pp. 5056-5061.
- Barbieri, N. L., de Oliveira, A. L., Tejkowski, T. M., Pavanelo, D. B., Rocha, D. A., Matter, L. B., Callegari-Jacques, S. M., de Brito, B. G. and Horn, F. (2013)

- 'Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence', *PLoS One*, 8(8), pp. e72322.
- Barbieri, N. L., Nicholson, B., Hussein, A., Cai, W., Wannemuehler, Y. M., Dell'Anna, G., Logue, C. M., Horn, F., Nolan, L. K. and Li, G. (2014) 'FNR regulates expression of important virulence factors contributing to pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli*', *Infect Immun*, 82(12), pp. 5086-98.
- Barichello, T., Fagundes, G. D., Generoso, J. S., Elias, S. G., Simões, L. R. and Teixeira, A. L. (2013) 'Pathophysiology of neonatal acute bacterial meningitis', *J Med Microbiol*, 62(Pt 12), pp. 1781-9.
- Barnes, H. J., Vaillancourt, J. P. and Gross, W. B. (2003) 'Colibacillosis', in Hofstad (ed.) *Diseases of Poultry*. Iowa: Iowa State University Press, pp. 631-656.
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J. and Denamur, E. (1998) 'Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains', *J Infect Dis*, 177, pp. 642-650.
- Bliss, J. M., Garon, C. F. and Silver, R. P. (1996) 'Polysialic acid export in *Escherichia coli* K1: the role of KpsT, the ATP-binding component of an ABC transporter, in chain translocation.', *Glycobiology*, 6, pp. 445-452.
- Bonacorsi, S., Clermont, O., Houdouin, V., Cordevant, C., Brahimi, N., Marecat, A., Tisley, C., Nassif, X., Lange, M. and Bingen, E. (2003) 'Molecular analysis and experimental virulence of French and North American

- Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone', *The Journal of Infectious Diseases*, 187(12), pp. 1895-1906.
- Boos, W., Ehmann, U., Bremer, E., Middendorf, A. and Postma, P. (1987) 'Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions', *J Biol Chem*, 262(27), pp. 13212-8.
- Portaria Nº 210, DE 10 DE NOVEMBRO DE 1998 Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves.
- Bree, A., Dho, M. and Lafont, J. (1989) 'Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* with or without virulence factors', *Avian Diseases*, 33(1), pp. 134-139.
- Busch, A. and Waksman, G. (2012) 'Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1592), pp. 1112-22.
- Caza, M., Lépine, F., Milot, S. and Dozois, C. M. (2008) 'Specific roles of the *iroBCDEN* genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins', *Infection and Immunity*, 76(8), pp. 3539-3549.
- Caza, M., Lépine, F. and Dozois, C. M. (2011) 'Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 80(1), pp. 266-282.
- Chanteloup, N. K., Porcheron, G., Delaleu, B., Germon, P., Schouler, C., Moulin-Schouleur, M. and Gilot, P. (2011) 'The extra-intestinal avian pathogenic

- Escherichia coli* strain BEN2908 invades avian and human epithelial cells and survives intracellularly', *Vet Microbiol*, 147(3-4), pp. 435-9.
- Cheville, N. and Arp, L. (1978) 'Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infection in birds', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173(5), pp. 584-587.
- Chouikha, I., Germon, P., Bree, A., Gilot, P., Moulin-Schouleur, M. and Schouler, C. (2006) 'A *sefC*-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence', *J Bacteriol*, 188(3), pp. 977-87.
- Corcoran, C. P. and Dorman, C. J. (2009) 'DNA relaxation-dependent phase biasing of the *fim* genetic switch in *Escherichia coli* depends on the interplay of H-NS, IHF and LRP', *Mol Microbiol*, 74(5), pp. 1071-82.
- Cortes, M. A. M., Gibon, J., Chanteloup, N. K., Moulin-Schouleur, M., Gilot, P. and Germon, P. (2008) 'Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908', *Infection and Immunity*, 76(9), pp. 4129-4136.
- Crepin, S., Harel, J. and Dozois, C. M. (2012a) 'Chromosomal Complementation Using Tn7 Transposon Vectors in Enterobacteriaceae', *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), pp. 6001-6008.
- Crepin, S., Houle, S., Charbonneau, M. E., Mourez, M., Harel, J. and Dozois, C. M. (2012b) 'Decreased expression of type 1 fimbriae by a *pst* mutant of uropathogenic *Escherichia coli* reduces urinary tract infection', *Infect Immun*, 80(8), pp. 2802-15.

- Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) 'One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), pp. 6640-6645.
- De Brito, B., Gaziri, L. and Vidotto, M. (2003) 'Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis', *Infection and Immunity*, 71(7), pp. 4175-4177.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. N. (1990) 'Mini-*Tn5* Transposon Derivates for Insertion Mutagenesis, Promoter Probing, and Chromosomal Insertion of Cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria', *Journal of Bacteriology*, 172(11), pp. 6568-6572.
- De Pace, F., Nakazato, G., Pacheco, A., de Paiva, J. B., Sperandio, V. and da Silveira, W. D. (2010) 'The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain', *Infect Immun*, 78(12), pp. 4990-4998.
- De Ricke, J., Milon, A. and Oswald, E. (1999) 'Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens', *Veterinary Research*, 2(3), pp. 299-316.
- Dho, M. and Lafont, J. P. (1982) '*Escherichia coli* Colonization of the Trachea in Poultry: Comparison of Virulent and Avirulent Strains in Gnotoxenic Chickens', *Avian Diseases*, 26(4), pp. 787-797.
- Dho, M. and Lafont, J. P. (1984) 'Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks', *Avian Diseases*, 28, pp. 1016-1025.

- Dorman, C. J. (2007) 'H-NS, the genome sentinel', *Nat Rev Microbiol*, 5(2), pp. 157-61.
- Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C. and III, R. C. (2000) 'Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region', *Infection and Immunity*, 68, pp. 4145-4154.
- Dziva, F., Hauser, H., Connor, T. R., Diemen, P. M. v., Prescott, G., Langridge, G. C., Eckert, S., Chaudhuri, R. R., Ewers, C., Mellata, M., Mukhopadhyay, S., III, R. C., Dougan, G., Wieler, L. H., Thomson, N. R., Pickard, D. J. and Stevens, M. P. (2013) 'Sequencing and Functional Annotation of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Serogroup O78 Strains Reveal the Evolution of *E. coli* Lineages Pathogenic for Poultry via Distinct Mechanisms'.
- Dziva, F. and Stevens, M. P. (2008) 'Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts', *Avian Pathology*, 37(4), pp. 355- 366.
- Eris, D., Preston, R. C., Scharenberg, M., Hulliger, F., Abgottspon, D., Pang, L., Jiang, X., Schwardt, O. and Ernst, B. (2016) 'The Conformational Variability of FimH: Which Conformation Represents the Therapeutic Target?', *Chembiochem*, 17(11), pp. 1012-20.
- Ewers, C., Antão, E.-M., Diehl, I., Philipp, H.-C. and Wieler, L. H. (2009) 'Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains with Zoonotic Potential', *Applied Environmental Microbiology*, 75(1), pp. 184-192.

- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antão, E., Latarnus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Bohnke, U., Steinruck, H., Phillip, H. and Wieler, L. (2007) 'Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they?', *International Journal of Medical Microbiology*, 297(3), pp. 163-176.
- Falkow, S. (1991) 'Bacterial Entry into Eukaryotic Cells', *Cell*, (65), pp. 1099-1102.
- Fallavena, L. C. B., Moraes, H. L. S., Salle, C. T. P., da Silva, A. B., Vargas, R. S., do Nascimento, V. P. and Canal, C. W. (2000) 'Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses - a microscopic and macroscopic study.', *Avian Pathology*, 29, pp. 557-562.
- Ferreira, A. J. and Knöbl, T. (2000) 'Colibacilose aviária', in Berchieri, A.M., M. (ed.) *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA, pp. 197-205.
- Finlay, B. B. and Falkow, S. (1997) 'Common themes in microbial pathogenicity revisited', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), pp. 136-169.
- Flechar, M., Cortes, M. A., Reperant, M. and Germon, P. (2012) 'New role for the *ibeA* gene in H₂O₂ stress resistance of *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 194(17), pp. 4550-60.
- Fleckenstein, J. M., Kopecko, D. J., Warren, R. L. and Elsinghort, E. A. (1996) 'Molecular characterization of the *tia* invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*', *Infection and Immunity*, 64(2256-2265).
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. and Hultgren, S. J. (2015) 'Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options', *Nat Rev Microbiol*, 13(5), pp. 269-84.

- Foxman, B. (2014) 'Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden', *Infect Dis Clin North Am*, 28(1), pp. 1-13.
- Furyk, J. S., Swann, O. and Molyneux, E. (2011) 'Systematic review: neonatal meningitis in the developing world', *Trop Med Int Health*, 16(6), pp. 672-9.
- Galiza, E. P. and Heath, P. T. (2009) 'Improving the outcome of neonatal meningitis', *Curr Opin Infect Dis*, 22(3), pp. 229-34.
- Gaschignard, J., Levy, C., Romain, O., Cohen, R., Bingen, E., Aujard, Y. and Boileau, P. (2011) 'Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years', *Pediatr Infect Dis J*, 30(3), pp. 212-7.
- Germon, P., Chen, Y., He, L., Blanco, J. E., Brée, A., Schouler, C., Huang, S. and Moulin-Schouleur, M. (2005) '*ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*', *Microbiology*, 151, pp. 1179-1186.
- Giaever, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, I. and Strom, A. R. (1988) 'Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 170(6), pp. 2841-9.
- Greene, S. E., Hibbing, M. E., Janetka, J., Chen, S. L. and Hultgren, S. J. (2015) 'Human urine decreases function and expression of type 1 pili in uropathogenic *Escherichia coli*', *MBio*, 6(4), pp. e00820.
- Gross, W. B. (1961) 'The development of "air sac disease"', *Avian Diseases*, 5, pp. 431-439.
- Guyer, D. M., Henderson, I. R., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. T. (2000) 'Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 38(1), pp. 53-66.

- Harwani, D. (2014) 'Regulation of gene expression: cryptic beta-glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* as a paradigm', *Braz J Microbiol*, 45(4), pp. 1139-44.
- Harwani, D., Zangoui, P. and Mahadevan, S. (2012) 'The beta-glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* is involved in the regulation of *oppA*, encoding an oligopeptide transporter', *J Bacteriol*, 194(1), pp. 90-9.
- Heath, P. T., Okike, I. O. and Oeser, C. (2011) 'Neonatal Meningitis: Can We Do Better?', *Hot Topics in Infection and Immunity in Children VIII: Vol. 719*: Springer New York.
- Hensel, M., Shea, J. E., Gleeson, C., Jones, M. D., Dalton, E. and Holden, D. W. (1995) 'Simultaneous Identification of Bacterial Virulence Genes by Negative Selection', *Science*, 269, pp. 400 - 403.
- Horlacher, R., Uhland, K., Klein, W., Ehrmann, M. and Boos, W. (1996) 'Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 178(21), pp. 6250-7.
- Horn, F., Correa, A. M. R., Barbieri, N. L., Glodde, S., Weyrauch, K. D., Kaspers, B., Driemeier, D., Ewers, C. and Wieler, L. H. (2012) 'Infections with Avian Pathogenic and Fecal *Escherichia coli* Strains Display Similar Lung Histopathology and Macrophage Apoptosis', *Plos One*, 7(7), pp. 11.
- Hung, C. S., Dodson, K. W. and Hultgren, S. J. (2009) 'A murine model of urinary tract infection', *Nat Protoc*, 4(8), pp. 1230-43.
- Hunstad, D. A. and Justice, S. S. (2010) 'Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*', *Annu. Rev. Microbiol.*, 64, pp. 203-21.

- Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M. and Stell, A. L. (2001) 'Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*', *J Infect Dis*, 183(1), pp. 78-88.
- Johnson, T. J., Siek, K. E., Johnson, S. J. and Nolan, L. K. (2006) 'DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains', *J Bacteriol*, 188(2), pp. 745-58.
- Kaaden, O. R., Lange, S. and Stiburek, B. (1982) 'Establishment and characterization of chicken embryo fibroblast clone LSCC-H32', *In Vitro*, 18(10), pp. 827-834.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. T. (2004) 'Pathogenic *Escherichia coli*', *Nature Reviews - Microbiology*, 2, pp. 123-140.
- Karimova, G., Robichon, C. and Ladant, D. (2009) 'Characterization of YmgF, a 72-residue inner membrane protein that associates with the *Escherichia coli* cell division machinery', *J Bacteriol*, 191(1), pp. 333-46.
- Kariyawasam, S., Johnson, T. J., Debroy, C. and Nolan, L. K. (2006) 'Occurrence of pathogenicity island I (APEC-O1) genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis', *Avian Diseases*, 50, pp. 405-410.
- Khasheii, B., Anvari, S. and Jamalli, A. (2016) 'Frequency evaluation of genes encoding siderophores and the effects of different concentrations of Fe ions on growth rate of uropathogenic *Escherichia coli*', *Iran J Microbiol*, 8(6), pp. 359-365.
- Kim, K. S. (2001) '*Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier', *Infection and Immunity*, 69, pp. 5217-5222.

- Kim, K. S. (2003) 'Pathogenesis of bacterial meningitis: From bacteraemia to neuronal injury', *Nature Reviews Neuroscience*, 4(5), pp. 376-385.
- Kim, K. S. (2008) 'Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier', *Nature Reviews - Microbiology*, 625-634.
- Klemm, P., Hancock, V. and Schembri, M. A. (2010) 'Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*', *Environmental Microbiology Reports*, 2(5), pp. 628-640.
- Knobl, T., Moreno, A., Paixao, R., Gomes, T., Vieira, M., Leite, D., Blanco, J. and Ferreira, A. (2012) 'Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Clone Harboring *sfa* Gene in Brazil', *Scientific World Journal*.
- Ku, L. C., Boggess, K. A. and Cohen-Wolkowicz, M. (2015) 'Bacterial meningitis in infants', *Clin Perinatol*, 42(1), pp. 29-45, vii-viii.
- Kuczynska-Wisnik, D., Stojowska, K., Matuszewska, E., Leszczynska, D., Algara, M. M., Augustynowicz, M. and Laskowska, E. (2015) 'Lack of intracellular trehalose affects formation of *Escherichia coli* persister cells', *Microbiology*, 161(Pt 4), pp. 786-96.
- Kuwahara, H., Myers, C. J. and Samoilov, M. S. (2010) 'Temperature control of fimbriation circuit switch in uropathogenic *Escherichia coli*: quantitative analysis via automated model abstraction', *PLoS Comput Biol*, 6(3), pp. e1000723.
- La Ragione, R. and Woodward, M. (2002) 'Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia', *Research in Veterinary Science*, 73(1), pp. 27-35.

- Li, G., Tivendale, K., Liu, P., Feng, Y., Wannemuehler, Y., Cai, W., Mangiamele, P., Johnson, T., Constantinidou, C., Penn, C. and Nolan, L. (2011) 'Transcriptome Analysis of Avian Pathogenic *Escherichia coli* O1 in Chicken Serum Reveals Adaptive Responses to Systemic Infection', *Infection and Immunity*, 79(5), pp. 1951-1960.
- Li, G. W., Laturus, C., Ewers, C. and Wieler, L. H. (2005) 'Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis', *Infection and Immunity*, 73(5), pp. 2818-2827.
- Li, H., Su, H., Kim, S. B., Chang, Y. K., Hong, S. K., Seo, Y. G. and Kim, C. J. (2012) 'Enhanced production of trehalose in *Escherichia coli* by homologous expression of *otsBA* in the presence of the trehalase inhibitor, validamycin A, at high osmolarity', *J Biosci Bioeng*, 113(2), pp. 224-32.
- Mahadevan, S., Reynolds, A. E. and Wright, A. (1987) 'Positive and negative regulation of the *bgl* operon in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 169(6), pp. 2570-8.
- Marc, D., Arne, P., Bree, A. and Dho-Moulin, M. (1998) 'Colonization ability and pathogenic properties of a *fim(-)* mutant of an avian strain of *Escherichia coli*', *Res Microbiol*, 149(7), pp. 473-485.
- Martinez, J. J., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner and S. J. Hultgren (2000) 'Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells', *EMBO Journal*, 19(12), pp. 2803–2812.
- Maruvada, R. and Kim, K. S. (2012) 'IbeA and OmpA of *Escherichia coli* K1 exploit Rac1 activation for invasion of human brain microvascular endothelial cells', *Infect Immun*, 80(6), pp. 2035-41.

- Masuda, N. and Church, G. M. (2002) '*Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA', *J Bacteriol*, 184(22), pp. 6225-34.
- Matter, L. B., Barbieri, N. L., Nordhoff, M., Ewers, C. and Horn, F. (2011) 'Avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts', *Veterinary Microbiology*, 148(1), pp. 51-59.
- Mazurkiewicz, P., Tang, C. M., Boone, C. and Holden, D. W. (2006) 'Signature-tagged mutagenesis: barcoding mutants for genome-wide screens', *Nature Reviews - Genetics*, 7, pp. 929-939.
- Mekalanos, J. J. (1992) 'Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria', *J Bacteriol*, 174(1), pp. 1-7.
- Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., III, R. C., Brown, P. K., Arné, P., Brée, A., Desautels, C. and Fairbrother, J. M. (2003a) 'Role of Virulence Factors in Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* to Serum and in Pathogenicity', *Infection and Immunity*, 71(1), pp. 536-540.
- Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., III, R. C., Lehoux, B. and Fairbrother, J. M. (2003b) 'Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages', *Infection and Immunity*, 71, pp. 494-503.
- Mittal, R., Krishnan, S., Gonzalez-Gomez, I. and Prasadarao, N. V. (2011) 'Deciphering the roles of outer membrane protein A extracellular loops in the pathogenesis of *Escherichia coli* K1 meningitis', *J Biol Chem*, 286(3), pp. 2183-93.

- Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockatell, C. V., Jones, B. D. and Warren, J. W. (1990) 'Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains', *Infect Immun*, 58(5), pp. 1281-9.
- Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, M. R., Bree, A., Germon, P., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M. and Blanco, J. (2006) 'Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin', *J Clin Microbiol*, 44(10), pp. 3484-92.
- Muller, C. M., Aberg, A., Straseviciene, J., Emody, L., Uhlin, B. E. and Balsalobre, C. (2009) 'Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP', *PLoS Pathog*, 5(2), pp. e1000303.
- Mulvey, M., Lopez-Boado, Y., Wilson, C., Roth, R., Parks, W., Heuser, J. and Hultgren, S. (1998) 'Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*', *Science*, 20(282), pp. 1494-7.
- Nagai, S., Yagihashi, T. and Ishihama, A. (1998) 'An avian pathogenic *Escherichia coli* strain produces a hemolysin, the expression of which is dependent on cyclic AMP receptor protein gene function', *Veterinary Microbiology*, 60, pp. 227-238.
- NCBI (2017) *E. coli* Genomes.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?db=genome&cmd=Retrieve&map_dopt=Overview&list_uids=167 (Accessed: 21/08/2017 2017).

- Nolan, L. K., Horne, S. M., Giddings, C. W., Foley, S. L., Johnson, T. J., Lynne, A. M. and Skyberg, J. (2003) 'Resistance to serum complement, *iss* and virulence of avian *Escherichia coli*', *Veterinary Research Communications*, 27, pp. 101-110.
- Orndorff, P. E. and Falkow, S. (1985) 'Nucleotide sequence of *pilA*, the gene encoding the structural component of type 1 pili in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 162(1), pp. 454-7.
- Parreira, V. R. and Gyles, C. L. (2003) 'A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin', *Infection and Immunity*, 71(9), pp. 5087-5096.
- Pavanelo, D. B. (2013) Padronização da técnica de mutagênese marcada com assinatura para obtenção de mutantes de *Escherichia coli* patogênica aviária com virulência atenuada. Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular., Porto Alegre, Brasil.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. and Denamur, E. (1999) 'The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection', *Infect. Immun.*, 67(2), pp. 546-553.
- Polin, R. A. and Comm Fetus, N. (2012) 'Management of Neonates With Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis', *Pediatrics*, 129(5), pp. 1006-1015.

- Porcheron, G., Chanteloup, N. K., Trotereau, A., Bree, A. and Schouler, C. (2012) 'Effect of fructooligosaccharide metabolism on chicken colonization by an extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strain', *PLoS One*, 7(4), pp. e35475.
- Pourbakhsh, S. A., Boulianne, M., Martineau-Doizé, B. and Fairbrother, J. M. (1997) 'Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens', *Veterinary Microbiology*, 58, pp. 195 - 213.
- Pramoonjago, P., Kaneko, M., Kinoshita, T., Ohtsubo, E., Takeda, J., Hong, K. S., Inagi, R. and Inoue, K. (1992) 'Role of TraT protein, an anticomplementary protein produced in *Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance', *Journal of Immunology*, 148, pp. 827-836.
- Provence, D. L. and Curtiss, R. (1994) 'Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain.', *Infection and Immunity*, 62(4), pp. 1369-1380.
- Raskin, D. M., Seshadri, R., Pukatzki, S. U. and Mekalanos, J. J. (2006) 'Bacterial genomics and pathogen evolution', *Cell*, 124(4), pp. 703-714.
- Reis, R. S. and Horn, F. (2010) 'Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases', *Gut Pathogens*, 2(8).
- Rimmele, M. and Boos, W. (1994) 'Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 176(18), pp. 5654-64.
- Rouquet, G., Porcheron, G., Barra, C., Reperant, M., Chanteloup, N. K., Schouler, C. and Gilot, P. (2009) 'A metabolic operon in extraintestinal pathogenic

- Escherichia coli* promotes fitness under stressful conditions and invasion of eukaryotic cells', *J Bacteriol*, 191(13), pp. 4427-40.
- Russo, T. A., Carlino, U. B. and Johnson, J. R. (2001) 'Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*', *Infection and Immunity*, 69(10), pp. 6209-6216.
- Sabri, M., Caza, M., Proulx, J., Lymberopoulos, M. H., Brée, A., Moulin-Schouleur, M., III, R. C. and Dozois, C. M. (2008) 'Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122', *Infection and Immunity*, 76, pp. 601-611.
- Salscheider, S. L., Jahn, A. and Schnetz, K. (2014) 'Transcriptional regulation by BglJ–RcsB, a pleiotropic heteromeric activator in *Escherichia coli*', *Nucleic Acids Res*, 42(5), pp. 2999-3008.
- Sankar, T. S., Neelakanta, G., Sangal, V., Plum, G., Achtman, M. and Schnetz, K. (2009) 'Fate of the H-NS-repressed *bgl* operon in evolution of *Escherichia coli*', *PLoS Genet*, 5(3), pp. e1000405.
- Sauer, F. G., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J. and Hultgren, S. J. (2000) 'Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis', *Current Opinion in Microbiology*, 3, pp. 65-72.
- Schaeffler, S. (1967) 'Inducible system for the utilization of beta-glucosides in *Escherichia coli*. I. Active transport and utilization of beta-glucosides', *J Bacteriol*, 93(1), pp. 254-63.
- Schnetz, K. (1995) 'Silencing of *Escherichia coli bgl* promoter by flanking sequence elements', *EMBO J.*, 14(11), pp. 2545-50.

- Schnetz, K. and Rak, B. (1988) 'Regulation of the *bgl* operon of *Escherichia coli* by transcriptional antitermination', *Embo j*, 7(10), pp. 3271-7.
- Schnetz, K. and Rak, B. (1990) 'Beta-glucoside permease represses the *bgl* operon of *Escherichia coli* by phosphorylation of the antiterminator protein and also interacts with glucose-specific enzyme III, the key element in catabolite control', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(13), pp. 5074-8.
- Schnetz, K., Toloczyki, C. and Rak, B. (1987) 'Beta-glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization, and possible evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes', *J. Bacteriol.*, 169(6), pp. 2579-90.
- Schouler, C., Taki, A., Chouikha, I., Moulin-Schouleur, M. and Gilot, P. (2009) 'A genomic island of an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* Strain enables the metabolism of fructooligosaccharides, which improves intestinal colonization', *J Bacteriol*, 191(1), pp. 388-93.
- Schwan, W. R., Lee, J. L., Lenard, F. A., Matthews, B. T. and Beck, M. T. (2002) 'Osmolarity and pH Growth Conditions Regulate *fim* Gene Transcription and Type 1 Pilus Expression in Uropathogenic *Escherichia coli*', *Infection and Immunity*, 70(3), pp. 1391-1402.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D. and Higgins, D. G. (2011) 'Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega', *Mol Syst Biol*, 7, pp. 539.
- Skyberg, J. A., Johnson, T. J., Johnson, J. R., Clabots, C., Logue, C. M. and Nolan, L. K. (2006) 'Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli*

- plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney', *Infect Immun*, 74(11), pp. 6287-92.
- Smith, S. G. J., Mahon, V., Lambert, M. A. and Fagan, R. P. (2007) 'A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression', *FEMS Microbiology Letters*, 273, pp. 1-11.
- Snyder, J. A., Haugen, B. J., Buckles, E. L., Lockett, C. V., Johnson, D. E., Donnenberg, M. S., Welch, R. A. and Mobley, H. L. (2004) 'Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection', *Infect Immun*, 72(11), pp. 6373-81.
- Stamm, W. E. and Norrby, S. R. (2001) 'Urinary tract infections: disease panorama and challenges', *J Infect Dis*, 183 Suppl 1, pp. S1-4.
- Stathopoulos, C., Provence, D. L. and Curtiss, R. (1999) 'Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters', *Infection and Immunity*, 67(2), pp. 772-781.
- Stawski, G., Nielsen, L., Orskov, F. and Orskov, I. (1990) 'Serum sensitivity of a diversity of *Escherichia coli* antigenic reference strains. Correlation with an LPS variation phenomenon', *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 98, pp. 828-838.
- Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A., Lemons, J. A., Donovan, E. F., Stark, A. R., Tyson, J. E., Oh, W., Bauer, C. R., Korones, S. B., Shankaran, S., Laptook, A. R., Stevenson, D. K., Papile, L. A. and Poole, W. K. (2002) 'Late-onset sepsis in very low birth

- weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network', *Pediatrics*, 110(2 Pt 1), pp. 285-91.
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Sánchez, P. J., Faix, R. G., Poindexter, B. B., Van Meurs, K. P., Bizzarro, M. J., Goldberg, R. N., Frantz, I. D., Hale, E. C., Shankaran, S., Kennedy, K., Carlo, W. A., Watterberg, K. L., Bell, E. F., Walsh, M. C., Schibler, K., Laptook, A. R., Shane, A. L., Schrag, S. J., Das, A., Higgins, R. D. and Network, E. K. S. N. I. o. C. H. a. H. D. N. R. (2011) 'Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues', *Pediatrics*, 127(5), pp. 817-26.
- Stordeur, P., Bree, A., Mainil, J. and Moulin-Schouler, M. (2004) 'Pathogenicity of *pap*-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicaemic lesions.', *Microbes and Infection*, 6, pp. 637-645.
- Stordeur, P., Marlier, D., Blanco, J., Oswald, E., Biet, F., Dho-Moulin, M. and Mainil, J. (2002) 'Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesion genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli* ', *Veterinary Microbiology*, 84, pp. 231-241.
- Strom, A. R. and Kaasen, I. (1993) 'Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression', *Mol Microbiol*, 8(2), pp. 205-10.
- Styvold, O. B. and Strom, A. R. (1991) 'Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli*-K-12 strains - influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase', *Journal of Bacteriology*, 173(3), pp. 1187-1192.

- Su, Q., Guan, T. and Lv, H. (2016) 'Siderophore biosynthesis coordinately modulated the virulence-associated interactive metabolome of uropathogenic *Escherichia coli* and human urine', *Sci Rep*, 6, pp. 24099.
- Swaggerty, C., Pevzner, I., He, H., Genovese, K., Nisbet, D., Kaiser, P. and Kogut, M. (2009) 'Selection of Broilers with Improved Innate Immune Responsiveness to Reduce On-Farm Infection by Foodborne Pathogens', *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), pp. 777-783.
- Tan, J., Kan, J., Qiu, G., Zhao, D., Ren, F., Luo, Z. and Zhang, Y. (2015) 'Clinical Prognosis in Neonatal Bacterial Meningitis: The Role of Cerebrospinal Fluid Protein', *PLoS One*, 10(10), pp. e0141620.
- Thaver, D. and Zaidi, A. K. (2009) 'Burden of neonatal infections in developing countries: a review of evidence from community-based studies', *Pediatr Infect Dis J*, 28(1 Suppl), pp. S3-9.
- Thumbikat, P., Berry, R. E., Zhou, G., Billips, B. K., Yaggie, R. E., Zaichuk, T., Sun, T.-T., Schaeffer, A. J. and Klumpp, D. J. (2009) 'Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection', *PLOS Pathogens*, 5(5).
- Tivendale, K. A., Allen, J. L., Ginns, C. A., Crabb, B. S. and Browning, G. F. (2004) 'Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh* with plasmid mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*', *Infection and Immunity*, 72, pp. 6554-6560.
- Tivendale, K. A., Logue, C. M., Kariyawasam, S., Jordan, D., Hussein, A., Li, G., Wannemuehler, Y. and Nolan, L. K. (2010) 'Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to

- cause meningitis in the rat model of human disease', *Infect Immun*, 78(8), pp. 3412-9.
- Valenski, M. L., Harris, S. L., Spears, P. A., Horton, J. R. and Orndorff, P. E. (2003) 'The Product of the fimI gene is necessary for *Escherichia coli* type 1 pilus biosynthesis', *J Bacteriol*, 185(16), pp. 5007-11.
- Van Dijk, W. C., Verbrugh, H. A., Tol, M. E. V. D., Peters, R. and Verhoef, J. (1979) 'Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonisation', *Infection and Immunity*, 25, pp. 603-609.
- Vanaporn, M., Sarkar-Tyson, M., Kovacs-Simon, A., Ireland, P. M., Pumirat, P., Korbsrisate, S., Titball, R. W. and Butt, A. (2017) 'Trehalase plays a role in macrophage colonization and virulence of *Burkholderia pseudomallei* in insect and mammalian hosts', *Virulence*, 8(1), pp. 30-40.
- Verma, R., Rojas, T. C., Maluta, R. P., Leite, J. L., da Silva, L. P., Nakazato, G. and Dias da Silveira, W. (2015) 'Fimbria-encoding gene *yadC* has a pleiotropic effect on several biological characteristics and plays a role in avian pathogenic *Escherichia coli* pathogenicity', *Infect Immun*, 84(1), pp. 187-93.
- Vokes, S., Reeves, S. A., Torres, A. G. and Payne, S. M. (1999) 'The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island', *Molecular Microbiology*, 33(1), pp. 63-73.
- Wang, R. F. and Kushner, S. R. (1991) 'Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*', *Gene*, 100, pp. 195-9.

- Wang, S., Niu, C., Shi, Z., Xia, Y., Yaqoob, M., Dai, J. and Lu, C. (2011) 'Effects of *ibeA* Deletion on Virulence and Biofilm Formation of Avian Pathogenic *Escherichia coli*', *Infection and Immunity*, 79(1), pp. 279-287.
- Withman, B., Gunasekera, T. S., Beesetty, P., Agans, R. and Paliy, O. (2013) 'Transcriptional Responses of Uropathogenic *Escherichia coli* to Increased Environmental Osmolality Caused by Salt or Urea', *Infection and Immunity*, 81(1), pp. 80-89.
- Wooster, D. G., Maruvada, R., Blom, A. M. and Prasadarao, N. V. (2006) 'Logarithmic phase *Escherichia coli* K1 efficiently avoids serum killing by promoting C4bp-mediated C3b and C4b degradation', *Immunology*, 117(4), pp. 482-93.
- Zhao, L., Gao, S., Huan, H., Xu, X., Zhu, X., Yang, W., Gao, Q. and Lui, X. (2009) 'Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model', *Microbiology*, 155, pp. 1634-1644.
- Zhou, L., Lei, X. H., Bochner, B. R. and Wanner, B. L. (2003) 'Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems', *J Bacteriol*, 185(16), pp. 4956-72.

CURRICULUM VITÆ

PAVANELO, D. B.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Daniel Brisotto Pavanelo

Local e data de nascimento: 26/09/1989, Porto Alegre/RS, Brasil

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500. Agronomia. Porto Alegre/RS.

Telefone profissional: +55 51 33087610

E-mail: srpavanelo@gmail.com

2. FORMAÇÃO:

Graduação em Biomedicina (UFRGS, 2010)

Mestrado em Biologia Celular e Molecular (UFRGS, 2013)

3. ESTÁGIOS:

Estágio curricular em análises clínicas na Policlínica Militar de Porto Alegre (2010);

Estágio como iniciação científica no Laboratório de Microbiologia Celular (2009 – 2010), sob orientação da prof. Fabiana Horn e com bolsa FAPERGS;

Estágio como bolsista da Secretaria de Educação à Distância (2008), sob orientação da prof. Fabiana Horn e com bolsa CNPq..

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

DE OLIVEIRA, ALINE LUÍSA; ROCHA, DÉBORA ASSUMPÇÃO; FINKLER, FABRINE; DE MORAES, LUCAS BRUNELLI; BARBIERI, NICOLLE LIMA; **PAVANELO, DANIEL BRISOTTO**; WINKLER, CRISTINA; GRASSOTTI, TIELA TRAPP; DE BRITO, KELLY CRISTINA TAGLIARI; DE BRITO, BENITO GUIMARÃES; HORN, FABIANA. Prevalence of ColV Plasmid-Linked Genes and *In Vivo* Pathogenicity of Avian Strains of *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*^{JCR}, v. 12, p. 679-685, 2015.

BARBIERI, NICOLLE LIMA; OLIVEIRA, ALINE LUÍSA DE; TEJKOWSKI, THIAGO MOREIRA; **PAVANELO, DANIEL BRISOTTO**; MATTER, LETÍCIA BEATRIZ; PINHEIRO, SANDRA REGINA SCHINCARIOL; VAZ, TÂNIA MARA IBELLI ; NOLAN, LISA K.; LOGUE, CATHERINE M.; BRITO, BENITO GUIMARÃES DE; HORN, FABIANA. Molecular Characterization and Clonal Relationships Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Colisepticemia. *Foodborne Pathogens and Disease*^{JCR}, v. 12, p. 74-83, 2015.

BARBIERI, NICOLLE LIMA; OLIVEIRA, ALINE LUÍSA DE; TEJKOWSKI, THIAGO MOREIRA; **PAVANELO, DANIEL BRISOTTO**; ROCHA, DÉBORA ASSUMPÇÃO; MATTER, LETÍCIA BEATRIZ; CALLEGARI-JACQUES, SIDIA MARIA; DE BRITO, BENITO GUIMARÃES; HORN, FABIANA. Genotypes and Pathogenicity of Cellulitis Isolates Reveal Traits That Modulate APEC Virulence. Plos One ^{JCR}, v. 8, p. e72322, 2013.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

PAVANELO, DANIEL BRISOTTO; HOULE, S.; MATTER, L. B.; DOZOIS, C. M.; HORN, F.. The *treA* gene contributes to expression of type I fimbriae and colonization of the urinary tract of extraintestinal pathogenic *E. coli* strain BEN2908. In: XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2016, Rosario. Resúmenes del XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2016.

PAVANELO, DANIEL BRISOTTO; HOULE, S.; MATTER, LETÍCIA BEATRIZ; DOZOIS, C. M.; HORN, F. Caractérisation du mutant *treA* de la souche APEC BEN2908. In: 9e Congrès Armand-Frappier, 2015, Magog-Orford. Résumés du 9e Congrès Armand-Frappier, 2015.

PAVANELO, DANIEL BRISOTTO; MATTER, LETÍCIA BEATRIZ; HORN, FABIANA; DOZOIS, C. M. Selection and characterization of attenuated mutants of the APEC strain BEN2908. In: 8e Symposium du CRIPA (Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole), 2015, Saint-Hyacinthe. PROGRAMME COMPLET DU 8e SYMPOSIUM ANNUEL DU CRIPA 21-22 MAI 2015, 2015.

PAVANELO, DANIEL BRISOTTO; MATTER, LETÍCIA BEATRIZ; DOZOIS, C. M.; HORN, FABIANA. Selection and characterization of attenuated mutants of the APEC strain BEN2908. In: 65th Annual Conference of The Canadian Society of Microbiology, 2015, Regina, SK. Abstract library of the 65th Annual Conference of The Canadian Society of Microbiology, 2015.

PAVANELO, DANIEL BRISOTTO; HORN, F. IN VITRO SELECTION OF NON-INVASIVE AVIAN PATHOGENIC *Escherichia Coli* MUTANTS. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. Anais do 27º CBM, 2013.

PAVANELO, D. B.; matter, L. B.; HORN, F. Produção de uma biblioteca de 1800 mutantes de *Echerichia coli* patogênica aviária através da técnica de mutagênese marcada com assinatura. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu.