

O flagelo de *Aliarcobacter butzleri*: avaliação do seu papel na motilidade e virulência

Versão final após defesa

Raquel Neves Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof.^a Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira
Co-orientador: Prof.^a Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro

janeiro de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Raquel Neves Santos, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10730 do 2º ciclo de estudos de mestrado em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 31 /10 /2022

A handwritten signature in blue ink that reads "Raquel Neves Santos". The signature is written in a cursive style and is centered on the page.

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente
assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Agradecimentos

Nesta secção, gostaria de expressar a minha gratidão a todos os que contribuíram de diversas formas e me apoiaram no processo de desenvolvimento e escrita desta dissertação. Por estes motivos, quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora, Professora Doutora Susana Ferreira, por aceitar orientar-me, pela constante disponibilidade, ajuda prestada, paciência, ensinamentos e sabedoria que me transmitiu ao longo destes meses de colaboração. Admiro a sua capacidade de dedicação profissional, associada a uma permanente atualização científica.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Mónica Oleastro, pela orientação prestada na realização deste trabalho de investigação, pelas críticas, sugestões e partilha de conhecimento.

Aos meus amigos, aos meus colegas de laboratório Cristiana, Inês, Joel, Madalena e Marina, gostaria de agradecer todos os momentos passados dentro e fora do local de trabalho, pelas gargalhadas e boa disposição, mas também pelos conselhos e conforto nos momentos chave. Um especial agradecimento à Cristiana pela permanente disponibilidade em todo o processo de integração, amizade, conhecimento transmitido e auxílio prestado.

À minha irmã, Madalena, que foi um pilar importante ao longo desta caminhada académica. Aos meus pais, pela educação transmitida, incentivo e encorajamento ao longo destes anos de estudo e por regarem em mim o jardim do sonho. Ao meu namorado, Pedro, por todo o companheirismo, amizade e palavras de conforto. Agradeço-lhes todo o incentivo, paciência, auxílio e principalmente pela compreensão do tempo que este trabalho sonou ao convívio familiar. Obrigado por fazerem parte da minha vida!

Ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior por possibilitarem a realização deste trabalho de investigação e à colaboração do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Muito obrigado a todos!

Resumo

Aliarcobacter butzleri é uma espécie de bactérias de Gram-negativo, pertencente ao género *Aliarcobacter* e à família *Arcobacteraceae*. Este microrganismo está distribuído em diversos ambientes e hospedeiros sendo descrito como um agente enteropatogénico devido à sua associação com doença diarreica. A patogenicidade de *A. butzleri* tem sido destacada pela sua capacidade de aderir, invadir e até sobreviver intracelularmente em linhas celulares epiteliais do intestino, para além de produzir toxinas e induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias. O flagelo bacteriano é um conhecido fator de virulência, com um papel importante em diversos agentes enteropatogénicos. A espécie de *A. butzleri* possui um único flagelo polar, cujo filamento possui a proteína flagelina A, que representa a principal unidade do filamento flagelar e que confere motilidade à bactéria. Embora tenham sido feitos alguns estudos para elucidar a potencial patogenicidade de *A. butzleri*, existe ainda a necessidade de compreender melhor o mecanismo que desencadeia a infeção por esta bactéria. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o papel do flagelo na virulência de *A. butzleri*. Para tal, começou por se analisar o perfil de motilidade de diversos isolados de *A. butzleri*, os quais apresentaram elevada variabilidade. De seguida, de forma a perceber o comportamento de *A. butzleri* na presença de um conjunto de fatores ambientais e outros associados à passagem da bactéria através do trato gastrointestinal, foi avaliada a motilidade bacteriana de duas estirpes selecionadas. Assim, a motilidade apresentou-se diminuída em condições de aerobiose, em concentrações menores de nutrientes e à medida que a temperatura diminuía, apresentando menor valor de motilidade a 15 °C. Também, na presença de mucinas e concentrações mais altas de ácidos gordos de cadeia curta, (90 e 130 mM) associadas ao intestino grosso, a motilidade diminuiu. Posteriormente, foi avaliada a expressão do gene *flaA*, que codifica para a flagelina de *A. butzleri*, na presença de compostos associados ao intestino, não sendo no geral observadas diferenças significativas na expressão do gene nas condições testadas em relação ao controlo. No entanto, na presença de 30 e 90 mM de ácidos gordos de cadeia curta em relação aos controlos de NaCl, verificou-se um aumento significativo da expressão de *flaA* em ambos os casos. De seguida, avaliou-se o papel funcional do flagelo na virulência de *A. butzleri*, através da construção de um mutante por mutagénesse insercional no gene *flaA* e através de transformação natural. Para tal, foi avaliado o efeito desta mutação na motilidade, na formação de biofilmes, na velocidade bacteriana, na capacidade de aderir e invadir células Caco-2 e na capacidade de adesão a mucinas. A estirpe mutante de *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* exibiu uma diminuição da motilidade, velocidade média, capacidade de formar biofilmes, de aderir a mucinas e de invadir a linha celular Caco-2, não reduzindo

a sua capacidade de adesão celular, quando comparada com a estirpe nativa. Em suma, tendo em conta os resultados obtidos podemos afirmar que a influência das condições ambientais e do hospedeiro podem afetar o perfil de motilidade bacteriana e o flagelo apresenta um papel importante na mediação da patogenicidade de *A. butzleri*.

Palavras-chave

Aliarcobacter butzleri; Virulência; Motilidade; Flagelo; Flagelina A; Hospedeiro; Condições ambientais.

Abstract

Aliarcobacter butzleri is a Gram-negative bacterium, belonging to the genus *Aliarcobacter* and the family *Arcobacteraceae*. This microorganism is distributed in diverse environments and hosts and it is described as an enteropathogenic agent due to its association with diarrheal disease. The pathogenicity of *A. butzleri* has been highlighted by its ability to adhere, invade and even survive intracellularly in intestinal epithelial cell lines, in addition to producing toxins and inducing the secretion of pro-inflammatory cytokines. The bacterial flagellum is a known virulence factor with an important role in several enteropathogenic agents. *A. butzleri* has a single polar flagellum, whose filament contain the flagellin A protein, which represents the main unit of the flagellar filament and confers motility to the bacterium. Although some studies have been done to elucidate the potential pathogenicity of *A. butzleri*, there is still a need to better understand the mechanism that triggers infection by this bacterium. Thus, this work aimed to evaluate the role of the flagellum in the virulence of *A. butzleri*. To this end, the motility profile of several isolates of *A. butzleri* was first analyzed, which showed high variability. Next, in order to understand the behavior of *A. butzleri* in the presence of a set of environmental factors and others associated with the passage of the bacterium through the gastrointestinal tract, the bacterial motility of two selected strains was evaluated. The results show that motility under aerobic conditions, in lower nutrient concentrations and as the temperature decreased, with the lowest motility value being at 15 °C. In addition, motility in the presence of mucins and higher concentrations of short chain fatty acids, (90 and 130 mM) associated with the large intestine also diminished. Subsequently, the expression of the *flaA* gene encoding for *A. butzleri* flagellin in the presence of gut-associated compounds was evaluated, and overall, no significant differences in gene expression under the tested conditions were observed compared to the control. However, in the presence of 30 and 90 mM of short chain fatty acids a significant increase in *flaA* expression when compared to NaCl controls. Next, the functional role of the flagellum in the virulence of *A. butzleri* was evaluated by constructing a mutant by insertional mutagenesis in the *flaA* gene and by natural transformation. To this end, the effect of this mutation on motility, biofilm formation, bacterial speed, ability to adhere to and to invade Caco-2 cells, and the ability to adhere to mucins were evaluated. The mutant strain of *A. butzleri* DQ40A1Δ*flaA* exhibited decreased motility and mean velocity, less ability to form biofilms, less ability to adhere to mucins as well as to invade Caco-2 cell line, while not reducing its cell adhesion ability, when compared to the native strain. In summary, considering the obtained results, we

can state that the influence of environmental and host conditions can affect the bacterial motility profile and the bacterial flagellum plays an important role in mediating the pathogenicity of *A. butzleri*.

Keywords

Aliarcobacter butzleri; Virulence; Motility; Flagellum; Flagellin A; Host; Environmental conditions.

Índice

Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1 Género <i>Aliarcobacter</i>	1
1.1.1 Contexto histórico e Classificação taxonómica	1
1.1.2 Características do género <i>Aliarcobacter</i>	3
1.2 Fontes de contaminação e vias de transmissão do género <i>Aliarcobacter</i>	3
1.2.1 <i>Aliarcobacter</i> em água	4
1.2.2 <i>Aliarcobacter</i> em alimentos	5
1.2.3 <i>Aliarcobacter</i> em animais	6
1.2.4 <i>Aliarcobacter</i> em humanos	7
1.3 Virulência e Patogenicidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	8
1.4 Flagelo bacteriano	12
1.4.1 Morfologia e estrutura do flagelo bacteriano	13
1.4.2 Estrutura do flagelo em <i>Aliarcobacter butzleri</i>	15
1.4.3 O flagelo na virulência bacteriana	16
1.4.3.1 O flagelo na formação de biofilmes bacterianos	17
1.4.3.2 O flagelo na adesão e invasão	18
1.4.3.3 Interação da bactéria com o hospedeiro	19
Capítulo 2	21
Objetivos	21
Capítulo 3	22
Materiais e Métodos	22
3.1 Estirpes usadas no estudo	22
3.2 Condições gerais de armazenamento	22
3.3 Condições gerais de crescimento	22
3.4 Avaliação da sobrevivência de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	23
3.5 Avaliação da motilidade bacteriana	24
3.5.1 Influência da temperatura, das condições atmosféricas e da concentração de nutrientes na motilidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	24

3.5.2	Influência da mucina e ácidos gordos de cadeia curta na motilidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	25
3.6	Determinação das curvas de crescimento	25
3.7	Determinação da expressão do gene <i>flaA</i> na presença de mucinas e ácidos gordos de cadeia curta	25
3.8	Construção do mutante do filamento flagelar de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	27
3.8.1	Extração de DNA genómico de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	27
3.8.2	Obtenção do fragmento de DNA transformante	27
3.8.2.1	Extração do plasmídeo pUC18-K2 de <i>Escherichia coli</i>	27
3.8.2.2	Digestão do plasmídeo pUC18-K2 e purificação da cassette <i>aphA-3</i>	28
3.8.2.3	Construção dos fragmentos hibridizantes com a cassette <i>aphA-3</i>	29
3.8.2.4	Junção dos fragmentos hibridizantes com a cassette <i>aphA-3</i>	31
3.9	Transformação Natural	32
3.10	Confirmação da mutagénese	33
3.10.1	Verificação da inserção do fragmento de DNA transformante	33
3.10.2	Verificação da expressão do gene <i>flaA</i>	34
3.11	Avaliação da influência do gene <i>flaA</i> na virulência de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	35
3.11.1	Avaliação da motilidade	35
3.11.2	Velocidade média de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	35
3.11.3	Capacidade de formação de biofilmes	35
3.11.4	Capacidade de adesão e invasão de <i>Aliarcobacter butzleri</i> a células Caco-2	36
3.11.5	Adesão de <i>Aliarcobacter butzleri</i> a mucinas	37
3.12	Análise Bioinformática	38
Capítulo 4		39
Resultados e Discussão		39
4.1	Motilidade bacteriana	39
4.1.1	Motilidade dos isolados clínicos e alimentares de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	39
4.1.2	Influência de diferentes condições ambientais e a nível do hospedeiro na motilidade bacteriana de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	42
4.1.2.1	Influência da temperatura e das condições atmosféricas na motilidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	43

4.1.2.2	Influência da concentração de nutrientes na motilidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	46
4.1.2.3	Influência de diferentes compostos associados ao hospedeiro na motilidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	48
4.2	Avaliação da expressão do gene <i>flaA</i> na presença de compostos presentes no hospedeiro	52
4.3	Análise bioinformática	56
4.4	Construção do mutante do filamento flagelar de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	58
4.5	Efeito da deleção do gene <i>flaA</i> no crescimento bacteriano	60
4.6	Efeito da deleção do gene <i>flaA</i> na virulência de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	61
4.6.1	Motilidade na estirpe <i>Aliarcobacter butzleri</i>	61
4.6.2	Velocidade média de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	62
4.6.3	Formação de biofilmes na estirpe <i>Aliarcobacter butzleri</i>	64
4.6.4	Adesão e invasão de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	66
4.6.5	Adesão de <i>Aliarcobacter butzleri</i> a mucinas	67
	Capítulo 5	69
	Conclusões	69
	Capítulo 6	71
	Perspetivas Futuras	71
	Referências Bibliográficas	72
	Apêndice I	89
	Apêndice II	91

Lista de Figuras

- Figura 1** – Representação dos diferentes números e organizações dos flagelos nas bactérias. 13
- Figura 2** – Representação esquemática da estrutura flagelar das bactérias de Gram-negativo. 14
- Figura 3** – Representação da digestão do plasmídeo pUC18-K2 de *Escherichia coli*, com o objetivo de obtenção da cassette de resistência à canamicina *aphA-3*. 29
- Figura 4** – Representação esquemática da construção dos fragmentos hibridizantes, com a amplificação da região a jusante do codão de iniciação e a montante do códon stop do gene *flaA*, resultando nos fragmentos A e B respectivamente. 30
- Figura 5** – Representação esquemática da construção do fragmento de DNA transformante (Fragmento C), através da união dos fragmentos A e B com a cassette de resistência à canamicina *aphA-3*. 31
- Figura 6** – Halo da motilidade dos 19 isolados de *Aliarcobacter butzleri* em milímetros. 39
- Figura 7** – Árvore filogenética obtida através da concatenação dos 34 genes flagelares para cada um dos isolados. 41
- Figura 8** – Árvore filogenética obtida através da concatenação dos principais genes considerados polimórficos do genoma core (*flgD*, *flgL*, *flgK*, *flgE2*, *flgG2* e *flgH*). 42
- Figura 9** – Representação da influência da temperatura (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C) na motilidade (em milímetros) bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 (A e B) e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (C e D). 44
- Figura 10** – Representação da influência da atmosfera (microaerobiose e aerobiose) na motilidade (em milímetros) bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 (A) e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (B). 45
- Figura 11** – Representação da influência de diferentes concentrações de TSB (não diluído; 1:1,25; 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:20) na motilidade (em milímetros) bacteriana de

Aliarcobacter butzleri AB28/11 (A) e de *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (B). Avaliação da sobrevivência dos isolados nos meios usados (C- *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e D- *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1). 47

Figura 12 – Representação da motilidade (em milímetros) bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 (A e B) e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (C e D) na presença de diferentes concentrações de ácidos gordos de cadeia curta e NaCl. 50

Figura 13 – Representação da motilidade (em milímetros) de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 (A) e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (B) na presença de 0,5 % de mucina. (C) - A sobrevivência da bactéria foi avaliada na presença de mucina, considerando o controlo (meio sem mucina) dos dois isolados em estudo, *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1. 52

Figura 14 – Curvas de crescimento de *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 na presença de compostos encontrados no intestino delgado e intestino grosso. 54

Figura 15 – Níveis relativos da expressão genética do gene *flaA* em *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1, quando cultivadas em diferentes concentrações de ácidos gordos de cadeia curta (A) e em 0,5 % de mucina tipo II do estômago de porco (B). O gráfico C representa as duas condições de ácidos gordos de cadeia curta (30 e 90 mM) em relação às concentrações de 30 e 90 mM NaCl. 55

Figura 16 – Árvore filogenética obtida através do alinhamento sequencial do gene *flaA* das 19 estirpes bacterianas utilizadas neste estudo. 57

Figura 17 – Extração e digestão do plasmídeo pUC18-K2. 58

Figura 18 – Amplificação dos fragmentos hibridizantes e do fragmento de DNA transformante. 59

Figura 19 – Verificação da incorporação do fragmento de DNA transformante no genoma bacteriano e análise da expressão do gene *flaA*. 60

Figura 20 – Curvas de crescimento da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*. 61

Figura 21 – Representação do halo da motilidade (em milímetros) de *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*, após 48 horas de incubação. 62

- Figura 22** – Análise da velocidade média bacteriana. 63
- Figura 23** – Capacidade de formação de biofilme da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* avaliada por coloração com violeta de cristal. 64
- Figura 24** – Imagens de microscopia de confocal com visualização da formação de biofilmes da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* em 2D e 3D. 65
- Figura 25** – Representação da adesão e invasão da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* em células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2). 66
- Figura 26** – Adesão das estirpes nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* na presença e ausência de mucinas. 68

Lista de Tabelas

- Tabela 1** – Representação das espécies incluídas no gênero *Aliarcobacter*, com a origem, país e ano de publicação. 2
- Tabela 2** – Genes putativos de virulência identificados no genoma de *Aliarcobacter butzleri* e a sua respetiva função. 11
- Tabela 3** – Lista de oligonucleótidos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real, sequência e tamanho. 26
- Tabela 4** – Sequências nucleotídicas dos oligonucleótidos iniciadores utilizados nas reações de PCR, com o respetivo tamanho. 29
- Tabela 5** – Lista dos oligonucleótidos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR, com o respetivo tamanho. 34
- Tabela 6** – Representação da sobrevivência bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 sob diversas temperaturas (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C) e em duas condições atmosféricas: microaerobiose e aerobiose. 43
- Tabela 7** – Sobrevivência bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 na presença de diferentes concentrações de NaCl e ácidos gordos de cadeia curta. 49

Lista de Acrónimos

ATPase	Adenosinatrifosfatase
BHI	“Brain Heart Infusion”
cDNA	DNA complementar
DMEM	“Dulbecco's modified Eagle”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO	Densidade ótica
gDNA	DNA genómico
IL-8	Interleucina-8
IMG	Intramamária
IP	Intraperitoneal
LB	“Luria Bertani”
NaCl	Cloreto de sódio
O	Oral
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos, do inglês “Pathogen-associated molecular patterns”
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês “Phosphate buffered saline”
PCR	Reações em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase chain reaction”
PRRs	Recetores de reconhecimento de padrão, do inglês “Pattern recognition receptors”
qPCR	PCR quantitativo em tempo real, do inglês “Real-time polymerase chain reaction”
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossómico
RT-PCR	Do inglês “Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction”
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TB	“Terrific Broth”
TLR-5	Recetor do tipo Toll-like 5, do inglês “Toll-like receptor 5”
TSA	“Tryptic Soy Agar”
TSB	“Tryptic Soy Broth”
UFC	Unidades formadoras de colónias
UV	Ultravioleta

Capítulo 1

Introdução

1.1 Género *Aliarcobacter*

1.1.1 Contexto histórico e Classificação taxonómica

A primeira vez que foi isolado um microrganismo identificado como *Arcobacter* foi em 1977 por Ellis et al., que descreveram esse organismo com uma forma espiralada presente em fetos suínos e bovinos. Este microrganismo foi posteriormente incluído no género *Campylobacter*, sendo classificado como *Campylobacter* aerotolerante com a capacidade de crescer a temperaturas baixas (Ferreira et al., 2016).

Em 1991 Vandamme et al., criaram o género *Arcobacter* para acomodar duas espécies aerotolerantes de *Campylobacter* (Vandamme et al., 1991): *Campylobacter nitrofigilis* (fixador de azoto, isolado de raízes de *Spartina alterniflora* Loisel e de raízes de sedimentos de pântanos de sal) (McClung et al., 1983) e *Campylobacter cryaerophila* (isolado de vias reprodutivas, fezes humanas e de animais, leite de vaca com inflamação do tecido da glândula mamária e de animais fetais abortados) (Neill et al., 1985). Estas espécies, *Campylobacter nitrofigilis* e *Campylobacter cryaerophila*, passaram a designar-se de *Arcobacter nitrofigilis* e *Arcobacter cryaerophila*, respetivamente (Collado & Figueras, 2011). O género *Arcobacter* foi então incluído na família *Campylobacteraceae* (Vandamme et al., 1991a), assim como os géneros *Sulfurospirillum* e *Campylobacter*, pertencentes à classe *Epsilonproteobacteria* (Ferreira et al., 2016; Miller et al., 2007).

Após um ano, o género *Arcobacter* sofreu algumas modificações, com a introdução de mais duas espécies: *Arcobacter skirrowii* (isolado de fezes diarreicas, suínos e ovinos, fetos abortados de ovinos, e ainda de fluídos prepuciais de touros) e *Arcobacter butzleri* (isolado de diarreia de animais e diarreia humana) (Vandamme, Vancanneyt, et al., 1992). Ao longo dos anos, diversas espécies foram reconhecidas como pertencendo a este género, sendo que se poderiam considerar neste momento 35 espécies, no género historicamente reconhecido como *Arcobacter*. A semelhança do gene 16S ácido ribonucleico ribossómico (rRNA) destas novas espécies justificaram a sua incorporação no género *Arcobacter*, mas em 2018, o trabalho de Diéguez et al. (2018) vem sugerir que algumas espécies poderiam pertencer a outros géneros, mostrando que a espécie *Arcobacter haliotis* era um heterotípico posterior a *Arcobacter lekithochrous* e para

além disso, *Arcobacter lekithochrous*, quando comparado com outras espécies de *Arcobacter*, apresentava baixa similaridade do gene 16S rRNA, sugerindo-se assim uma revisão do género para clarificar a taxonomia de algumas espécies (Diéguez et al., 2017, 2018).

A revisão taxonómica ao género *Arcobacter* iniciou-se com a sua integração numa nova família designada de *Arcobacteraceae* (Waite et al., 2017). Posteriormente, considerando a grande variabilidade genómica, e também diferentes características fenotípicas, o género *Arcobacter* foi dividido em seis novos géneros, nomeadamente: *Arcobacter*, *Aliarcobacter*, *Halarcobacter*, *Pseudoarcobacter*, *Poseidonibacter* e *Malaciobacter* e um novo candidato proposto, “*Arcomarinus*” (Pérez-Cataluña et al., 2018). Dentro destes novos géneros destaca-se *Aliarcobacter* que engloba várias espécies de reconhecida importância: *Aliarcobacter cryaerophilus*, *Aliarcobacter butzleri*, *Aliarcobacter cibarius*, *Aliarcobacter faecis*, *Aliarcobacter lacus*, *Aliarcobacter lanthieri*, *Aliarcobacter porcinus*, *Aliarcobacter skirrowii*, *Aliarcobacter thereius*, *Aliarcobacter trophiarum* e *Aliarcobacter vitoriensis* (Tabela 1) (Alonso et al., 2020; Figueras et al., 2017; Mateus, Nunes, et al., 2021; Pérez-Cataluña et al., 2018).

Tabela 1 – Representação das espécies incluídas no género *Aliarcobacter*, com a origem, país e ano de publicação.

Espécie	Origem	País	Ano	Referência
<i>A. cryaerophilus</i>	Bovinos fetais abortados	Diversos países	1985	(Neill et al., 1985)
<i>A. butzleri</i>	Animais e humanos com diarreia	Diversos países	1991	(Kiehlbauch et al., 1991)
<i>A. skirrowii</i>	Fluidos prepuciais de touros Bovinos, ovinos e suínos fetais abortados e fezes diarreicas	Diversos países	1992	(Vandamme, Vancanneyt, et al., 1992)
<i>A. cibarius</i>	Carcaças de frango	Bélgica	2005	(Houf et al., 2005)
<i>A. thereius</i>	Rim e fígado de fetos abortados de porco Cloaca de patos	Dinamarca	2009	(Houf et al., 2009)
<i>A. trophiarum</i>	Fezes de suínos	Bélgica	2011	(De Smet et al., 2011)
<i>A. lanthieri</i>	Estrume de suínos e gado leiteiro	Canadá	2015	(Whiteduck-Léveillé et al., 2015)
<i>A. faecis</i>	Poço séptico de resíduos humanos	Canadá	2016	(Whiteduck-Léveillé et al., 2016)
<i>A. porcinus</i>	Fígado e rim de leitão abortado	Espanha	2017	(Figueras et al., 2017)
<i>A. lacus</i>	Águas residuais tratadas	Espanha	2019	(Perez-Cataluña et al., 2019)
<i>A. vitoriensis</i>	Cenoura e águas residuais urbanas	Espanha	2020	(Alonso et al., 2020)

1.1.2 Características do género *Aliarcobacter*

As espécies do género *Aliarcobacter* são bacilos de Gram-negativo, com células helicoidais ou em forma de “S” com um comprimento de aproximadamente 1-3 µm e de largura 0,2-0,5 µm. A motilidade bacteriana é conferida por um único flagelo polar presente em todas as espécies de *Aliarcobacter*. No que diz respeito ao crescimento bacteriano este pode variar entre 15-42 °C e as espécies podem crescer sob diferentes condições atmosféricas, tais como aerobiose e microaerobiose (Ferreira et al., 2016; Miller et al., 2007; Pérez-Cataluña et al., 2018). Relativamente ao pH, dependendo das espécies do género *Aliarcobacter*, normalmente conseguem sobreviver num intervalo de pH compreendido entre 5,5-8, no entanto considera-se como intervalo de pH ótimo entre 6,0-7,5 (Cervenka, 2007).

As espécies do género *Aliarcobacter* apresentam diferentes características fenotípicas, sendo que algumas são capazes de crescer na presença de safranina (0,05 % p/vol), oxgall (1 % p/vol) e cloreto de sódio (4 % p/vol), outras espécies podem ser inibidas na presença de cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio (0,04 % p/vol), glicina (1 % p/vol) e até apresentarem sensibilidade à cefoperazona (64 mg/L) (Pérez-Cataluña et al., 2018).

No que diz respeito à obtenção de energia, as bactérias deste género são quimiorganotróficas, utilizam ácidos orgânicos e aminoácidos como fontes de carbono e conseguem reduzir o nitrato a nitrito. Relativamente à atividade enzimática, as estirpes de *Aliarcobacter* são positivas para o teste de oxidase, catalase e hidrólise do acetato de indoxil e normalmente não apresentam atividade para a urease (Pérez-Cataluña et al., 2018; Vandamme, Vancanneyt, et al., 1992).

Quanto ao conteúdo guanina-citosina (G+C), as bactérias deste género normalmente apresentam baixa percentagem molar, que geralmente está compreendida entre 24,6-35 % mol (Pérez-Cataluña et al., 2018).

1.2 Fontes de contaminação e vias de transmissão do género *Aliarcobacter*

Aliarcobacter spp. encontra-se amplamente distribuído em vários ambientes e hospedeiros, sugerindo-se que possa ter a capacidade de infetar e causar doença no homem e nos animais por diversas vias de transmissão, como a ingestão de água e alimentos contaminados; transmissão por contacto com animais domésticos e selvagens ou mesmo transmissão pessoa-a-pessoa (Collado & Figueras, 2011).

1.2.1 *Aliarcobacter* em água

As espécies de *Aliarcobacter* podem estar presentes em diferentes tipos de águas, nomeadamente rios, lagos, água do mar, água subterrânea, águas residuais e água potável (Collado et al., 2008; Fera et al., 2004; Hsu & Lee, 2015; Rice et al., 1999). Após análise de diversos estudos e uma meta-análise dos dados, a prevalência estimada de espécies de *Arcobacteraceae* encontradas em ambiente aquático foi de 90,6 % em água de esgoto; 78,0 % em água do mar; 64,5 % em águas superficiais; 39,6 % em águas subterrâneas; 34,3 % em água processada e 3,2 % em água potável (Venâncio et al., 2022). De entre as espécies desta família, *A. butzleri* tem sido apresentada como a mais prevalente (Venâncio et al., 2022).

De forma geral, a presença de *Aliarcobacter* em águas ambientais e a sua capacidade de sobreviver nestes ambientes, surge como uma ameaça à saúde humana, uma vez que a água poderá ser uma fonte de contaminação, tanto para os humanos, como para os animais (Collado & Figueras, 2011; Ferreira et al., 2017). Efetivamente, diversos estudos demonstram a presença de espécies de *Aliarcobacter* em diferentes amostras de água (rios, lagos e mar), verificando-se que a maior parte dos casos de surtos em humanos estão relacionados com a contaminação fecal das águas ingeridas. Em Idaho, registou-se o primeiro caso de surto de *Aliarcobacter* por ingestão de água contaminada. Esta situação sucedeu-se num acampamento de escuteiros, em que 81 % das pessoas foram afetadas e apresentavam alguns sintomas, tais como, náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia. De facto, a presença de *A. butzleri* na água de um poço foi identificada como a principal fonte do surto, devido a uma avaria no sistema automatizado da cloração da água (Rice et al., 1999).

Em Ohio, após a ocorrência de vários eventos de precipitação extrema, o transporte de agentes patogénicos de uma instalação de tratamento de águas residuais e fossas sépticas para o lago Erie, levou à contaminação das águas subterrâneas por *Aliarcobacter*. Neste seguimento, cerca de 1450 residentes e visitantes da ilha foram afetados, sendo que as principais manifestações foram cólicas e diarreia (Fong et al., 2007).

Um outro surto de gastroenterite aguda descrito na Eslovénia, ocorreu devido à contaminação do sistema de distribuição de água que abastecia os habitantes. Esta infeção afetou pelo menos 408 pessoas que apresentavam como principais sintomas diarreia, dor abdominal, vômitos e náuseas, sendo que, *A. cryaerophilus*, uma das espécies do género *Aliarcobacter*, foi detetada nas amostras das fezes dos doentes (Kopilović et al., 2008).

Assim, considerando a distribuição de *Aliarcobacter* em águas e a descrição destes surtos, é possível inferir que a água pode ser um reservatório de *Aliarcobacter*, sendo uma potencial fonte de contaminação para homens e animais (Collado & Figueras, 2011; Van Driessche & Houf, 2008).

1.2.2 *Aliarcobacter* em alimentos

Aliarcobacter spp. é frequentemente encontrado em produtos de origem animal, nomeadamente bovinos, ovinos, suínos, aves de capoeira, lacticínios, alimentos do mar, mexilhões, camarão, ameijoas, marisco e peixe, mas também em vegetais (Collado et al., 2009; Ferreira et al., 2019). Após meta-análise de diversos estudos, Mateus et al. (2021) verificaram a seguinte prevalência estimada de espécies de *Aliarcobacter* em amostras de animais para consumo humano: aves de capoeira 40,4 %; marisco 34,9 %; suíno 29,5 %; bovino 19,6 % e ovino 16,1 %. Para os vegetais observou-se uma prevalência estimada de 17,5 % e para os lacticínios de 14,4 % (Mateus et al., 2021). Ao avaliarem a prevalência das espécies de *Aliarcobacter* detetadas nos alimentos, a espécie encontrada com maior frequência foi *A. butzleri*, seguida de *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (Ferreira et al., 2019; Lehner et al., 2005; Mateus et al., 2021). De facto, algumas das espécies do género *Aliarcobacter* são descritas como bactérias patogénicas de origem alimentar, que se encontram vastamente distribuídas ao longo de toda a cadeia (Collado & Figueras, 2011; Ferreira et al., 2017).

De entre os alimentos onde se pode encontrar *Aliarcobacter*, tem sido dada alguma relevância ao marisco, mexilhão, amêijoas, moluscos e vegetais, uma vez que estes podem ser consumidos crus ou mal cozinhados, salientando-se o seu papel como uma potencial fonte de contaminação (Collado et al., 2009; Ferreira et al., 2017; González & Ferrús, 2011). Contudo, a transmissão de *Aliarcobacter* ao consumidor também pode ocorrer através de outros alimentos de origem animal, nomeadamente, a carne e o peixe contaminados. Um exemplo de transmissão de *Aliarcobacter* através do consumo de carne ocorreu em Wisconsin, durante uma recepção de casamento, em que após a ingestão de frango assado contaminado, foi detetado um surto de gastroenterite. Os testes laboratoriais indicaram que *A. butzleri* foi provavelmente o agente causador deste surto (Lappi et al., 2013).

No que toca à saúde do viajante, Teague et al. (2010), com o intuito de determinarem o risco de exposição de um viajante a certos agentes patogénicos de origem alimentar, obtiveram 70 amostras de refeições em restaurantes recomendados para turistas na Tailândia. Após a análise das amostras verificou-se que o risco de exposição do viajante

a *A. butzleri* foi de 13 % por refeição consumida, e aumenta para 75 % quando são consumidas 10 ou mais refeições (Teague et al., 2010). Um outro estudo de etiologia da diarreia do viajante, geralmente associada com os países em desenvolvimento, em que o tratamento da água é deficiente e os microrganismos normalmente estão presentes nos alimentos ou na água (inclusive a água utilizada para lavar alimentos), *A. butzleri* foi detetado em 8 % dos 201 viajantes norte-americanos e europeus com diarreia aguda adquirida na Índia, México ou Guatemala (Jiang et al., 2010).

Assim, estes estudos apoiam o pressuposto de que *Aliarcobacter* spp. pode ser encontrado em diversos alimentos, e o consumo destes pode ser uma via de transmissão relevante, podendo levar a doenças nos animais e nos humanos.

1.2.3 *Aliarcobacter* em animais

Aliarcobacter spp. tem sido frequentemente encontrado no intestino e em amostras fecais de alguns animais de quinta (Ho et al., 2006), sendo que já foi isolado de esfregaços vaginais de gado bovino e suíno (Kabeya et al., 2003). Além disso, espécies de *Aliarcobacter* também foram encontradas em gatos e cães de estimação e de rua (Fera et al., 2009; Goni et al., 2016) e animais selvagens/exóticos (alpaca, ema, gazela, guaxinim, rinoceronte e tartaruga-das-galápagos) (Collado & Figueras, 2011). De facto, *Aliarcobacter* spp. pode ser encontrado em animais saudáveis, mas também associado à capacidade de provocar doenças (abortos, mastite e diarreia) em alguns animais, constatando-se, por exemplo, que as espécies com menor prevalência e associadas a abortos são *A. butzleri* e *A. skirrowii* e com maior prevalência a espécie *A. cryaerophilus* (Collado & Figueras, 2011; De Oliveira et al., 1997; On et al., 2003).

Apesar de serem necessários mais estudos, verifica-se que a presença de *Aliarcobacter* em animais de estimação evidencia potenciais implicações para a saúde pública, sendo que estes podem transmitir os microrganismos aos humanos e disseminá-los para o ambiente (contacto com fezes ou saliva de animais) (Collado & Figueras, 2011; Ferreira et al., 2017; Goni et al., 2016).

Os animais selvagens também podem desempenhar um papel importante na propagação de *Aliarcobacter*. Ainda que existam poucos estudos que indiquem a presença de espécies de entre este género nestes animais, Hamir et al. (2004), verificaram a sua presença em amostras intestinais de guaxinins (60 %). Uma vez que, estes animais compartilham o ambiente suburbano ou urbano com os seres humanos, podem apresentar um papel importante na epidemiologia destas bactérias (Hamir et al., 2004).

1.2.4 *Aliarcobacter* em humanos

O primeiro isolamento de uma espécie do género de *Aliarcobacter*, nomeadamente *A. cryaerophilus*, ocorreu em 1988, numa amostra fecal humana (Tee et al., 1988). No entanto é a espécie *A. butzleri* a mais prevalente no ambiente, animais e humanos, sendo ainda o quarto microrganismo mais frequentemente detetado em amostras fecais humanas dentro dos *Campylobacter-like organisms* (Collado et al., 2013; Ferreira, Júlio, et al., 2014; Vandenberg et al., 2004), seguida da espécie *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* e *A. thereius* (Brückner et al., 2020a). Num estudo realizado em Portugal com 298 amostras fecais de pacientes com diarreia e utilizando métodos de deteção molecular, obtiveram-se 1,3 % de amostras positivas para *A. butzleri* e 0,3 % para *A. cryaerophilus*. Além disso, a prevalência de *Aliarcobacter* diferiu entre as faixas etárias estudadas, verificando-se maior prevalência em crianças (Ferreira, Júlio, et al., 2014).

A transmissão de *Aliarcobacter* de pessoa-a-pessoa foi sugerida pela primeira vez numa escola em Itália, com um surto de *A. butzleri*, onde um total de 10 crianças foram afetadas, com idades compreendidas entre 3-7 anos (cinco crianças da pré-primária, duas do primeiro ano da primária e três do segundo ano da primária) e um professor. Alguns dos sintomas associados foram cólicas abdominais recorrentes (2-3 vezes por dia), dores súbitas e agudas, vômitos, ausência de resposta aos antibióticos tomados e ausência de febre e diarreia. Das amostras fecais recolhidas, constatou-se que todos os isolados apresentavam o mesmo perfil proteico e pertenciam ao mesmo serogrupo, sendo identificados como *A. butzleri*. O facto de os microrganismos isolados apresentarem o mesmo perfil de *A. butzleri* e nenhum outro habitante da zona ter sido contaminado, nem outras crianças que usavam o mesmo refeitório, levou a que os autores sugerissem uma relação epidemiológica desta bactéria com a transmissão pessoa-a-pessoa (Vandamme, Pugina, et al., 1992).

Mais tarde, outro estudo relacionado com transmissão pessoa-a-pessoa, ocorrido no Reino Unido, envolveu uma mãe de 34 anos de idade e o seu recém-nascido de 29 semanas de gestação, sendo que no momento do parto a mãe não apresentava quaisquer sinais de doença. Após a recolha de amostras de sangue, esfregaços auriculares e perianais, foi reportada a infeção do neonato com bacteriemia provocada por *A. butzleri*, sugerindo a transmissão vertical da infeção entre mãe e filho através da placenta (On et al., 1995).

1.3 Virulência e Patogenicidade de *Aliarcobacter butzleri*

Diversos estudos associados com a patogenicidade de *A. butzleri* mostraram que esta é uma espécie que constitui perigo para a saúde humana (ICMSF, 2018). Esta bactéria é descrita como um agente enteropatogénico devido à sua associação com doença diarreica, mas também com doença gastrointestinal não-diarreica com sintomatologia caracterizada por dor abdominal, náuseas, vômitos ou febre (Van den Abeele et al., 2014; Vandamme, Pugina, et al., 1992; Vandenberg et al., 2004).

Embora tenham sido feitos alguns estudos para elucidar a potencial patogenicidade de *A. butzleri*, ainda há necessidade de compreender melhor o mecanismo que leva ao desencadeamento de uma infeção por *A. butzleri*. A virulência de *A. butzleri* tem sido destacada pela sua capacidade de aderir, invadir e até sobreviver intracelularmente em linhas celulares epiteliais do intestino, para além de produzir toxinas e induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (citotoxicidade) (Ferreira et al., 2016; Ferreira, Queiroz, et al., 2014; Karadas et al., 2013).

Até ao momento, foram realizados diversos estudos para avaliar a capacidade de adesão e invasão de *Aliarcobacter* ao hospedeiro, de modo a inferir o potencial de virulência das espécies deste género. Dentro dos estudos *in vitro* realizados, são utilizados diferentes modelos de linhas celulares humanas e animais, tais como: Hep-2 (linha celular do carcinoma da laringe humana); HeLa (linha celular do carcinoma do colo do útero humano); INT407 (linha de células epiteliais do intestino embrionário humano); CHO (linha de células de ovário de hamster chinês), Caco-2 (linha celular de adenocarcinoma colorretal humano); IPI-2I (linha celular de epitelioides intestinais de porco), Vero (linha de células epiteliais renais de macaco verde africano), HT-29 (linha celular de adenocarcinoma colorretal humano) para o estudo do potencial de infeção de algumas espécies de *Aliarcobacter*, tais como *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* e *A. cibarius* (Collado & Figueras, 2011; Karadas et al., 2013).

Levican et al. (2013), estudaram a capacidade de adesão e invasão de várias espécies do género *Aliarcobacter* em células Caco-2 e verificaram que de entre as 16 espécies em estudo, quase todas apresentaram adesão celular, sendo que as espécies que se mostraram mais invasivas foram *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. trophiarum* e *A. defluvi* (Levican et al., 2013). Uma revisão de diversos estudos abordando a adesão, invasão e citotoxicidade das espécies de *Aliarcobacter* em linhas celulares de várias origens foi realizado por Ferreira et al. (2016), com a espécie *A. butzleri* a apresentar capacidade de invasão (32,3 %), adesão (72,1 %) e citotoxicidade

(87,3 %) (Ferreira et al., 2016). Para além disso, constata-se que as diferentes espécies estudadas apresentam variações consideráveis na virulência, o que poderá estar relacionado com a origem dos isolados e das linhas celulares utilizadas (Levican et al., 2013; Wesley & Miller, 2010). Por sua vez, Karadas et al. (2016) estudaram o potencial patogénico de *A. butzleri* em duas linhas celulares: IPEC-J2 (linha celular do epitélio intestinal de suínos) e HT-29/B6 (linha celular de adenocarcinoma do cólon humano). Nesse estudo, foram testadas seis estirpes de *A. butzleri* e verificou-se que estas tinham maior capacidade de aderir e invadir células humanas comparativamente com o perfil obtido em células animais, sendo que as estirpes que apresentavam pouca ou nenhuma invasão, foram altamente citotóxicas para as células humanas (Karadas et al., 2016). A diferença observada entre linhas celulares pode ainda ser justificada pela existência de uma camada mucosa que é produzida pelas células HT-29/B6, que influencia o processo de adesão e invasão de *A. butzleri*, onde o movimento flagelar no muco poderá auxiliar o processo de infeção (Furter et al., 2019; Karadas et al., 2016). De facto, recentemente Buzzanca et al. (2021) demonstrou que a capacidade de colonização de *A. butzleri* foi maior na presença de modelos intestinais humanos produtores de muco (cultura mista de células Caco-2/HT29-MTX) em contraste com modelos não produtores de muco (cultura mista de células Caco-2/HT29) (Buzzanca et al., 2021).

Outro mecanismo envolvido na patogenicidade e virulência bacteriana é a produção de toxinas. As toxinas podem induzir a secreção epitelial, danificar as células epiteliais/função da barreira intestinal, ou recrutar células secundárias ou mediadores que provocam a secreção, dano ou inflamação intestinal (Guerrant et al., 1999). A produção de enterotoxinas é a principal característica de virulência de bactérias associadas com doenças do aparelho digestivo. Assim, em 1997, em Itália foi reportado o primeiro estudo do efeito de citotoxicidade em *A. butzleri*, onde foram isoladas 18 estirpes de água de rio e o perfil citotónico, citotóxico e citoletal foi avaliado após a exposição de células Vero e CHO a filtrados de cultura bacteriana. Dos isolados em estudo, 17 induziram efeitos citotóxicos nas células e o restante exibiu um efeito citotónico e de adesão, mostrando-se assim que as estirpes de origem ambiental podem ser potencialmente virulentas (Ferreira et al., 2016; Musmanno et al., 1997). Também recentemente, Brückner et al. (2020), analisaram os efeitos citotóxicos de 24 isolados da espécie *A. butzleri* na linha celular HT-29/B6 e os resultados mostraram que todos os isolados de *A. butzleri* apresentaram efeitos citotóxicos (Brückner et al., 2020b).

Considerando modelos *in vivo*, Welsey et al. (1996) investigaram a patogenicidade de três espécies de *Aliarcobacter* (*A. butzleri*, *A. skirrowii* e *A. cryaerophilus*) nos tecidos do hospedeiro (leitões). Os leitões (1 dia de vida) foram infetados oralmente, com diversas espécies de *Aliarcobacter*, verificando-se que todas as espécies (100 %) colonizaram os leitões e foram capazes de se multiplicar no intestino, uma vez que foram observadas nas fezes dos animais, o que significa que conseguiram atravessar a barreira intestinal. Para além disso, verificou-se que apenas as estirpes de *A. butzleri* invadiram os órgãos internos dos leitões (tecidos pulmonares, renais, íleo, cérebro e intestino delgado) (Wesley et al., 1996). Mais tarde, Welsey et al. (1999), infetaram oralmente galinhas e perus (3-5 dias de vida) com estirpes de origens diferentes. Em contraste com a experiência realizada nos leitões pelos mesmos autores, constatou-se que a estirpe *A. butzleri* ATCC 49616 não conseguiu colonizar e invadir os perus de criação e as galinhas *White Leghorn*, no entanto, nos perus *White Beltsville*, foi recuperada a partir de tecidos e esfregaços cloacais (fígado (3 %), baço (6 %), intestino delgado distal (9 %) e proximal (9 %), ceco (9 %) e intestino grosso (12 %)), demonstrando que estes animais foram os mais suscetíveis a *A. butzleri*, em comparação com os três animais em estudo (Wesley & Baetz, 1999). Estes resultados apontam que a capacidade invasiva e a virulência das estirpes de *A. butzleri* dependem da espécie ou da raça do hospedeiro (Wesley et al., 1996; Wesley & Baetz, 1999). Também Ahmet & Latife (2016), investigaram em ratos a patogenicidade e colonização de tecidos com *A. butzleri*. Os ratos BALB/c foram divididos por três grupos distintos e infetados por via oral (O), intraperitoneal (IP) ou intramamária (IMG). Alguns sintomas registados nos animais infetados foram diarreia, tremores, fraqueza, temperatura corporal baixa e conjuntivite. Nos exames histopatológicos constatou-se a inflamação/lesão de alguns tecidos/estruturas, tais como: intestino, gânglios linfáticos (O); pulmões, rins, fígado, baço, estômago, cólon, gânglios linfáticos (IP) e glândula mamária (IMG). A bactéria *A. butzleri* foi re-isolada de diversos órgãos até ao 5º dia de infeção (pulmão, fígado, baço, estômago, intestino, rim, cérebro e glândula mamária) (Ahmet & Latife, 2016).

Suportando os mecanismos de virulência de *Aliarcobacter* referidos anteriormente, Miller et al. (2007) sequenciou o genoma de *A. butzleri* RM4018 identificando diversos genes putativos de virulência, dos quais nove têm sido salientados: *cadF*, *cj1349*, *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*, *irgA*, *hecA* e *hecB* (Tabela 2), que apresentam homologia com genes associados a virulência em outros microrganismos, como a espécie próxima *Campylobacter jejuni*. Estes genes putativos de virulência podem então estar envolvidos na patogenicidade desta bactéria, funcionando como estratégias bacterianas que conduzem à infeção bacteriana do hospedeiro (Miller et al., 2007).

Tabela 2 – Genes putativos de virulência identificados no genoma de *Aliarcobacter butzleri* e a sua respetiva função.

Gene putativo de virulência	Função da proteína codificada	Referências
<i>cadF</i>	Proteína da membrana externa com papel na adesão celular e no desencadeamento de processos de internalização celular.	(Dasti et al., 2010; Fanelli et al., 2019, 2020; Flanagan et al., 2009; Monteville et al., 2003)
<i>cj1349</i>	Proteína da membrana externa, envolvidas na ligação à fibronectina.	(Fanelli et al., 2019, 2020; Flanagan et al., 2009)
<i>hecA</i>	Adesina	(Rojas et al., 2002)
<i>hecB</i>	Proteína de ativação de hemolisina.	(Fanelli et al., 2020; Miller et al., 2007)
<i>irgA</i>	Proteína de membrana externa reguladora de ferro.	(Fanelli et al., 2020; Johnson et al., 2005; Mey et al., 2002)
<i>mviN</i>	Proteína associada com a síntese de peptidoglicano.	(Fanelli et al., 2020; Inoue et al., 2008)
<i>pldA</i>	Proteína da membrana externa, a fosfolipase A, envolvida com a atividade hemolítica.	(Fanelli et al., 2019, 2020; Grant et al., 1997)
<i>tlyA</i>	Proteína envolvida com a atividade hemolítica.	(Sałamaszyńska-Guz & Klimuszko, 2008)
<i>ciaB</i>	Proteína invasiva das células hospedeiras.	(Fanelli et al., 2019, 2020; M. E. Konkel et al., 2000)

Para além dos determinantes de virulência descritos anteriormente por Miller et al. (2007), em 2020 Isidro et al. (2020) detetaram vários genes putativos de virulência associados a processos metabólicos no genoma de *A. butzleri*, com homologia com os de outras espécies de bactérias, como *Campylobacter* spp. (*luxS* e *docA* - associados à quimiotaxia; *htrA* - chaperone envolvido no enrolamento de adesinas; *iamA* - associado com a invasão; *fur* e *cfrB* - associado com a captação de ferro; *iroE* - associado à uropatogenicidade), sugerindo-se uma semelhança entre a virulência destas espécies. Para além destes fatores de virulência homólogos, os autores encontraram 34 genes flagelares, 8 genes associados ao sistema de quimiotaxia e 6 genes pertencentes ao *cluster* da urease nas estirpes de *A. butzleri* estudadas (Isidro et al., 2020).

Diversos estudos têm-se focado na avaliação da prevalência de genes putativos de virulência em estirpes de *A. butzleri*. Um exemplo foi o estudo realizado no Irão por Tabatabaei et al. (2014) que tiveram como objetivo a identificação de seis genes de virulência (*cadF*, *cj1349*, *mviN*, *pldA*, *tlyA* e *ciaB*) em isolados de três espécies de *Aliarcobacter* (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*). Para todos os isolados de *A.*

butzleri foram identificados os seis genes de virulência (Tabatabaei et al., 2014). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Doudah et al. (2012), onde se detetaram esses mesmos genes em todos os isolados de *A. butzleri* (Doudah et al., 2012). Mais tarde, Nelapati et al. (2020) verificou também que os isolados de *A. butzleri* apresentavam os genes *mviN*, *irgA*, *tlyA*, *pldA*, *ciaB* e *cadF*, onde todos os isolados foram positivos para os genes *mviN*, *tlyA* e *ciaB* (Mottola et al., 2016; Nelapati et al., 2020). A presença destes genes putativos de virulência suporta o potencial patogénico da espécie *A. butzleri*.

1.4 Flagelo bacteriano

As bactérias para se movimentarem podem utilizar um ou vários apêndices longos que são denominados de flagelos (Duan et al., 2013). Dependendo da espécie bacteriana, o número e a organização do flagelo poderá variar: as bactérias monótricas apresentam apenas um flagelo (por exemplo *Pseudomonas aeruginosa* e *Caulobacter crescentus*); as bactérias lofótricas têm vários flagelos localizados num único ponto da superfície da célula e movem-se em sincronia permitindo que a bactéria se movimente numa determinada direção (por exemplo *Helicobacter pylori*); as bactérias anfítricas têm um flagelo em cada extremidade da célula e quando um flagelo se movimenta, o outro encontra-se parado fazendo com que a bactéria mude de direção (por exemplo *C. jejuni*), e as bactérias perítricas são constituídas por flagelos em toda a sua superfície (por exemplo *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*) (Figura 1) (Altegoer et al., 2014; Schuhmacher et al., 2015).

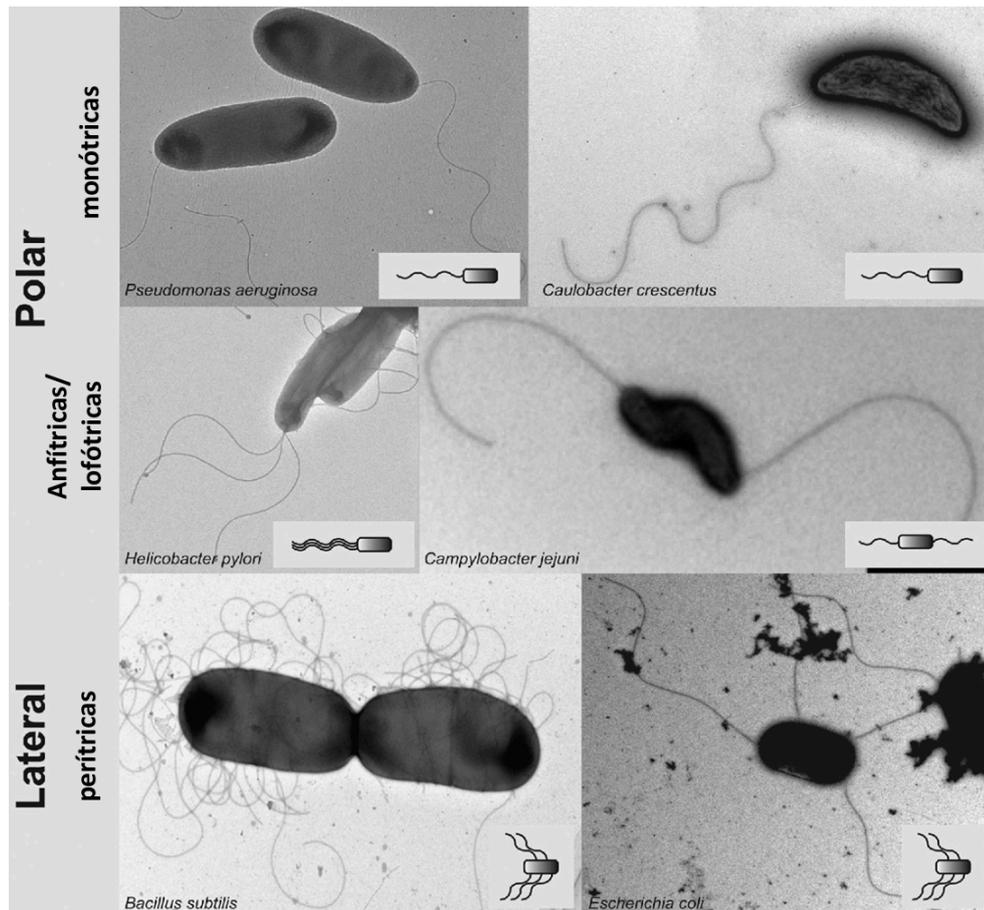


Figura 1 – Representação dos diferentes números e organizações dos flagelos nas bactérias. Bactérias monótricas – *Pseudomonas aeruginosa* e *Caulobacter crescentus*; Bactérias lofótricas – *Helicobacter pylori*; Bactérias anfitricas – *Campylobacter jejuni* e bactérias peritricas – *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Adaptado de Schuhmacher et al., 2015.

1.4.1 Morfologia e estrutura do flagelo bacteriano

O flagelo bacteriano é uma máquina molecular complexa constituída por três partes: o corpo basal, o gancho e o filamento, e apresenta diversos papéis na patogenicidade bacteriana (Figura 2) (Duan et al., 2013).

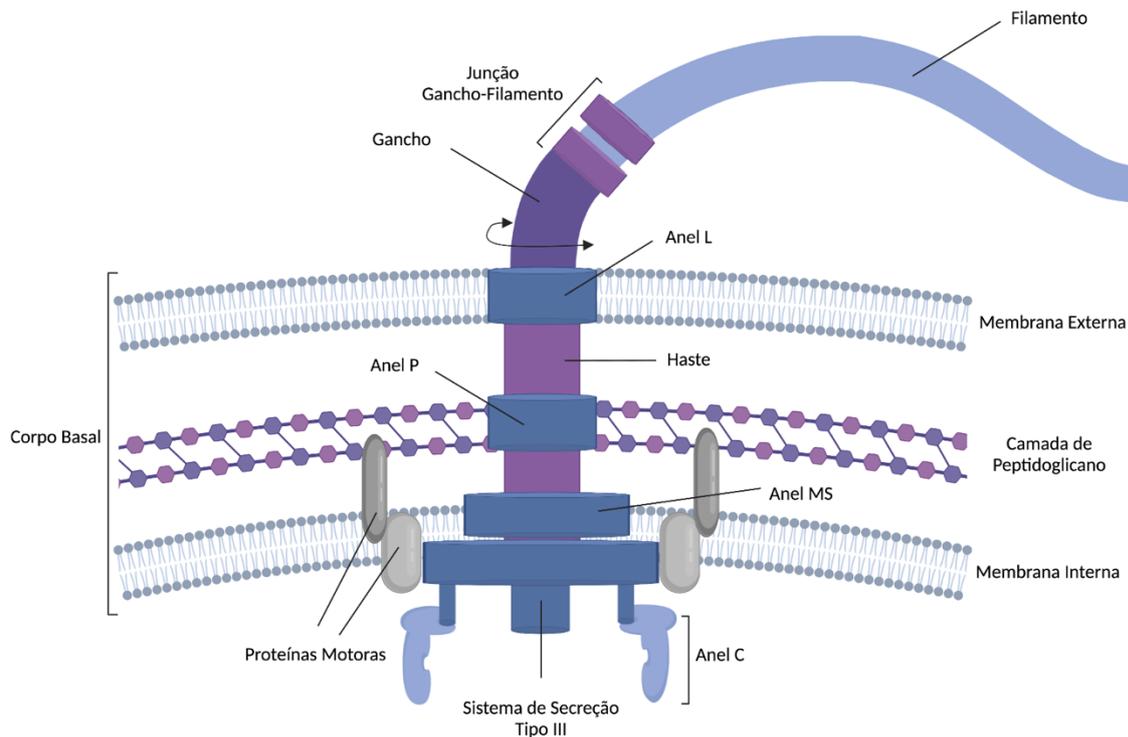


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura flagelar das bactérias de Gram-negativo. Adaptado de Chaban et al., 2015; Schuhmacher et al., 2015.

O corpo basal nas bactérias de Gram-positivo estende-se desde a membrana interna até à parede celular (camada de peptidoglicano), enquanto nas bactérias de Gram-negativo estende-se desde a membrana interna à membrana externa. As maiores diferenças entre as bactérias de Gram-positivo e Gram-negativo estão na haste, onde as bactérias de Gram-negativo apresentam o anel P e L e nas de Gram-positivo estes anéis estão ausentes (Altegoer et al., 2014; Schuhmacher et al., 2015). Além disso, o corpo basal contém o “motor” proteico rotativo que fixa a estrutura à membrana da bactéria e permite a translocação de proteínas de virulência bacteriana e de componentes flagelares. Este motor faz acionar o flagelo através de um fluxo de prótons, causado por um gradiente de concentrações originado pelo metabolismo da célula, ou através de um gradiente iônico de sódio (Altegoer et al., 2014; Berg, 2003; Chaban et al., 2015).

No corpo basal pode ainda encontrar-se o sistema de secreção tipo III que está associado com a virulência bacteriana, através da exportação de proteínas flagelares (Büttner, 2012). Estes sistemas de secreção são constituídos por um núcleo formado por proteínas transmembranares (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ e FliR), originando na membrana interna um canal no anel MS. Na parte citoplasmática existem mais três proteínas solúveis associadas (FliI, FliH e FliJ), que formam um complexo de adenosinatrifosfatases (ATPase) (Macnab, 2004). Assim, estes sistemas atuam em

conjunto exportando os fatores de virulência para as células hospedeiras (Cornelis, 2006). A montagem flagelar ocorre em várias fases, começando pela montagem do sistema de secreção flagelar tipo III, seguidamente ocorre a montagem dos anéis MS, C, P e L sucessivamente e associam-se ao sistema de secreção tipo III, formando canais ocos no corpo basal através dos quais os componentes flagelares podem ser montados. Durante a montagem do flagelo, o sistema de secreção flagelar do tipo III, exporta proteínas através do núcleo da estrutura axial para montar a haste, o gancho e o filamento flagelar (Chaban et al., 2015; Minamino, 2014).

O gancho estende-se desde o corpo basal, funcionando como uma junta universal. Na zona distal do gancho existem duas proteínas, chamadas de proteínas junção gancho-filamento (FlgK e FlgL), que reforçam e aumentam a flexibilidade da ligação do gancho e do filamento (Macnab, 2003).

Por sua vez, o filamento é uma estrutura longa cilíndrica que estende o corpo celular a partir do gancho e quando movimentado funciona como uma hélice (Chaban et al., 2015; Duan et al., 2013). A principal unidade do filamento flagelar é a proteína flagelina (Moens & Vanderleyden, 1996).

1.4.2 Estrutura do flagelo em *Aliarcobacter butzleri*

Nas espécies de *Aliarcobacter*, a motilidade é atribuída ao flagelo polar existente na célula bacteriana (Ho et al., 2008). A estrutura flagelar completa, em geral, pesa aproximadamente 1 bilhão de Da, mede aproximadamente 50 nm de largura e 10 µm de comprimento (Chaban et al., 2018).

Chaban et al. (2018), identificaram por criotomografia eletrônica as estruturas flagelares de algumas espécies de bactérias tais como: *Wolinella succinogenes*, *Bdellovibrio bacteriovorus* e *A. butzleri*. Após pesquisas sequenciais de proteínas motoras acessórias, os autores verificaram a presença de PflA, PflB (proteínas acessórias flagelares específicas de *Campylobacter*, associadas aos anéis existentes no disco basal) e FlgO (proteína acessória flagelar específica de *Vibrio*) em *Aliarcobacter*, propondo um modelo de evolução da estrutura motora flagelar bacteriana, onde as estruturas internas e externas associadas à membrana evoluíram e formaram estruturas mais complexas (Chaban et al., 2018).

Mais tarde, Isidro et al. (2020) estudaram 49 genomas de *A. butzleri* identificando 34 genes codificando para proteínas flagelares, com algumas associados ao sistema de secreção tipo III. Assim os genes identificados que codificam para proteínas associadas

são: corpo basal - *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgH* (anel L), *flgI* (anel P), *fliF* (anel MS), *fliG*, *fliL*, *fliM*, *fliN*, *fliY*, *motA* e *motB*; gancho - *flgE1*, *flgE2*, *flgG1*, *flgG2*, *flgK* e *flgL* (junção gancho-filamento), *fliD*, *fliE* e *fliK*; filamento extracelular - proteínas de flagelina, FlaA (principal proteína da flagelina) e a FLA_B (proteína da flagelina menor) e um gene que codifica a proteína Hag responsável pela regulação da formação de novos filamentos (Isidro et al., 2020; Macnab, 2004); Outros genes importantes estão envolvidos em: biossíntese flagelar - *flhA*, *flhB*, *flhF*, *fliP*, *fliQ* e *fliR* (sistema de secreção flagelar tipo III), biossíntese do complexo ATPase - *fliH* e *fliI*, e o gene *fliS* que representa um *chaperone* de exportação flagelar. Analisando os 34 genes flagelares, dois apresentaram deleções (*flgE1* e *fliM*), com possível impacto na função flagelar e os genes *flgD*, *flgL*, *flgK*, *flgE2*, *flgG2* e *flgH* foram considerados os principais genes polimórficos do genoma core associados com a motilidade bacteriana (Isidro et al., 2020).

Com o objetivo de caracterizar as proteínas flagelina FlaA e FlaB no gênero *Aliarcobacter*, Ho et al. (2008) construíram mutantes. Os mutantes *flaA* e *flaB* foram comparados com a estirpe nativa de *A. butzleri* e verificou-se que a bactéria quando mutada no gene *flaA* não apresentava motilidade em nenhuma condição de crescimento (aerobiose e microaerobiose) e eram aflageladas. Para o gene *flaB* mutado os resultados apresentados foram diferentes, uma vez que *A. butzleri* revelou ser móvel em todas as condições de crescimento. Para além disso, também se verificou que a mutação no gene *flaA* aumentou a expressão do gene *flaB* e a mutação no gene *flaB* não teve qualquer efeito na transcrição do gene *flaA* (Ho et al., 2008). Este estudo da análise da motilidade e transcrição dos genes mostrou ter um padrão semelhante a *Campylobacter* spp., onde para os filamentos bacterianos que apresentaram uma mutação no gene *flaA*, as bactérias não foram móveis, enquanto filamentos bacterianos apenas com *flaA*, as bactérias apresentaram motilidade. Assim, o filamento é composto principalmente pelo gene *flaA* que apresenta um papel essencial na motilidade, demonstrando-se que embora o *flaB* não desempenhe um papel essencial na motilidade este pode estar envolvido na variação antigénica, que é importante na patogenicidade (adesão e invasão) bacteriana e na interação do hospedeiro-parasita (Guerry, 1997; Ho et al., 2008; Medina et al., 2019).

1.4.3 O flagelo na virulência bacteriana

Para que um agente patogénico seja bem sucedido, deverá adotar diversas estratégias que possibilitem a entrada e a replicação dentro do hospedeiro (Cross, 2008). Uma vantagem bacteriana são os flagelos que desempenham um papel no processo de colonização do hospedeiro. Através destas estruturas, a bactéria adquire motilidade, que quando acoplada à quimiotaxia, permite que os agentes patogénicos detetem uma

variedade de sinais ambientais (luz, fluídos em movimento, osmolaridade e temperatura) e se deslocam no encalço de fontes de nutrientes e condições ambientais favoráveis ao crescimento e proliferação bacteriana (Chaban et al., 2015; Eisenbach, 2011). Além disso, também desempenham um papel no direcionamento da bactéria para o processo de colonização do hospedeiro. Uma vez que a bactéria encontre um local adequado à sua sobrevivência, o flagelo polar vai atuar na adesão bacteriana, formação e diferenciação de biofilmes, translocação de proteínas de virulência para as células hospedeiras, penetração através de estruturas tecidulares ou no desencadeamento de respostas pró-inflamatórias (por exemplo na ativação da fagocitose para entrar em células eucarióticas), para que seja iniciada a infecção do hospedeiro (Chaban et al., 2015; Duan et al., 2013; López et al., 2010).

1.4.3.1 O flagelo na formação de biofilmes bacterianos

No que diz respeito aos biofilmes, as bactérias têm a capacidade de fixar-se, residir e proliferar devido à sua capacidade de formar biofilmes, que se apresentam como comunidades bacterianas que formam estruturas complexas (Ferreira et al., 2013). Estas estruturas representam um risco substancial para a saúde, uma vez que podem contribuir para as infeções crónicas e recorrentes em humanos (Hathroubi & Zerebinski, 2018).

A formação de biofilme inicialmente envolve a adesão das bactérias ao substrato e posteriormente o seu desenvolvimento (ganho de forma e amadurecimento). Por fim, podem desprender-se do biofilme aglomerados de bactérias que aderem a uma nova superfície ou a um biofilme próximo do original. Uma das características associadas à adesão microbiana é a presença de apêndices (flagelo, fimbria e pili) na superfície celular dos microrganismos. Estas estruturas auxiliam a ligação inicial da bactéria à superfície até que ocorra uma ligação irreversível, aumentando o contacto entre as células e a superfície (Donlan, 2001; Duan et al., 2013).

Ao longo dos anos, alguns estudos têm analisado o papel do flagelo na capacidade de bactérias formarem biofilmes. Por exemplo, num trabalho de Hathroubi & Zerebinski (2018) verificou-se que *H. pylori* com uma mutação no gene *fliM* (um componente chave do corpo basal) apresentou uma perda completa do flagelo, o que por sua vez dificultou a formação de biofilme. Para além disso, os autores analisaram a capacidade de formação de biofilme numa bactéria flagelada e não motriz (perturbação da proteína motora MotB), verificando-se que mais uma vez o desenvolvimento do biofilme foi prejudicado, em comparação com a estirpe nativa. No entanto, o mutante $\Delta fliM$ produziu menos

biofilme que o mutante $\Delta motB$. Assim, o flagelo de *H. pylori* desempenha um papel estrutural durante a formação de biofilme ajudando as bactérias a fixarem-se (Hathroubi & Zerebinski, 2018).

Recentemente, Salazar-Sánchez et al. (2022) investigaram o papel de seis genes de *A. buzteri* (*flaA*, *flaB*, *fliS*, *luxS*, *pta* e *spoT*) na formação de biofilmes, mostrando-se que os genes *flaA*, *flaB*, *fliS* e *luxS* desempenharam um papel positivo na formação de biofilmes de *A. buzteri* e o gene *spoT* um papel negativo. Além disso, houve uma diminuição da motilidade bacteriana nos mutantes *flaA*, *flaB* e *fliS*, o que significa que a deleção do gene poderá ter afetado a capacidade de fixação bacteriana à superfície e diretamente a formação de biofilme (Salazar-Sánchez et al., 2022).

1.4.3.2 O flagelo na adesão e invasão

O mecanismo de adesão bacteriana é essencial para o estabelecimento da infecção do hospedeiro, consistindo na fixação das bactérias às células do hospedeiro e estruturas que as envolvem. Após esta adesão celular pode seguir-se a colonização de tecidos, invasão celular, multiplicação intracelular e disseminação para outros tecidos (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006).

Num estudo realizado por Allen-Vercoe et al. (1999), constatou-se que a bactéria *Salmonella enterica* quando mutada no flagelo, era incapaz de colonizar e provocar infecção, o que sugere que o flagelo é importante para a motilidade e adesão desta bactéria (Allen-Vercoe & Woodward, 1999). Por sua vez, a bactéria *Listeria monocytogenes* apresenta capacidade de invasão celular (de células Caco-2) diminuída em quatro vezes quando se compara a estirpe mutada no flagelo com a não mutada (Dons et al., 2004).

Em 2014, Gao et al. (2014), identificaram seis novos genes que codificam potenciais componentes do sistema flagelar em *Epsilonproteobacteria*. Assim, os autores construíram mutantes não motores de *C. jejuni* e através de microscopia de fluorescência investigaram a localização subcelular de cada proteína, verificando-se que os genes mutados estavam envolvidos na montagem e a função motora de *C. jejuni*. Mutantes não motores apresentaram níveis de internalização bacteriana reduzidos em células Cos-1 (linha celular de fibroblasto de rim de macaco verde africano), o que foi associado com a perda de motilidade que terá sido influenciada por defeitos no motor flagelar que impediram a movimentação bacteriana, essencial para a invasão celular (Gao et al., 2014). Outros estudos semelhantes, realizados em *C. jejuni*, mostraram que a motilidade bacteriana é essencial para a adesão e invasão celular e a para a colonização de animais

principalmente em condições ambientais mais viscosos, tal como o epitélio intestinal (Guerry, 2007; Szymanski et al., 1995; Wassenaar et al., 1991). Apesar, da associação do flagelo à virulência em diversas espécies bacterianas, este papel não se encontra ainda definido para *A. butzleri*.

No entanto, Medina et al. (2019) analisaram o padrão transcricional dos genes flagelares de *A. butzleri*, *flaA*, *flaB*, *flgH* e *motA* quando esta bactéria interagia com uma ameba, *Acanthamoeba castellanii*. Os resultados mostraram que antes de *A. butzleri* se estabelecer como endossimbionte de *A. castellanii* havia uma regulação positiva de todos os genes flagelares analisados. Após o estabelecimento de *A. butzleri* como endossimbionte, ocorreu uma diminuição na transcrição dos genes flagelares, sugerindo-se que a regulação dos genes antes de *A. butzleri* se estabelecer como endossimbionte permite aumentar a sua capacidade de adesão e invasão, e após a infecção da *A. castellanii* a expressão dos genes diminuem para que *A. butzleri* consiga sobreviver dentro da ameba (Medina et al., 2019).

1.4.3.3 Interação da bactéria com o hospedeiro

O agente patogénico ao atingir o local de infecção do hospedeiro, terá que enfrentar diversas condições de stress, entre as quais, os ácidos gordos de cadeia curta e mucinas, que são compostos presentes ao longo do trato gastrointestinal e que em diversos agentes enteropatogénicos afetam a virulência, bem como a expressão flagelar e a motilidade bacteriana (Chaban et al., 2015; Lackraj et al., 2016; Ovesen et al., 2017). Assim a motilidade representa uma vantagem do agente bacteriano para encontrar locais favoráveis, contudo consoante os sinais microambientais encontrados o agente patogénico terá que modular a motilidade (Lackraj et al., 2016). Deste modo, no início da infecção, a expressão flagelar deverá ser adaptada para o agente bacteriano lidar contra as defesas do sistema imunitário, quer por alteração da expressão flagelar, ou por modificação estrutural (Chaban et al., 2015). Neste sentido, Lackraj et al. (2016) demonstraram o impacto dos ácidos gordos de cadeia curta na motilidade e expressão flagelar de *Escherichia coli* enterohemorrágica, tendo sido observado a existência de uma regulação negativa da expressão flagelar e da motilidade bacteriana de *E. coli* na presença de ácidos gordos de cadeia curta em concentrações semelhantes às que estão presentes no intestino grosso. O inverso ocorreu na presença de concentrações de ácidos gordos de cadeia curta associados ao intestino delgado (Lackraj et al., 2016). Na presença de mucinas também se verificou que a motilidade e a expressão flagelar de *E. coli* enterohemorrágica diminuíram (Kim et al., 2012).

Um dos mecanismos importantes para a bactéria interagir com o hospedeiro são os sistemas de secreção tipo III, uma vez que estes injetam e exportam fatores de virulência que modulam e alteram a atividade do hospedeiro (Duan et al., 2013). Por exemplo, no caso da bactéria *C. jejuni*, verificou-se que a exportação de proteínas Cia (proteína de virulência que utiliza o sistema de secreção tipo III para exportação) requeriam um corpo basal funcional, um gancho e pelo menos uma das duas proteínas do filamento (FlaA ou FlaB). Na ausência de secreção da proteica Cia, a invasão e internalização de *C. jejuni* nas células epiteliais do hospedeiro ficaram comprometidos (Konkel et al., 2004).

Além disso, o sistema imunitário inato inclui um conjunto de recetores de reconhecimento de padrão (PRRs, do inglês “Pattern recognition receptors”) que reconhecem os microrganismos. A flagelina, componente estrutural do filamento flagelar, é considerada um padrão molecular associado a patógenos (PAMP, do inglês “Pathogen-associated molecular patterns”). Assim, esta proteína poderá ser reconhecida pelas células do sistema imunitário inato quando interage com o recetor do tipo Toll-like 5 (TLR-5, do inglês “Toll-like receptor 5”), presente nas células hospedeiras, desencadeando respostas imunitárias pró-inflamatórias e adaptativas. Quando a flagelina estimula o recetor TLR-5, ativam-se as vias de sinalização NF- κ B e MAPK (via de sinalização dependente de TLR-5) ou os recetores Ipaf e Naip5 (via de sinalização independente de TLR-5), desencadeando-se a libertação de citocinas pró-inflamatórias (Duan et al., 2013; Feldman et al., 1998; Hayashi et al., 2001). *C. jejuni* é o exemplo de uma das bactérias em que a flagelina é incapaz de ativar o TLR-5 humano, e produzir a citocina pró-inflamatória interleucina-8 (IL-8, fator quimiotático libertado durante o processo de inflamação), apresentando outras vias possíveis para desencadear o processo (Watson & Galán, 2005).

Assim torna-se importante explorar o potencial papel do flagelo na patogenicidade e virulência de *A. butzleri*, incluindo a avaliação do papel do gene *flaA* na motilidade e invasão celular.

Capítulo 2

Objetivos

Aliarcobacter butzleri é uma das mais prevalentes espécies de entre o seu género no ambiente, animais e humanos e encontra-se associada a doença diarreica com sintomatologia caracterizada por dor abdominal, náuseas, vômitos ou febre. Embora tenham sido feitos alguns estudos para elucidar a potencial patogenicidade de *A. butzleri*, ainda há necessidade de compreender melhor o mecanismo que leva ao desencadeamento de uma infeção por esta bactéria. O flagelo bacteriano é um conhecido fator de virulência com um papel importante em diversos agentes enteropatogénicos, mas que no caso de *A. butzleri* ainda carece de caracterização. Assim, o objetivo geral deste trabalho passou por avaliar o papel do flagelo na virulência de *A. butzleri*, mas também de que forma a motilidade bacteriana é influenciada pelo meio envolvente.

Para tal, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o perfil de motilidade de um grupo de isolados de *A. butzleri*;
- Avaliar o perfil de motilidade de *A. butzleri* sob diversas condições ambientais e compostos associados ao hospedeiro;
- Avaliar a expressão do gene codificante da flagelina A presente no filamento flagelar de *A. butzleri*, *flaA*, na presença de compostos associados ao ambiente intestinal do hospedeiro;
- Construir um mutante do gene *flaA* presente no filamento flagelar de *A. butzleri*;
- Avaliar a motilidade, velocidade média, formação de biofilmes em *A. butzleri* nativa e mutante;
- Avaliar a adesão e invasão de *A. butzleri* nativa e mutante em células de adenocarcinoma colorretal humano;
- Avaliar a capacidade de adesão de *A. butzleri* nativa e mutante a mucinas.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Estirpes usadas no estudo

Para avaliar a motilidade foram utilizadas 19 estirpes de *A. butzleri*, dois isolados de origem em indústria de processamento alimentar (isolados alimentares: *A. butzleri* AB28/11 e DQ40A1) e 17 isolados com origem em fezes humanas (isolados clínicos: *A. butzleri* 2003/1426, INSA 2680, INSA 2756, INSA 2808, INSA 2999, INSA 3202, INSA 3711, INSA 3727, INSA 3774, INSA 3800, INSA 3890, INSA 4015, INSA 4333, INSA 593, INSA 776, INSA 4211, INSA CU29393). Os isolados alimentares, *A. butzleri* AB28/11 e DQ40A1, foram selecionados para fazer uma análise comparativa do perfil de motilidade em diferentes concentrações de nutrientes, em condições de microaerobiose e aerobiose, em diversas temperaturas e na presença de compostos associados ao trato gastrointestinal do hospedeiro (ácidos gordos de cadeia curta e mucinas). Além disso, a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 foi selecionada para a construção do mutante do gene da flagelina (*flaA*), sendo esta naturalmente transformável.

3.2 Condições gerais de armazenamento

As estirpes foram conservadas a uma temperatura de -80 °C em tubos criogênicos contendo meio Brain Heart Infusion (BHI, Liofilchem, Italy) com 20 % de glicerol. Para posterior utilização, as estirpes foram inoculadas em placas de Tryptic Soy Agar (TSA) e incubadas por 24 horas a 37 °C em condições de microaerobiose. Após a incubação, as placas inoculadas foram armazenadas a 4 °C, por um período máximo de duas semanas. Antes de cada ensaio foi preparada uma cultura em TSA, nas mesmas condições de crescimento. A atmosfera de microaerobiose utilizada foi 6 % O₂; ± 7,1 % CO₂ e 3,6 % H₂ e restante de N₂, produzida por um sistema de Anoxomat (Anoxomat AN2CTS, Mart Microbiology B.V., Alemanha).

3.3 Condições gerais de crescimento

Para a realização dos ensaios descritos de seguida foi necessária a preparação de uma cultura prévia das estirpes. Para isso, foram todas inoculadas previamente em placas de TSA incubadas a 37 °C durante 24h e em condições de microaerobiose. Após incubação, realizaram-se pré-culturas em 10 mL de meio Tryptic Soy Broth (TSB, VWR, Bélgica)

com uma densidade ótica a 620 nm (DO_{620nm}) inicial de 0,02 para todas as estirpes, com exceção das estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* (estirpe mutante) ($DO_{inicial}=0,05$). As pré-culturas foram incubadas num agitador orbital, a 100 rpm, 37 °C e 16 horas, exceto as estirpes *A. butzleri* DQ40A1 e *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* DQ40A1, onde o tempo de incubação utilizado foi de 20 horas.

3.4 Avaliação da sobrevivência de *Aliarcobacter butzleri*

Antes da realização dos ensaios da motilidade, foi confirmada se haveria ou não inibição bacteriana das estirpes *A. butzleri* AB28/11 e *A. butzleri* DQ40A1 a: (i) diferentes temperaturas (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C); (ii) em condições de microaerobiose e aerobiose; (iii) em diferentes concentrações de nutrientes usando para tal TSB diluído (1:1,25; 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:20); (iv) na presença de 0,5 % (m/v) de mucinas; ou (v) na presença de uma mistura de ácidos gordos de cadeia curta e no seu controlo o cloreto de sódio (NaCl, AppliChem, Alemanha).

Assim, para avaliar a sobrevivência bacteriana, as bactérias *A. butzleri* AB28/11 e *A. butzleri* DQ40A1 foram colocadas a crescer como indicado no tópico 3.3. Após a incubação das pré-culturas, as células foram recolhidas por centrifugação (8000 \times g, durante 5 minutos) e o depósito celular ressuspense em meio TSB e diluído de forma a obter $\approx 10^8$ unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL). Para avaliação da sobrevivência bacteriana procedeu-se à contagem das UFC/mL nas diferentes condições. Assim, foram realizadas diluições decimais sucessivas, seguidas da transferência de 10 μ L de cada diluição, em triplicado, para as placas preparadas com meio TSA, que foram posteriormente incubadas nas diferentes condições atmosféricas, ou para meio TSA diluído ou suplementado com os diferentes compostos em estudo, que por sua vez foram incubadas durante 48 horas a 37 °C e em condições de microaerobiose.

Relativamente à sobrevivência na presença de mucinas, as placas foram preparadas de acordo com Kim et al. (2012), com ligeiras modificações. Assim, o meio foi suplementado com 0,5 % (m/v) de mucinas (tipo II do estômago de porco) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América), sendo que a mucina suína foi adicionada ao meio de cultura e colocada em agitação até a solução ficar homogénea, sendo posteriormente autoclavada a 121 °C (Kim et al., 2012).

No caso dos ácidos gordos de cadeia curta, usaram-se concentrações variáveis destes compostos, selecionadas de acordo com Herold et al. (2009) e associadas às concentrações totais de ácidos gordos de cadeia curta encontradas ao longo do intestino

delgado (entre 20 a 40 mM) e ao longo do intestino grosso (entre 70 a 200 mM) (Lackraj et al., 2016). Assim, de forma a simular as concentrações encontradas no intestino delgado foram preparadas placas com meio TSA suplementado com 30 mM de ácidos gordos de cadeia curta (25 mM de acetato de sódio (Merck, Alemanha), 2,5 mM de propionato de sódio (Thermo Scientific, Estados Unidos da América) e 2,5 mM butirato de sódio (Thermo Scientific, Estados Unidos da América)) (Herold et al., 2009). Para a simulação das concentrações encontradas no intestino grosso, prepararam-se placas suplementadas com 90 mM (49,5 mM de acetato de sódio, 31,5 mM de propionato de sódio e 9 mM butirato de sódio), 130 mM (71,5 mM de acetato de sódio, 45,5 mM de propionato de sódio e 13 mM butirato de sódio) e 172 mM (95 mM de acetato de sódio, 60 mM de propionato de sódio e 17 mM butirato de sódio) (Herold et al., 2009). Os ácidos gordos de cadeia curta foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem a 121 °C. As placas controlo de 30, 90, 130 ou 172 mM de NaCl foram preparadas por suplementação do meio TSA, por forma a avaliar o efeito da osmolaridade (Herold et al., 2009).

Todos os ensaios foram realizados de forma independente, pelo menos três vezes.

3.5 Avaliação da motilidade bacteriana

Após a incubação das pré-culturas (tópico 3.3), as células foram recolhidas por centrifugação (8000 ×g, durante 5 minutos) e o depósito celular ressuspensão em meio TSB e diluído de forma a obter ~10⁸ UFC/mL. Seguidamente 5 µL de cada suspensão foram inoculados no centro de uma placa de meio TSB com 0,4 % de agar. Como método padrão, as placas foram incubadas durante 48 horas a 37 °C em condições de microaerobiose. Após 48 horas de incubação avaliou-se a motilidade através da medição do halo de motilidade das estirpes.

3.5.1 Influência da temperatura, das condições atmosféricas e da concentração de nutrientes na motilidade de *Aliarobacter butzleri*

Para avaliar o efeito da temperatura e das condições atmosféricas (aerobiose e microaerobiose) procedeu-se como no ponto 3.5 incubando-se as placas nas diferentes condições. No que diz respeito ao efeito de diferentes concentrações de nutrientes na motilidade de *A. butzleri*, usou-se o procedimento descrito no ponto 3.5, inoculando-se no entanto meio com diferentes diluições de TSB e 0,4 % (m/V) de agar. Os ensaios foram realizados de forma independente, pelo menos três vezes.

3.5.2 Influência da mucina e ácidos gordos de cadeia curta na motilidade de *Aliarcobacter butzleri*

De modo a estudar a motilidade das estirpes *A. butzleri* AB28/11 e *A. butzleri* DQ40A1 na presença de mucinas e ácidos gordos de cadeia curta, procedeu-se como descrito no ponto 3.5, mas inoculando placas com diferentes concentrações destes compostos e controlos (descritas no ponto 3.4). Os ensaios foram realizados de forma independente, pelo menos três vezes.

3.6 Determinação das curvas de crescimento

Para a realização deste ensaio, as estirpes foram colocadas a crescer como descrito no tópico 3.3. Posteriormente, as pré-culturas foram utilizadas para iniciar as culturas com uma DO_{620nm} inicial de 0,02 em 10 mL de meio TSB, que foram incubadas num agitador orbital, a 100 rpm, 37 °C e em condições de microaerobiose.

De forma a acompanhar o crescimento bacteriano foram recolhidas amostras de cultura de 2 em 2 horas e analisada a DO_{620nm} até ser atingida a fase estacionária, recolhendo-se uma última amostra às 24 horas. Por fim, analisaram-se os resultados através da construção das curvas de crescimento da DO_{620nm} em função do tempo. Estes ensaios foram realizados, pelo menos, três vezes e de forma independente.

3.7 Determinação da expressão do gene *flaA* na presença de mucinas e ácidos gordos de cadeia curta

De forma a avaliar a expressão do gene *flaA* em condições associadas ao hospedeiro (presença de mucinas e ácidos gordos de cadeia curta), a estirpe *A. butzleri* DQ40A1, foi cultivada como descrito no tópico 3.6, usando meio TSB suplementado com 0,5 % (m/v) de mucina suína, ou 30 e 90 mM de ácidos gordos de cadeia curta, ou 30 ou 90 mM de NaCl. Depois das culturas atingirem o meio da fase exponencial (\approx 8 horas) foi retirado 1 mL de cultura, as quais foram centrifugadas a 11000 \times g durante 5 minutos a 4 °C, sendo descartado o sobrenadante. O depósito celular foi lavado com uma solução de NaCl a 0,85 % (v/v), com posterior centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e o depósito celular armazenado em 500 μ L de TripleXtractor (Grisp, Portugal) a -80 °C até à sua utilização.

A extração de ácido ribonucleico (RNA) foi executada de acordo com instruções do fabricante do TripleXtractor (Grisp, Portugal). O RNA extraído foi dissolvido em 40 μ L

de água dietilpirocarbonato (DEPC) e foi determinada a concentração e pureza num nanoespetrofotômetro. Por fim, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1 %, durante 30 minutos a 120V, para avaliar a integridade do RNA e a presença de contaminantes.

Para remover possíveis contaminações das amostras de RNA com DNA, foi utilizado o kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, Estados Unidos da América), seguindo as instruções do fabricante. As alíquotas obtidas foram armazenadas a -80 °C, até à sua utilização.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi efetuada a partir do RNA isolado da estirpe, utilizando o kit Xpert cDNA Synthesis Mastermix (Grisp, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante, sendo que o cDNA sintetizado correspondente à estirpe *A. butzleri* DQ40A1 foi armazenado a -20 °C.

De seguida realizou-se a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR, do inglês “Real-time polymerase chain reaction”), que foi utilizada para avaliar a expressão do gene *flaA* na estirpe em estudo (*A. butzleri* DQ40A1). Para a reação qPCR, foi utilizado o kit comercial NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2×) (NZY Tech). Para a reação de amplificação, foi realizada uma mistura reacional com 5 µL master mix (2×), 0,4 µM de cada oligonucleótido iniciador referentes ao gene *flaA* ou 16S rRNA (Tabela 3) e 1 µL de cDNA, perfazendo o volume até 10 µL com água ultrapura.

Tabela 3 – Lista de oligonucleótidos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real, sequência e tamanho.

Gene	Designação do oligonucleótido iniciador	Sequência do oligonucleótido iniciador	Tamanho (pb)	Referência
<i>flaA</i>	flaA_F	5' -AGT TGC ACC AGC TGA CAT TT- 3'	20	(Medina et al., 2019)
	flaA_R	5' -AGT TGG TGA AGG AAG TTC CGA- 3'	21	
16S rRNA	P338_F	5' -ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG- 3'	20	(Øvreås et al., 1997)
	P518_R	5' -ATT ACC GCG GCT GCT GG- 3'	17	

De seguida, as reações foram incubadas num sistema de PCR em Tempo Real CFX (Bio-Rad, Estados Unidos da América), com o seguinte programa: 95 °C a 2 minutos; 40 ciclos constituídos por um passo a 95 °C durante 5 segundos e outro passo a 60 °C durante 30 segundos; 65 °C a 5 segundos e por fim 95 °C durante 5 segundos. Os níveis de pureza e de formação de dímeros foram avaliados pelas curvas de fusão resultantes. A expressão relativa do gene *flaA* foi analisada pelo método $\Delta\Delta C_t$, utilizando o gene 16S

rRNA expresso constitutivamente (Ferreira et al., 2021). Todas as reações de qPCR foram realizadas de forma independente em duplicado, pelo menos três vezes.

3.8 Construção do mutante do filamento flagelar de *Aliarcobacter butzleri*

De forma a estudar o papel da flagelina A e por sua vez do filamento bacteriano na patogenicidade de *A. butzleri*, procedeu-se à construção de um mutante do gene *flaA* da estirpe *A. butzleri* DQ40A1. O mutante foi construído por mutagénesse insercional no gene *flaA*, através da inserção de um fragmento que contém uma cassete de resistência à canamicina *aphA-3*, presente no plasmídeo pUC18-K2 em *E. coli*. Este gene foi selecionado dado que está descrito que os mutantes que não expressam o gene *flaA* resultam em bactérias não flageladas e imóveis (Ho et al., 2008).

3.8.1 Extração de DNA genómico de *Aliarcobacter butzleri*

Inicialmente foi efetuada a extração do DNA genómico (gDNA) da estirpe em estudo, *A. butzleri* DQ40A1, para amplificação das regiões a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene *flaA*, para que fossem obtidos os fragmentos a hibridizar com a cassete *aphA-3*.

Para isso, a estirpe *A. butzleri* DQ40A1 foi inoculada em placas com meio de TSA e incubadas a 37 °C durante 24 horas e em condições de microaerobiose. Após 24 horas, a biomassa celular foi ressuspensa em água Milli-Q estéril e a extração e purificação do gDNA foi realizado através do kit GRS Genomic DNA Kit - Bacteria (Grisp, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante, e determinada a sua concentração e pureza num nanoespectrofotómetro (IMPLEN, Alemanha).

3.8.2 Obtenção do fragmento de DNA transformante

3.8.2.1 Extração do plasmídeo pUC18-K2 de *Escherichia coli*

Para proceder à extração do plasmídeo pUC18-K2 presente em *E. coli*, o qual contém uma cassete de resistência à canamicina, a estirpe *E. coli* portadora deste plasmídeo foi inicialmente inoculada numa placa com meio sólido de Luria Bertani (LB, OXOID, Reino Unido) suplementada com 30 µg/mL de canamicina, e incubada durante 24 horas, a 37 °C em condições de aerobiose. Seguidamente iniciou-se uma pré-cultura da bactéria em

62,5 mL de meio líquido Terrific Broth (TB), constituído por 12 g/L de triptona, 24 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de glicerol, 0,017 M de fosfato monopotássico (KH₂PO₄) e 0,072 M de fosfato dipotássico (K₂HPO₄) e ainda suplementado com 30 µg/mL de canamicina. A pré-cultura foi incubada num agitador orbital a 37 °C, com agitação de 250 rpm, até atingir uma densidade ótica a 600 nm (DO_{600 nm}) de 2,6. Após atingir a DO esperada, foi iniciada uma cultura a partir da pré-cultura, em 125 mL de meio TB com uma DO_{600 nm} inicial de 0,2. A cultura foi colocada em agitação (250 rpm) durante 16 horas, a 37 °C. De seguida, as células provenientes da cultura foram recuperadas através de centrifugação (Hettich, Mikro 200R) a 5500 ×g, durante 20 minutos e 4 °C, e o sedimento celular foi utilizado para extrair o plasmídeo de interesse. O plasmídeo foi extraído com recurso ao kit MaxiPrep (NZYtech, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, foi quantificada a concentração e pureza do plasmídeo através de um nanoespectrofotómetro. Além disso, para confirmação da extração do plasmídeo, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose de 1 % (m/v) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1x), durante 30 minutos a 120 Volts (V), com posterior observação num transiluminador (UVITEC, Reino Unido) sob luz ultravioleta (UV).

3.8.2.2 Digestão do plasmídeo pUC18-K2 e purificação da cassette *aphA-3*

Para obtenção da cassette de resistência à canamicina *aphA-3*, foi necessário digerir o plasmídeo pUC18-K2. Com esse intuito, foram utilizadas duas enzimas de restrição BamHI e KpnI (Bioron, Alemanha) (Figura 3).

A digestão do plasmídeo foi realizada através da preparação de uma mistura reacional contendo de 10 U de enzima BamHI, 10 U de enzima KpnI, 2 µL de tampão K (10x) (Bioron, Alemanha), 1 µg de plasmídeo purificado, prefazendo um volume total de 20 µL com água ultrapura. A mistura foi incubada num termocilador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, Estados Unidos da América) durante 1 hora e 37 °C. Após 1 hora de incubação, o produto da digestão enzimática, bem como o marcador de peso molecular (Bioron, Alemanha), foram colocados num gel de agarose de 0,6 % (m/v), em tampão TAE a 1x, corado com Green Safe Premium (NZYTech, Portugal), durante 30 minutos a 120 V, com posterior observação num transiluminador sob luz UV.

A cassette *aphA-3* foi recuperada, através da excisão do gel de agarose que continha a banda de interesse. Seguidamente, foi realizada a purificação da cassette *aphA-3* utilizando o kit GRS PCR & Gel Band Purification (Grisp, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante e posterior determinação da concentração e pureza do fragmento obtido no nanoespectrofotómetro.

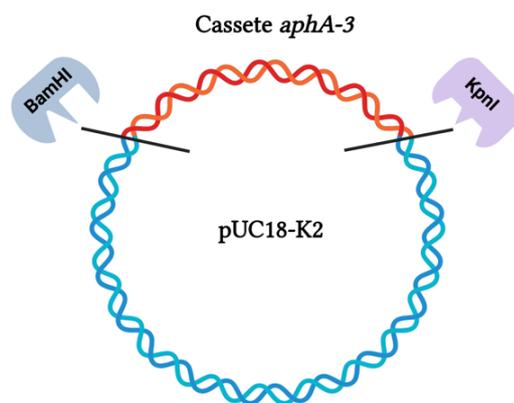


Figura 3 – Representação da digestão do plasmídeo pUC18-K2 de *Escherichia coli*, com o objetivo de obtenção da cassete de resistência à canamicina *aphA-3*.

3.8.2.3 Construção dos fragmentos hibridizantes com a cassete *aphA-3*

Para que haja recombinação homóloga de forma eficiente, a cassete *aphA-3* deve ser flanqueada por regiões de DNA homólogas à do gene que se pretende inativar. Assim, através do gDNA da estirpe *A. butzleri* DQ40A1, procedeu-se à amplificação da região a jusante do codão de iniciação e a montante do códon stop do gene *flaA*. A amplificação dos fragmentos do gene *flaA* (fragmento A e B) foi efetuada através de reações em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “Polymerase chain reaction”), com a utilização de dois conjuntos de oligonucleótidos iniciadores (Tabela 4): *flaA_A1* e *flaA_A2* para a amplificação do fragmento a jusante do codão de iniciação (fragmento A), e *flaA_B1* e *flaA_B2* para o fragmento a montante do codão de stop do gene *flaA* (fragmento B) (Figura 4).

Tabela 4 – Sequências nucleotídicas dos oligonucleótidos iniciadores utilizados nas reações de PCR, com o respetivo tamanho.

Fragmento hibridizante	Designação do oligonucleótido iniciador	Sequência do oligonucleótido iniciador	Tamanho (pb)
Fragmento A	<i>flaA_A1</i>	5' -GCA GAT GAT GCT TCT GGT CTT- 3'	21
	<i>flaA_A2</i>	5' -TTA TTC CTC CTA GTT AGT CAT GAT TGC TCA GCC ATT GAT T- 3'	40
Fragmento B	<i>flaA_B1</i>	5' -TAC CTG GAG GGA ATA ATG AGA GGG GAT ATC GGT TCT ACT CA- 3'	41
	<i>flaA_B2</i>	5' -TGT TGA ACT GCA TTA GCT TGG C- 3'	22

Nota: Encontram-se identificadas a itálico as sequências adaptadoras para ligação à cassete de resistência *aphA-3*

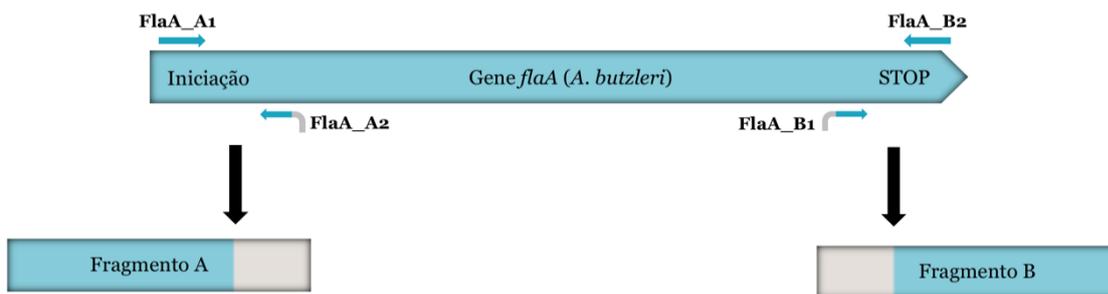


Figura 4 – Representação esquemática da construção dos fragmentos hibridizantes, com a amplificação da região a jusante do codão de iniciação e a montante do códon stop do gene *flaA*, resultando nos fragmentos A e B respectivamente. A cinzento encontram-se representados os adaptadores adicionados aos oligonucleótidos iniciadores de forma a permitir a hibridização com a cassette *aphA-3*.

A mistura reacional realizada para a amplificação de cada um dos fragmentos foi composta por 4 μL Phusion HF Buffer (5 \times) (Thermo Fisher Scientific), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 0,5 μM de cada oligonucleótido iniciador (*flaA_A1* e *flaA_A2* para a amplificação do fragmento A e *flaA_B1* e *flaA_B2* para a amplificação do fragmento B), 0,4 U da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μL) (Thermo Fisher Scientific), 2 μL de gDNA da estirpe *A. butzleri* DQ40A1 e perfazendo o volume até 20 μL com água ultrapura.

Seguidamente as misturas reacionais foram incubadas num termociclador com o seguinte programa, otimizado para cada reação: desnaturação inicial a 98 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos; 30 ciclos constituídos por um passo inicial de desnaturação a 98 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos, por um passo de hibridização a 54 $^{\circ}\text{C}$ para o fragmento A e 52 $^{\circ}\text{C}$ para o fragmento B durante 15 segundos e um passo de extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos e por último, a extensão final a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.

Após a amplificação, as amostras foram carregadas num gel de agarose 1 % (m/v) em tampão TAE 1x, corado com Green Safe Premium, assim como um marcador de peso molecular. A corrida de eletroforese ocorreu durante 30 minutos a 120 V, com posterior observação num transiluminador sob luz UV para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados (fragmento A- 135 pb e fragmento B- 251 pb).

De seguida, foram purificados os fragmentos de PCR amplificados, usando o kit GRS PCR & Gel Band Purification, de acordo com as instruções do fabricante, com posterior determinação da concentração e pureza dos fragmentos no nanoespectrofotómetro.

3.8.2.4 Junção dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*

Através da utilização dos oligonucleótidos iniciadores *flaA_A1* e *flaA_B2*, pela técnica de PCR, uniram-se os dois produtos amplificados (fragmentos A e B), que conferem homologia com o gene *flaA* de *A. butzleri*, com a cassette *aphA-3*. Assim, obteve-se o fragmento de DNA transformante (fragmento C) que foi posteriormente usado para transformar a bactéria *A. butzleri* DQ40A1 (Figura 5).

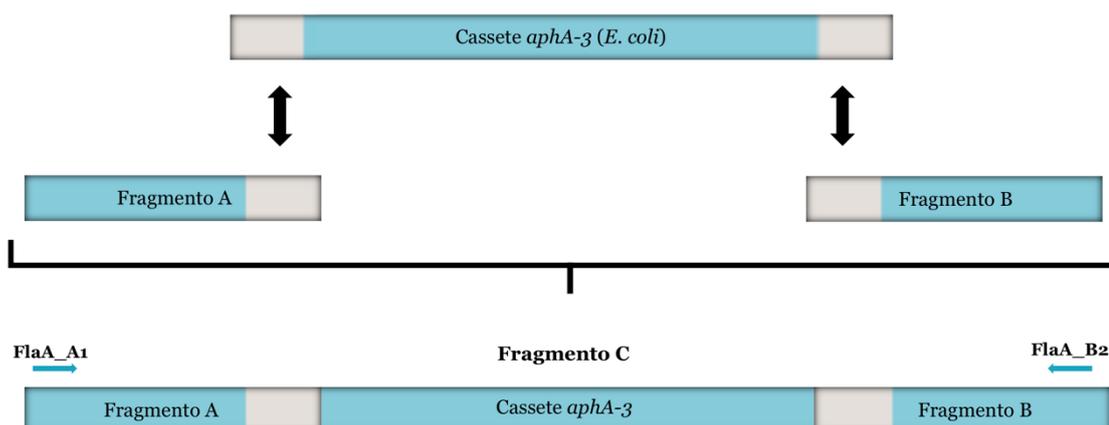


Figura 5 – Representação esquemática da construção do fragmento de DNA transformante (Fragmento C), através da união dos fragmentos A e B com a cassete de resistência à canamicina *aphA-3*.

A mistura reacional para obtenção do fragmento C foi constituída por 4 μL Phusion HF Buffer (5 \times), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μM do oligonucleótido iniciador *flaA_A1*, 0,5 μM do oligonucleótido iniciador *flaA_B2*, 0,4 U da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μL), 25 ng de cada um dos fragmentos de PCR purificados, fragmento A e fragmento B, 25 ng de cassete *aphA-3* purificada e perfazendo o volume até 20 μL com água ultrapura.

Seguidamente a mistura reacional foi incubada num termociclador, com o seguinte programa: desnaturação inicial a 98 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos; 30 ciclos constituídos por desnaturação a 98 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos, posterior hibridização a 58 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos e seguida da extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos; por último, a extensão final a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.

Após a amplificação, as amostras foram carregadas num gel de agarose 1 % (m/v), durante 30 minutos a 120 V, com posterior observação num transiluminador como descrito anteriormente, de modo a observar a banda de tamanho correspondente à junção dos fragmentos com a cassete *aphA-3* (fragmento C- 1236 pb).

Por fim, foi purificado o fragmento C, a partir do kit GRS PCR & Gel Band Purification, de acordo com as instruções do fabricante, com posterior determinação da concentração e pureza no nanoespectrofotômetro.

3.9 Transformação Natural

Com o objetivo de avaliar a contribuição da flagelina A (FlaA) na patogenicidade e virulência bacteriana de *A. butzleri*, construiu-se um mutante com a interrupção do gene de interesse (*flaA*), localizado no genoma de *A. butzleri*. A estirpe mutante foi construída por mutagenese insercional com a incorporação do fragmento de DNA exógeno desenvolvido, na estirpe *A. butzleri* DQ40A1, através do processo de transformação natural.

Assim iniciou-se o processo de transformação natural em meio sólido, previamente descrito, com modificações (Bonifácio et al., 2021). Primeiramente, a estirpe *A. butzleri* DQ40A1 foi inoculada numa placa de meio TSA suplementado com 5 % de sangue de cavalo desfibrinado e incubou-se a 30 °C, durante 24 horas e em condições de microaerobiose. Após 24 horas, preparou-se a suspensão bacteriana da estirpe *A. butzleri* DQ40A1 em meio TSB com cerca de 5×10^8 UFC/mL em 200 µL. Seguidamente, a suspensão preparada foi transferida para uma nova placa de meio TSA suplementado com 5 % de sangue de cavalo desfibrinado, onde se realizou o seu espalhamento e a qual foi incubada a 30 °C, durante 4 horas e em condições de microaerobiose. Após este período, em duas áreas distintas da mesma placa, adicionou-se 2,27 µg de fragmento de DNA transformante (fragmento C) e como controlo negativo foi adicionado 40 µL de água Milli-Q estéril. A placa foi reincubada a 30 °C, durante 8 horas em condições de microaerobiose. Após incubação, as células do ensaio e do controlo foram transferidas para uma nova placa com meio TSA suplementado com 5 % de sangue de cavalo desfibrinado, onde se realizou o seu espalhamento. Essa placa foi incubada a 30 °C, durante 18 horas em condições de microaerobiose. De seguida, a biomassa celular foi recolhida e ressuspenderam-se as células em 200 µL de meio TSB e transferidas para novas placas de meio TSA suplementado com 5 % de sangue de cavalo desfibrinado e com 50 µg/mL de canamicina, através de espalhamento. Após isto, as placas foram incubadas a 30 °C durante 5 dias e em condições de microaerobiose. Decorridos os 5 dias, a placa de meio seletivo foi observada para a presença de colónias de mutantes.

3.10 Confirmação da mutagénese

Após realização do processo de transformação natural e após obtenção de colónias de mutantes no meio seletivo, foi necessário perceber se o fragmento de DNA transformante foi incorporado no genoma e se o gene *flaA* deixou de ser expresso na estirpe *A. butzleri* DQ40A1.

3.10.1 Verificação da inserção do fragmento de DNA transformante

Para confirmar a inserção do fragmento de DNA transformante na estirpe *A. butzleri* DQ40A1, foram inicialmente selecionadas colónias, das placas relativas ao processo de transformação natural, e transferidas para uma nova placa de meio TSA com 5 % de sangue de cavalo desfibrinado e com 50 µg/mL de canamicina. A placa foi incubada a 30 °C, durante 24 horas e em condições de microaerobiose. Após este período, as células foram ressuspensas em 200 µL de água Milli-Q estéril, e procedeu-se à extração do gDNA por fervura incubando a suspensão a 100 °C durante 10 minutos. Após 10 minutos, centrifugou-se a suspensão a 8000 ×g durante 3 minutos à temperatura ambiente e removeu-se o sobrenadante para um novo tubo, sendo utilizado como molde num PCR para amplificação do gene em estudo e verificação da inserção do DNA transformante no genoma da estirpe *A. butzleri* DQ40A1.

A mistura reacional realizada foi constituída por 4 µL de Phusion HF Buffer (5×), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM do oligonucleótido iniciador *flaA_A1*, 0,5 µM do oligonucleótido iniciador *flaA_B2*, 0,4 U da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µL), 2 µL de gDNA diluído 1:5 e perfazendo o volume até 20 µL com água ultrapura. Como controlo positivo da reação usou-se gDNA da estirpe nativa em estudo. Seguidamente a mistura reacional foi incubada num termociclador, com o programa definido para a construção do fragmento C. Os fragmentos obtidos foram posteriormente observados após eletroforese em gel de agarose. Após análise do gel de agarose, os mutantes confirmados foram ressuspensos em 200 µL de meio BHI com 20 % de glicerol e armazenados a -80 °C, para utilização em ensaios posteriores.

Para complementar, os produtos de PCR com o tamanho correto, foram purificados e enviados para uma empresa externa para a realização do método de sequenciação de Sanger para confirmação da inserção do fragmento C no genoma da estirpe *A. butzleri* DQ40A1.

3.10.2 Verificação da expressão do gene *flaA*

Para confirmar se a interrupção do gene *flaA* levou à inativação da sua expressão, realizou-se uma transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR do inglês “Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction”).

Para tal, a estirpe nativa *A. butzleri* DQ40A1 e mutante *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*, foram cultivadas como descrito no tópico 3.6. Depois de ambas as culturas atingirem o meio da fase exponencial foi retirado 1 mL de cultura, as quais foram centrifugadas 11000 \times g durante 5 minutos a 4 °C, sendo descartado o sobrenadante. O depósito celular foi lavado com uma solução de NaCl a 0,85 % (v/v), com posterior centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e o depósito celular armazenado em 500 μ L de TripleXtractor a -80 °C até à sua utilização. De seguida, iniciou-se a extração de RNA, o tratamento das amostras de RNA com DNaseI e a síntese de cDNA, como descrito no tópico 3.7.

Para avaliar a expressão do gene *flaA*, o cDNA sintetizado anteriormente foi utilizado para a realização da técnica de PCR. Assim, foi preparada uma mistura reacional usando 1 μ L de Dream Taq Green Buffer (10x), 0,2 mM dNTPs, 0,5 μ M dos oligonucleótidos iniciadores *flaA_F* e *flaA_R* (Tabela 5), 0,5 U da enzima Dream Taq DNA Polimerase (Thermo Scientific, Estados Unidos da América), 2 μ L de cDNA e perpez-se o volume até 10 μ L com água ultrapura.

Tabela 5 – Lista dos oligonucleótidos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR, com o respetivo tamanho.

Gene	Designação do oligonucleótido iniciador	Sequência do oligonucleótido iniciador	Tamanho (pb)	Referência
<i>flaA</i>	<i>flaA_F</i>	5' -AGT TGC ACC AGC TGA CAT TT- 3'	20	(Medina et al., 2019)
	<i>flaA_R</i>	5' -AGT TGG TGA AGG AAG TTC CGA- 3'	21	

As misturas reacionais foram incubadas no termociclador com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 °C durante 3 minutos; 30 ciclos constituídos por desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, posterior hibridização a 58 °C durante 30 segundos e seguida da extensão a 72 °C durante 1 minuto; por último, a extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Após a amplificação, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose como descrito anteriormente.

3.11 Avaliação da influência do gene *flaA* na virulência de *Aliarcobacter butzleri*

Antes de avaliar o efeito da mutação na virulência de *A. butzleri*, avaliou-se se a mutação induzida no gene *flaA* provocou alterações no crescimento bacteriano, através da construção de curvas de crescimento das estirpes nativa *A. butzleri* DQ40A1 e mutante *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*, como descrito no ponto 3.6.

3.11.1 Avaliação da motilidade

A fim de avaliar se a interrupção do gene *flaA* afetou a motilidade bacteriana, foi realizado o ensaio da motilidade, como descrito anteriormente no tópico 3.5, na estirpe nativa *A. butzleri* DQ40A1 e na mutante *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*. Os ensaios foram realizados de forma independente, pelo menos três vezes.

3.11.2 Velocidade média de *Aliarcobacter butzleri*

Para perceber de que forma a mutação poderia afetar a velocidade média de cada uma das estirpes nativa *A. butzleri* DQ40A1 e mutante DQ40A1 Δ *flaA*, estas foram cultivadas como previamente descrito no tópico 3.3. Após a incubação, as células diluídas de 1:10 num volume final de 10 μ L, foram colocadas na superfície de uma lâmina, sobre a qual se colocou uma lamela. De seguida, a lâmina com a respetiva suspensão foi observada num microscópio Axio Imager Z2 (ZEISS, Alemanha) por microcopia de contraste de fase, com uma ampliação 63 \times (Plan-Apochromat) e uma abertura numérica de 1.4, onde foi possível a obtenção de vídeos sequenciais.

A análise dos vídeos obtidos, foi realizada utilizando o plugin MTrackJ do software ImageJ (Image J, NIH, Estados Unidos da América), onde foi possível o seguimento da trajetória das bactérias individuais. A análise foi realizada nas bactérias que se deslocavam no plano da região de interesse, o que significa que a análise parou quando as bactérias apareciam e desapareciam do plano (x, y). Esta análise permitiu a reconstituição matemática das trajetórias bacterianas, sendo possível a obtenção da velocidade média bacteriana em micrómetros por segundo (μ m/segundo).

3.11.3 Capacidade de formação de biofilmes

A capacidade de cada uma das estirpes nativa *A. butzleri* DQ40A1 e mutante DQ40A1 Δ *flaA* formarem biofilmes foi avaliada conforme descrito por Reeser et al. (2007), com algumas modificações (Reeser et al., 2007). As suspensões celulares usadas

para iniciar a formação de biofilme foram preparadas de acordo com o descrito previamente para a motilidade bacteriana na seção 3.5.

De seguida, 1 mL da suspensão bacteriana preparada a $\sim 10^8$ UFC/mL para cada uma das estirpes, foram adicionadas em placas de poliestireno de 24 poços, em sextuplicado, e a placa foi incubada a 37 °C, por 48 horas e em condições de microaerobiose. Após a incubação, o meio foi removido de todos os poços e recorreu-se à técnica de fixação por calor a 55 °C por 1 hora, para que os biofilmes ficassem fixos. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de 0,1 % (m/v) violeta de cristal durante 15 minutos e à temperatura ambiente. O violeta de cristal foi removido e realizaram-se três lavagens sucessivas com água destilada. Seguidamente, os poços foram secos a 55 °C, durante 15 minutos e após esse período de incubação adicionou-se 1 mL de solução de 30 % de metanol com 10 % de ácido acético. Por fim, a placa foi revelada através da leitura da absorvância a 570 nm utilizando um leitor de micropalcos (xMark, Bio-Rad, Estados Unidos da América). Os ensaios foram realizados de forma independente, pelo menos três vezes.

Realizou-se também o ensaio de microscopia de fluorescência de confocal para visualização da formação de biofilmes. Para isso, 3 mL da suspensão bacteriana preparada a $\sim 10^8$ UFC/mL para cada uma das estirpes nativa *A. butzleri* DQ40A1 e mutante *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*, foram adicionadas em placas de fundo de vidro MatTek de 35 mm (lamela de espessura nº 1,5), e incubadas a 37 °C, por 48 horas e em condições de microaerobiose. Após 48 horas, o biofilme foi incubado com 15 μ M de SYTO 9 (Molecular Probes- Invitrogen™, Estados Unidos da América) durante 30 minutos. Após incubação as bactérias foram lavadas com água e visualizadas num microscópio Zeiss AxioObserver LSM 710 (Oberkochen, Alemanha) com uma ampliação 40 \times , um comprimento de onda de excitação 488 nm e de emissão 534 nm. As imagens foram tratadas com recurso ao software Zeiss Zen blue 3.5.

3.11.4 Capacidade de adesão e invasão de *Aliarcobacter butzleri* a células Caco-2

O ensaio de adesão e invasão foi realizado como descrito por Ferreira et al. (2014), com ligeiras modificações (Ferreira, Júlio, et al., 2014). Assim, para a realização deste ensaio, foi utilizada a linha de células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2). As células Caco-2 foram cultivadas em frascos de cultura com meio Dulbecco's modified Eagle (DMEM, D7777-Sigma, Estados Unidos da América) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (Biocrom AG, Germany), 1 % (v/v) de aminoácidos não essenciais, 100 μ g/ml de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. Os frascos foram mantidos em

incubadoras a 37 °C, em 5 % de CO₂ e 95 % de ar e o meio foi substituído de dois em dois dias até as células atingiram um estado de semi-confluência (80 %). Antes da realização de cada ensaio, as células foram tripsinizadas e as células viáveis foram contabilizadas num hemocítmetro usando azul de tripano. Para o ensaio, foram semeadas 4,5 x 10⁴ células por poço numa placa de 24 poços, com posterior incubação a 37 °C, em 5 % de CO₂, 95 % de ar e durante 7 dias. As células foram então contadas por poço, e posteriormente infetadas usando uma suspensão bacteriana proveniente da pré-cultura preparada para cada uma das estirpes bacterianas, de acordo com o descrito no tópico 3.3, sendo recolhidas por centrifugação (10000 ×g, durante 5 minutos) e ressuspensas em meio DMEM com suplementação, pré-aquecido a 37 °C, mas sem antibiótico, de forma a atingirem aproximadamente 10⁷ UFC por poço.

Posteriormente, as monocamadas de células Caco-2 foram lavadas duas vezes com 500 µL de tampão fosfato salino (PBS, do inglês “Phosphate buffered saline”) e de seguida, foram infetadas com 500 µL da suspensão bacteriana preparada para cada uma das estirpes. De seguida, a placa foi incubada a 37 °C, 5 % de CO₂, 95 % de ar e durante 3 horas, para permitir a adesão e invasão celular. Findo este período de tempo, as células infetadas foram novamente lavadas, três vezes, para remover bactérias que não aderiram, e o número de bactérias que interagem (aderentes e internalizadas) foi determinado através da lise das células Caco-2 com a adição de 0,1 % (v/v) de Triton X-100 a cada poço durante 5 minutos, seguida da contagem bacteriana por diluições sucessivas. Para avaliar a invasão bacteriana de células Caco-2, após as 3 horas de incubação e lavagens sucessivas como indicado anteriormente, foi adicionado aos poços correspondentes 500 µL de gentamicina (125 µg/mL), durante 1 hora. Após incubação, as células foram lavadas três vezes, e o número de bactérias intracelulares foi determinado através da lise das células e contagem, como descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados de forma independente, pelo menos três vezes.

3.11.5 Adesão de *Aliarcobacter butzleri* a mucinas

Os ensaios de adesão na presença de mucinas foram realizados como descrito por Tsilia et al. (2015), com ligeiras modificações. Assim, as estirpes nativa e mutante foram usadas a meio da fase exponencial (≈ 8 horas), sendo as células recolhidas por centrifugação (8000 ×g, durante 5 minutos) e ressuspensas em PBS estéril de forma a obter uma suspensão com uma DO_{620nm}=0,5 (≈ 1 x 10¹⁰ UFC/mL). Após a preparação da suspensão de cada uma das estirpes bacterianas, 1 mL foi transferido para uma placa de 12 poços, em triplicado, contendo 1,2 mL de 5 % (m/v) de mucinas tipo II do estômago de porco com 1 % (m/v) agar a um pH=6,8 ou como controlo a mesma preparação na ausência de

mucina. Posteriormente, a placa de 12 poços foi colocada num agitador orbital a 37 °C, a 40 rpm durante 90 minutos (Tsilia et al., 2015).

Após incubação, foram realizadas duas lavagens sucessivas com PBS, e com o auxílio de uma espátula foi removido o conteúdo do poço, e colocado num saco de Stomacher. De seguida, adicionou-se 10 mL de água peptonada estéril em cada saco e homogeneizou-se através do Stomacher MicroBiomaster Blender (Thermo Scientific, Estados Unidos da América). Posteriormente, diluições sucessivas foram realizadas, seguida da transferência de 10 µL de cada diluição para placas com meio TSA para posterior contagem das UFC/mL (Tsilia et al., 2015). Os ensaios foram realizados de forma independente, pelo menos três vezes.

3.12 Análise Bioinformática

Os genomas das estirpes bacterianas usadas neste estudo foram previamente sequenciados. Assim, o mapa genómico das estirpes bacterianas utilizadas foi visualizado no software SnapGene (www.snapgene.com) (GSL Biotech), para a identificação dos 34 genes flagelares de interesse que foram descritos anteriormente por Isidro et al. (2020), como fazendo parte do repertório de genes do flagelo de *A. butzleri* (Isidro et al., 2020).

O software MEGA 11 foi utilizado na realização do alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína FlaA pertencente ao flagelo, para os 19 isolados de *Aliarcobacter butzleri* em estudo, de forma a serem identificadas possíveis diferenças nas sequências de aminoácidos entre os isolados.

Recorrendo ao mesmo software, construíram-se três árvores filogenéticas, tendo sido considerada a concatenação dos 34 genes flagelares, a concatenação dos principais genes polimórficos do genoma core (*flgD*, *flgL*, *flgK*, *flgE2*, *flgG2* e *flgH*) ou o gene *flaA* dos 19 isolados em estudo. Na construção das árvores filogenéticas foi utilizado o método *Neighbor-joining* e um valor de *bootstrap* em percentagem após 1000 iterações, tendo por base a análise da maior probabilidade e proximidade entre as estirpes estudadas.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Motilidade bacteriana

Perante uma variedade de ambientes a que as bactérias são expostas, a motilidade confere-lhes uma vantagem de sobrevivência, não só pela possibilidade de ser usada na localização de nutrientes, como também pela exploração de novos nichos para a colonização do hospedeiro (Chaban et al., 2015; Harshey, 2003). Neste sentido, é fundamental analisar de que forma as condições a que as bactérias estão sujeitas, poderão influenciar a motilidade bacteriana.

4.1.1 Motilidade dos isolados clínicos e alimentares de *Aliarcobacter butzleri*

Com o objetivo de estudar o perfil de motilidade de diversos isolados de *A. butzleri*, avaliou-se a motilidade de 19 isolados, dois de origem em indústria de processamento alimentar (isolados alimentares) e 17 com origem em fezes humanas (isolados clínicos). O halo da motilidade bacteriana foi medido e na Figura 6 estão representados os resultados obtidos para os diferentes isolados de *A. butzleri*.

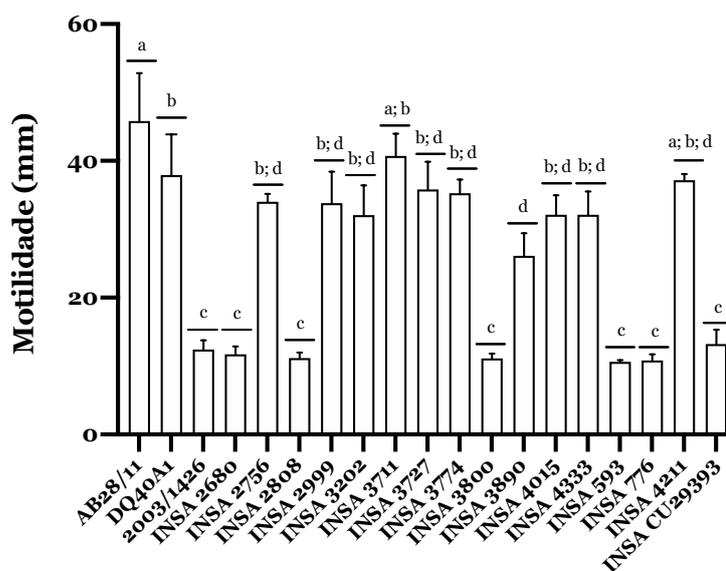


Figura 6 – Halo da motilidade dos 19 isolados de *Aliarcobacter butzleri* em milímetros. Os resultados foram analisados utilizando um teste *one-way* ANOVA com múltiplas comparações. As colunas assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Os dados apresentados representam a

média \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. As estirpes *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e DQ40A1 são de origem alimentar e as restantes são clínicas. O ensaio foi realizado em condições de microaerobiose e a 37 °C.

Pela observação dos resultados obtidos (Figura 6), verifica-se a existência de dois tipos de perfil de motilidade das estirpes em estudo. O grupo onde as estirpes mostraram halos de motilidade maiores (entre 25-50 mm) que inclui os isolados: AB28/11; DQ40A1; INSA 2756; INSA 2999; INSA 3202; INSA 3711; INSA 3727; INSA 3774; INSA 3890; INSA 4015; INSA 4333 e a INSA 4211 e o grupo onde as estirpes apresentaram halos de motilidade menores (entre 10-15 mm) que inclui os isolados: 2003/1426; INSA 2680; INSA 2808; INSA 3800; INSA 593; INSA 776 e a INSA CU29393.

Quando comparado com outros estudos que avaliaram a motilidade bacteriana em estirpes de *A. butzleri*, Ferreira et al. (2018) constataram que todas as estirpes apresentaram um perfil semelhante de motilidade, onde o halo obtido variou entre 23,8 e 29,3 mm, de notar que o grupo de bactérias considerado para o estudo era pequeno, de apenas quatro estirpes (Ferreira et al., 2018). Neste trabalho os resultados apresentados (Figura 6) foram marcados por uma elevada variabilidade bacteriana entre as estirpes analisadas, como se verificou num estudo em *C. concisus*. Nesse estudo não foi possível estabelecer uma correlação entre a motilidade e a origem da estirpe ou a doença. Além disso, foi sugerido que a variabilidade apresentada poderia estar relacionada com uma composição e nível de glicosilação diferentes do flagelo, uma vez que a glicosilação é essencial para a montagem do flagelo bacteriano (Ovesen et al., 2017).

Também neste caso, podemos inferir que parece não haver relação entre a motilidade obtida e a origem dos isolados de *A. butzleri*, no entanto são necessários mais estudos que ajudem a compreender os mecanismos envolvidos e que expliquem esta diferença na variabilidade da motilidade apresentada para *A. butzleri*.

De modo a perceber se a variabilidade da motilidade apresentada para os 19 isolados de *A. butzleri* estaria ou não relacionado com o genoma bacteriano, foi ainda realizada a concatenação dos 34 genes flagelares, descritos anteriormente por Isidro et al. (2020), para cada um dos isolados. Por sua vez, a árvore filogenética foi efetuada, como representado na Figura 7, tendo-se verificado a formação de vários *clusters* genéticos. Contudo, não foi possível fazer uma correlação dos *clusters* com o halo de motilidade bacteriano obtido para cada isolado.

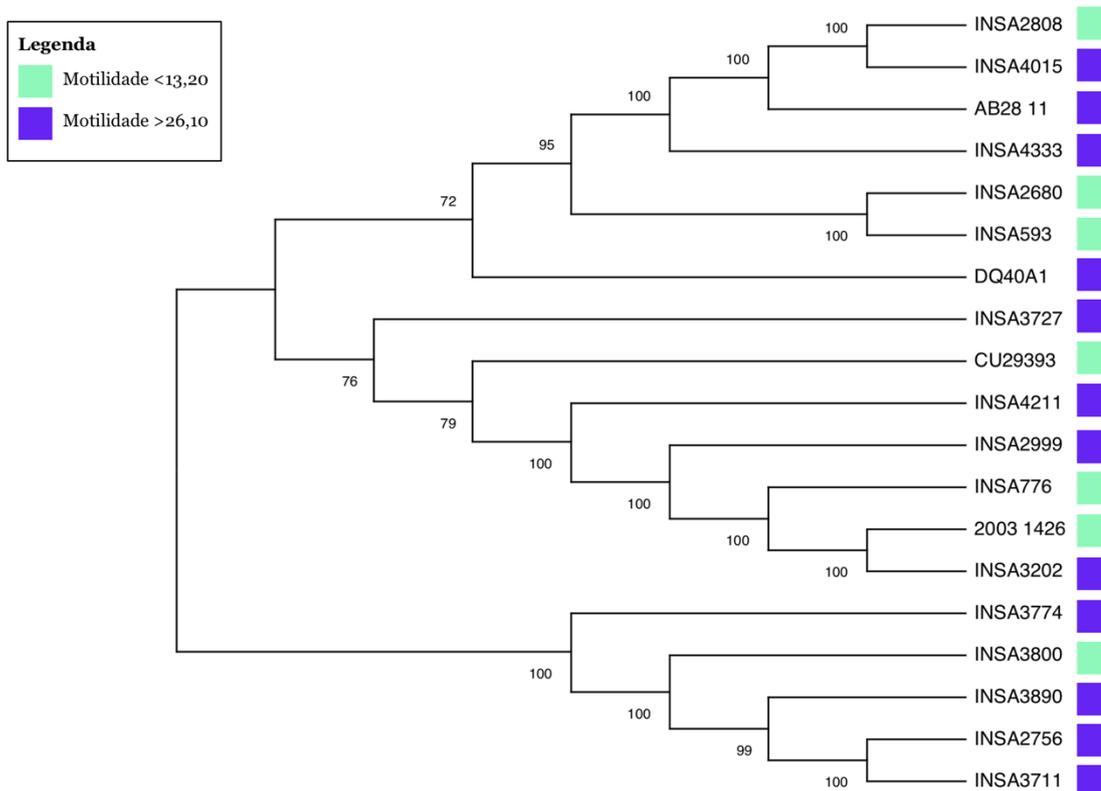


Figura 7 – Árvore filogenética obtida através da concatenação dos 34 genes flagelares para cada um dos isolados. Encontra-se representado, à frente de cada estirpe bacteriana em estudo, um quadrado com a cor representativa do halo de motilidade (em milímetros). A árvore filogenética foi inferida através do método *Neighbour-joining*. Os números nos nós da árvore filogenética representam o valor de *bootstrap* em percentagem após 1000 iterações.

No entanto, sabe-se que os genes que poderão apresentar um possível impacto na motilidade bacteriana são *flgD*, *flgL*, *flgK*, *flgE2*, *flgG2* e *flgH*, uma vez que foram considerados os principais genes polimórficos do genoma core (Isidro et al., 2020). Assim, foi ainda realizada uma concatenação dos seis genes mais polimórficos e a análise da árvore filogenética (Figura 8) focada nestes genes também não segregou as estirpes de acordo com a motilidade.

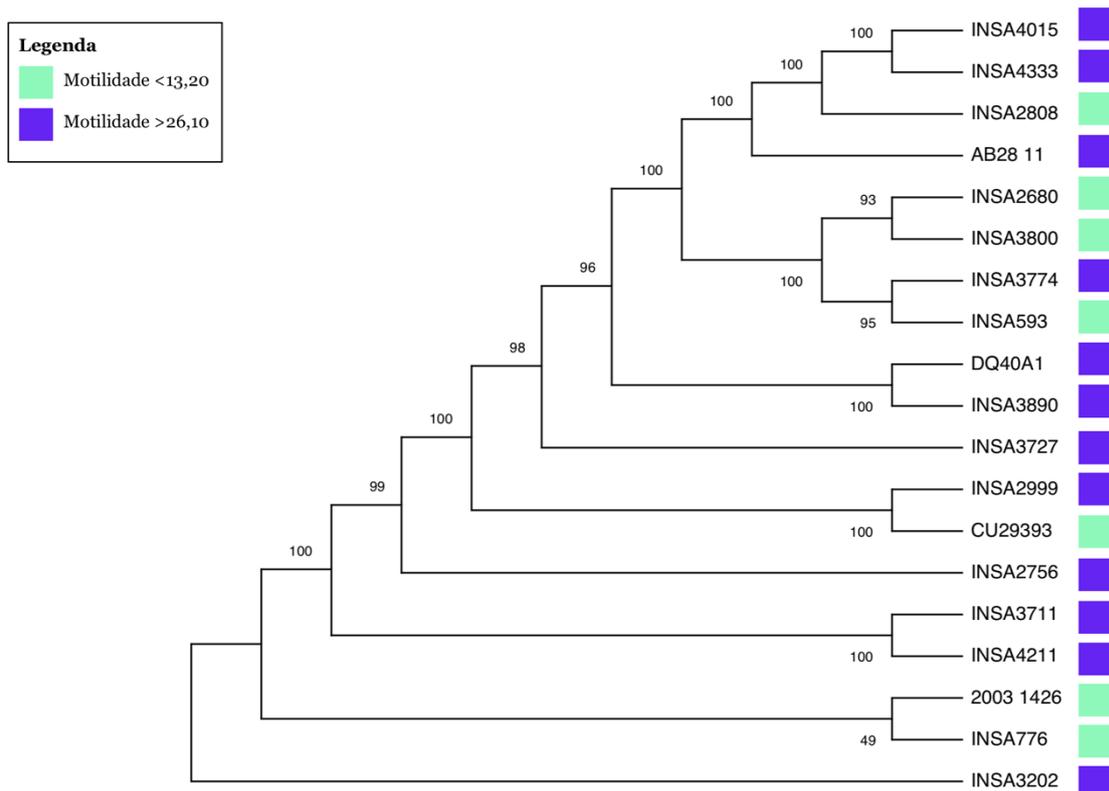


Figura 8 – Árvore filogenética obtida através da concatenação dos principais genes considerados polimórficos do genoma core (*flgD*, *flgL*, *flgK*, *flgE2*, *flgG2* e *flgH*). Encontra-se representado, à frente de cada estirpe bacteriana em estudo, um quadrado com a cor representativa do halo de motilidade (em milímetros). A árvore filogenética foi inferida através do método *Neighbour-joining*. Os números nos nós da árvore filogenética representam o valor de *bootstrap* em percentagem após 1000 iterações.

4.1.2 Influência de diferentes condições ambientais e a nível do hospedeiro na motilidade bacteriana de *Aliarcobacter butzleri*

A motilidade bacteriana não é estacionária e a função flagelar é suscetível a diferentes ambientes (Ovesen et al., 2017). Para determinar a importância da motilidade no potencial patogénico de *A. butzleri*, são necessários estudos que explorem a influência das condições a que as bactérias estão sujeitas na motilidade. Assim, a influência de diferentes condições foi avaliada nos isolados *A. butzleri* DQ40A1 e *A. butzleri* AB28/11, uma vez que foram dois dos isolados que apresentaram maior motilidade bacteriana dentro das estirpes em estudo (AB28/11 - 45,85 mm e DQ40A1 - 37,94 mm) (Figura 6). Além disso, o isolado *A. butzleri* DQ40A1 foi selecionado para a construção do mutante do gene da flagelina (*flaA*), por ser naturalmente transformável.

4.1.2.1 Influência da temperatura e das condições atmosféricas na motilidade de *Aliarcobacter butzleri*

Antes de avaliar a influência da temperatura na motilidade de *A. butzleri* AB28/11 e *A. butzleri* DQ40A1, a sobrevivência dos isolados foi analisada nas condições de teste (Tabela 6). A partir da análise dos resultados, verificou-se que para o isolado *A. butzleri* AB28/11 houve uma inibição significativa do crescimento às temperaturas de 25 e 30 °C em microaerobiose. No caso do isolado *A. butzleri* DQ40A1, constatou-se uma inibição do crescimento bacteriano a 15 °C em microaerobiose e a 37 °C em aerobiose.

Tabela 6 – Representação da sobrevivência bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 sob diversas temperaturas (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C) e em duas condições atmosféricas: microaerobiose e aerobiose. Foram realizados pelo menos três ensaios independentes, estando representado o significado estatístico da condição em relação às condições estabelecidas como controle (37 °C em microaerobiose).

Condição		Log ₁₀ (N _{Teste} /N _{Controle}) ^a			
		AB28/11		DQ40A1	
		Média ± Desvio padrão	Valor de p	Média ± Desvio padrão	Valor de p
Microaerobiose	15 °C	-0,07 ± 0,11	0,2581	-1,43 ± 0,19	<0,0001
	20 °C	-0,06 ± 0,02	0,4101	-0,05 ± 0,15	0,8434
	25 °C	-0,14 ± 0,06	0,0007	-0,01 ± 0,10	0,9998
	30 °C	-0,10 ± 0,10	0,0250	-0,09 ± 0,13	0,4563
	37 °C	0,00 ± 0,00	-	0,00 ± 0,00	-
Aerobiose	15 °C	-0,06 ± 0,11	0,7515	-0,05 ± 0,02	0,9782
	20 °C	-0,07 ± 0,08	0,5740	-0,14 ± 0,09	0,5109
	25 °C	-0,02 ± 0,10	0,9963	-0,01 ± 0,13	>0,9999
	30 °C	-0,07 ± 0,09	0,4353	-0,01 ± 0,06	0,9998
	37 °C	-0,05 ± 0,09	0,5658	-5,51 ± 0,28	<0,0001

^a N_{Teste}: Número total das UFC/mL na condição teste; N_{Controle}: Número total das UFC/mL na condição de controle a 37 °C em microaerobiose.

Na Figura 9 observam-se os resultados obtidos no ensaio da motilidade, onde se verifica que tanto *A. butzleri* AB28/11 (Figura 9A e B) como *A. butzleri* DQ40A1 (Figura 9C e D) apresentam um aumento da motilidade com o aumento da temperatura. De notar que a motilidade de *A. butzleri* DQ40A1 (valores compreendidos entre 13,62 – 29,11 mm) é inferior à estirpe *A. butzleri* AB28/11 (valores compreendidos entre 17,13 – 49,63 mm) em condições de aerobiose (Figura 9D e B respetivamente).

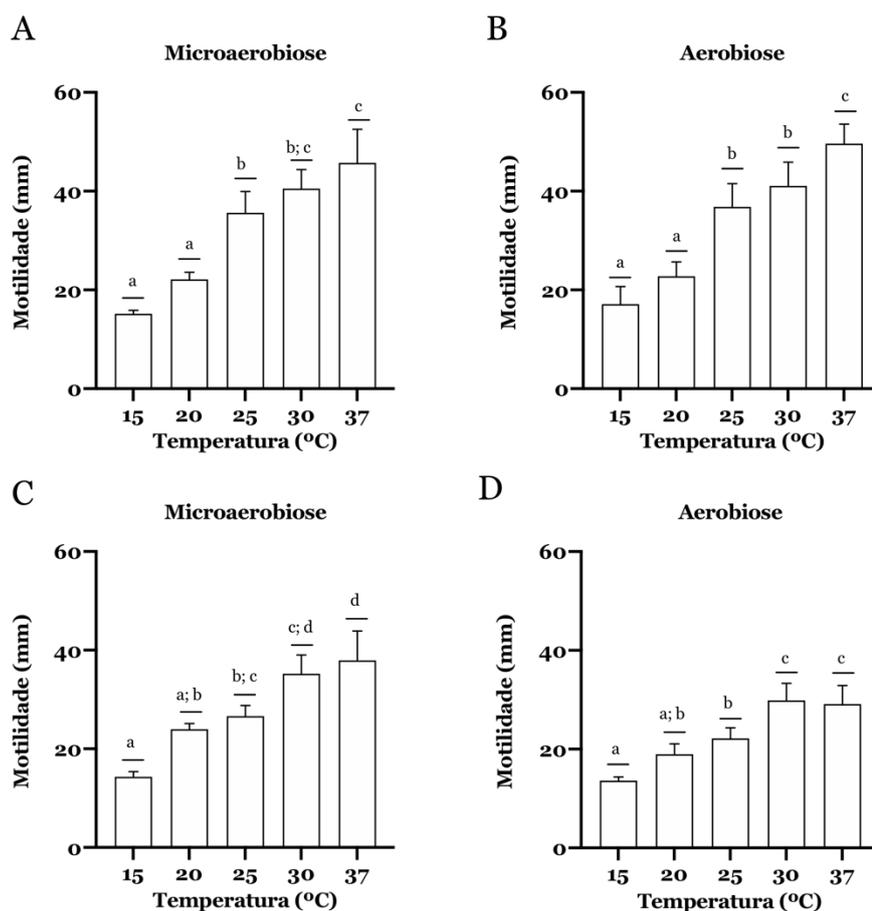


Figura 9 – Representação da influência da temperatura (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C) na motilidade (em milímetros) bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 (A e B) e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (C e D). Foram avaliadas duas condições atmosféricas: microaerobiose (A e C) e aerobiose (B e D). Os resultados foram analisados utilizando um teste *one-way* ANOVA com múltiplas comparações. As colunas assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

De seguida, analisando os dados da motilidade bacteriana nas duas condições atmosféricas testadas para todas as temperaturas estudadas, não há diferença estatística entre a motilidade em ambiente de aerobiose e de microaerobiose, em *A. butzleri* AB28/11 (Figura 10A). No entanto, apesar de também não se ter verificado diferença estatística entre as duas condições atmosféricas testadas para 15 e 25 °C de *A. butzleri* DQ40A1, a motilidade bacteriana foi estatisticamente favorecida em condições de microaerobiose para 20, 30 e 37 °C (Figura 10B).

Quando analisado em conjunto com os resultados da sobrevivência nas diferentes condições, constatou-se que apesar de uma pequena inibição do crescimento em *A. butzleri* AB28/11 nas temperaturas 25 e 30 °C em microaerobiose, os resultados da motilidade bacteriana não foram afetados. Já em *A. butzleri* DQ40A1, pode-se inferir que a inibição do crescimento verificada a 15 °C em microaerobiose e 37 °C em aerobiose,

apenas afetou a motilidade a 37 °C, a qual pode estar associada à elevada redução do número de células viáveis nesta condição.

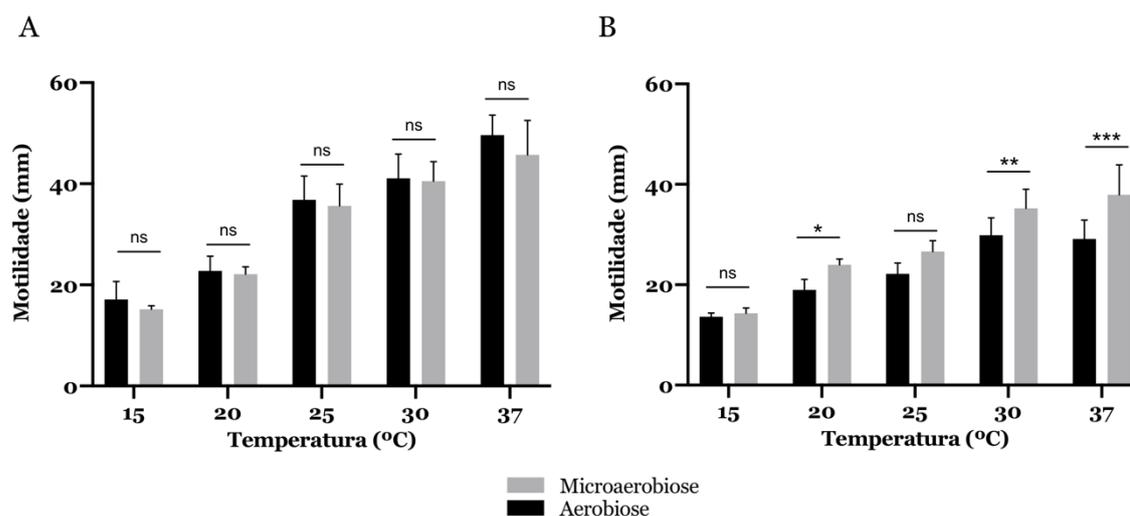


Figura 10 – Representação da influência da atmosfera (microaerobiose e aerobiose) na motilidade (em milímetros) bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 (A) e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (B). Os resultados foram analisados utilizando um teste *t-student*. Os dados apresentados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*), os asteriscos representam diferença significativa.

Uma vez verificado maiores valores de motilidade bacteriana a 37 °C em microaerobiose para *A. butzleri* DQ40A1, e sem diferença estatisticamente significativa em *A. butzleri* AB28/11, em ambas as condições atmosféricas testadas, os ensaios posteriores foram realizados a 37 °C e em microaerobiose. Além disso, entre os estudos realizados em *A. butzleri* que têm avaliado a motilidade bacteriana, as condições estudadas são 30 ou 37 °C em condições de aerobiose e 37 °C em condições de microaerobiose (Ferreira et al., 2018; Mateus, Nunes, et al., 2021; Salazar-Sánchez et al., 2022).

Apesar de os estudos que avaliam a motilidade na presença de condições atmosféricas diferentes serem escassos, foi demonstrado que a atmosfera pode influenciar a motilidade, como descrito por Ovesen et al. (2019), onde constataram que grande parte dos isolados de *C. concisus*, apresentaram um fenótipo móvel em condições de microaerobiose quando comparado com as condições de anaerobiose. As diferenças existentes na motilidade podem ainda ser justificadas pela heterogeneidade dos isolados ou pela seleção de isolados de nichos distintos do hospedeiro. Além disso, foi sugerido que embora o intestino saudável seja anaeróbico, no intestino inflamado há o aumento da disponibilidade de oxigênio, servindo como um sinal promotor da motilidade de *C. concisus* (Ovesen et al., 2019).

De forma geral, noutras bactérias, a temperatura também parece influenciar a motilidade bacteriana, como descrito por Murakami et al. (2020), que investigaram a motilidade em duas estirpes de *Escherichia albertii* entre 15 e 42 °C. No entanto, a temperatura ótima de motilidade bacteriana observada para este microrganismo foi a 30 °C, uma vez que a partir de 35 °C não se observou motilidade (Murakami et al., 2020). Tendo já sido demonstrado numa bactéria de Gram-positivo (*Listeria monocytogenes*) que a expressão flagelar depende da temperatura, uma vez que a proteína GmaR atua como uma proteína reguladora da temperatura, que regula a transcrição dos genes envolvidos com a motilidade bacteriana. A temperatura é utilizada como um sinal para controlar a expressão de genes de virulência envolvidos com a permanência no ambiente ou envolvidos com a infeção do hospedeiro (Kamp & Higgins, 2011).

Assim, são necessários mais estudos que avaliem os mecanismos que estão envolvidos na motilidade de *A. butzleri* na presença de diferentes temperaturas e condições atmosféricas.

4.1.2.2 Influência da concentração de nutrientes na motilidade de *Aliarcobacter butzleri*

Outro fator que pode influenciar a motilidade bacteriana é a disponibilidade de nutrientes, uma vez que a motilidade bacteriana permite à bactéria localizar os nutrientes e também alcançar o nicho preferido para a colonização (Josenhans & Suerbaum, 2002).

Neste sentido, na Figura 11 encontram-se representados os resultados da motilidade e da sobrevivência de *A. butzleri* na presença de diversas concentrações de TSB diluído. Após análise dos resultados do ensaio da motilidade com *A. butzleri* AB28/11 (Figura 11A) e *A. butzleri* DQ40A1 (Figura 11B), verificou-se que à medida que a concentração de nutrientes diminuiu, a motilidade bacteriana também diminuiu. No entanto, na concentração de nutrientes obtida por diluição do meio TSB de 1:20, ocorreu uma inibição bacteriana acentuada da sobrevivência relativamente ao controlo (Figura 11C e D), pelo que não é possível associar os resultados da motilidade com esta concentração de nutrientes, uma vez que a diminuição da motilidade está associada com a diminuição da sobrevivência bacteriana. Nas restantes concentrações de nutrientes não foi verificada inibição bacteriana, pelo que os resultados de motilidade apresentados podem ser validados.

De notar que, mais uma vez, a motilidade de *A. butzleri* DQ40A1 (valores compreendidos entre 0 – 38,59 mm) foi inferior à estirpe *A. butzleri* AB28/11 (valores compreendidos entre 27,52 – 45,85 mm) (B e A respetivamente).

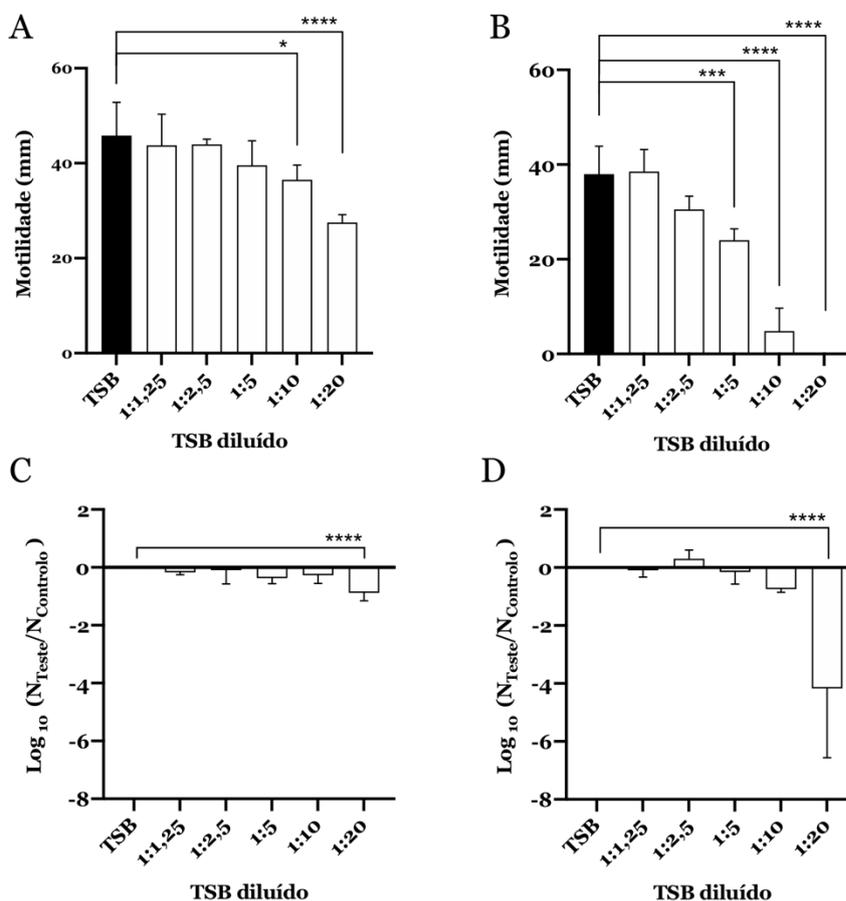


Figura 11 – Representação da influência de diferentes concentrações de TSB (não diluído; 1:1,25; 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:20) na motilidade (em milímetros) bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 (A) e de *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (B). Avaliação da sobrevivência dos isolados nos meios usados (C- *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e D- *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1). O ensaio foi realizado em condições de microaerobiose e a 37 °C. Os resultados foram analisados utilizando um teste *one-way* ANOVA. Os dados apresentados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. $p < 0,0001$ (****); $p < 0,001$ (***); $p < 0,05$ (*), os asteriscos representam diferença significativa. Barra preta – representa o ensaio usado como controlo (TSB não diluído). N_{Teste}: Número total das UFC/mL na condição teste; N_{Controlo}: Número total das UFC/mL na condição de controlo.

Entre os estudos realizados, que avaliam a motilidade bacteriana na presença de nutrientes, constatou-se que, *E. albertii* não parece ter o mesmo comportamento que a espécie *A. butzleri* uma vez que, estudos recentes em *E. albertii* mostraram que a baixas concentrações de nutrientes e baixas temperaturas, os flagelos são produzidos e a

motilidade bacteriana parece ser promovida (Ikeda et al., 2020; Murakami et al., 2020). O mesmo acontece em *E. coli*, a motilidade aumenta quando os nutrientes são escassos (Ni et al., 2020).

Assim, torna-se importante perceber que outros mecanismos poderão estar por detrás destes resultados obtidos em *A. butzleri*.

4.1.2.3 Influência de diferentes compostos associados ao hospedeiro na motilidade de *Aliarcobacter butzleri*

Durante a passagem no trato gastrointestinal, o agente patogénico encontra diversos stresses e condições adversas que terá que enfrentar e se adaptar para lidar contra as defesas do hospedeiro (Chaban et al., 2015).

Assim, neste ensaio avaliámos a influência da presença de compostos presentes no intestino delgado e no intestino grosso, como mucinas e ácidos gordos de cadeia curta, no perfil de motilidade da *A. butzleri* AB28/11 e *A. butzleri* DQ40A1.

Os ácidos gordos de cadeia curta são produtos finais do metabolismo da microbiota intestinal e são constituídos maioritariamente por acetato, butirato e propionato, encontrando-se em concentrações mais elevadas no intestino grosso e mais baixas no intestino delgado (Herold et al., 2009). Assim, para a realização deste ensaio da motilidade foram selecionadas diversas concentrações de ácidos gordos de cadeia curta, de acordo com a variação de concentração encontrada ao longo do intestino. Por sua vez, o NaCl foi selecionado para o controlo da osmolaridade do ensaio.

Os resultados da sobrevivência (Tabela 7) mostraram que houve uma inibição parcial do crescimento de *A. butzleri* AB28/11 para 90 mM de ácidos gordos de cadeia curta e uma inibição total para 130 e 172 mM de ácidos gordos de cadeia curta. Para o isolado *A. butzleri* DQ40A1 verificou-se uma inibição total do crescimento bacteriano a 172 mM de ácidos gordos de cadeia curta e nas restantes concentrações não foi observada inibição da sobrevivência bacteriana. De notar que não houve inibição significativa do crescimento bacteriano na presença de NaCl. Assim, para ambos os isolados as concentrações selecionadas para a realização do ensaio da motilidade foram 30, 90 e 130 mM de ácidos gordos de cadeia curta e NaCl.

Tabela 7 – Sobrevivência bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 na presença de diferentes concentrações de NaCl e ácidos gordos de cadeia curta. Foram realizados pelo menos três ensaios independentes, estando representado o significado estatístico da condição em relação ao controlo (0 mM de ácidos gordos de cadeia curta ou NaCl). O ensaio foi realizado em condições de microaerobiose e a 37 °C.

Condição	Log ₁₀ (N _{Teste} /N _{Controlo}) ^a				
	AB28/11		DQ40A1		
	Média ± Desvio padrão	Valor de p	Média ± Desvio padrão	Valor de p	
NaCl	30 mM	0,05 ± 0,16	0,9996	0,00 ± 0,19	>0,9999
	90 mM	-0,16 ± 0,32	0,9386	0,09 ± 0,27	0,9972
	130 mM	-0,44 ± 0,28	0,1181	-0,17 ± 0,26	0,9674
	172 mM	-0,02 ± 0,16	0,9999	0,01 ± 0,16	>0,9999
Ácidos gordos de cadeia curta	30 mM	-0,09 ± 0,21	0,9972	-0,31 ± 0,80	0,3850
	90 mM	-0,67 ± 0,12	0,0118	-0,05 ± 0,05	0,9997
	130 mM	-5,71 ± 0,71	<0,0001	-0,31 ± 0,22	0,4810
	172 mM	-6,52 ± 0,17	<0,0001	-6,53 ± 0,14	<0,0001

^a N_{Teste}: Número total das UFC/mL na condição teste; N_{Controlo}: Número total das UFC/mL na condição de controlo a 0 mM de ácidos gordos de cadeia curta ou NaCl.

Na Figura 12 encontram-se representados os resultados da motilidade obtidos, onde é possível observar um comportamento semelhante entre as duas estirpes de *A. butzleri* em estudo. Tanto usando concentrações de ácidos gordos de cadeia curta encontradas no intestino grosso, como no intestino delgado, ocorreu uma diminuição da motilidade bacteriana (Figura 12A e C). Sendo que à medida que aumenta a concentração de ácidos gordos de cadeia curta, há diminuição da motilidade bacteriana quando comparado com o controlo de NaCl. De notar que nenhuma concentração de NaCl teve um efeito significativo na motilidade bacteriana, exceto para a estirpe *A. butzleri* AB28/11 a 130 mM de NaCl (Figura 12B). Na estirpe *A. butzleri* AB28/11, sugere-se que a diminuição significativa da motilidade a 90 e 130 mM de ácidos gordos de cadeia curta (Figura 12A) possa ter uma correlação com a diminuição da sobrevivência (Tabela 7). Por sua vez, em *A. butzleri* DQ40A1, não houve diminuição significativa da sobrevivência a 30, 90 e 130 mM de ácidos gordos de cadeia curta, pelo que os resultados da motilidade apresentados (Figura 12C) estão associados apenas ao papel dos ácidos gordos de cadeia curta.

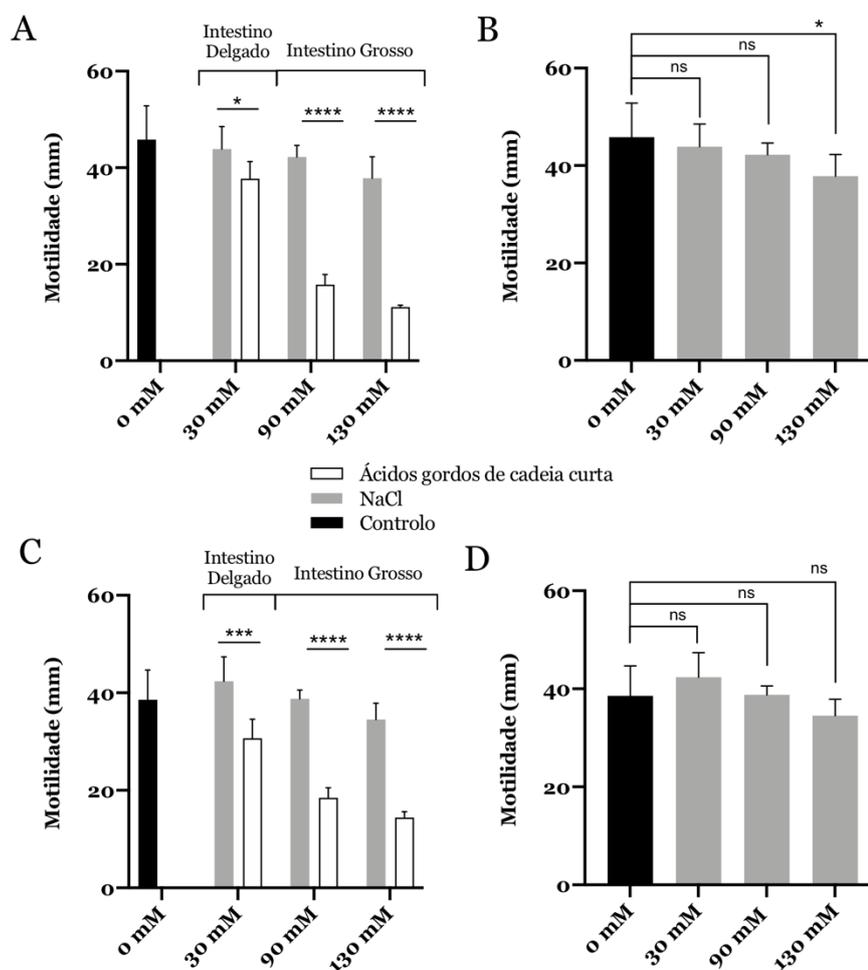


Figura 12 – Representação da motilidade (em milímetros) bacteriana de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 (A e B) e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (C e D) na presença de diferentes concentrações de mistura de ácidos gordos de cadeia curta e NaCl. O ensaio foi realizado em condições de microaerobiose e a 37 °C. Os resultados da motilidade foram analisados utilizando um teste *t-student*. Os dados apresentados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. $p < 0,0001$ (****); $p < 0,001$ (***); $p < 0,05$ (*), os asteriscos representam diferença significativa.

Entre os estudos realizados, que avaliam a motilidade bacteriana quando em contacto com compostos presentes no hospedeiro, Lackraj et al. (2016) investigaram o comportamento de *E. coli* na presença de 30 e 172 mM de ácidos gordos de cadeia curta e NaCl. Os resultados mostraram uma diminuição da motilidade bacteriana para 172 mM de ácidos gordos de cadeia curta e um aumento na presença de 30 mM de ácidos gordos de cadeia curta quando comparado com o controlo de NaCl. Além disso, o crescimento bacteriano não teve um papel significativo nos resultados da motilidade. Assim, foi sugerido que na concentração mais alta de ácidos gordos de cadeia curta, a diminuição da motilidade pode ser justificada por uma mudança de comportamento de *E. coli*, uma vez que a bactéria passa de um estado de motilidade para um de adesão no hospedeiro.

Este comportamento permite que *E. coli* armazene energia e melhore a capacidade para o estabelecimento de infecção no hospedeiro (Lackraj et al., 2016).

Noutro estudo, mas desta vez com *A. butzleri*, Heimesaat et al. (2015) verificaram que após infecção de ratos com duas estirpes de *A. butzleri*, estas foram capazes de colonizar e estabelecer uma infecção ao longo do trato gastrointestinal, tendo sido observado no intestino grosso 10^8 UFC/mL e no intestino delgado 10^4 UFC/mL (Heimesaat et al., 2015). Estes resultados parecem ir de encontro com os obtidos neste trabalho, uma vez que, à medida que a motilidade diminui na presença de concentrações elevadas (90 e 130 mM) de ácidos gordos de cadeia curta (intestino grosso), *A. butzleri* atinge o seu nicho de colonização preferido, sugerindo que haja uma maior acumulação na região do intestino grosso associado a uma maior quantidade de UFC/mL.

Posto isto, as diferentes concentrações de misturas de ácidos gordos de cadeia curta parecem apresentar um papel na modulação da motilidade e patogenicidade bacteriana de *A. butzleri*.

Para além dos ácidos gordos de cadeia curta, também se tentou perceber de que forma o perfil de motilidade dos dois isolados em estudo é afetado na presença de mucinas, uma vez que o trato gastrointestinal é revestido por uma camada de muco constituída por glicoproteínas associado à proteção do epitélio contra as bactérias (Hansson, 2012).

Na Figura 13A e B foi possível observar-se uma diminuição significativa da motilidade bacteriana tanto de *A. butzleri* AB28/11 como de *A. butzleri* DQ40A1, na presença de 0,5 % de mucina. No entanto, na Figura 13C verificou-se uma inibição do crescimento bacteriano de *A. butzleri* AB28/11 quando em contacto com mucina. Neste sentido, a inibição da motilidade apresentada por *A. butzleri* AB28/11 (Figura 13A) poderá estar associada também a uma diminuição da sobrevivência da bactéria nestas condições.

Assim, o isolado *A. butzleri* DQ40A1 parece estar mais adaptado à presença de ácidos gordos de cadeia curta e mucinas do que *A. butzleri* AB28/11 e por sua vez, mais adaptado ao hospedeiro.

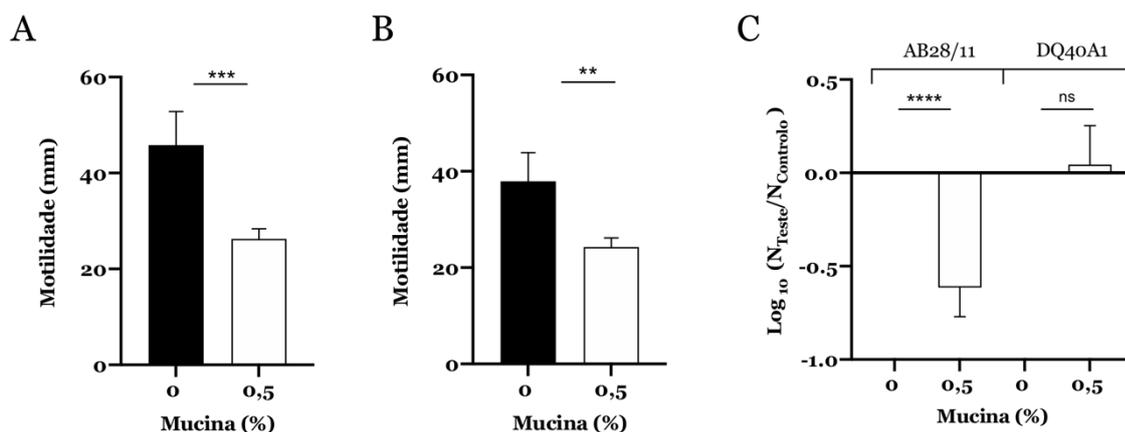


Figura 13 – Representação da motilidade (em milímetros) de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 (A) e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (B) na presença de 0,5 % de mucina. (C) - A sobrevivência da bactéria foi avaliada na presença de mucina, considerando o controle (meio sem mucina) dos dois isolados em estudo, *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1. O ensaio foi realizado em condições de microaerobiose e a 37 °C. Os resultados foram analisados utilizando um teste *t-student*. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. $p < 0,0001$ (****); $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**), os asteriscos representam diferença significativa. Barra preta – representa o controle (meio sem mucina). N_{Teste} : Número total das UFC/mL na condição teste; N_{Controle} : Número total das UFC/mL na condição de controle.

Estes resultados (Figura 13) foram semelhantes aos obtidos por Kim et al. (2012), onde a motilidade de *E. coli* também foi afetada na presença de 0,5 % de mucina, tendo sido sugerido que a diminuição da motilidade foi provocada pela repressão dos genes envolvidos com a biossíntese flagelar (Kim et al., 2012).

No entanto, são necessários mais estudos para compreender a importância da motilidade na virulência de *A. butzleri* em ambiente intestinal.

4.2 Avaliação da expressão do gene *flaA* na presença de compostos presentes no hospedeiro

Em seguida, para aprofundar a tendência observada no tópico 4.1.2.3, e uma vez que há estudos que apontam para uma sub- ou sobre-expressão dos genes do flagelo na presença de compostos presentes no intestino delgado e intestino grosso, o isolado *A. butzleri* DQ40A1 foi selecionado, uma vez que iria ser utilizado para ensaios posteriores da construção do mutante.

Deste modo, foram inicialmente realizadas as curvas de crescimento bacteriano do isolado *A. butzleri* DQ40A1 (Figura 14) na presença de 30 e 90 mM de ácidos gordos de cadeia curta e NaCl (utilizado como controlo). Estas condições foram selecionadas uma vez que não se verificou uma diminuição da sobrevivência bacteriana nos ensaios anteriores (Tabela 7). Além dos ácidos gordos de cadeia curta, também foi avaliado o crescimento bacteriano de *A. butzleri* DQ40A1 na presença de 0,5 % de mucina.

A Figura 14A representa o perfil de crescimento de *A. butzleri* DQ40A1 na presença de 30 mM de ácidos gordos de cadeia curta e NaCl. Pela análise destes resultados, não se verificou diferença estatística entre as três curvas, uma vez que, o perfil de crescimento bacteriano foi similar entre *A. butzleri* DQ40A1 na presença de 30 mM de ácidos gordos de cadeia curta, a mesma concentração de NaCl e na ausência de ambos os compostos, em linha com o obtido na avaliação da sobrevivência bacteriana determinada anteriormente (Tabela 7).

No entanto, na Figura 14B o perfil de crescimento do isolado *A. butzleri* DQ40A1 na presença de 90 mM de ácidos gordos de cadeia curta demonstra um aumento da fase lag com uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo (0 mM), o que significa que o crescimento bacteriano poderá ter sido ligeiramente inibido na presença de 90 mM de ácidos gordos de cadeia curta, recuperando com o tempo de incubação.

Na presença de 0,5 % de mucina (Figura 14C), o crescimento da estirpe *A. butzleri* DQ40A1 foi semelhante ao do controlo, pelo que não houve inibição bacteriana significativa, em linha com o obtido na avaliação da sobrevivência bacteriana (Tabela 7). Tal situação também foi encontrada num estudo realizado por Kim et al. (2012), onde determinaram o crescimento de *E. coli* na presença de 0,5 % de mucina (Kim et al., 2012).

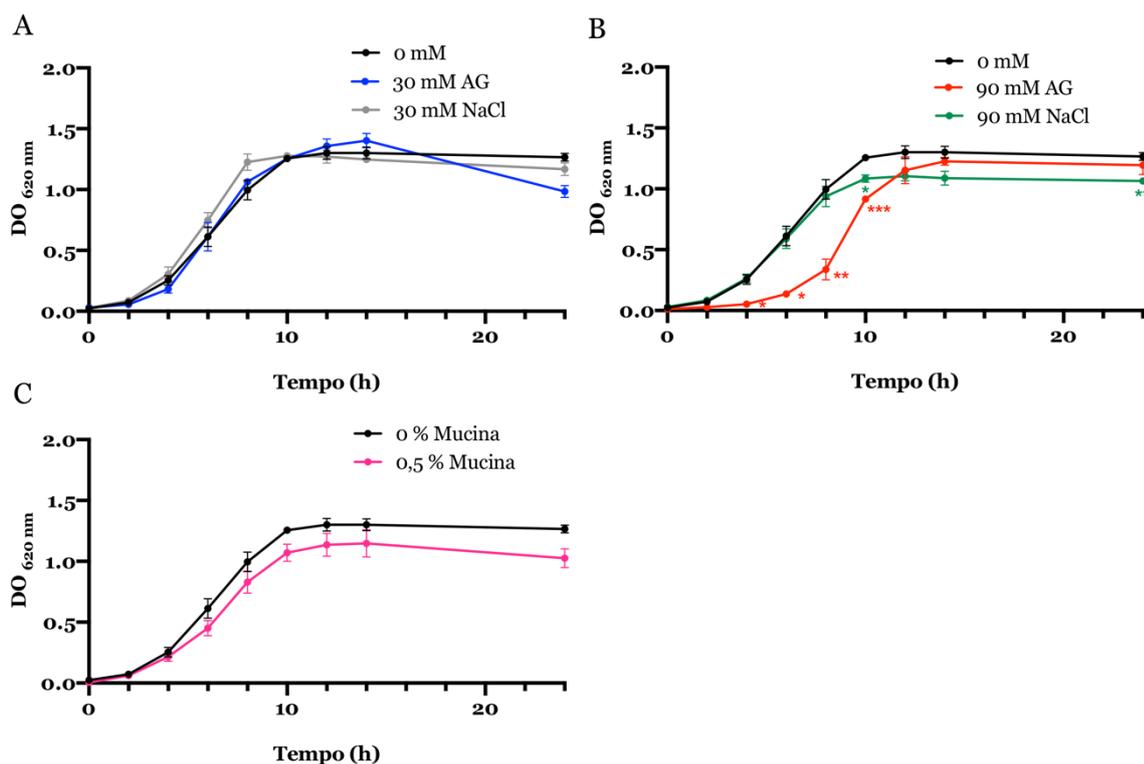


Figura 14 – Curvas de crescimento de *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 na presença de compostos encontrados no intestino delgado e intestino grosso. (A e B) - *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 na presença de ácidos gordos de cadeia curta (AG) e NaCl. (C) - *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 na presença de 0,5 % de mucina tipo II do estômago de porco. Curva com cor preta representa o controlo (meio sem adição de composto). Foram realizados três ensaios independentes a 37 °C e em condições de microaerobiose. $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*), os asteriscos representam diferença significativa em relação ao controlo.

Após a realização das curvas de crescimento bacteriano, foi avaliada a expressão do gene *flaA* (Figura 15). Na figura 15A e B, a expressão de *flaA* do isolado *A. butzleri* DQ40A1, na presença de compostos encontrados no intestino delgado e intestino grosso (ácidos gordos de cadeia curta e mucina), foi comparada com *A. butzleri* DQ40A1 na ausência destes compostos (controlo). Nenhuma das condições desempenhou um papel importante na modulação da expressão de *flaA*, uma vez que os valores obtidos não apresentaram diferença estatisticamente significativa, relativamente ao controlo. Por sua vez, quando a expressão de *flaA* da estirpe *A. butzleri* DQ40A1, na presença de 30 e 90 mM de ácidos gordos de cadeia curta foi comparada com os respetivos controlos de NaCl (Figura 15C), verificou-se um aumento significativo da expressão em ambos os casos. No entanto, entre as duas concentrações de ácidos gordos de cadeia curta testadas, não foi observada diferença estatisticamente significativa.

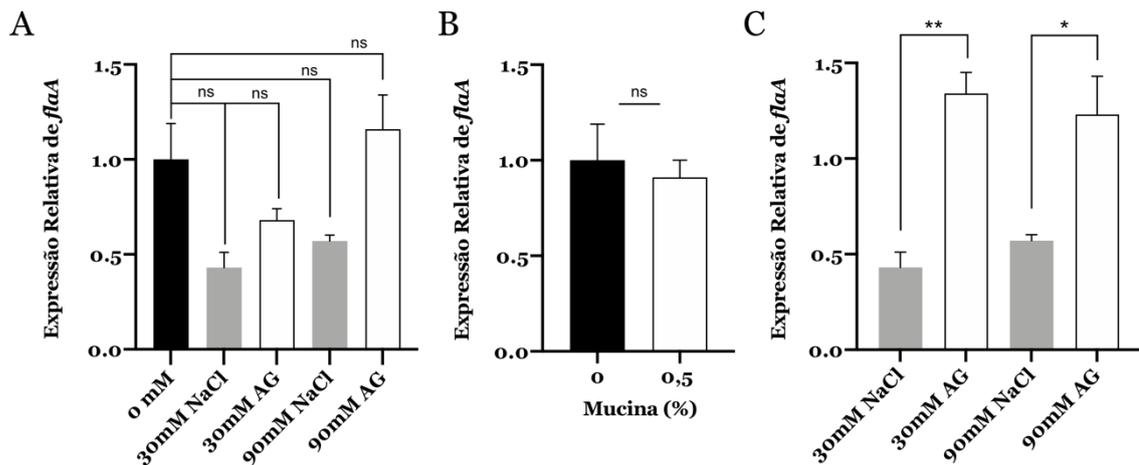


Figura 15 – Níveis relativos da expressão genética do gene *flaA* em *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1, quando cultivadas em diferentes concentrações de ácidos gordos de cadeia curta (A) e em 0,5 % de mucina tipo II do estômago de porco (B). O gráfico C representa as duas condições de ácidos gordos de cadeia curta (30 e 90 mM) em relação às concentrações de 30 e 90 mM NaCl. Os resultados foram analisados utilizando o teste *one-way* ANOVA (A) e o teste *t-student* (B e C). Os dados apresentados representam a média \pm erro padrão das médias de pelo menos três ensaios independentes efetuados em duplicado. $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*), os asteriscos representam diferença significativa. Barra preta – representa o ensaio usado como controlo (0 mM de ácidos gordos de cadeia curta ou NaCl).

Os resultados apresentados neste ensaio não são consistentes com os resultados da motilidade bacteriana obtidos anteriormente (tópico 4.1.2.3), uma vez que é esperado que com o aumento da motilidade, a expressão dos genes envolvidos com o flagelo seja regulada positivamente. Tal situação foi demonstrada por Lackraj et al. (2016), que estudaram a motilidade e a expressão de genes flagelares de *E. coli* na presença de duas concentrações de ácidos gordos de cadeia curta (30 e 90 mM). Nesse estudo, verificou-se que a motilidade e a expressão flagelar de *E. coli* aumentaram quando esta bactéria foi exposta a 30 mM de ácidos gordos de cadeia curta. Por outro lado, na presença de 90 mM de ácidos gordos de cadeia curta, a motilidade e a expressão flagelar de *E. coli* diminuíram (Lackraj et al., 2016).

Entre os estudos realizados, que avaliam a expressão flagelar de bactérias em contacto com mucinas, Kim et al. (2012) mostraram que, após análise de seis genes envolvidos com a biossíntese flagelar na estirpe *E. coli*, a expressão dos genes diminuiu na presença de mucina, quando comparado com o controlo, assim como a motilidade bacteriana. O facto de o flagelo bacteriano funcionar como um ponto de ligação ao hospedeiro (na fase inicial da colonização e indução da infeção) e dado que a flagelação bacteriana poderá ser um forte indutor imune, sugere-se que a repressão flagelar e a diminuição da motilidade pode ser benéfica para o estabelecimento da infeção por *E. coli* no trato

gastrointestinal (Kim et al., 2012). Noutro estudo, Heimesaat et al. (2016), investigaram se a infecção de *A. butzleri* afetava a expressão da mucina no colon (intestino grosso) de ratos, sendo que a mucina também foi pouco expressa (Heimesaat et al., 2016).

Assim, uma vez que não foram observados os resultados esperados na expressão de *flaA*, sugere-se a necessidade de mais estudos que elucidem o papel da expressão flagelar no ambiente do hospedeiro de *A. butzleri*, como por exemplo o estudo da expressão de outros genes flagelares (*flaB*, *flgH* e *motA*) que poderão estar envolvidos na motilidade de *A. butzleri* aquando presente em condições que simulam o ambiente do hospedeiro (Medina et al., 2019).

4.3 Análise bioinformática

A partir dos 19 genomas de *A. butzleri*, foram extraídos os 34 genes que codificam para o flagelo, descritos anteriormente por Isidro et al. (2020). Posteriormente, realizou-se o alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína FlaA pertencente ao flagelo, para os isolados de *A. butzleri* em estudo (apêndice I), usando a estirpe *A. butzleri* RM4018 como o genoma de referência, dado que esta tem sido globalmente usada como base de diversas análises genéticas.

Uma substituição não sinónima refere-se a uma substituição de um nucleótido que altera a sequência de aminoácidos, enquanto numa substituição sinónima acontece o oposto, onde a substituição do nucleótido não altera a sequência de aminoácidos, correspondendo a mutações silenciosas (Choudhuri, 2014). Assim, pela análise do alinhamento da sequência de aminoácidos, verifica-se a existência de maiores alterações na FlaA dos isolados: *A. butzleri* INSA 3800, INSA 2756, INSA 3711, INSA 3890 e INSA 3774 com a presença de substituições e deleções de aminoácidos na proteína FlaA. Nestes casos temos a presença de substituições não sinónimas. De facto, para *A. butzleri* INSA 3800, INSA 2756, INSA 3711 e INSA 3890 verificaram-se 62 variações em aminoácidos variáveis e INSA 3774 apresentou 59 aminoácidos variáveis (incluindo deleções), em relação à sequência de aminoácidos de referência. Por sua vez, os isolados alimentares *A. butzleri* AB28/11 e *A. butzleri* DQ40A1 foram um dos que apresentaram maior motilidade bacteriana aquando a realização deste ensaio (Figura 6) e além disso, foram os isolados que apresentaram maior homologia com a estirpe usada como referência verificando-se uma variação de apenas 2 aminoácidos para *A. butzleri* AB28/11 e 5 aminoácidos para *A. butzleri* DQ40A1.

Quando realizada a árvore filogenética (Figura 16) do gene *flaA*, as estirpes bacterianas *A. butzleri* INSA 2756, INSA 3711, INSA 3890, INSA 3800 e INSA 3774 agruparam num *cluster* genético representado no cimo da árvore filogenética, o que estará associado à existência de deleções semelhantes entre as estirpes. Apesar de estas estirpes terem agrupado num *cluster*, que é, no entanto, o mais heterogéneo em termos de homologia de FlaA, no caso da estirpe INSA 3800 apresenta pouca motilidade e as restantes elevada motilidade, não havendo associação entre a variabilidade na sequência de *flaA* e a motilidade bacteriana.

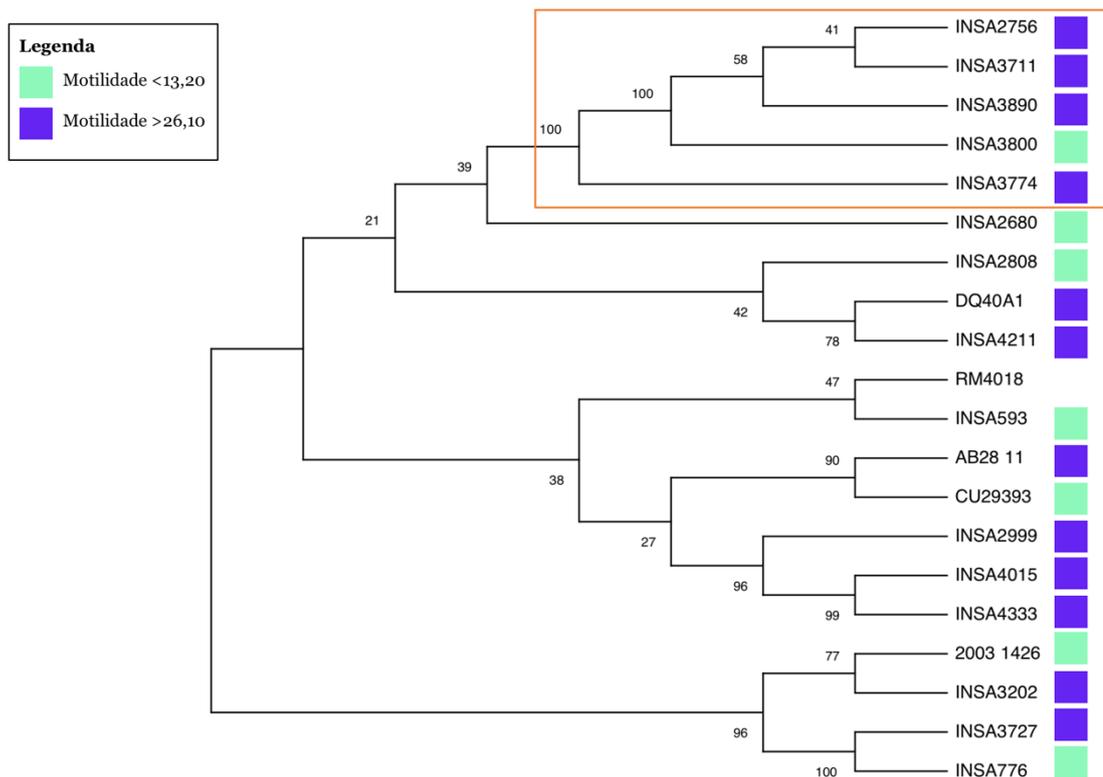


Figura 16 – Árvore filogenética obtida através do alinhamento sequencial do gene *flaA* das 19 estirpes bacterianas utilizadas neste estudo. Encontra-se representado, à frente de cada estirpe bacteriana em estudo, um quadrado com a cor representativa do halo de motilidade (em milímetros). O retângulo de cor-de-laranja engloba o *cluster* genético das estirpes onde se constatou a existência de maiores alterações na FlaA dos isolados, aquando da realização do alinhamento da sequência de aminoácidos. A árvore filogenética foi inferida através do método *Neighbour-joining*. Os números nos nós da árvore filogenética representam o valor de *bootstrap* em percentagem após 1000 iterações.

4.4 Construção do mutante do filamento flagelar de *Aliarcobacter butzleri*

Com a intenção de avaliar o papel do flagelo na patogenicidade e virulência bacteriana, foi construído um mutante do isolado *A. butzleri* DQ40A1, usando mutagenese insercional e transformação natural. A competência natural deste isolado foi importante para que a bactéria pudesse absorver, incorporar e adquirir espontaneamente o fragmento de DNA extracelular presente no meio em que se encontrava. Esta aquisição de DNA exógeno por bactérias é normalmente expressa quando as bactérias se encontram num ambiente de stress, fornecendo uma pressão para a adaptação e sobrevivência bacteriana num ambiente diferente (Thomas & Nielsen, 2005; Wilson et al., 2003).

A primeira etapa consistiu na extração do plasmídeo pUC18-K2 de *E. coli*, o qual continha a cassete *aphA-3*, importante para posterior seleção do mutante. Assim, foi possível observar na Figura 17A a presença de uma banda correspondente ao plasmídeo situado aproximadamente a 3500 pb.

O plasmídeo pUC18-K2 foi posteriormente submetido a digestão enzimática com as enzimas de restrição BamHI e KpnI. A banda correspondente à cassete *aphA-3* (aproximadamente 850 pb) (Figura 17B) foi excisada e purificada para posterior utilização.

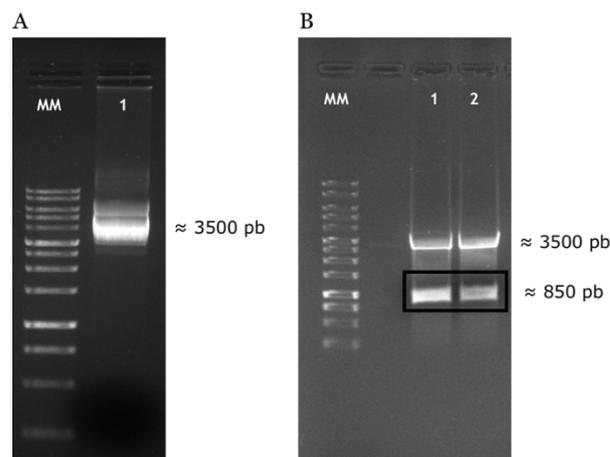


Figura 17 – Extração e digestão do plasmídeo pUC18-K2. (A) - Eletroforese em gel de agarose na qual se encontra representado o resultado da extração do plasmídeo pUC18-K2 de *Escherichia coli*. (MM: Marcador molecular Bioron 1 Kb DNA Ladder; 1: plasmídeo pUC18-K2 contendo a cassete *aphA-3*). (B) - Eletroforese em gel de agarose dos produtos resultantes da digestão enzimática do plasmídeo pUC18-K2 com as enzimas

BamHI e KpnI. (MM: Marcador molecular Bioron 1 Kb DNA Ladder; 1-2: Produtos da digestão enzimática do plasmídeo pUC18-K2; Retângulo preto: representa o produto de interesse, a cassette *aphA-3*).

De seguida, através da técnica de PCR e tendo o gDNA da estirpe nativa *A. butzleri* DQ40A1 como molde, foram amplificados os fragmentos a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene *flaA*, com 135 pb e 251 pb respetivamente (Figura 18A).

A técnica de PCR foi então usada para a hibridização da cassette *aphA-3* e dos fragmentos A e B (Figura 18A), gerando o fragmento de DNA transformante, com aproximadamente 1236 pb (Figura 18B).

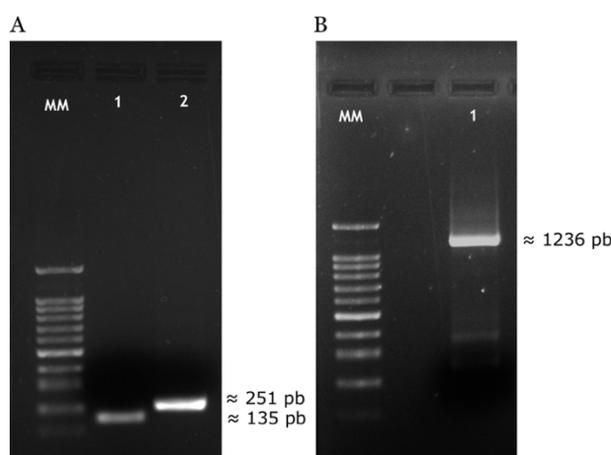


Figura 18 – Amplificação dos fragmentos hibridizantes e do fragmento de DNA transformante. (A) - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes à amplificação dos fragmentos hibridizantes (fragmentos A e B). (MM: Marcador molecular Bioron 100 pb plus DNA Ladder; 1: Fragmento A; 2: Fragmento B). (B) - Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR correspondente à junção dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3* (fragmento C). (MM: Marcador molecular Bioron 100 pb plus DNA Ladder; 1: Fragmento C).

Após obtenção do fragmento de DNA transformante realizou-se o processo da transformação natural, com o objetivo do isolado *A. butzleri* DQ40A1 adquirir o fragmento no seu genoma bacteriano. Passado os 5 dias de incubação, foi visualizado o surgimento de diversas colónias que foram recolhidas e utilizadas para a realização de um PCR, com o objetivo de verificar a incorporação do fragmento no genoma do mutante. Na Figura 19A, encontra-se representado o resultado da eletroforese em gel de agarose, onde é possível observar a presença de bandas correspondentes a um fragmento do tamanho esperado, indicando a substituição do gene *flaA* pelo fragmento de DNA transformante construído. Além disso, a inserção do fragmento C também foi confirmada pelo método de sequenciação de Sanger.

Por fim, foi utilizada a técnica de RT-PCR onde se utilizou o RNA mensageiro, correspondente à estirpe nativa *A. butzleri* DQ40A1 e mutante *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*, para sintetizar o cDNA que foi utilizado para a realização de um PCR. De acordo com a Figura 19B, constatou-se que o mutante (poço 2) não expressa o gene *flaA*, suportando a sua construção com sucesso.

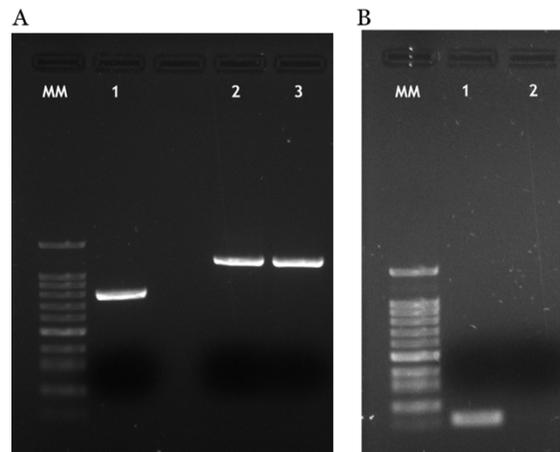


Figura 19 – Verificação da incorporação do fragmento de DNA transformante no genoma bacteriano e análise da expressão do gene *flaA*. (A) - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes à amplificação do gene *flaA* na estirpe nativa e do fragmento de DNA transformante no mutante. (MM: Marcador molecular Bioron 100 pb plus DNA Ladder; 1: Fragmento amplificado do gDNA da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1; 2-3: Fragmento amplificado do gDNA do mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*. (B) - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e mutante DQ40A1 Δ *flaA*. (MM: Marcador molecular Bioron 100 pb plus DNA Ladder; 1: cDNA amplificado da estirpe nativa, controlo positivo; 2: cDNA amplificado da estirpe mutante).

4.5 Efeito da deleção do gene *flaA* no crescimento bacteriano

O efeito da deleção do gene *flaA* no crescimento bacteriano foi avaliado ao longo do tempo através da realização de curvas de crescimento para a estirpe nativa *A. butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 20. Através da comparação das curvas de crescimento obtidas para a estirpe nativa e mutante, verifica-se que não houve diferença significativa entre os perfis de crescimento.

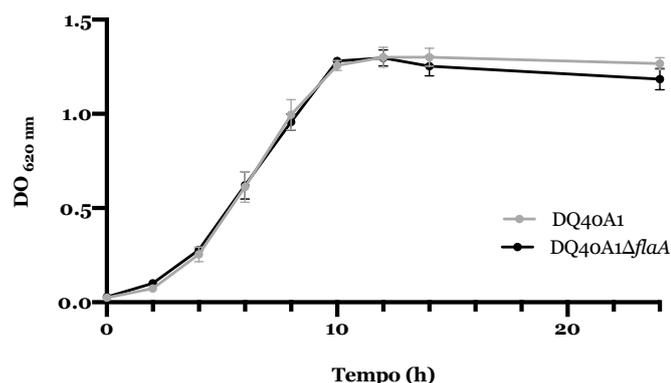


Figura 20 – Curvas de crescimento da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1ΔflaA. Foram realizados três ensaios independentes a 37 °C e em condições de microaerobiose.

O comportamento da estirpe nativa e respetivo mutante é concordante com outros estudos onde mutantes de genes codificantes para proteínas da estrutura flagelar não demonstram influência no crescimento (Salazar-Sánchez et al., 2022). Num estudo com *E. coli*, por exemplo, foi possível verificar que as estirpes que possuíam uma mutação no gene *fliG* (envolvido com o motor flagelar) não tiveram qualquer alteração no crescimento de *E. coli*, quando comparado com a estirpe nativa (L. Yin et al., 2021).

Este perfil de crescimento bacteriano similar entre a estirpe nativa e mutante, comprovam que, a mutação efetuada no gene *flaA* não afetou o crescimento bacteriano. Assim os resultados que serão apresentados posteriormente dever-se-ão unicamente a um efeito da mutação e não uma modificação do perfil de crescimento da estirpe.

4.6 Efeito da deleção do gene *flaA* na virulência de *Aliarcobacter butzleri*

4.6.1 Motilidade na estirpe *Aliarcobacter butzleri*

A motilidade bacteriana permite que as bactérias alcancem o ambiente favorável dentro do hospedeiro, portanto é necessário perceber de que forma o flagelo atua neste mecanismo. Assim, foi avaliada a motilidade bacteriana da estirpe nativa *A. butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *A. butzleri* DQ40A1ΔflaA de forma a perceber se a mutação no gene *flaA* afetava esta capacidade.

Uma vez que o gene *flaA* é responsável por codificar a maior proteína envolvida na síntese flagelar (FlaA), à partida se o gene é inativado, esta proteína deixa de produzir

flagelina, a bactéria deixa de apresentar filamento ou fica com um filamento mais curto, o que significa que a capacidade de motilidade fica afetada (Ho et al., 2008; Radomska et al., 2017). Assim, pode-se inferir que um mutante do gene *flaA* pode ser usado para avaliar o papel do flagelo.

Na Figura 21 encontram-se representados os resultados obtidos, verificando-se uma diferença estatisticamente significativa entre a estirpe nativa e respetivo mutante na motilidade. Estes resultados também foram observados em *Arcobacter butzleri* LMG 6620, onde o mutante no gene *flaA* se mostrou aflagelado e não móvel (Ho et al., 2008). Também recentemente, foi demonstrado num estudo onde foram construídos dois mutantes para os genes *flaA* e *flaB* em estirpes de *A. butzleri*, uma perda de motilidade completa das estirpes mutantes em relação às estirpes nativas (Salazar-Sánchez et al., 2022). De facto, os resultados obtidos suportam o papel do flagelo na motilidade de *A. butzleri*.

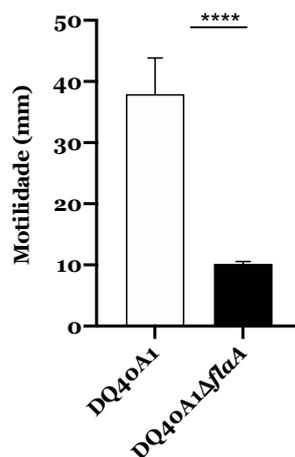


Figura 21 – Representação do halo da motilidade (em milímetros) de *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1Δ*flaA*, após 48 horas de incubação. O ensaio foi realizado em condições de microaerobiose e a 37 °C. Os resultados foram analisados utilizando o teste *t-student*. Os dados apresentados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. $p < 0,0001$ (****), os asteriscos representam diferença significativa.

4.6.2 Velocidade média de *Aliarcobacter butzleri*

Outro ensaio realizado foi a avaliação da velocidade bacteriana através de microscopia de contraste. Foram obtidos vídeos da estirpe nativa *A. butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *A. butzleri* DQ40A1Δ*flaA* que foram analisados utilizando o Image J, através do seguimento da trajetória das bactérias (Figura 22A e B).

Pela observação dos resultados obtidos (Figura 22A e B) verifica-se uma elevada dispersão e aleatoriedade das trajetórias obtidas da estirpe nativa quando comparadas com a estirpe mutante. O que pode ser comprovado através dos dados tratados e que se encontram apresentados na Figura 22C, constatando-se que na estirpe nativa a velocidade média foi 34,73 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ e na estirpe mutante foi 3,08 $\mu\text{m}/\text{segundo}$, o que significa que a estirpe mutante apresentou uma velocidade muito inferior à estirpe nativa.

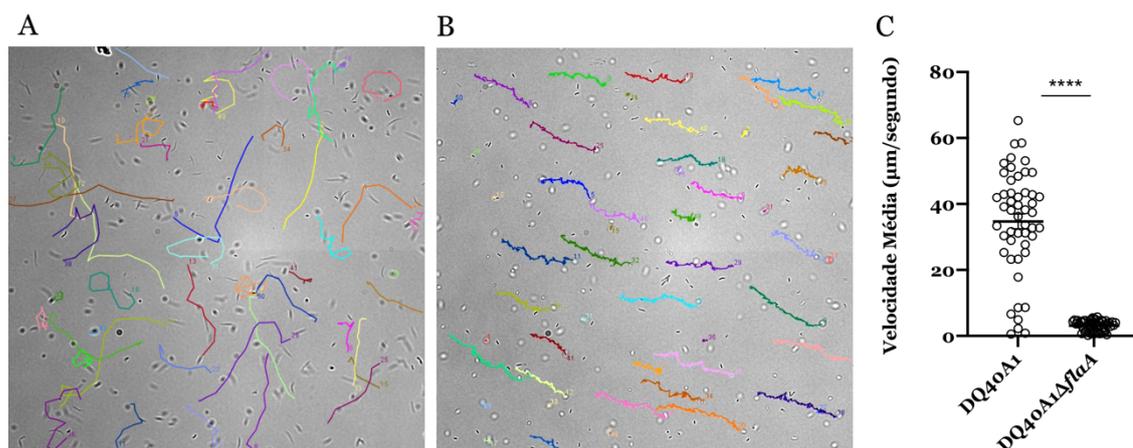


Figura 22 – Análise da velocidade média bacteriana. (A e B) - Representação das trajetórias de movimentação efetuadas pelas estirpes nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 (A) e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* (B). Imagens A e B foram obtidas através do plugin MTrackJ, onde foi possível localizar no plano (x,y) cada bactéria. Cores diferentes representam trajetórias diferentes e cada trajetória tem o seu próprio número. (C) - Velocidade média (em $\mu\text{m}/\text{segundo}$) da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*. Os resultados foram analisados utilizando o teste *t-student*. Os dados apresentados representam a média \pm erro padrão das médias da velocidade bacteriana de cada uma das trajetórias obtidas. $p < 0,0001$ (****), os asteriscos representam diferença significativa.

Num estudo semelhante, foram realizadas diversas supressões internas na região hipervariável da flagelina de *Salmonella* Typhimurium, e por análise da velocidade média bacteriana dos mutantes construídos, constatou-se que nas bactérias com as variantes de flagelina, a velocidade média foi inferior à da estirpe nativa (Malapaka et al., 2007).

Assim, corroborando os resultados obtidos de motilidade, a determinação da velocidade média comprovou que o gene *flaA* é importante para a motilidade bacteriana.

4.6.3 Formação de biofilmes na estirpe *Aliarcobacter butzleri*

A capacidade de formação de biofilmes tem sido descrita como um importante fator na sobrevivência bacteriana tanto no ambiente, como no hospedeiro, sendo capaz de aumentar a resistência ao sistema imunitário e resistir na presença de antibióticos. Um dos fatores que tem demonstrado um papel na formação de biofilmes é o flagelo que aumenta o contacto entre as células e a superfície (Donlan, 2001; Duan et al., 2013).

Como noutros agentes enteropatogénicos há um papel descrito do flagelo no estágio inicial da formação de biofilmes (adesão), estudou-se o efeito da mutação do gene *flaA* em *A. butzleri* (Figura 23) e verificou-se que neste caso também ocorre uma diminuição significativa da formação de biofilmes na estirpe *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*, quando comparada com a estirpe nativa *A. butzleri* DQ40A1. Estes resultados são concordantes com um estudo realizado por Salazar-Sánchez et al. (2022) que demonstraram que os mutantes construídos nos genes *flaAB*, *fliS* e *luxS* apresentaram uma diminuição da capacidade de formação de biofilmes, em relação às estirpes nativas (Salazar-Sánchez et al., 2022). Também em *C. jejuni*, tinha sido demonstrado que a formação de biofilmes seria inibida nos mutantes *C. jejuni* M129 *flaA flaB* e *luxS* (genes envolvidos com o flagelo e o *quorum sensing*) (Reeser et al., 2007).

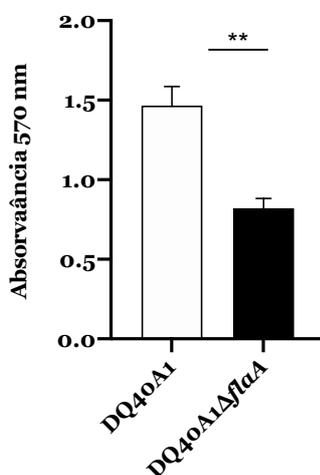


Figura 23 – Capacidade de formação de biofilme da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* avaliada por coloração com violeta de cristal. Os resultados foram analisados utilizando o teste *t-student*. Os dados apresentados representam a média \pm erro padrão das médias de pelo menos três ensaios independentes. $p < 0,01$ (**), os asteriscos representam diferença significativa.

A formação de biofilmes foi também avaliada por microscopia de confocal (Figura 24), usando o fluorocromo SYTO 9. Este composto difunde-se através da membrana celular das bactérias e cora os ácidos nucleicos de células viáveis e mortas. No caso dos biofilmes, irá também corar ácidos nucleicos extracelulares, emitindo fluorescência verde e assim permitindo observar e avaliar a estrutura parcial do biofilme. De acordo com os resultados obtidos, visualiza-se maior densidade de fluorescência em *A. butzleri* DQ40A1 do que na estirpe *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*, encontrando-se de acordo com os resultados anteriores (Figura 23).

Está descrito que a inativação de genes que codificam para proteínas do flagelo na maioria dos agentes patogênicos leva a uma diminuição da formação de biofilmes, uma vez que a perda de flagelo dificulta a fixação inicial (Bridges et al., 2020; W. L. Yin et al., 2022). Sugerindo-se que a proteína codificada pelo gene *flaA* pode afetar a fixação inicial da bactéria à superfície e daí o mutante apresentar menor capacidade para formação de biofilme. Assim, estes resultados suportam o papel do flagelo na formação de biofilme de *A. butzleri*, e demonstram que este pode influenciar a patogenicidade de *A. butzleri*.

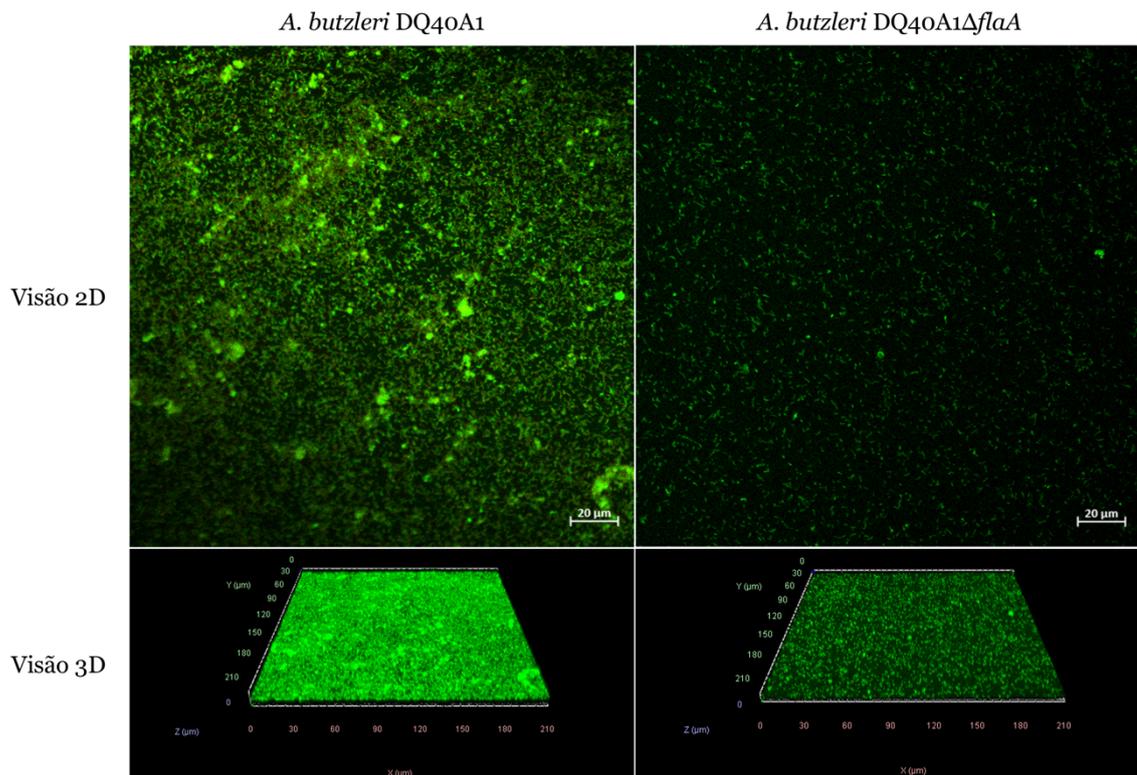


Figura 24 – Imagens de microscopia de confocal com visualização da formação de biofilmes da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* em 2D e 3D. As bactérias foram marcadas com o fluorocromo SYTO 9.

4.6.4 Adesão e invasão de *Aliarcobacter butzleri*

Uma vez que as capacidades de adesão e invasão em células hospedeiras são importantes para o estabelecimento de uma infecção (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006), fomos estudar o papel do flagelo na interação bacteriana com a linha de células Caco-2. Após a infecção da linha celular com as estirpes nativa *A. butzleri* DQ40A1 e mutante *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*, verificou-se que no que toca à capacidade de adesão à linha celular Caco-2 (Figura 25A), não ocorreram alterações significativas entre as estirpes. No entanto, foi demonstrado que *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* diminuiu significativamente a sua capacidade de invasão nas células Caco-2 (Figura 25B).

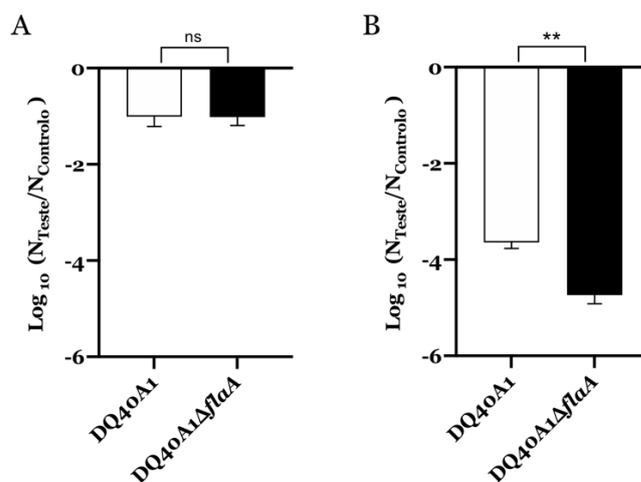


Figura 25 – Representação da adesão e invasão da estirpe nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* em células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2). (A) - Capacidade de adesão bacteriana. (B) - Capacidade de invasão bacteriana. Os dados apresentados representam a média de $\text{Log}_{10} (N_{\text{Teste}}/N_{\text{Controlo}})$ ^a \pm erro padrão das médias de pelo menos três ensaios independentes. ^a N_{Teste} : Número total das UFC/mL na condição teste; N_{Controlo} : Número total das UFC/mL na condição de controlo. $p < 0,01$ (**), os asteriscos representam diferença significativa, por análise dos dados através do teste *t student*

Num estudo com *A. butzleri*, Bruegge et al. (2014) sugeriram que uma maior motilidade poderia estar associada a maiores taxas de invasão e infeção (Bruegge et al., 2014), o que se correlaciona com os resultados obtidos, uma vez que uma diminuída motilidade na mesma estirpe mutante correlacionou-se com diminuída capacidade de invasão nas células Caco-2. Por sua vez, uma diminuição da capacidade de invasão pode estar associada com uma perda da capacidade da bactéria invadir os tecidos, o que aponta para a relevância de se avaliar posteriormente a capacidade de translocação de *A. butzleri* nativa e mutante através de células polarizadas.

Em comparação com outros estudos, esta tendência de redução da invasão bacteriana na estirpe mutante também se verificou em *C. jejuni*, que pela deleção do gene *flaA* demonstrou uma diminuição da capacidade de invasão em células INT-407 (linha celular do colo do útero humano). Neste sentido, a presença de um flagelo constituído pela proteína FlaA parece ser importante para o processo de invasão (Wassenaar et al., 1991).

Assim, o flagelo tem um papel na capacidade de invasão de *A. butzleri* DQ40A1 e possível estabelecimento de infecção no hospedeiro, contribuindo para a virulência bacteriana. No entanto, não se encontra correlacionado com a adesão à linha celular em estudo.

4.6.5 Adesão de *Aliarcobacter butzleri* a mucinas

O muco intestinal é composto principalmente por mucinas que formam complexos estruturais de glicoproteínas com glicanos específicos produzidos por células do hospedeiro, que são utilizados como potenciais sítios de ligação para as adesinas bacterianas. Assim, pode-se inferir que as mucinas facilitam a fixação inicial bacteriana no hospedeiro e a invasão das células epiteliais, contribuindo para virulência das bactérias patogénicas (Derrien et al., 2010; Finlay & Falkow, 1997). Neste sentido, Karadas et al. (2016) mostraram que a existência de uma camada mucosa produzida pelas células HT-29/B6, potenciou a capacidade de adesão e invasão de *A. butzleri* (Karadas et al., 2016).

Noutro estudo, Erdem et al. (2007) constataram que os flagelos bacterianos são uma das estruturas bacterianas envolvidas na adesão a mucinas, como foi demonstrado em *E. coli*, através de uma mutação no gene *fliC* que levou a uma diminuição da adesão bacteriana ao tecido intestinal bovino (Erdem et al., 2007). *C. jejuni* é outro agente patogénico que utiliza o flagelo para se ligar à mucina, constatando-se que a proteína FlaA encontra-se envolvida na adesão de diferentes antígenos do sistema ABO sanguíneo humano na mucosa intestinal (Mahdavi et al., 2014).

Considerando isto, neste trabalho foi avaliada a adesão bacteriana das estirpes nativa *A. butzleri* DQ40A1 e mutante *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* a mucinas tipo II do estômago de porco (mucina comercializada e parcialmente purificada de estômago de suínos). A Figura 26 mostra a adesão das bactérias nativa e mutante a meio sem mucina, que foi utilizado como controlo e meio com mucina, verificando-se uma diminuição estatisticamente significativa na capacidade de *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA* aderir a mucinas, quando comparado com *A. butzleri* DQ40A1. Além disto, enquanto a estirpe

nativa demonstrou maior adesão ao meio contendo mucinas do que na sua ausência, para a estirpe mutante não foram verificadas diferenças.

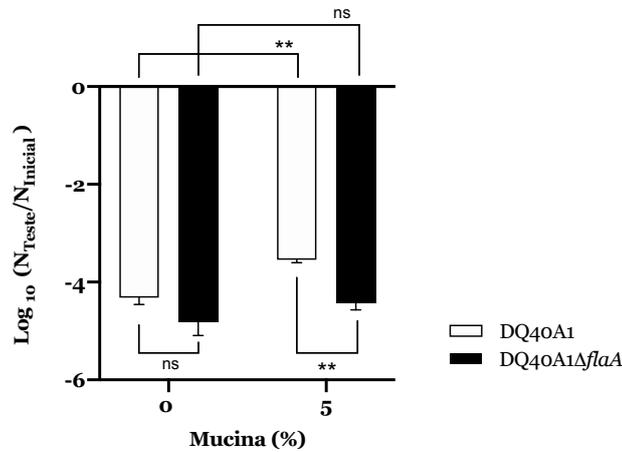


Figura 26 – Adesão das estirpes nativa *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1 e respetivo mutante *Aliarcobacter butzleri* DQ40A1ΔflaA na presença e ausência de mucinas. O meio utilizado continha 5 % de mucinas tipo II do estômago de porco com 1 % de agar a um pH=6,8 ou como controlo a mesma preparação na ausência de mucina. Os dados apresentados representam a média de $\text{Log}_{10} (N_{\text{Teste}}/N_{\text{Controlo}})^a \pm$ erro padrão das médias de pelo menos três ensaios independentes. ^a N_{Teste} : Número total das UFC/mL na condição teste; N_{Controlo} : Número total das UFC/mL na condição de controlo. $p < 0,01 (**)$, os asteriscos representam diferença significativa, obtida pela análise dos dados usando o teste *t student*.

Assim, o flagelo mostrou ter um papel importante para que *A. butzleri* DQ40A1 consiga aderir às mucinas existentes no ambiente intestinal e potencialmente estabelecer uma infecção no hospedeiro, contribuindo para a virulência bacteriana. No entanto, mais estudos são necessários para perceber de que forma o gene *flaA* se encontra envolvido na adesão a células eucarióticas que simulem com mais eficiência este ambiente.

Capítulo 5

Conclusões

Aliarcobacter butzleri é uma das espécies pertencente ao género *Aliarcobacter*, género esse que se encontra inserido na família *Arcobacteraceae*. A patogenicidade de *A. butzleri* tem sido demonstrada em diversos estudos, no entanto, pouco se sabe acerca dos mecanismos envolvidos com o desencadeamento de infeções por este microrganismo. Deste modo, a conceção e desenvolvimento de estratégias que facilitem o controlo de *A. butzleri*, mas também o conhecimento aprofundado destes mecanismos envolvidos com a patogenicidade e virulência, são de grande importância para o controlo da sua transmissão. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel do flagelo na virulência de *A. butzleri*, mas também de que forma a motilidade bacteriana é influenciada pelo meio envolvente.

Para tal, começou-se por estudar o papel da motilidade bacteriana em diversos isolados de *A. butzleri*, verificando-se que os isolados podem ser divididos em dois grupos distintos com diferentes níveis de motilidade. Neste sentido, é possível supor que a variabilidade apresentada pode estar associada a uma diferente composição do flagelo e por diferentes níveis de glicosilação do flagelo. No entanto, pela análise dos 34 genes flagelares concatenados para cada um dos isolados estudados, não foi possível fazer uma correlação dos *clusters* genéticos formados com o halo de motilidade bacteriano.

No seguimento deste estudo, prosseguiu-se com a avaliação da motilidade bacteriana de dois isolados de *A. butzleri*, *A. butzleri* AB28/11 e *A. butzleri* DQ40A1, em diferentes condições ambientais. Na presença de condições atmosféricas de microaerobiose, num meio com maior concentração de nutrientes e a 37 °C, *A. butzleri* apresentou um aumento considerável da motilidade. Assim, estas condições podem ser consideradas favoráveis para que *A. butzleri* permaneça no ambiente ou infete o hospedeiro.

Ao avaliar a motilidade de *A. butzleri* AB28/11 e *A. butzleri* DQ40A1 na presença de compostos associados com o intestino, verificou-se que na presença de concentrações de ácidos gordos de cadeia curta semelhantes às descritas para o intestino grosso humano ou de mucinas, *A. butzleri* apresentou uma diminuição da motilidade, sugerindo a capacidade adaptativa de *A. butzleri* na sobrevivência e no estabelecimento de uma infeção no hospedeiro.

Contudo, ao avaliar a expressão de *flaA* da estirpe *A. butzleri* DQ40A1 quando em contacto com compostos presentes no intestino, os resultados não foram consistentes com a motilidade bacteriana obtida, uma vez que se esperava que na presença mucinas e de concentrações mais altas de ácidos gordos de cadeia curta, tanto a expressão de *flaA*, como a motilidade, diminuísse em relação ao controlo. Assim, sugere-se a necessidade de estudar a expressão de outros genes flagelares que poderão estar envolvidos na motilidade de *A. butzleri*.

O último objetivo, consistiu na avaliação do gene *flaA* na virulência da estirpe *A. butzleri* DQ40A1. Assim, realizou-se uma interrupção do gene *flaA* através da construção de um mutante por mutagénese insercional, envolvendo uma cassette de resistência à canamicina (*aphA-3*). Após a obtenção do mutante, foram realizados ensaios com as estirpes do tipo nativa e mutante. Dos ensaios realizados, a estirpe mutante *A. butzleri* DQ40A1 Δ *flaA*, apresentou uma diminuição da motilidade bacteriana, assim como da sua velocidade média. Para além disso, foi notória a redução da capacidade de formar biofilmes, de aderir a mucinas e de invadir a linha celular Caco-2, não reduzindo significativamente a sua capacidade de adesão celular. Estes resultados mostraram o papel que o gene *flaA* desempenha na mediação da patogenicidade de *A. butzleri*, embora sejam necessários estudos futuros.

Em suma, este trabalho de investigação permitiu a aquisição de novos conhecimentos acerca do comportamento de *A. butzleri* na presença de algumas condições ambientais. Por sua vez, foram fornecidas potenciais pistas do papel da motilidade e expressão flagelar de *A. butzleri* na presença de compostos associados ao trato gastrointestinal, até agora desconhecidos. Além disso, ainda foi verificada a importância do gene *flaA* na virulência de *A. butzleri*, demonstrando-se o potencial patogénico do flagelo de *A. butzleri*.

Capítulo 6

Perspetivas Futuras

Um maior conhecimento dos mecanismos de patogenicidade e virulência é importante para o desenvolvimento de estratégias que facilitem o controlo de infeção de *A. butzleri*. Deste modo, mais estudos serão necessários para complementar o trabalho desenvolvido, tais como:

- Alargar o número de estirpes de *A. butzleri* na avaliação da motilidade em diferentes condições ambientais;
- Avaliar a capacidade da bactéria migrar através das mucinas;
- Avaliar a influência dos ácidos gordos de cadeia curta numa linha celular com *A. butzleri*;
- Avaliar a expressão de outros genes flagelares que poderão estar envolvidos na motilidade de *A. butzleri* em condições associadas ao ambiente do hospedeiro;
- Avaliar a capacidade de translocação de *A. butzleri* nativa e mutante através de células polarizadas;
- Avaliar a adesão e invasão de *A. butzleri* numa linha celular produtora de muco;
- Verificar através de microscopia eletrónica de transmissão a perda do flagelo na estirpe mutante;
- Alargar o número de estirpes usadas para validação do papel do gene *flaA* na virulência e patogenicidade bacteriana.

Referências Bibliográficas

- Ahmet, A., & Latife, Ç. (2016). Histopathological findings and immunohistochemical distribution of bacterial antigen in Balb/c mice experimentally infected with *Arcobacter butzleri*. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *63*(3), 267–276. https://doi.org/10.1501/vetfak_0000002739
- Allen-Vercoe, E., & Woodward, M. J. (1999). The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. *Journal of Medical Microbiology*, *48*(8), 771–780. <https://doi.org/10.1099/00222615-48-8-771>
- Alonso, R., Girbau, C., Martinez-Malaxetxebarria, I., Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Romalde, J. L., Figueras, M. J., & Fernandez-Astorga, A. (2020). *Aliarcobacter vitoriensis* sp. nov., isolated from carrot and urban wastewater. *Systematic and Applied Microbiology*, *43*(4), 126091. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126091>
- Altegoer, F., Schuhmacher, J., Pausch, P., & Bange, G. (2014). From molecular evolution to biobricks and synthetic modules: A lesson by the bacterial flagellum. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *30*(1), 49–64. <https://doi.org/10.1080/02648725.2014.921500>
- Berg, H. C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annual Review of Biochemistry*, *72*, 19–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737>
- Bonifácio, M., Mateus, C., Alves, A. R., Maldonado, E., Duarte, A. P., Domingues, F., Oleastro, M., & Ferreira, S. (2021). Natural transformation as a mechanism of horizontal gene transfer in *Aliarcobacter butzleri*. *Pathogens*, *10*(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070909>
- Bridges, A. A., Fei, C., & Bassler, B. L. (2020). Identification of signaling pathways, matrix-digestion enzymes, and motility components controlling *Vibrio cholerae* biofilm dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(51), 32639–32647. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021166117>
- Brückner, V., Fiebiger, U., Ignatius, R., Friesen, J., Eisenblätter, M., Höck, M., Alter, T., Bereswill, S., Gölz, G., & Heimesaat, M. M. (2020b). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in human stool samples derived from out- and inpatients: the prospective German *Arcobacter* prevalence study Arcopath. *Gut Pathogens*, *12*(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00360-x>

- Brückner, V., Fiebiger, U., Ignatius, R., Friesen, J., Eisenblätter, M., Höck, M., Alter, T., Bereswill, S., Heimesaat, M. M., & Gözl, G. (2020a). Characterization of *Arcobacter* strains isolated from human stool samples: Results from the prospective German prevalence study Arcopath. *Gut Pathogens*, *12*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0344-3>
- Bruegge, J. zur, Hanisch, C., Einspanier, R., Alter, T., Gözl, G., & Sharbati, S. (2014). *Arcobacter butzleri* induces a pro-inflammatory response in THP-1 derived macrophages and has limited ability for intracellular survival. *International Journal of Medical Microbiology*, *304*(8), 1209–1217. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.017>
- Büttner, D. (2012). Protein Export According to Schedule: Architecture, Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *76*(2), 262–310. <https://doi.org/10.1128/membr.05017-11>
- Buzzanca, D., Botta, C., Ferrocino, I., Alessandria, V., Houf, K., & Rantsiou, K. (2021). Functional pangenome analysis reveals high virulence plasticity of *Aliarcobacter butzleri* and affinity to human mucus. *Genomics*, *113*(4), 2065–2076. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.05.001>
- Cervenka, L. (2007). Survival and inactivation of *Arcobacter* spp., a current status and future prospect. *Critical Reviews in Microbiology*, *33*(2), 101–108. <https://doi.org/10.1080/10408410701364497>
- Chaban, B., Coleman, I., & Beeby, M. (2018). Evolution of higher torque in *Campylobacter*-Type bacterial flagellar motors. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18115-1>
- Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *46*, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.032>
- Choudhuri, S. (2014). Fundamentals of Molecular Evolution. In *Bioinformatics for Beginners* (pp. 27–53). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-410471-6.00002-5>
- Collado, L., & Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(1), 174–192. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10>
- Collado, L., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2009). Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *Journal of Food Protection*, *72*(5), 1102–1106. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1102>

- Collado, L., Gutiérrez, M., González, M., & Fernández, H. (2013). Assessment of the prevalence and diversity of emergent campylobacteria in human stool samples using a combination of traditional and molecular methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(4), 434–436. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.12.006>
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1635–1640. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01555.x>
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(11), 811–825. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1526>
- Cross, A. S. (2008). What is a virulence factor? *Critical Care (London, England)*, 12(6), 196. <https://doi.org/10.1186/cc7127>
- Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E., & Groß, U. (2010). *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(4), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.07.002>
- De Oliveira, S. J., Baetz, A. L., Wesley, I. V., & Harmon, K. M. (1997). Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 57(4), 347–354. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00106-5)
- De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L. W., Doudah, L., & Houf, K. (2011). *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 356–361. <https://doi.org/10.1099/ijso.0.022665-0>
- Derrien, M., van Passel, M. W. J., van de Bovenkamp, J. H. B., Schipper, R. G., de Vos, W. M., & Dekker, J. (2010). Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*, 1(4), 254–268. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.4.12778>
- Diéguez, A. L., Balboa, S., Magnesen, T., & Romalde, J. L. (2017). *Arcobacter lekithochrous* sp. nov., isolated from a molluscan hatchery. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1327–1332. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001809>
- Diéguez, A. L., Pérez-Cataluña, A., Figueras, M. J., & Romalde, J. L. (2018). *Arcobacter haliotis* Tanaka et al. 2017 is a later heterotypic synonym of *Arcobacter lekithochrous* Diéguez et al. 2017. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2851–2854.

- <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002909>
- Donlan, R. M. (2001). Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387–1392. <https://doi.org/10.1086/322972>
- Dons, L., Eriksson, E., Jin, Y., Rottenberg, M. E., Kristensson, K., Larsen, C. N., Bresciani, J., & Olsen, J. E. (2004). Role of flagellin and the two-component cheA/cheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. *Infection and Immunity*, 72(6), 3237–3244. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.6.3237-3244.2004>
- Doudah, L., De Zutter, L., Baré, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., Van Den Abeele, A. M., & Houf, K. (2012). Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* species isolated from humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 735–741. <https://doi.org/10.1128/JCM.05872-11>
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., & Zhu, G. (2013). Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*, 53(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100335>
- Eisenbach, M. (2011). Bacterial Chemotaxis. *ELS*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001251.pub3>
- Erdem, A. L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., & Girón, J. A. (2007). Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7426–7435. <https://doi.org/10.1128/JB.00464-07>
- Fanelli, F., Chieffi, D., Di Pinto, A., Mottola, A., Baruzzi, F., & Fusco, V. (2020). Phenotype and genomic background of *Arcobacter butzleri* strains and taxogenomic assessment of the species. *Food Microbiology*, 89, 103416. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103416>
- Fanelli, F., Di Pinto, A., Mottola, A., Mule, G., Chieffi, D., Baruzzi, F., Tantillo, G., & Fusco, V. (2019). Genomic characterization of *Arcobacter butzleri* isolated from shellfish: Novel insight into antibiotic resistance and virulence determinants. *Frontiers in Microbiology*, 10, 670. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00670>
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., & Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infection and Immunity*, 66(1), 43–51. <https://doi.org/10.1128/iai.66.1.43-51.1998>
- Fera, M. T., La Camera, E., Carbone, M., Malara, D., & Pennisi, M. G. (2009). Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1661–1666. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04133.x>

- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Beninati, C., Giannone, M., La Camera, E., & Carbone, M. (2004). Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the mediterranean sea. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(3), 1271–1276. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1271-1276.2004>
- Ferreira, S., Correia, D. R., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2018). *Arcobacter butzleri* ciprofloxacin resistance: Point mutations in DNA Gyrase A and role on fitness cost. *Microbial Drug Resistance*, *24*(7), 915–922. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0295>
- Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., & Oleastro, M. (2013). Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, *162*(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.003>
- Ferreira, S., Júlio, C., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., & Oleastro, M. (2014). Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *78*(3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.021>
- Ferreira, S., Oleastro, M., & Domingues, F. (2017). *Arcobacter* spp. in food chain—from culture to omics. *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, 73–117. <https://doi.org/10.1002/9781119139188.ch4>
- Ferreira, S., Oleastro, M., & Domingues, F. (2019). Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain. *Current Opinion in Food Science*, *26*, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.013>
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2014). Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*, *76*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.09.004>
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2016). Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, *42*(3), 364–383. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.954523>
- Ferreira, S., Silva, A. L., Tomás, J., Mateus, C., Domingues, F., & Oleastro, M. (2021). Characterization of AreABC, an RND-type efflux system involved in antimicrobial resistance of *Aliarcobacter butzleri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(9), e00729–21. <https://doi.org/10.1128/AAC.00729-21>
- Figueras, M. J., Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Levican, A., & Collado, L. (2017). ‘*Arcobacter porcinius*’ sp. nov., a novel *Arcobacter* species uncovered by *Arcobacter thereius*. *New Microbes and New Infections*, *15*, 104–106. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.11.014>

- Finlay, B. B., & Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *61*(2), 136–169. <https://doi.org/10.1128/membr.61.2.136-169.1997>
- Flanagan, R. C., Neal-McKinney, J. M., Dhillon, A. S., Miller, W. G., & Konkel, M. E. (2009). Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infection and Immunity*, *77*(6), 2399–2407. <https://doi.org/10.1128/IAI.01266-08>
- Fong, T. T., Mansfield, L. S., Wilson, D. L., Schwab, D. J., Molloy, S. L., & Rose, J. B. (2007). Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environmental Health Perspectives*, *115*(6), 856–864. <https://doi.org/10.1289/ehp.9430>
- Furter, M., Sellin, M. E., Hansson, G. C., & Hardt, W. D. (2019). Mucus architecture and near-surface swimming affect distinct *Salmonella* Typhimurium infection patterns along the murine intestinal tract. *Cell Reports*, *27*(9), 2665–2678.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.106>
- Gao, B., Lara-Tejero, M., Lefebvre, M., Goodman, A. L., & Galán, J. E. (2014). Novel components of the flagellar system in Epsilonproteobacteria. *MBio*, *5*(3), e01349–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01349-14>
- Goni, D. M., Abdulaziz, S., Dhaliwa, G. K., Zakaria, Z., Muhammad, I. J., Mohamed, M. A., Bello, A. A., & Bitrus, A. A. (2016). Occurrence of *Arcobacter* in dogs and cats in Selangor, Malaysia, and associated risk factors. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *40*(6), 769–775. <https://doi.org/10.3906/vet-1602-7>
- González, A., & Ferrús, M. A. (2011). Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, *145*(1), 311–314. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.018>
- Grant, K. A., Belandia, I. U., Dekker, N., Richardson, P. T., & Park, S. F. (1997). Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infection and Immunity*, *65*(4), 1172–1180. <https://doi.org/10.1128/iai.65.4.1172-1180.1997>
- Guerrant, R. L., Steiner, T. S., Lima, A. A. M., & Bobak, D. A. (1999). How intestinal bacteria cause disease. *Journal of Infectious Diseases*, *179*(SUPPL. 2), S331–337. <https://doi.org/10.1086/513845>
- Guerry, P. (1997). Nonlipopolysaccharide surface antigens of *Campylobacter* species. *Journal of Infectious Diseases*, *176*(SUPPL. 2), S122–124. <https://doi.org/10.1086/513782>

- Guerry, P. (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology*, 15(10), 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.09.006>
- Hamir, A. N., Sonn, R. J., Franklin, S., & Wesley, I. V. (2004). *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter* species associated with intussusception in raccoon (*Procyon lotor*). *Veterinary Record*, 155(11), 338–340.
- Hansson, G. C. (2012). Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.002>
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annual Review of Microbiology*, 57, 249–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091014>
- Hathroubi, S., & Zerebinski, J. (2018). *Helicobacter pylori* biofilm involves a multigene stress-biased. 9(5), e01973-18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mBio.01973-18>
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/35074106>
- Heimesaat, M. M., Alter, T., Bereswill, S., & Götz, G. (2016). Intestinal expression of genes encoding inflammatory mediators and gelatinases during *Arcobacter butzleri* infection of gnotobiotic IL-10 deficient mice. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 6(1), 56–66. <https://doi.org/10.1556/1886.2016.00005>
- Heimesaat, M. M., Karadas, G., Alutis, M., Fischer, A., Kühn, A. A., Breithaupt, A., Göbel, U. B., Alter, T., Bereswill, S., & Götz, G. (2015). Survey of small intestinal and systemic immune responses following murine *Arcobacter butzleri* infection. *Gut Pathogens*, 7(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0075-z>
- Herold, S., Paton, J. C., Srimanote, P., & Paton, A. W. (2009). Differential effects of short-chain fatty acids and iron on expression of *iha* in Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155(11), 3554–3563. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029454-0>
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., & Gaastra, W. (2006). *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology*, 115(1–3), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.03.004>
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Wösten, M. M. S. M., Van Asten, A. J. A. M., & Gaastra, W. (2008). *Arcobacter* spp. possess two very short flagellins of which FlaA is essential for motility. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53(1), 85–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00405.x>

- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S., & Vandamme, P. (2009). *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2599–2604. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006650-0>
- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Mast, J., Van Hoof, J., & Vandamme, P. (2005). *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 713–717. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63103-0>
- Hsu, T. T. D., & Lee, J. (2015). Global distribution and prevalence of *Arcobacter* in food and water. *Zoonoses and Public Health*, 62(8), 579–589. <https://doi.org/10.1111/zph.12215>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), (2018). Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management. *Second Edition*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68460-4>
- Ikeda, T., Shinagawa, T., Ito, T., Ohno, Y., Kubo, A., Nishi, J., Gotoh, Y., Ogura, Y., Ooka, T., & Hayashi, T. (2020). Hypoosmotic stress induces flagellar biosynthesis and swimming motility in *Escherichia albertii*. *Communications Biology*, 3(1), 87. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0816-5>
- Inoue, A., Murata, Y., Takahashi, H., Tsuji, N., Fujisaki, S., & Kato, J. I. (2008). Involvement of an essential gene, *mviN*, in murein synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7298–7301. <https://doi.org/10.1128/JB.00551-08>
- Isidro, J., Ferreira, S., Pinto, M., Domingues, F., Oleastro, M., Gomes, J. P., & Borges, V. (2020). Virulence and antibiotic resistance plasticity of *Arcobacter butzleri*: Insights on the genomic diversity of an emerging human pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*, 80, 104213. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104213>
- Jiang, Z. D., Dupont, H. L., Brown, E. L., Nandy, R. K., Ramamurthy, T., Sinha, A., Ghosh, S., Guin, S., Gurleen, K., Rodrigues, S., Chen, J. J., McKenzie, R., & Steffen, R. (2010). Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: Importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1417–1419. <https://doi.org/10.1128/JCM.01709-09>
- Johnson, J. R., Jelacic, S., Schoening, L. M., Clabots, C., Shaikh, N., Mobley, H. L. T., & Tarr, P. I. (2005). The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 73(2), 965–971.

<https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.965-971.2005>

- Josenhans, C., & Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(8), 605–614. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00173>
- Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Kubo, M., Yamamoto, K., Arai, S., Izumi, T., Kobayashi, Y., Katsube, Y., & Mikami, T. (2003). Distribution of *Arcobacter* species among livestock in Japan. *Veterinary Microbiology*, 93(2), 153–158. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00312-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00312-7)
- Kamp, H. D., & Higgins, D. E. (2011). A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, 7(8), e1002153. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002153>
- Karadas, G., Bücken, R., Sharbati, S., Schulzke, J. D., Alter, T., & Götz, G. (2016). *Arcobacter butzleri* isolates exhibit pathogenic potential in intestinal epithelial cell models. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 218–225. <https://doi.org/10.1111/jam.12979>
- Karadas, G., Sharbati, S., Hänel, I., Messelhäuser, U., Glocker, E., Alter, T., & Götz, G. (2013). Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 583–590. <https://doi.org/10.1111/jam.12245>
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G., & Wachsmuth, I. K. (1991). *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(2), 376–385. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.376-385.1991>
- Kim, J. C., Yoon, J. W., Kim, C. H., Park, M. S., & Cho, S. H. (2012). Repression of flagella motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 by mucin components. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(4), 789–792. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.041>
- Konkel, M. E., Kim, B. J., Rivera-Amill, V., & Garvis, S. G. (2000). Identification of proteins required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 473, 215–224. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4143-1_22
- Konkel, Michael E., Klena, J. D., Rivera-Amill, V., Monteville, M. R., Biswas, D., Raphael, B., & Mickelson, J. (2004). Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 186(11), 3296–3303. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3296-3303.2004>

- Kopilović, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M., & Kraigher, A. (2008). Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008. *Eurosurveillance*, *13*(34), 7–9. <https://doi.org/10.2807/ese.13.34.18957-en>
- Lackraj, T., Kim, J. I., Tran, S. L., & Barnett Foster, D. E. (2016). Differential modulation of flagella expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 by intestinal short-chain fatty acid mixes. *Microbiology (United Kingdom)*, *162*(10), 1761–1772. <https://doi.org/10.1099/mic.o.000357>
- Lappi, V., Archer, J. R., Cebelinski, E., Leano, F., Besser, J. M., Klos, R. F., Medus, C., Smith, K. E., Fitzgerald, C., & Davis, J. P. (2013). An outbreak of foodborne illness among attendees of a wedding reception in Wisconsin likely caused by *Arcobacter butzleri*. *Foodborne Pathogens and Disease*, *10*(3), 250–255. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1307>
- Lehner, A., Tasara, T., & Stephan, R. (2005). Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *International Journal of Food Microbiology*, *102*(2), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.003>
- Levican, A., Alkeskas, A., Günter, C., Forsythe, S. J., & Figueras, M. J. (2013). Adherence to and invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(16), 4951–4957. <https://doi.org/10.1128/AEM.01073-13>
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(7), a000398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>
- Macnab, R. M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology*, *57*, 77–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090832>
- Macnab, R. M. (2004). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1694*, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.005>
- Mahdavi, J., Pirinccioglu, N., Oldfield, N. J., Carlsohn, E., Stoof, J., Aslam, A., Self, T., Cawthraw, S. A., Petrovska, L., Colborne, N., Sihlbom, C., Borén, T., Wooldridge, K. G., & Ala'Aldeen, D. A. A. (2014). A novel O-linked glycan modulates *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein-mediated adhesion to human histo-blood group antigens and chicken colonization. *Open Biology*, *4*(1), 130202. <https://doi.org/10.1098/rsob.130202>
- Malapaka, R. R. V., Adebayo, L. O., & Tripp, B. C. (2007). A deletion variant study of the functional role of the *Salmonella* flagellin hypervariable domain region in motility. *Journal of Molecular Biology*, *365*(4), 1102–1116. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.054>

- Mateus, C., Martins, R., Luís, Â., Oleastro, M., Domingues, F., Pereira, L., & Ferreira, S. (2021). Prevalence of *Arcobacter*: From farm to retail – A systematic review and meta-analysis. *Food Control*, *128*, 108177. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108177>
- Mateus, C., Nunes, A. R., Domingues, F., & Ferreira, S. (2021). RND efflux systems contribute to resistance and virulence of *Aliarcobacter butzleri*. *Antibiotics*, *10*(7), 823. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070823>
- McClung, C. R., Patriquin, D. G., & Davis, R. E. (1983). *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a Nitrogen-Fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* loisel. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *33*(3), 605–612. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-3-605>
- Medina, G., Neves, P., Flores-Martin, S., Manosalva, C., Andaur, M., Oth, C., Lincopan, N., & Fernández, H. (2019). Transcriptional analysis of flagellar and putative virulence genes of *Arcobacter butzleri* as an endocytobiont of *Acanthamoeba castellanii*. *Archives of Microbiology*, *201*(8), 1075–1083. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01678-0>
- Mey, A. R., Wyckoff, E. E., Oglesby, A. G., Rab, E., Taylor, R. K., & Payne, S. M. (2002). Identification of the *Vibrio cholerae* enterobactin receptors VctA and IrgA: IrgA is not required for virulence. *Infection and Immunity*, *70*(7), 3419–3426. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3419-3426.2002>
- Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wösten, M. M. S. M., Ussery, D. W., Stolz, J. F., Binnewies, T. T., Hallin, P. F., Wang, G., Malek, J. A., Rogosin, A., Stanker, L. H., & Mandrell, R. E. (2007). The complete genome sequence and analysis of the Epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLoS ONE*, *2*(12), e1358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001358>
- Minamino, T. (2014). Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1843*(8), 1642–1648. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.09.005>
- Moens, S., & Vanderleyden, J. (1996). Functions of bacterial flagella. *Critical Reviews in Microbiology*, *22*(2), 67–100. <https://doi.org/10.3109/10408419609106456>
- Monteville, M. R., Yoon, J. E., & Konkel, M. E. (2003). Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outermembrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology*, *149*(1), 153–165. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25820-0>
- Mottola, A., Bonerba, E., Figueras, M. J., Pérez-Cataluña, A., Marchetti, P., Serraino, A., Bozzo, G., Terio, V., Tantillo, G., & Di Pinto, A. (2016). Occurrence of potentially pathogenic *Arcobacters* in shellfish. *Food Microbiology*, *57*, 23–27.

- <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.010>
- Murakami, K., Kimura, S., Nagafuchi, O., Sekizuka, T., Onozuka, D., Mizukoshi, F., Tsukagoshi, H., Ishioka, T., Asai, T., Hirai, S., Musashi, M., Suzuki, M., Ohnishi, M., Oishi, K., Saruki, N., Kimura, H., Iyoda, S., Kuroda, M., & Fujimoto, S. (2020). Flagellum expression and swimming activity by the zoonotic pathogen *Escherichia albertii*. *Environmental Microbiology Reports*, *12*(1), 92–96. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12818>
- Musmanno, R. A., Russi, M., Lior, H., & Figura, N. (1997). *In vitro* virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples. *New Microbiologica*, *20*(1), 63–68.
- Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C., & Ellis, W. A. (1985). Taxonomic Position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *35*(3), 342–356.
- Nelapati, S., Tumati, S. R., Thirtham, M. R., Ramani Pushpa, R. N., Kamisetty, A. K., & Ch, B. K. (2020). Occurrence, virulence gene and antimicrobial susceptibility profiles of *Arcobacter* sp. isolated from catla (*Catla catla*) in India. *Letters in Applied Microbiology*, *70*(5), 365–371. <https://doi.org/10.1111/lam.13281>
- Ni, B., Colin, R., Link, H., Endres, R. G., & Sourjik, V. (2020). Growth-rate dependent resource investment in bacterial motile behavior quantitatively follows potential benefit of chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(1), 595–601. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910849117>
- On, S. L. W., Harrington, C. S., & Atabay, H. I. (2003). Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(5), 1096–1105. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02100.x>
- On, S. L. W., Stacey, A., & Smyth, J. (1995). Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *Journal of Infection*, *31*(3), 225–227. [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(95\)80031-X](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(95)80031-X)
- Ovesen, S., Durack, J., Kirk, K. F., Nielsen, H. L., Nielsen, H., & Lynch, S. V. (2019). Motility and biofilm formation of the emerging gastrointestinal pathogen *Campylobacter concisus* differs under microaerophilic and anaerobic environments. *Gut Microbes*, *10*(1), 34–44. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1472201>
- Ovesen, S., Kirk, K. F., Nielsen, H. L., & Nielsen, H. (2017). Motility of *Campylobacter concisus* isolated from saliva, feces, and gut mucosal biopsies. *Apmis*, *125*(3), 230–235. <https://doi.org/10.1111/apm.12655>

- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F. L., & Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3367–3373. <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3367-3373.1997>
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2018). Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: Getting order from the chaos. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02077>
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., & Figueras, M. J. (2019). *Arcobacter lacus* sp. Nov. and *Arcobacter caeni* sp. nov., two novel species isolated from reclaimed water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(11), 3326–3331. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003101>
- Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124(4), 715–727. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>
- Radomska, K. A., Wösten, M. M. S. M., Ordoñez, S. R., Wagenaar, J. A., & van Putten, J. P. M. (2017). Importance of *Campylobacter jejuni* FliS and FliW in flagella biogenesis and flagellin secretion. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1060. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01060>
- Reeser, R. J., Medler, R. T., Billington, S. J., Jost, B. H., & Joens, L. A. (2007). Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1908–1913. <https://doi.org/10.1128/AEM.00740-06>
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H., & Tanner, S. A. (1999). Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Letters in Applied Microbiology*, 28(1), 31–35. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00483.x>
- Rojas, C. M., Ham, J. H., Deng, W. L., Doyle, J. J., & Collmer, A. (2002). HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 13142–13147. <https://doi.org/10.1073/pnas.202358699>
- Salamaszyńska-Guz, A., & Klimuszkó, D. (2008). Functional analysis of the *Campylobacter jejuni* *cj0183* and *cj0588* genes. *Current Microbiology*, 56(6), 592–596. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9130-z>
- Salazar-Sánchez, A., Baztarrika, I., Alonso, R., Fernández-Astorga, A., Martínez-Ballesteros, I., & Martínez-Malaxetxebarria, I. (2022). *Arcobacter butzleri*

- Biofilms: Insights into the genes beneath their formation. *Microorganisms*, 10(7), 1280. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071280>
- Schuhmacher, J. S., Thormann, K. M., & Bange, G. (2015). How bacteria maintain location and number of flagella? *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 812–822. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuvo34>
- Szymanski, C. M., King, M., Haardt, M., & Armstrong, G. D. (1995). *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infection and Immunity*, 63(11), 4295–4300. <https://doi.org/10.1128/iai.63.11.4295-4300.1995>
- Tabatabaei, M., Shirzad Aski, H., shayegh, H., & Khoshbakht, R. (2014). Occurrence of six virulence-associated genes in *Arcobacter* species isolated from various sources in Shiraz, Southern Iran. *Microbial Pathogenesis*, 66, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.10.003>
- Teague, N. S., Srijan, A., Wongstitwilairoong, B., Poramathikul, K., Champathai, T., Ruksasiri, S., Pavlin, J., & Mason, C. J. (2010). Enteric pathogen sampling of tourist restaurants in Bangkok, Thailand. *Journal of Travel Medicine*, 17(2), 118–123. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2009.00388.x>
- Tee, W., Baird, R., Dyll-Smith, M., & Dwyer, B. (1988). *Campylobacter cryaerophila* isolated from a human. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(12), 2469–2473. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.12.2469-2473.1988>
- Tsilia, V., Van den Abbeele, P., & Van de Wiele, T. (2015). Improved *in vitro* assay for determining the mucin adherence of bacteria sensitive to Triton X-100 treatment. *Folia Microbiologica*, 60(5), 435–442. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0376-0>
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- Van den Abeele, A. M., Vogelaers, D., Van Hende, J., & Houf, K. (2014). Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008–2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1731–1734. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140433>
- Van Driessche, E., & Houf, K. (2008). Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 443–451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03762.x>
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., & De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(1), 88–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-1-88>

- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H., & Lauwers, S. (1992). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2335–2337. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.9.2335-2337.1992>
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J. P., & Goossens, H. (1992). Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 344–356. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-3-344>
- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zisis, G., Butzler, J. P., & Vandamme, P. (2004). *Arcobacter* species in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 10(10), 1863–1867. <https://doi.org/10.3201/eid1010.040241>
- Venâncio, I., Luís, Â., Domingues, F., Oleastro, M., Pereira, L., & Ferreira, S. (2022). The prevalence of *Arcobacteraceae* in aquatic environments: A systematic review and meta-analysis. *Pathogens*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens11020244>
- Wassenaar, T. M., Bleumink-Pluym, N. M., & van der Zeijst, B. A. (1991). Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion. *The EMBO Journal*, 10(8), 2055–2061. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07736.x>
- Watson, R. O., & Galán, J. E. (2005). Signal transduction in *Campylobacter jejuni*-induced cytokine production. *Cellular Microbiology*, 7(5), 655–665. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00498.x>
- Wesley, I. V., & Baetz, A. L. (1999). Natural and experimental infections of *Arcobacter* in poultry. *Poultry Science*, 78(4), 536–545. <https://doi.org/10.1093/ps/78.4.536>
- Wesley, I. V., Baetz, A. L., & Larson, D. J. (1996). Infection of cesarean-derived colostrum-deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*. *Infection and Immunity*, 64(6), 2295–2299. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2295-2299.1996>
- Wesley, Irene V, & Miller, W. G. (2010). *Arcobacter*: an Opportunistic Human Food-Borne Pathogen? In *Emerging Infections* 9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/9781555816803.ch9>
- Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Arts, M. T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C. A., Lapen, D. R., Villemur, R., & Khan, I. U. H. (2016). Identification, characterization and description of

- Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(2), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.12.002>
- Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Arts, M. T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C. A., Lapen, D. R., Villemur, R., Talbot, G., & Khan, I. U. H. (2015). *Arcobacter lanthieri* sp. Nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(8), 2709–2716. <https://doi.org/10.1099/ijs.o.000318>
- Wilson, D. L., Bell, J. A., Young, V. B., Wilder, S. R., Mansfield, L. S., & Linz, J. E. (2003). Variation of the natural transformation frequency of *Campylobacter jejuni* in liquid shake culture. *Microbiology*, 149(12), 3603–3615. <https://doi.org/10.1099/mic.o.26531-0>
- Yin, L., Shen, X., Zhang, D., Zhao, R., Dai, Y., Hu, X., Zhou, X., Hou, H., Pan, X., & Qi, K. (2021). Flagellar rotor protein FliG is involved in the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 160, 105198. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105198>
- Yin, W. L., Xie, Z. Y., Zeng, Y. H., Zhang, J., Long, H., Ren, W., Zhang, X., Cai, X. N., & Huang, A. Y. (2022). Two (p)ppGpp synthetase genes, *relA* and *spoT*, are involved in regulating cell motility, exopolysaccharides production, and biofilm formation of *Vibrio alginolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 858559. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.858559>

RM4018	N A E S V I R D V D Y A Q E S A N F N K L N I I S Q A G S Y A I S Q A N A V Q Q N V L K L L Q *
AB28 11	.
DQ40A1	.
2009 1426	.
INSA2680	.
INSA2756	.
INSA2808	.
INSA2999	.
INSA3202	.
INSA3711	.
INSA3727	.
INSA3774	.
INSA3800	.
INSA3890	.
INSA4015	.
INSA4333	.
INSA593	.
INSA776	.
INSA4211	.
CU29393	.

Apêndice II

Apresentação em comunicação oral

Raquel Santos, Cristiana Mateus, Mónica Oleastro, Susana Ferreira (20 e 21 de julho, 2022). The role of flagellum in the pathogenicity of *Aliarcobacter butzleri*. XVII Simpósio Internacional do CICS-UBI, Covilhã, Portugal 2022.

