

LUANA BORGES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO REGULADOR
TRANSCRICIONAL FUR DE *Klebsiella pneumoniae***

Bragança Paulista

2012

LUANA BORGES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO REGULADOR
TRANSCRICIONAL FUR DE *Klebsiella pneumoniae***

Orientador

Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2012

QW 138.5.K5
B732c

Borges, Luana.

Caracterização molecular do regulador transcricional Fur de *Klebsiella pneumoniae* / Luana Borges. -- Bragança Paulista, 2012. 57p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Lúcio Fábio Caldas Ferraz.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Regulador FUR. 3. Genes reguladores. 4. Modelagem molecular por homologia. I. Ferraz, Lúcio Fábio Caldas. II. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz

Membros Titulares:

1. Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz (orientador).
2. Profa. Dra. Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini.
3. Profa. Dra. Giovana Tofoli.

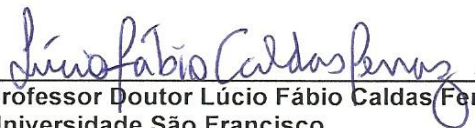
Membros Suplentes:

1. Profa. Dra. Natália Reiko Sato Miyasaka.
2. Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini.

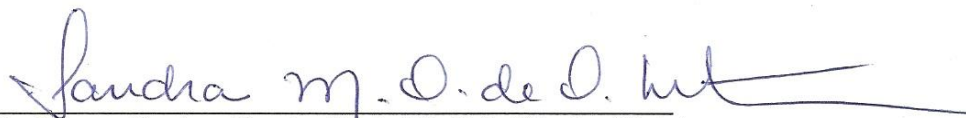
**Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco, campus Bragança Paulista.**

Data: 29/08/2012.

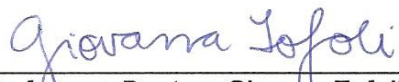
BORGES, Luana, “Caracterização molecular do regulador transcricional Fur de *Klebsiella pneumoniae*”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e nove de Agosto de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Professor Doutor Lúcio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco



Professora Doutora Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitri
Universidade São Francisco



Professora Doutora Giovana Tofoli
Universidade São Francisco

Dedico este trabalho ao Pai Celestial, pois Este me proporcionou o
Mestrado e me capacitou para realizar este sonho;
Aos meus avós, tão queridos e admirados que participaram desta
conquista e fizeram tudo que foi preciso para que meu sonho se
concretizasse. Muito obrigada por nunca me negarem ajuda. Boa
parte do que sou, devo a vocês;
Ao meu pai, que nem as melhores palavras seriam suficientes para
agradecer tudo que você faz por mim. Você é simplesmente incrível,
me proporciona sempre mais do que espero e acredita em mim como
se eu fosse “super”, mas saiba que o herói é você;
À minha mãe que acompanhou meus primeiros passos e continua me
amparando, incentivando e torcendo por mim. Eu amo você!
Ao meu marido, que acredita no meu potencial, me julga forte e
guerreira, saiba que se hoje sou isso tudo, foi porque você me
incentivou e me ensinou a correr atrás dos meus sonhos;
Ao meu querido tio Alexis e tia Marli, que em muitos momentos da
minha vida, não cumpriram apenas os papéis de tios, mas também de
pais;
Aos demais familiares que me apoiaram e torceram por mim,
obrigada por vocês acreditarem em mim, me ouvirem e darem força
sempre que precisei.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz, me lembro com clareza, antes de conhecê-lo e já sabia que seria meu orientador que, curiosa, pesquisei seu currículo na Plataforma Lattes e desde então, me senti orgulhosa por ter a oportunidade de trabalhar com alguém tão competente como você. Com os dias, constatei que além de um profissional extremamente capaz, você também é muito humano, humilde e amigo. Obrigada pela paciência que teve ao me orientar, pois esta pareceu ser infinita. Obrigada por contribuir grandemente para a minha formação.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, que muito me ensinaram e acompanharam meus experimentos, em especial a Ana Érika, saiba que em você, encontrei uma grande amiga, você é muito especial, bondosa e generosa. Obrigada por tudo!

Prof^a. Giovana, com você aprendi muito, saiba que a admiro imensamente. Obrigada por contribuir tanto para o meu crescimento.

Obrigada Prof^a. Sandra por aceitar nosso convite e acrescentar muito ao meu conhecimento, na construção deste trabalho que hoje é a realização de um grande sonho.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa no qual este trabalho esteve vinculado.

Ao Prof. Dr. Renato Vicentini (CBMEG – Unicamp) agradeço pela valiosa contribuição a este trabalho.

Agradeço a Universidade São Francisco e os professores e colaboradores do mestrado, especialmente a secretaria Vilma, que sempre me receberam de braços abertos. Obrigada!

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um patógeno gram-negativo oportunista, causador de infecções hospitalares, tais como infecções urinárias, pneumonia, sepse, entre outras. O ferro, sendo um nutriente essencial para os microrganismos, participa de vários processos metabólicos importantes e é também um importante mediador da expressão de genes de virulência. Em bactérias a regulação gênica mediada por ferro é controlada pelo regulador transcricional Fur, que forma um complexo com o íon ferroso e este complexo se liga a sequências específicas, chamadas boxes Fur, localizadas na região promotora dos genes alvos, e modula a transcrição destes genes. Foram identificados, por análises de bioinformática, prováveis boxes Fur na região promotora do gene *fur* e dos genes *fimZ*, *rseA*, *rstR* e *sdiA* de *K. pneumoniae*. Estes boxes Fur foram validados pelo ensaio FURTA com a linhagem de *E. coli* H1717, confirmando que a expressão desses genes pode ser regulada por Fur. A identificação de um box Fur no gene *fur* e o padrão de expressão deste gene modulado de acordo com a disponibilidade de ferro no meio revelam que a expressão deste gene é auto-regulada. A caracterização da proteína Fur de *K. pneumoniae* pelo ensaio FURTA na linhagem de *E. coli* H1780 mostrou que não houve a complementação do gene *fur* mutante de H1780 pelo gene *fur* de *K. pneumoniae*, possivelmente porque o gene *fur* de *K. pneumoniae* não foi transcrito e a proteína Fur não foi expressa em H1780. Um modelo tridimensional da proteína Fur de *K. pneumoniae* foi construída pela técnica de modelagem molecular por homologia e poderá fornecer informações valiosas quanto ao mecanismo de ação do regulador Fur quando complexado às suas respectivas sequências reguladoras. Este trabalho mostra que a proteína Fur é um importante regulador da transcrição não apenas de genes de virulência, mas também de genes que codificam outros reguladores transcricionais potencialmente associados a fatores de virulência.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*; Regulador Fur; Genes Reguladores; Modelagem Molecular por Homologia.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a gram-negative opportunistic pathogen that causes nosocomial infections such as urinary tract infections, pneumonia, sepsis, among others. Iron is an essential nutrient for microorganisms and participates in several metabolic processes. Besides the role in the metabolism, iron is also an important mediator in the expression of virulence genes. In bacteria the gene expression regulation mediated by iron is controlled by the transcriptional regulator Fur. The Fur regulator forms a complex with ferrous ion and this complex binds to specific sequences, called Fur box, located in the promoter region of target genes and modulates the transcription of these genes. In this work bioinformatic analysis revealed putative Fur boxes on the promoter region of *fur*, *fimZ*, *rseA*, *rstR* and *sdiA* genes from *K. pneumoniae*. These Fur boxes were validated by FURTA analysis in *E. coli* strain H1717, confirming that the expression of these genes can be regulated by Fur. The identification of a Fur box on *fur* gene and the expression of this gene modulated according to the availability of iron in the medium showed that the expression of *fur* gene is auto-regulated. The characterization of *K. pneumoniae* Fur protein by FURTA analysis in *E. coli* strain H1780 showed no complementation of H1780 *fur* mutant by the *K. pneumoniae fur* gene, possibly because the *fur* gene of *K. pneumoniae* was not transcribed and the Fur protein was not expressed in H1780. A three-dimensional model of the *K. pneumoniae* Fur protein was constructed by homology molecular modeling and can provide valuable information regarding the mechanism of action of the regulator Fur when complexed to their respective regulatory sequences. This study shows that *K. pneumoniae* Fur is an important regulator not only of virulence genes, but also of other genes that encode transcriptional regulators associated with virulence factors.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; Fur regulator; Genes Regulators; Homology Molecular Modeling.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Cultivo de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25.
Figura 2. Princípio do Ensaio FURTA.....	35.
Figura 3. Validação dos boxes Fur pelo ensaio FURTA.....	36.
Figura 4. Padrão de expressão do gene <i>fur</i>	38.
Figura 5. Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína Fur de <i>K. pneumoniae</i> e de <i>Vibrio cholerae</i> , e estrutura dimérica da proteína Fur de <i>V. cholerae</i>	40.
Figura 6. Modelo gerado da proteína Fur de <i>K. pneumoniae</i> e o perfil DOPE.....	40.
Figura 7. Esquemas com as posições de anelamento dos primers específicos para o gene <i>fur</i> e as orientações possíveis do gene <i>fur</i> no vetor <i>pGEM[®]-T Easy</i>	42.
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a orientação do gene <i>fur</i> no vetor <i>pGEM[®]-T Easy</i>	42.
Figura 9. Ensaio FURTA em <i>E. coli</i> H1780 transformada com o vetor <i>pGEM+fur_{antisense}</i>	43.
Figura 10. Gel de poli-acrilamida mostrando as proteínas totais extraídas de <i>E. coli</i> H1780.....	45.
Tabela 1. Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	28.
Tabela 2. Par de primers utilizado para a amplificação do gene <i>fur</i> de <i>K. pneumoniae</i>	30.
Tabela 3. Prováveis boxes Fur identificados na região promotora de genes que codificam reguladores de transcrição em <i>K. pneumoniae</i>	34.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
D.O._{600nm}	Densidade ótica a 600 nm de comprimento
Fur	do inglês, <i>Ferric uptake regulator</i>
FURTA	do inglês, <i>FUR Titration Assay</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria-Bertani, meio de cultura bacteriano
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RNase	Ribonuclease A
r.p.m.	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TE	Tampão Tris-HCl a 30 mM contendo 1 mM EDTA (pH 8,0)
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13.
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13.
1.2. Patologias causadas por <i>K. pneumoniae</i>	13.
1.3. Mecanismos de resistência da <i>K. pneumoniae</i>	16.
1.4. Fatores de virulência influenciados por ferro.....	18.
1.5. Fur e seu sistema de regulação.....	20.
2. OBJETIVOS	24.
2.1. Objetivo geral.....	24.
2.2. Objetivos específicos.....	24.
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25.
3.1. Cultivo de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25.
3.2. Identificação de prováveis boxes Fur por análises de bioinformática.....	25.
3.3. Validação dos prováveis boxes Fur pelo ensaio FURTA em <i>E. coli</i> H1717.....	26.
3.4. Caracterização do padrão de expressão do gene <i>fur</i>	27.
3.5. Modelagem molecular por homologia da proteína Fur de <i>K. pneumoniae</i>	29.
3.6. Caracterização do regulador Fur pelo ensaio FURTA em <i>E. coli</i> H1780.....	30.
3.6.1. Amplificação e clonagem do gene <i>fur</i> de <i>K. pneumoniae</i>	30.

3.6.2. Ensaio FURTA em <i>E. coli</i> H1780 clonada com o gene <i>fur</i> de <i>K. pneumoniae</i>	31.
3.6.3. Indução da expressão do gene <i>fur</i> de <i>K. pneumoniae</i> em <i>E. coli</i> H1780.....	32.
3.7. Técnicas básicas de biologia molecular.....	33.
4. RESULTADO e DISCUSSÃO.....	34.
4.1. Identificação de prováveis boxes Fur por bioinformática e validação pelo ensaio FURTA.....	34.
4.2. Caracterização do padrão de expressão do gene <i>fur</i>	38.
4.3. Modelagem molecular por homologia da proteína Fur de <i>K. pneumoniae</i>	39.
4.4. Caracterização do regulador Fur pelo ensaio FURTA em <i>E. coli</i> H1780.....	41.
4.4.1. Confirmação por PCR da clonagem do gene <i>fur</i> no vetor pGEM [®] -T Easy	41.
4.4.2. Ensaio FURTA em <i>E. coli</i> H1780 clonada com o gene <i>fur</i> de <i>K. pneumoniae</i>	43.
4.4.3. Expressão da proteína Fur de <i>K. pneumoniae</i> em <i>E. coli</i> H1780.....	44.
5. CONCLUSÕES.....	46.
6. REFERÊNCIAS.....	47.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo gram-negativo que consiste em um patógeno humano oportunista, causador de uma parte significativa de infecções hospitalares, como as infecções urinárias, pneumonia, sepse, entre outras. Estas bactérias são de fácil disseminação em ambiente hospitalar e estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade por serem multirresistentes aos antibióticos, principalmente quando são capazes de produzir enzimas betalactamases de espectro estendido (ESBL) (MARQUES et al., 2011).

Para Gales e colegas (1997), a resistência bacteriana constitui-se como algo que reflete no mundo inteiro, tornando muitos antimicrobianos menos efetivos, provavelmente devido ao uso inadequado desses medicamentos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes. O paciente infectado normalmente necessita de maior tempo de internação e ingestão aumentada de medicamentos que podem ser tóxicos, além de que apresentam risco aumentado de mortalidade.

Em estudo realizado recentemente em Recife, no qual utilizou-se 28 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, concluiu-se que os mesmos apresentaram resistência a cefalosporinas de espectro estendido tais como aztreonam, ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, cloranfenicol, tetraciclina e cefotaxima. Nenhum isolado apresentou resistência à amicacina, imipenem ou meropenem, que normalmente são medicamentos de primeira escolha para o tratamento de pneumonia, sepse, entre outras patologias causadas pela *K. pneumoniae* (LOPES et al., 2010).

1.2. Patologias causadas por *K. pneumoniae*

A *K. pneumoniae* é uma das principais bactérias causadoras de infecções hospitalares, ou nosocomiais (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). A infecção hospitalar é um problema limitado não somente ao meio em que está inserida, mas é uma questão de saúde pública que conduz ao aumento dos custos de medicamentos e internação, ocasionando demora no atendimento de outros pacientes. Santos (2004) afirma que

infecção hospitalar consiste naquela em que a infecção foi adquirida após o paciente ser hospitalizado. Esta infecção pode se manifestar durante o período em que o paciente se encontra internado ou pode ocorrer até mesmo após a alta hospitalar, estando relacionada ao período em que o paciente permaneceu instalado na instituição hospitalar (MOURA et al., 2008). A infecção hospitalar traz à saúde do homem prejuízos imensuráveis, como letalidade, aumento do tempo de internação, alta demanda de medicamentos, dor, mal estar e isolamento. Tudo isso contribui para o sofrimento do paciente e, também, de sua família, que vive este drama junto com a vítima hospitalizada, compartilhando com ela seus medos e receios (CARDOSO & SILVA, 2004).

Um dos fatores que determina se a infecção será recidiva é a produção de enzimas betalactamases que conferem à bactéria resistência contra antibióticos betalactâmicos. A resistência a estes antibióticos é fruto de mutações nos genes que codificam a enzima betalactamase. Desde então, inúmeros são os relatos de infecções ocasionadas por bactérias resistentes, pois as mutações nestes genes conferem resistência a vários antimicrobianos (MEYER & PICOLI, 2011).

O rápido diagnóstico e detecção de bactérias em pacientes hospitalizados são cruciais para determinar os medicamentos utilizados na terapia referente à patologia diagnosticada, além de determinar a necessidade de isolamento de pacientes. No caso das bactérias gram-negativas produtoras de ESBL, o diagnóstico é fundamental para que o manejo do paciente seja adequado. A permanência do paciente em tempo prolongado no hospital, sem medidas de controle precocemente tomadas, interfere na saúde de outros pacientes, que de certo modo estarão susceptíveis ao risco de contraírem a bactéria, sendo este, um fator agravante, pois ocasiona a disseminação do bacilo (MARTINS & PICOLI, 2011).

Uma das infecções causadas pela *K. pneumoniae* é a sepse, ou infecção sistêmica. A sepse é uma patologia de difícil tratamento e terapêutica limitada e, por isso, apresenta alta taxa de fatalidade, principalmente quando o contágio é feito por bactérias gram-negativas produtoras de betalactamases (TRAGANTE et al., 2008; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011; PANCERA et al., 2004). Suspeita-se de sepse

quando o indivíduo apresenta sinais e sintomas tais como: taquipnéia ou taquicardia, apnéia, hipotermia ou hipertermia, vômitos, distensão abdominal, petéquias, icterícia, etc. (CAMPOS et al., 2010). Porém, mesmo com estes sintomas, faz-se necessária a realização de exames diagnósticos.

Em estudo realizado em uma Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal foram investigados 84 casos suspeitos de sepse neonatal. *K. pneumoniae* foi identificada em 47% dos casos, correspondendo a 21 crianças, sendo que destas, sete apresentaram cepas produtoras de ESBL e três crianças faleceram (TRAGANTE et al., 2008).

Em um estudo realizado em Porto Alegre, que verificou a incidência de *K. pneumoniae* na hemocultura de 145 pacientes, constatou-se que 81 pacientes apresentaram a *K. pneumoniae* em infecções da corrente sanguínea (SUPERTI et al., 2009). Este estudo confirma a gravidade que a *K. pneumoniae* oferece a saúde do indivíduo, quando este é contaminado pela mesma.

A infecção do trato urinário é uma das afecções mais comuns da clínica médica, sendo definida como a invasão microbiana de qualquer órgão do trato urinário, desde a uretra até os rins. A infecção pode ser devida a fungos, vírus ou bactérias como a *K. pneumoniae* ou, mais comumente, por *E. coli* (HEILBERG & SCHOR, 2003). Quando não apresenta sintomas, é conhecida como bacteriúria assintomática. Os sintomas que podem ser encontrados decorrentes da infecção urinária incluem disúria, dor lombar, febre, urgência miccional, urina turva ou avermelhada, entre outros. O diagnóstico final consiste na coleta de urina e a presença de mais de 100 mil unidades formadoras de colônia por mililitro de urina (LUCCHETTI et al., 2005).

Em um estudo realizado em Brasília, no período entre 2001 a 2005, foram encontrados 2.433 uroculturas positivas. Destas, predominou a presença de *E. coli*, sendo que, posteriormente, a *K. pneumoniae* apareceu como a segunda maior causa de infecção do trato urinário (PIRES et al., 2009).

A colonização da orofaringe por bacilos gram-negativos é um importante precursor para a pneumonia, sendo que esta colonização pode ocorrer em indivíduos com maus hábitos de higiene, levando a fácil adesão do bacilo na mucosa oral. Já pacientes idosos possuem barreiras de defesa das mucosas alteradas, apresentando

maior susceptibilidade à colonização da orofaringe por bacilos gram-negativos como *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*. No período de três semanas pode ocorrer pneumonia ocasionada pelo patógeno em questão. Não se sabe ao certo qual o fator exato que leva a adesão de bacilos na mucosa orofaríngea, porém sabe-se que a presença de doença respiratória e o fato do paciente estar acamado são fatores que contribuem para a colonização (OLIVEIRA et al., 2011; LOPES & LÓPEZ, 2009).

O paciente internado em UTI (Unidade de Terapia Intensiva) geralmente apresenta má higiene bucal, podendo a mucosa orofaríngea ser colonizada por patógenos envolvidos na pneumonia. Ao realizar estudos para verificar quais os patógenos presentes no aspirado traqueal, Oliveira e colaboradores (2011) verificaram que a *K. pneumoniae* estava entre os mais frequentemente encontrados. Nos pacientes analisados neste estudo verificou-se que diferentes patógenos, incluindo a *K. pneumoniae*, foram encontrados com maior frequência no biofilme dental, nas amostras da língua e do tubo do respirador artificial. Com isso aqueles autores concluíram que a presença de patógenos no biofilme bucal pode servir de reservatório para microrganismos associados com pneumonia nosocomial.

1.3. Mecanismos de resistência da *K. pneumoniae*

Entre os mecanismos de resistência de *K. pneumoniae* estão as enzimas betalactamases de interesse clínico que são: betalactamase de espectro estendido (ESBL), a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), as metalobetalactamases (MBL) e a betalactamase classe C (AmpC) (MEYER & PICOLI, 2011).

Os microrganismos produtores de betalactamases representam um dos mais importantes problemas de resistência bacteriana nos hospitais brasileiros, visto que podem transmitir a resistência para outras espécies através dos plasmídeos, o que é preocupante, pois estes patógenos são os responsáveis por altos índices de morbimortalidade, multirresistência a antibióticos, aumento de internações e custos hospitalares (SUPERTI et al., 2009).

As bactérias resistentes, principalmente aquelas cepas produtoras de betalactamases, estão surgindo no mundo inteiro como uma ameaça ao tratamento de

infecções comuns em ambientes hospitalares (GHAFOURIAN et al., 2012).

Linhagens distintas produzem diferentes ESBLs capazes de hidrolisar diferentes antimicrobianos. Pois, enquanto uma ESBL pode ter maior capacidade para degradar a cefotaxima, outra pode ter maior capacidade para hidrolisar o aztreonam. Esta variação fenotípica aliada à falta de um teste eficaz para detectar estas linhagens, tem contribuído para a disseminação hospitalar da bactéria (PEREIRA et al., 2003; MENEZES et al., 2007). Estudos em São Paulo comprovaram a existência de alta variedade de grupos de ESBLs entre diferentes cepas de *K. pneumoniae* (DROPA et al., 2009).

As linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de betalactamases são capazes de hidrolisar as cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos, que são antibióticos usados no tratamento de infecções bacterianas. O mecanismo de ação destas enzimas envolve a modificação química do composto ativo, no qual ocorre o rompimento do anel betalactâmico das drogas derivadas da penicilina, impossibilitando sua atividade antimicrobiana (PEREIRA et al., 2003; MEYER & PICOLI, 2011).

Para Dienstmann e colegas (2010), a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase constitui um mecanismo emergente de resistência, uma vez que é capaz de degradar antibióticos como as cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos, sendo que um dos poucos antibióticos que combatem as bactérias resistentes ao carbapenemo é a polimixina B. Porém, este antibiótico oferece risco ao paciente, podendo ser nefrotóxico e de baixa penetração pulmonar.

Conforme ressalta Zanol e coautores (2010) e Franco e colegas (2010), a metalobetalactamase (MBL) consiste em uma enzima capaz de hidrolisar o anel betalactâmico por meio de hidroxilação irreversível do grupo amida. Deste modo inativa antimicrobianos como as penicilinas e cefalosporinas, porém são sensíveis a polimixina B. Os genes que codificam MBLs estão localizados em plasmídeos, elementos que possibilitam a mobilidade do gene, tornando a disseminação fácil e preocupante.

A enzima AmpC (betalactamase classe C), cujo gene que a codifica tem origem plasmidial, é capaz de hidrolisar as penicilinas, os monobactâmicos e cefalosporinas. A AmpC foi descrita pela primeira vez em 1999 e atualmente são conhecidas no mundo

inteiro mais de oito variedades de cepas produtoras desta enzima. O elevado índice de linhagens produtoras de AmpC faz com que seja necessário o uso excessivo de fármacos, o que pode ocasionar em cepas mais resistentes, como as produtoras de carbapenases que se disseminam facilmente (MEYER & PICOLI, 2011).

1.4. Fatores de virulência influenciados por ferro

O ferro é um nutriente essencial para qualquer organismo e participa de importantes processos metabólicos como transporte de oxigênio, síntese de DNA, reações metabólicas e outros (WIJAYANTI et al., 2004). Em bactérias o ferro é necessário para que se reproduzam de forma eficiente (RATLEDGE & DOVER, 2000). Situações de privação de ferro podem desencadear infecção e colonização de bactérias patogênicas nos tecidos do hospedeiro (LITWIN & CALDERWOOD, 1993), e nesta situação de privação as bactérias utilizam maquinarias eficientes para a captação de ferro do meio (TORRES et al., 2010).

No hospedeiro o ferro encontra-se normalmente complexado a proteínas como as transferrinas e lactoferrinas. Muitos patógenos expressam moléculas e receptores capazes de remover o ferro dessas proteínas para utilização em seu metabolismo. Esse processo é conhecido como sequestro de ferro. Dentre as moléculas e receptores expressos em condições de carência de ferro e que participam desse processo estão os sideróforos, moléculas com alta afinidade pelo ferro, e os receptores de membrana externa, denominados IROMPs (NEILANDS, 1981; OTTO et al., 1992).

Lee e colaboradores (2009a) mostraram em seus estudos com *Helicobacter pylori* que sob condições de privação de ferro houve um aumento na expressão de IROMP, e que em situações com disponibilidade de ferro foi constatada nenhuma expressão daquele receptor. Os autores concluem ainda que a falta de ferro no hospedeiro pode induzir a expressão de IROMPs pela bactéria para a aquisição do nutriente. Outros trabalhos corroboram a idéia de que a presença de *H. pylori* pode prejudicar a homeostase de ferro no hospedeiro, podendo até causar a deficiência do metal e o aparecimento de anemia (CHOE et al, 1999; CHOE et al., 2000). Em algumas situações, para alcançar sucesso na absorção de ferro das células do hospedeiro

alguns patógenos promovem hemólises que aumentam ainda mais a vulnerabilidade do hospedeiro (CHOE et al., 2000; HANTKE, 2001). Barabino (2002) afirma que, após a eliminação da bactéria, a anemia é controlada sem o fornecimento de ferro.

Em bactérias patogênicas o ferro desempenha um papel crucial na regulação da expressão de inúmeros fatores de virulência, como formação de biofilme mediado por *quorum-sensing*, expressão de genes de virulência, toxinas, proteases, e sistemas de assimilação de ferro (LITWIN & CALDERWOOD, 1993).

Condições de privação de ferro levam a um aumento na produção da toxina Shiga por *Shigella dysenteriae*, o mesmo ocorrendo com a produção de toxinas SLTs (do inglês, *Shiga-like toxins*) por algumas linhagens de *Escherichia coli* enterohemorrágica. Além da toxina Shiga, a toxina diftérica, produzida por *Corynebacterium diphtheriae*, e a exotoxina A, produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, também são reguladas de acordo com a concentração de ferro no meio externo (LITWIN & CALDERWOOD, 1993).

Outro fator de virulência bacteriana regulado pelos níveis de ferro é a formação de biofilme mediado por *quorum-sensing* (SINGH et al., 2004). A formação de biofilme consiste na aderência de bactérias por meio da produção de polímeros extracelulares, principalmente polissacarídeos. Esta adesão pode ocorrer em superfícies bióticas e abióticas (cateteres, agulhas, conexões, etc). Para tanto, os microrganismos fixam-se na superfície, se aderem e agregam-se, agindo como barreira contra os agentes antimicrobianos. Situações de alto nível de ferro pode-se observar a adesão das bactérias nas superfícies, formação de microcolônias e multiplicação dos microrganismos (BANIN et al., 2005). Já em baixos níveis de ferro, há um bloqueio da formação de microcolônias e estímulo a motilidade da bactéria (SINGH, 2004).

A formação de biofilme pode estar associada a um mecanismo de sinalização entre bactérias conhecido por *quorum-sensing*. Este mecanismo, que tem sido descrito tanto em relações simbióticas quanto em patogênicas, permite uma comunicação entre as bactérias por meio da expressão de pequenas moléculas sinalizadoras denominadas autoindutores (HASTINGS & GREENBERG, 1999; COLE et al., 2004). Os autoindutores são expressos de acordo com a densidade celular, e somente são efetivos quando

atingem um determinado limiar de concentração. Ao atingir este limiar, o sinal é desencadeado, indicando ao patógeno que o ambiente está propício para a sua instalação e início da expressão de inúmeros fatores de virulência (LITWIN & CALDERWOOD, 1993; BASSLER, 1999). Além de regular a formação de biofilme, o *quorum-sensing* participa de outras atividades como produção de antibiótico, expressão de genes de virulência e de motilidade das bactérias e regulação do sistema de captação de ferro (FERDELE & BASSLER, 2002; TAGA & BASSLER, 2003).

O reconhecimento dos autoindutores é específico para cada sistema de *quorum-sensing* (PARKER & SPERANDIO, 2009). A formação do biofilme sob influência do *quorum-sensing* tem sido descrita em algumas espécies de bactérias como *K. pneumoniae* (BALESTRINO et al., 2005), *Streptococcus pneumoniae* (SUNTHARALINGAM & CVITKOVITCH, 2005) e *Vibrio cholerae* (HAMMER & BASSLER, 2003).

1.5. Fur e seu sistema de regulação

Em bactérias patogênicas o ferro desempenha um papel crucial não apenas no metabolismo celular, mas também na regulação da expressão de inúmeros fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade da bactéria. Os efeitos do ferro na regulação da expressão dos genes de virulência são mediados pelo regulador transcricional Fur (do inglês, *Ferric uptake regulator*).

Homólogos do gene *fur*, que codifica o regulador Fur, têm sido descritos tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, inclusive em muitos patógenos humanos como *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia*, *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Neisseria* e *Staphylococcus* (ESCOLAR et al., 1999). A maioria destes homólogos são capazes de complementar linhagem de *E. coli* mutante para o gene *fur*, indicando que o mecanismo de regulação mediado pelo ferro por intermédio do Fur é comum a estes microrganismos (ESCOLAR et al., 1999).

A proteína Fur apresenta dois domínios necessários para seu mecanismo de ação. O domínio carboxi terminal contém sítios de ligação a íons metálicos divalentes, podendo ser ocupados *in vitro* por Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} e, com mais afinidade, por Fe^{2+} .

Estes sítios de ligação aos íons metálicos são importantes para as interações proteína-proteína que levam à dimerização da proteína Fur. O domínio amino terminal contém um motivo do tipo hélice-volta-hélice (tradução livre do inglês *helix-turn-helix*) que é responsável pelo reconhecimento e ancoragem ao DNA (HANTKE, 2001).

O regulador transcricional Fur controla a expressão gênica conforme a disponibilidade de ferro no meio. Isto porque em seu processo de regulação o Fur requer íon ferroso (Fe^{2+}) como correpressor. Em locais onde há excesso de ferro, a forma dimérica do Fur se liga ao Fe^{2+} e esta ligação induz uma alteração conformacional no complexo que faz com que os dímeros de Fur sejam capazes de reconhecer e se ligar a sequências nucleotídicas específicas, conhecidas como boxes Fur, localizados na região promotora dos genes alvos.

A sequência nucleotídica dos boxes Fur é um palíndromo de aproximadamente 19 pares de bases (pb) formado por 2 repetições invertidas de 9 pb ricas em adeninas e timinas, tal como GATAATGAT-a-ATCATTATC (ESCOLAR et al., 1999). Alternativamente é possível interpretar a sequência dos boxes Fur como uma sequência de repetições triméricas de 6 pb, sendo duas repetições diretas seguidas de uma indireta, tal como GATAAT-GATAAT-c-ATTATC (ESCOLAR et al., 1999; KADNER, 2005). O tamanho mínimo dos boxes Fur é de 19 pares de bases, porém em alguns casos foram encontrados boxes Fur com mais 3 repetições (KADNER, 2005).

A ligação do complexo $\text{Fur}+\text{Fe}^{2+}$ no box Fur impede o acesso da RNA polimerase à região promotora do gene alvo, levando à repressão da transcrição dos genes alvos. Na ausência do íon ferroso, como ocorre em condições de escassez de ferro, não há a formação do complexo $\text{Fur}+\text{Fe}^{2+}$, que não se liga ao box Fur nos genes alvos, deixando livre a região promotora para a ligação da RNA polimerase e a transcrição dos genes (ESCOLAR et al., 1999).

Em seu mecanismo clássico de ação o regulador Fur tem papel de repressor, impedido a transcrição dos genes alvos, principalmente de genes de captação de ferro. No entanto, alguns relatos na literatura têm mostrado que o regulador Fur pode atuar também como ativador da expressão de alguns genes alvos, seja de maneira direta ou de maneira indireta, por meio de um mecanismo de regulação pós-transcricional.

Porém, enquanto que o mecanismo de repressão por Fur é um processo bem conhecido e caracterizado, os mecanismos de regulação positiva por este regulador ainda são pouco compreendidos.

Delany e coautores (2001) mostraram que em *Helicobacter pylori* o íon ferroso pode diminuir a eficiência de ligação do Fur com a região promotora de determinados genes alvos. Neste caso, o íon ferroso estaria atuando como um indutor da expressão, e não como correpressor como ocorre no mecanismo clássico de repressão do Fur. O papel do Fur como regulador positivo da transcrição em *H. pylori* também foi relatada por Danielli e colegas (2006) que mostraram que o Fur induz a expressão de genes envolvidos com a motilidade e quimiotaxia, dois processos essenciais para a virulência desta bactéria, pois permite a colonização da mucosa gástrica. A ação ativadora do regulador Fur também tem sido descrita em *Neisseria meningitidis*. Delany e colaboradores (2004) demonstraram que em *N. meningitidis* Fur atua como uma proteína ativadora que se liga diretamente à região promotora de alguns genes alvos, induzindo a transcrição desses genes.

O regulador Fur também induz a expressão de determinados genes por meio de um mecanismo de regulação pós-transcricional. Este tipo de regulação envolve genes que codificam pequenos RNAs não codificantes e que estão sob o controle do repressor Fur. Estes pequenos RNAs apresentam sequência nucleotídica complementar ao RNA mensageiro (mRNA) dos genes alvos. Atuando como um RNA *anti-sense*, estes pequenos RNAs se anelam com o mRNA alvo, e este híbrido é rapidamente degradado por RNases, levando à não expressão daqueles genes (AFONYUSHKIN et al., 2005). Assim, Fur induz a expressão de determinados genes ao reprimir a expressão de pequenos RNAs reguladores que degradariam o mRNA destes genes.

Em *E. coli*, por exemplo, Fur reprime o gene *ryhB*, que codifica um pequeno RNA envolvido com a repressão da expressão de proteínas que estocam ferro em condições de privação de ferro (MASSE & GOTTESMAN, 2002). RyhB, que possui sequência nucleotídica altamente conservada, e homólogos ao *ryhB* de *E. coli* têm sido descritos em outras bactérias patogênicas tais como em *Neisseria gonorrhoeae* (MELLIN et al.,

2007), *Pseudomonas aeruginosa* (OGLESBY et al., 2008), e em *Shigella dysenteriae* (MURPHY & PAYNE, 2007). Recentemente Huang e coautores (2012) demonstraram que em *Klebsiella pneumoniae* RyhB tem um papel importante na patogenicidade desta bactéria, sobretudo na biosíntese de cápsula polissacarídica e nos sistemas de captação de ferro.

Apesar de inicialmente descrito como um regulador de genes de captação de ferro, Fur é considerado um regulador global que controla a expressão de genes envolvidos nos mais diversos processos celulares, tais como no metabolismo energético (QUATRINI et al., 2005), na tolerância a acidez (HALL & FOSTER, 1996), resposta ao estresse oxidativo (COOKSLEY et al., 2003) e na patogenicidade bacteriana. Dentre os fatores de virulência regulados por Fur destacam-se os mecanismos envolvidos no sistema de captação de ferro (LIN et al., 2011), formação de biofilme (JOHNSON et al., 2005), biossíntese de cápsula polissacarídica (CHENG et al., 2010; LIN et al., 2011), na expressão de fímbrias (WU et al., 2012), na expressão de hemolisinas e citotoxinas (TORRES et al., 2010; SINEVA et al., 2012).

Sendo um regulador global, Fur atua também no controle da expressão de inúmeros genes reguladores, seja transcricionais ou pós-transcricionais. Dentre os genes reguladores potencialmente modulados por Fur destacam-se genes que codificam pequenos RNAs reguladores, genes que codificam fatores de transcrição do *quorum-sensing* da família *luxR*, genes de sistemas de transdução de sinal de dois componentes, e genes que codificam fatores sigmas de função extracitoplasmática (HANTKE, 2001). Invariavelmente estes genes reguladores modulados por Fur controlam, por sua vez, a expressão de inúmeros fatores de virulência.

Denomina-se *regulon* Fur ao conjunto de todos os genes cuja expressão está sob o controle do regulador Fur. Inúmeras estratégias experimentais têm sido empregadas para a identificação de genes do *regulon* Fur, tais como análises de bioinformática (QUATRINI et al., 2007), ensaio FURTA (STOJILJKOVIC et al., 1994) e *DNA microarray* (DELANY et al., 2006). Dentre estas metodologias, as análises de bioinformática têm permitido a identificação de novos genes que pertencem ao *regulon* Fur a partir da identificação de novos boxes Fur e dos genes alvos correspondentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização molecular do repressor Fur de *Klebsiella pneumoniae*, e a investigação de seu papel na expressão de reguladores de transcrição associados a fatores de virulência.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar, por análises de bioinformática, prováveis boxes Fur na região promotora do gene *fur* e de genes que codificam reguladores de transcrição em *Klebsiella pneumoniae*.
2. Validar os prováveis boxes Fur pelo ensaio FURTA.
3. Investigar o padrão de expressão do gene *fur* a partir de células de *K. pneumoniae* cultivadas em meio LB (condição controle), e a partir de células isoladas após 30 minutos de incubação após a adição de ferro (FeSO_4) ou de quelante de ferro (2,2'-dipiridil).
4. Construir um modelo tridimensional da proteína Fur de *K. pneumoniae* por meio da modelagem molecular por homologia.
5. Caracterizar o regulador Fur de *K. pneumoniae* por meio da transformação de *E. coli* linhagem H1780 com vetor *pGEM[®]-T Easy* clonado com o gene *fur*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo de *Klebsiella pneumoniae*

Para este estudo foi utilizada a bactéria *Klebsiella pneumoniae* linhagem ATCC 10031. A bactéria foi cultivada a 37°C em meio de cultura LB sólido ou líquido. Os meios foram suplementados com 100 µM de FeSO₄, na condição repleta de ferro, ou 100 µM do quelante de ferro 2,2'-dipiridil, na condição de privação de ferro (Figura 1).



Figura 1: Cultivo de *K. pneumoniae* em meio LB líquido, e nas condições repleta e de privação de ferro.

3.2. Identificação de prováveis boxes Fur por análises de bioinformática

A identificação de prováveis boxes Fur na região promotora do gene *fur* e de genes que codificam reguladores de transcrição em *Klebsiella pneumoniae* foi realizada por análises de bioinformática, utilizando-se a metodologia empregada por Quatrini e colaboradores (2007) e Schneider (1997), com algumas modificações. Esta etapa do trabalho contou com a colaboração do Prof. Dr. Renato Vicentini (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, da Unicamp).

Para esta análise, boxes Fur de outras *Enterobacteriaceae* foram utilizados para a construção de uma sequência consenso e esta sequência foi utilizada como matriz para a identificação de prováveis boxes Fur na região promotora do gene *fur* e de genes que codificam reguladores de transcrição em *K. pneumoniae*. Foram consideradas as sequências que cumpriram os seguintes parâmetros: 1) tamanho de

19 pares de bases; 2) escore de similaridade maior que 10 *bits*; 3) distância máxima de até 600 pares de bases do códon iniciador do gene alvo, e 4) a presença de nucleotídeos mais conservados entre os boxes Fur de outras bactérias.

3.3. Validação dos prováveis boxes Fur pelo ensaio FURTA em *E. coli* H1717

Os boxes Fur identificados foram validados pelo ensaio FURTA (do inglês *FUR Titration Assay*) conforme descrito por Stojiljkovic e coautores (1994). As células de *E. coli* linhagem H1717 utilizadas neste ensaio foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Klaus Hantke (Universidade de Tübingen, Alemanha).

Para este ensaio oligonucleotídeos, fitas sense e antissense complementares, contendo a sequência nucleotídica dos prováveis boxes Fur identificados foram anelados formando sondas dupla fita. Estas sondas foram clonadas em vetores *pGEM[®]-T Easy* (Promega) por meio do uso da enzima *T4 DNA ligase* (Promega). Células de *E. coli* H1717 foram transformadas com os vetores contendo as sequências, e plaqueadas em meio de cultura MacConkey contendo 50 mg/mL de antibiótico Amp e 50 µM de FeSO₄, e incubadas por 12 horas a 37°C. A validação dos boxes é confirmada de acordo com o padrão de coloração das colônias.

A linhagem de *E. coli* H1717 possui inserido em seu cromossomo uma construção composta do box Fur do gene *fhuF* mais o gene *lacZ* (que codifica β-galactosidase). A dinâmica do ensaio ocorre quando o Fur se dissocia da construção boxFur_{fhuF}-*lacZ* para se ligar aos prováveis boxes contidos nos vetores recombinantes. Ao se desligar da construção, o gene da β-galactosidase é transcrito e resulta em colônias vermelhas no meio MacConkey, indicando que o vetor contém box Fur funcional. A ausência de coloração avermelhada indica que Fur permaneceu ligado à construção boxFur_{fhuF}-*lacZ* e reprimiu a expressão da β-galactosidase, indicando que o vetor não possui um box Fur funcional (STOJILJKOVIC et al., 1994).

O ensaio FURTA foi realizado a partir de dois cultivos independentes para cada um dos boxes investigados, e foi conduzido utilizando-se como controles o vetor *pGEM[®]-T Easy* contendo um box Fur previamente validado (controle positivo) e o vetor *pGEM[®]-T Easy* apenas (controle negativo).

3.4. Caracterização do padrão de expressão do gene *fur*

Experimentos de PCR em tempo real foram realizados para se investigar o padrão de expressão do gene *fur* em células de *K. pneumoniae* mantidas na presença e ausência de ferro. Para tal, as células foram cultivadas a 37°C e 200 r.p.m. de agitação, e o crescimento bacteriano foi monitorado por meio de leitura espectrofotométrica da densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm (D.O._{600nm}). As células foram cultivadas até que atingissem a fase intermediária de crescimento (*mid-log*); isto é, até que atingissem uma D.O._{600nm} de 0.4. Neste ponto, 100 µM (concentração final) de FeSO₄ foi adicionado em um dos frascos e 100 µM (concentração final) de 2,2'-dipiridil foi adicionado em outro frasco. No terceiro frasco nada foi adicionado, constituindo-se assim em condição controle. Após a adição dos suplementos, as células foram incubadas por 30 minutos e em seguida as células foram isoladas por centrifugações. Para a estabilização e preservação do RNA, as células foram isoladas e armazenadas em *RNAprotect[®] Bacteria Reagent* (Qiagen) a -80°C, até o momento da extração do RNA total.

A extração do RNA total foi realizada com o kit *RNeasy Protect Bacteria Mini Kit* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. Inicialmente as células foram ressuspendidas e lisadas por 15 minutos em tampão TE contendo 15 mg/mL de lisozima e 10 uL de pronase (concentração de 1 mg/mL), preparados com água tratada com DEPC. Em seguida foram adicionados os reagentes do kit em volumes determinados conforme as instruções do fabricante. As amostras foram depositadas nas colunas de purificação e após a precipitação do RNA com etanol e as lavagens sucessivas por centrifugações foi feito o tratamento com DNase (*RNase-Free DNase Set 50*, Qiagen) para a remoção de DNA. Após isso o RNA total foi eluído da coluna por centrifugação e a concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro. O RNA total extraído foi mantido em ultrafreezer -80°C até o momento de sua utilização na síntese de cDNA.

A síntese do cDNA foi realizada com o kit *ThermoScript[™] RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis* (Invitrogen), a partir de 3 µg de RNA total extraído e de acordo com as instruções do fabricante. Além do RNA total, as reações consistiram de

2 μL de um mix de dNTPs (10 mM), 1 μL de primer hexâmero randômico (50 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$) e quantidade suficiente de água tratada com DEPC para um volume final de 12 μL . Esta mistura foi submetida à desnaturação por 5 minutos a 65°C. Após este período de incubação, foram acrescentados 4 μL de tampão de reação (5x), 1 μL de DTT (100 mM), 1 μL de *RNaseOUT*TM (40U/ μl), 1 μL de água tratada com DEPC e 1 μL da enzima *ThermoScript*TM RT (15 U/ μL). Esta mistura foi inicialmente incubada por 10 minutos a 25°C, seguida de incubação por 50 minutos a 50°C. A reação foi finalizada após incubação por 5 minutos a 80°C. Em seguida, foi acrescentado 2 unidades de RNase H e a reação foi incubada por 20 minutos a 37°C. Os cDNAs sintetizados foram então quantificados em espectrofotômetro e utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Como controles internos dos experimentos de PCR em tempo real foram utilizados os genes endógenos *rho*, que codifica um fator envolvido com a terminação da transcrição, e *recA*, que codifica uma enzima envolvida com o processo de recombinação do DNA. Os pares de primers para os genes *fur*, *rho* e *recA* (Tabela 1) foram previamente testados por PCR convencional a partir de DNA genômico de *K. pneumoniae*, para se averiguar a eficiência de amplificação dos genes. Estes primers foram desenhados com o programa *Primer3 v. 0.4.0* (ROZEN & SKALETSKY, 2000) de maneira que tivessem temperatura de anelamento de 60°C e que rendessem amplicons com tamanhos entre 95 a 110 pares de bases.

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos primers utilizados nas reações de PCR em tempo real. O tamanho dos amplicons está representado em pares de bases.

Gene	Primer Sense (5' > 3')	Primer Antissense (5' > 3')	Amplicon
<i>Fur</i>	ATTAAGAAGGCTGGCCTGAA	GCGTTTATATAAGTCTTCCGCAC	106
<i>recA</i>	TTAAACAGGCCGAATTCCAG	CCGCTTTCTCAATCAGCTTC	99
<i>Rho</i>	AACTACGACAAGCCGGAAAA	ACCGTTACCACGCTCCATAC	99

As reações foram realizadas em triplicatas no equipamento *Real-Time PCR System 7500* (Applied Biosystems) e com o kit *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR*

SuperMix-UDG (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Ao final, uma etapa adicional de dissociação foi realizada com o intuito de se verificar a especificidade da reação, ou seja, a possível presença de bandas inespecíficas e/ou dímeros de primers. A análise dos dados gerados foi feita com o auxílio do *Sequence Detection Software v1.3.1* (Applied Biosystems). Para o cálculo da expressão relativa dos genes foi utilizado o método $\Delta\Delta C_T$, como descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os dados obtidos nos experimentos de PCR em tempo real foram analisados estatisticamente com o teste *t* de *Student*.

3.5. Modelagem molecular por homologia da proteína Fur de *K. pneumoniae*

A estrutura tridimensional da proteína Fur de *K. pneumoniae* foi predita por meio da técnica de modelagem molecular por homologia. Esta etapa do projeto contou com a colaboração do Prof. Dr. Renato Vicentini (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, da Unicamp). A construção do modelo envolveu as seguintes etapas: 1) identificação e seleção de proteínas Fur de outras bactérias com estrutura tridimensional já definida e que serviram de moldes, 2) alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína molde e da proteína Fur de *K. pneumoniae*, 3) construção do modelo a partir das coordenadas, e 4) validação e análise do modelo.

A busca por proteínas Fur de outras bactérias que serviram de moldes foi feita a partir de análises por BLASTP no banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB, www.pdb.org). Foram escolhidas sequências que apresentaram identidade superior a 40% quando alinhadas com a proteína Fur de *K. pneumoniae*. A construção do modelo foi feita com o auxílio do programa *Modeller 9v5* (<http://salilab.org/modeller/>). Este programa realiza o alinhamento das sequências juntamente com as coordenadas tridimensionais da proteína molde, respeitando regras geométricas estruturais derivadas dos moldes.

3.6. Caracterização do regulador Fur pelo Ensaio FURTA em *E. coli* H1780

3.6.1. Amplificação e clonagem do gene fur de *K. pneumoniae*

Para a amplificação do gene *fur* de *Klebsiella pneumoniae*, células cultivadas em meio LB líquido foram isoladas por centrifugação e submetidas à extração de DNA genômico com o kit *Wizard® Genomic DNA purification Kit* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Os primers sense (S) e antissense (AS) utilizados na amplificação do gene *fur* (Tabela 2) foram desenhados com o auxílio da ferramenta de bioinformática *Primer3 v. 0.4.0* (ROZEN & SKALETSKY, 2000) e apresentaram temperatura de anelamento de 62°C.

Tabela 2. Par de primers utilizado para a amplificação do gene *fur* por PCR.

Primers	Sequência (5' > 3') ¹	Amplicon
ex_Fur-S	GTCGCATATGATGACTGACAACAATACC	472 pares de bases
ex_Fur-AS	TATCTCGAGTTATTTTTCCACCGCG	

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL e continha os seguintes reagentes (em concentração final): tampão de PCR 1x, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada *primer*, 0,5 µg de DNA genômico de *K. pneumoniae*, 2,5 unidades de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen) e quantidade suficiente de água autoclavada para o volume final de 25 µL. As condições da reação de PCR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os ciclos, as amostras foram submetidas a uma etapa adicional de extensão a 72°C por 10 minutos.

O produto de amplificação foi submetido à corrida de eletroforese em gel de agarose e purificado com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Para isso, as bandas no gel foram seccionadas, dissolvidas a 50°C em tampão próprio do kit e, em seguida, submetidas à purificação por centrifugação em colunas fornecidas

pelo kit. No final, o gene *fur* amplificado foi eluído em água ultrapura (livre de nucleases), e utilizado nos experimentos de clonagem.

O gene *fur* foi clonado no vetor *pGEM[®]-T Easy* (Promega) por meio de reação de ligação com a enzima *T₄ DNA ligase*, conforme instruções do fabricante (Promega). Células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com o vetor *pGEM[®]-T Easy* clonado com o gene *fur* (*pGEM+fur*), plaqueadas em meio LB sólido contendo 50 mg/mL de Amp e X-gal, e foram incubadas por 12 horas a 37°C. Os plasmídios recombinantes foram extraídos das células transformadas por meio de minipreparações (*minipreps*) com o kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps* (Promega). Em seguida, os plasmídios foram analisados em espectrofotômetro, para verificar a concentração e o grau de pureza do DNA plasmidial.

Para se determinar a orientação do gene *fur* no vetor, se na orientação sense (vetor *pGEM+fur_{sense}*) ou antissense (vetor *pGEM+fur_{antissense}*), os vetores obtidos nas *minipreps* foram submetidos a reações de PCR utilizando a combinação dos primers M13-F e Fur-Kleb-F, se na orientação sense, ou dos primers M13-F e Fur-Kleb-R, se na orientação antissense (Tabela 3). A reação de PCR foi realizada conforme condições já descritas (página anterior), com a exceção de que foi utilizado 0,2 μ g de DNA plasmidial extraído nas *minipreps* e temperatura de anelamento dos primers de 65°C. Após as reações, os produtos de amplificação foram submetidos à corrida de eletroforese em gel de agarose 1%, e a definição da orientação do gene foi determinada conforme o tamanho dos fragmentos: 550 pares de bases se na orientação sense e 250 pares de bases se na orientação antissense.

3.6.2. Ensaio FURTA em *E. coli* H1780 clonada com o gene *fur* de *K. pneumoniae*

A linhagem de *E. coli* H1780 também possui a construção *boxFur_{fluF}-lacZ* inserida em seu cromossomo. Porém, diferentemente da linhagem H1717 a linhagem H1780 possui o seu gene *fur* inativado e, portanto, apresenta uma proteína Fur não funcional. Com isso, na ausência do regulador Fur o gene repórter *lacZ* é continuamente expresso, o que resulta em colônias vermelhas (fenótipo Lac⁺). Ao passo que, se for inserido nestas linhagens o gene *fur*, por complementação o

regulador Fur será expresso e irá reprimir a expressão da enzima β -galactosidase, resultando em colônias incolores (fenótipo Lac⁻).

Neste experimento células de *E. coli* H1780 foram transformadas com o vetor recombinante *pGEM+fur_{antisense}* e, em seguida, plaqueadas em meio de cultura MacConkey contendo 50 mg/mL de Amp e 50 μ M de FeSO₄ e incubadas a 37°C por 12 horas. Após a incubação a coloração das colônias foi checada para se determinar o fenótipo Lac, se positivo ou negativo.

3.6.3. Indução da expressão do gene fur de *K. pneumoniae* em *E. coli* H1780

A expressão do gene *fur* de *K. pneumoniae* foi induzida em *E. coli* linhagem H1780. Para isso, linhagens de *E. coli* H1780 transformadas com o vetor recombinante *pGEM+fur_{antisense}* foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo 50 mg/mL de Amp e submetidas ao crescimento a 37 °C em 180 r.p.m. de agitação. Após o crescimento bacteriano atingir uma D.O._{600nm} de 0.6 a expressão do gene *fur* foi induzida a partir da adição de 1 mM de IPTG e incubação a 37 °C por 4 horas e 180 r.p.m. de agitação. Após este período, as células foram coletadas por centrifugações e o pellet foi submetido à lise para a obtenção das proteínas totais.

A lise das células foi realizada após ressuspensão do *pellet* em 200 μ l de tampão de lise composto por Tris HCl a 50 mM em pH 8,0, 1 mM de PMSF, 5% de glicerol e 200 μ g/ml de lisozima. As amostras foram incubadas no gelo por 1 hora e misturadas por vortex a cada 10 minutos. Em seguida foi adicionado *DNase* e as amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após as incubações, as amostras foram centrifugadas a 10.000 r.p.m. por 15 minutos e a 4°C para separação do sobrenadante (fração solúvel) e do precipitado (*pellet*, fração insolúvel).

As amostras obtidas nas frações solúveis e insolúveis foram analisadas em gel SDS-PAGE composto por duas partes: gel de empacotamento a 5% na porção superior e um gel de separação a 15% na porção inferior. O aparato do gel de poliácridamida foi montado com espaçadores de 0,75 mm de espessura. Inicialmente foi depositado no aparato o gel de separação em concentração final de 15%. Este gel consistiu de 1,3 mL

de Tris-HCL 1,5 M em pH 8,8, 2,5 mL de bis-acrilamida na proporção 1:29 e a 30% de concentração, 50 µL de SDS 10%, 85 µL de persulfato de amônia (0,1 µg/ml), 15 µL de TEMED e água autoclavada em quantidade suficiente para um volume final de 5 mL. Após depositar o gel de separação foi adicionado aproximadamente 1 mL de propanol para evitar que o gel secasse e se enrugasse enquanto ocorresse a polimerização do gel, o que levou entre 30 a 60 minutos. Após a polimerização do gel de separação foi descartado o propanol e foi depositado o gel de empacotamento em concentração final de 5%. Este consistiu de 0,375 mL de Tris-HCL 1,0 M em pH 6,8, 0,5 mL de bis:acrilamida na proporção 1:29 e a 30% de concentração, 30 µL de 10% de SDS, 50 µL de persulfato de amônia (0,1 µg/ml), 10 µL de Temed e água autoclavada em quantidade suficiente para um volume final de 3 mL.

As amostras foram aplicadas no gel, na seguinte proporção: 20 µL das frações foram misturadas a 10 µL de tampão de amostra 3x (50 mM de Tris-HCl em pH 6,8, 45% de glicerol e 2% de SDS). Esta mistura foi fervida por 5 minutos a 95°C, aplicadas no gel e submetidas a eletroforese por 1 hora a 120V. Após a corrida as proteínas totais presentes nas frações solúveis e insolúveis foram visualizadas após coloração do gel em solução contendo o corante *Coomassie Blue* (0,25% de *Coomassie Blue* R-250, 10% de ácido acético e 50% de etanol) por 1 hora e, em seguida, descorado em solução descorante (10% de etanol e 5% de ácido acético).

3.7. Técnicas básicas de biologia molecular

As técnicas básicas de biologia molecular como extração de DNA, eletroforese de ácidos nucleicos, digestão enzimática do DNA, clonagens, foram realizadas conforme Sambrook e coautores (1989).

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Identificação de boxes Fur por bioinformática e validação pelo ensaio FURTA

Foram identificados prováveis boxes Fur na região promotora do gene *fur* e dos genes *fimZ*, *rseA*, *rstR* e *sdiA* que codificam reguladores de transcrição potencialmente envolvidos com a expressão de genes de virulência. Na Tabela 3 estão representadas as sequências nucleotídicas dos prováveis boxes Fur identificados, a localização dos boxes e os respectivos escores de cada box Fur.

Tabela 3. Prováveis boxes Fur identificados na região promotora de genes que codificam reguladores de transcrição em *K. pneumoniae*.

Gene	Função	Box Fur	Localização	Escore
<i>fur</i>	regulador de captação de ferro.	CGTAATGCGTCTCATTATA	66 pb	12.50
<i>fimZ</i>	regulador transcricional de expressão de fimbrias.	TATGATTATTATCATTCC	2 pb	14.38
<i>rseA</i>	fator anti Sigma E (anti RNA polimerase).	GAAC TTTATTATCAATAGC	52 pb	10.76
<i>rstR</i>	Repressor de um sistema de dois componentes.	CAAATTGAAAATTAATGTT	74 pb	10.30
<i>sdiA</i>	Regulador transcricional do <i>quorum-sensing</i> .	CTGATTGATAATCATTATT	53 pb	16.84

Com a identificação dos potenciais box Fur na região promotora dos genes alvos, o ensaio FURTA foi empregado para a validação dessas sequências nucleotídicas reguladas pelo repressor Fur. O ensaio de FURTA é uma técnica construída a partir da bactéria *Escherichia coli* linhagem H1717 no intuito de identificar genes específicos regulados por Fur. No entanto, é altamente sensível para a detecção de genes clonados que codificam proteínas reguladas por ferro, podendo ser utilizada tanto em bactérias gram-positivas quanto bactérias gram-negativas (STOJILJKOVIC et al., 1994). A proteína Fur é uma importante reguladora de transcrição com papel na regulação da

expressão de fatores de virulência em bactérias patogênicas, uma vez que ela reprime a transcrição de genes ao se ligar em sequências específicas, os boxes Fur, dependendo da disponibilidade de Fe^{2+} (FASSBINDER et al., 2000). A dinâmica da técnica de FURTA (Figura 2) é realizada quando o repressor Fur se dissocia do box Fur do gene *thuF*, que regula a expressão do gene repórter *lacZ* para a codificação de β -galactosidase, e se liga ao box Fur clonado de interesse, na presença de ferro. A transcrição de β -galactosidase resulta em colônias vermelhas no meio MacConkey indicando presença de box Fur funcional (STOJILJKOVIC et al., 1994). Na ausência de uma sequência funcional a dinâmica não é observado e resulta em colônias incolores.

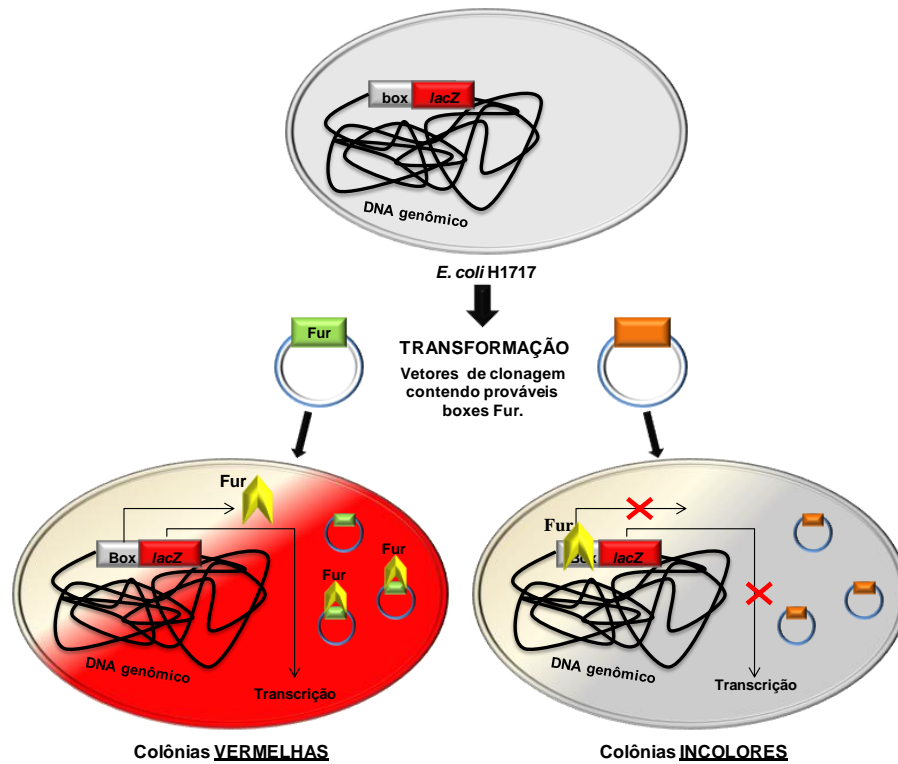


Figura 2. Princípio do ensaio FURTA. Célula *E. coli* H1717 é transformada com vetores de clonagem contendo prováveis boxes Fur, e plaqueada em meio MacConkey contendo ferro. Na dinâmica do ensaio, o repressor Fur se dissocia do box Fur, que regula o gene repórter *lacZ* (codifica β -galactosidase), e se liga ao box Fur clonado. A transcrição de β -galactosidase resulta em colônias vermelhas indicando presença de box Fur funcional. Na ausência de uma sequência funcional a dinâmica não é observado e resulta em colônias incolores.

O ensaio FURTA foi realizado com células de *E. coli* H1717 transformadas com vetor *pGEM*[®]-*T Easy* contendo um box Fur previamente validado (controle positivo), com *E. coli* H1717 transformadas com vetor *pGEM*[®]-*T Easy* sem box Fur (controle negativo) e com *E. coli* H1717 transformadas com vetores *pGEM*[®]-*T Easy* clonados com os boxes Fur identificados nos genes *fur*, *fimZ*, *rseA*, *rstR* e *sdiA*. As células foram incubadas a 37°C por 12 horas em meio indicador MacConkey contendo 50µM de FeSO₄ e a validação dos boxes Fur foi averiguada conforme a presença da cor avermelhada nas colônias, indicando presença de box Fur funcional.

Todos os genes analisados apresentam boxes Fur funcionais (válidos), conforme pode ser constatado pelas colônias com coloração avermelhada na Figura 3. Nesta Figura pode-se observar um controle positivo de cor avermelhada (presença de box Fur funcional), um controle negativo incolor (ausência de box Fur), e a confirmação funcional dos boxes Fur identificados.

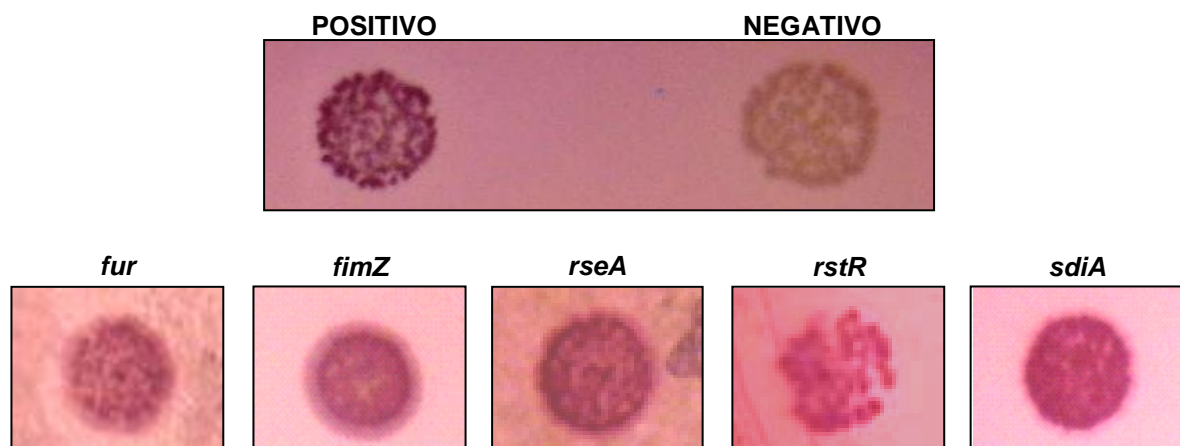


Figura 3. Validação dos boxes Fur pelo ensaio FURTA. Os cinco boxes clonados no vetor *pGEM*[®]-*T Easy* apresentaram colônias vermelhas nas placas, após serem inseridos em *E. coli* H1717 e cultivos em meio indicador MacConkey contendo ferro. A análise foi realizada comparando-se com a coloração dos controles positivo (colônias vermelhas) e negativo (colônias incolores).

Quanto aos genes regulados por Fur identificados neste estudo é importante ressaltar que em *K. pneumoniae* Fur controla a expressão não apenas de genes envolvidos na captação de ferro, mas também de genes que codificam reguladores da expressão potencialmente envolvidos com a patogenicidade da bactéria.

O gene *rstR*, por exemplo, codifica um repressor de um sistema de regulação de dois componentes que controla a expressão do gene *rstA* que, por sua vez, codifica uma proteína sensora envolvida com a formação de biofilme em *Salmonella enterica*, contribuindo assim para a patogenicidade daquela bactéria (CABEZA et al., 2007).

Em *Salmonella typhimurium* o gene *fimZ* codifica um regulador transcricional que induz a expressão do gene *fimA*, que codifica a maior subunidade das fimbrias (YEH et al., 1995). O gene *rseA* codifica o fator anti Sigma E. O fator Sigma E, por sua vez, controla a expressão de envolvidos com o transporte, a integridade celular e com a resposta da célula ao estresses (HEINRICH & WIERGET, 2009). A identificação de boxes Fur nos genes *fimZ* e *rseA* de *K. pneumoniae* é um resultado inédito na literatura e pode indicar que nestas bactérias a expressão dos genes fimbriais e do fator Sigma E é modulada por Fur de acordo com a disponibilidade de ferro no meio.

O gene *sdiA* codifica um regulador transcricional, SdiA, envolvido nas comunicações intra e inter-espécies e que regula a expressão de determinados genes por meio do mecanismo de *quorum-sensing*. SdiA tem um papel importante na patogenicidade de *E. coli*, pois diminui a formação de biofilme (LEE et al., 2009b), reprime a expressão de fatores de virulência (KANAMARU et al., 2000), aumenta a resistência a drogas (RAHMATI et al., 2002) e aumenta a tolerância a acidez (VAN HOUDT et al., 2006). Volf e colaboradores (2002) identificaram um box Fur na região promotora do gene *sdiA* de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. A deleção deste box Fur resultou em um aumento na transcrição de SdiA, indicando que a expressão do gene é regulada por Fur. Segundo aqueles autores, o gene *sdiA*, cuja expressão é modulada de acordo com a disponibilidade de ferro e da densidade celular, pode desempenhar um papel importante na regulação da virulência em *S. enterica*.

4.2. Caracterização do padrão de expressão do gene *fur*

O padrão de expressão do gene *fur* foi avaliado por PCR em tempo real a partir de células de *K. pneumoniae* cultivadas em meio LB (condição controle), e de células isoladas após 30 minutos de incubação após a adição de ferro (100 μ M de FeSO₄) ou 2,2'-dipiridil (100 μ M).

Conforme mostra a Figura 4, o gene *fur* apresenta padrão de expressão induzido na condição de escassez de ferro (1,95x, *p-value* de 0,002) e reprimido na condição repleta de ferro (0,57x, *p-value* de 0,005), quando comparado à condição controle. Este padrão de expressão e a presença de um box Fur funcional na região promotora do gene *fur* indicam que este gene apresenta um mecanismo de autorregulação.

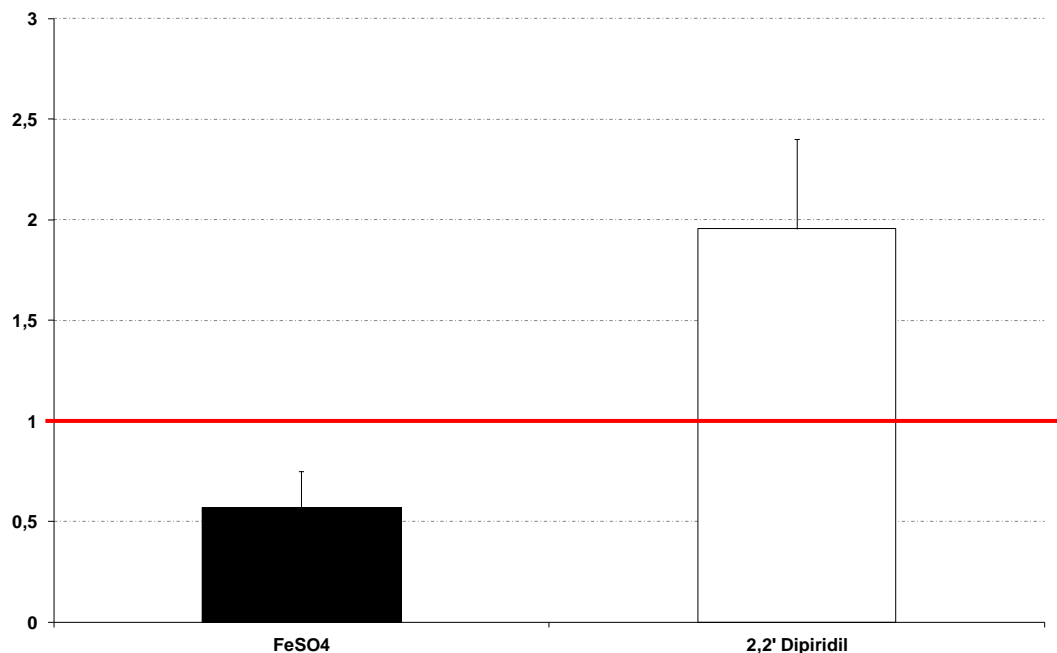


Figura 4. Padrão de expressão do gene *fur* nas condições repleta de ferro (FeSO₄) e em privação de ferro (2,2' Dipiridil). Os dados são relativos ao padrão de expressão do gene em células cultivadas na condição controle (meio LB apenas, indicado pela linha vermelha). Os resultados são estatisticamente significativos (*p-value* < 0.05), conforme revelou a análise estatística pelo teste *t* de Student.

O padrão de expressão do gene *fur* induzido em condição de escassez de ferro e reprimido na condição repleta de ferro, além da identificação e validação de um box Fur na região promotora deste gene, indicam que em *K. pneumoniae* o regulador Fur regula a sua própria expressão em resposta ao ferro. A autorregulação do gene *fur* já foi descrita também em *Helicobacter pylori* (DELANY et al., 2002), e em *Neisseria meningitidis* (DELANY et al., 2003).

4.3. Modelagem molecular por homologia da proteína Fur de *K. pneumoniae*

A construção de um modelo tridimensional (3D) da proteína Fur de *K. pneumoniae* foi realizada por meio da técnica de modelagem molecular por homologia. A modelagem molecular consiste em uma ferramenta de bioinformática que permite a análise profunda da estrutura molecular de determinado sistema biológico, ou seja, estuda a aplicação de modelos teóricos, utilizando para tanto, os conceitos de átomo e molécula (SANT'ANNA, 2009). De forma simplificada, pode ser considerada como conjunto de técnicas computadorizadas baseadas em métodos de química teórica e/ou dados experimentais.

O melhor molde utilizado na construção do modelo foi determinado por meio de uma busca de similaridade de sequências no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), a partir da sequência de aminoácidos da proteína Fur de *K. pneumoniae* e utilizando o programa *blastp*. Esta busca no PDB resultou na identificação de uma estrutura 3D da proteína Fur de *Vibrio cholerae* (código PDB 2w57, resolução de 2,6 Å) cuja sequência de aminoácidos apresentou alta homologia com a proteína Fur de *K. pneumoniae*. Como pode ser observado na Figura 5A, as sequências protéicas de Fur de *K. pneumoniae* de *Vibrio cholerae* apresentam 77% de identidade, com *E-value* de $7e-64$. A Figura 5B mostra a estrutura 3D da proteína Fur de *Vibrio cholerae* determinada por Sheikh e Taylor (2009), depositada no PDB sob o código 2w57, que foi utilizada como molde na construção da estrutura 3D da proteína Fur de *K. pneumoniae*.

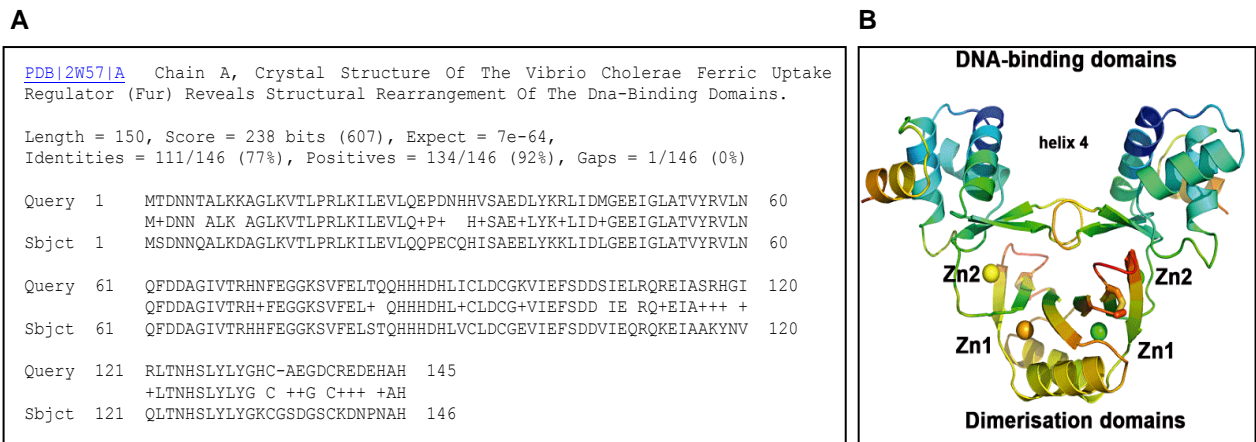


Figura 5. Em A, alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína Fur de *K. pneumoniae* (*query*) e de *Vibrio cholerae* (*sbjct*) mostrando a alta identidade entre elas. Em B, estrutura dimérica da proteína Fur de *V. cholerae* utilizada como molde na construção da proteína Fur de *K. pneumoniae*. A estrutura mostra os resíduos de ligação aos cátions divalentes e os domínios de dimerização e ligação ao DNA (extraída de Sheikh e Taylor, 2009).

O modelo da proteína Fur de *K. pneumoniae* (Figura 6A) gerado a partir do molde PDB 2w57 revelou-se extremamente acurado, conforme mostra o alinhamento de aminoácidos entre molde e modelo (perfil DOPE, Figura 6B).

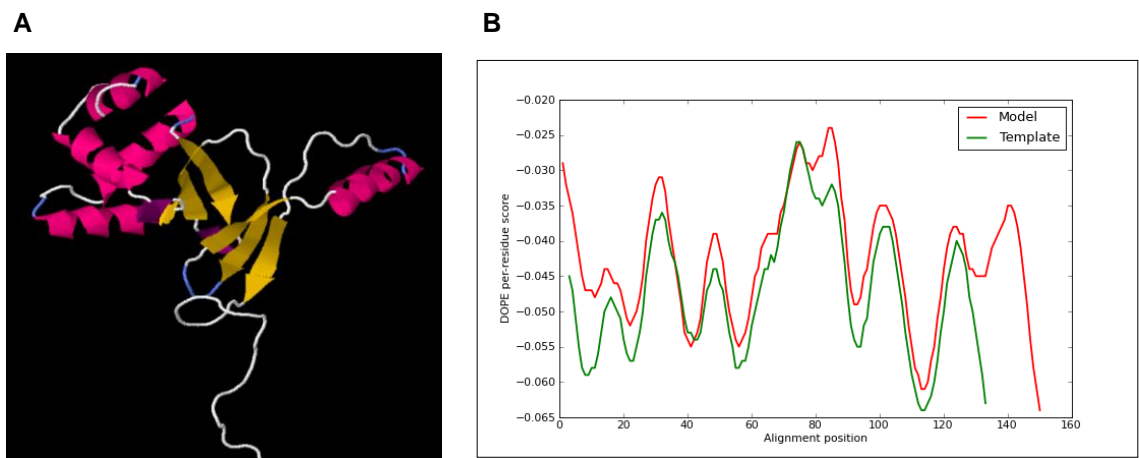


Figura 6. Em A, o modelo gerado da proteína Fur de *K. pneumoniae* gerado a partir da proteína Fur de *Vibrio cholerae*. Em B, perfil DOPE, o alinhamento de aminoácidos entre as duas proteínas Fur, o que mostra que o modelo gerado é acurado.

A técnica de modelagem molecular por homologia tem sido empregada na construção dos modelos tridimensionais da proteína Fur de bactérias tão distintas quanto *Dichelobacter nodosus* (PARKER et al., 2005), *Escherichia coli* (PECQUEUR et al., 2006), *Vibrio alginolyticus* (LIU et al., 2007), *Helicobacter pylori* (TSUGAWA et al., 2011), *Acidithiobacillus ferrooxidans* (FERRAZ et al., 2011) e *Campylobacter jejuni* (BUTCHER et al., 2012).

O estudo estrutural dos modelos gerados tem fornecido informações valiosas quanto ao mecanismo de ação da proteína Fur. Estes estudos tem resultado, por exemplo, na identificação de aminoácidos na proteína Fur que, quando mutados, conferem resistência da bactéria a antimicrobianos (TSUGAWA et al., 2011). Além disso, os estudos estruturais da proteína Fur têm contribuído para a elucidação dos domínios de dimerização, de ligação com os íons metálicos, e de interação com as sequências nucleotídicas alvo (BUTCHER et al., 2012).

4.4. Caracterização do regulador Fur pelo Ensaio FURTA em *E. coli* H1780

4.4.1. Confirmação por PCR da clonagem do gene fur no vetor pGEM[®]-T Easy

Para se determinar a orientação do gene *fur* no vetor pGEM[®]-T Easy, se na orientação sense (vetor pGEM+*fur*_{sense}) ou antissense (vetor pGEM+*fur*_{antissense}), os vetores obtidos nas *minipreps* foram submetidos a reações de PCR utilizando a combinação dos primers M13-F e Fur-Kleb-F, se na orientação sense, ou dos primers M13-F e Fur-Kleb-R, se na orientação antissense. Conforme mostra o esquema na Figura 7, a orientação do gene foi determinada conforme o tamanho dos fragmentos amplificados por PCR: 550 pares de bases se na orientação sense e 250 pares de bases se na orientação antissense.

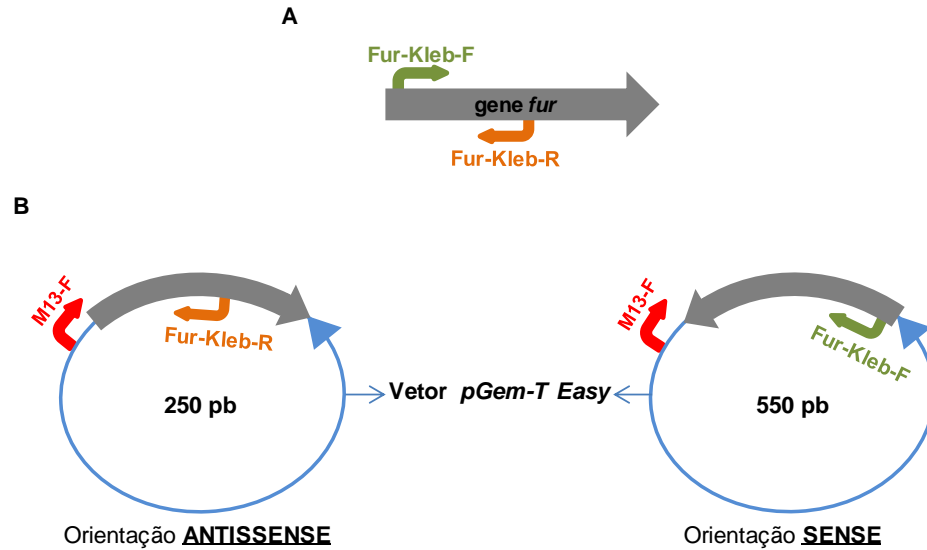


Figura 7. Esquemas com as posições de anelamento dos primers Fur-Kleb-F e Fur-Kleb-R no gene *fur* (A) e as orientações possíveis de ligação do gene *fur* no vetor *pGEM[®]-T Easy*, antissense ou sense (B). Para as reações de PCR foram utilizados os primers M13-F, que anela no vetor *pGEM[®]-T Easy*, e os primers específicos para o gene *fur*, Fur-Kleb-F ou Fur-Kleb-R, de acordo com a orientação do gene. Usando as combinações de primers foi possível identificar clones com o gene *fur* na orientação ANTISSENSE, identificada pelo produto de PCR de 250 pares de bases (pb), ou SENSE, identificada pelo produto de PCR de 550 pb.

Após amplificação dos clones, o produto da PCR foi submetido a uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1%. A Figura 8 mostra a identificação de vetores *pGEM+fur_{sense}* (550 pb) e *pGEM+fur_{antissense}* (250 pb).

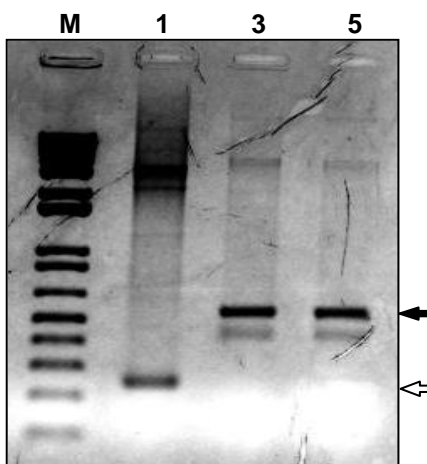


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a orientação do gene *fur* no vetor *pGEM[®]-T Easy*. Foram identificados vetores com o gene na orientação antissense (clone 1, 250 pb, seta branca), e vetores com o gene na orientação sense (clones 3 e 5, 550pb, seta preta). M, marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

4.4.2. Ensaio FURTA em *E. coli* H1780 clonada com o gene *fur* de *K. pneumoniae*

A técnica utilizada para esta caracterização da proteína Fur foi simples e rápida, pois a partir das células transformadas e plaqueadas em meio MacConkey contendo ferro é observado o padrão de coloração das colônias para se determinar a regulação positiva ou negativa do Fur.

A *E. coli* H1780, um pouco diferente da linhagem H1717, apresenta em seu DNA cromossômico uma construção composta do box Fur do gene *thuF* mais o gene *lacZ* que codifica β -galactosidase, que quebra a lactose presente no meio de cultura e faz com que as colônias apresentem coloração avermelhada. Porém, o gene *fur* na *E. coli* H1780 está inativo. No entanto, se por complementação um gene *fur* for inserido na H1780, uma vez expresso dentro da bactéria o Fur complexado ao ferro irá se ligar à construção $\text{boxFur}_{thuF-lacZ}$, reprimindo a transcrição do gene *lacZ* e resultando na ausência de β -galactosidase, o que conduz a colônias incolores. Se por outro lado o gene *fur* inserido na linhagem H1780 codificar uma proteína Fur não funcional, o complexo não irá se ligar à construção $\text{boxFur}_{thuF-lacZ}$ e a enzima β -galactosidase será expressa, resultando em colônias vermelhas.

O ensaio FURTA foi realizado somente com *E. coli* H1780 transformada com o vetor pGEM+*fur*_{antissense}; isto é, vetores clonados com o gene *fur* na orientação antissense. Nestas condições não foi observada a complementação em H1780 com a proteína Fur de *K. pneumoniae* (Figura 9).



Figura 9. Ensaio FURTA em *E. coli* H1780 transformada com o vetor pGEM+*fur*_{antissense}; isto é, vetores contendo o gene *fur* na orientação antissense. Como controle positivo foi utilizado a linhagem H1717. A presença de um gene *fur* ativo nesta linhagem garante a expressão de uma proteína Fur funcional, o que resulta em colônias incolores. A colônia avermelhada indica que a complementação de *E. coli* H1780 com o gene *fur* de *K. pneumoniae* não ocorreu.

Uma possível explicação para a não complementação talvez se deva às condições de cultivo em que o ensaio FURTA foi realizado. Novas padronizações são necessárias, principalmente quanto à concentração de ferro a ser adicionada no meio MacConkey. Outra possível explicação refere-se ao vetor recombinante utilizado na transformação de *E. coli* H1780, vetor pGEM+*fur*_{antissense} que apresenta o gene *fur* na orientação antissense. É possível que nesta orientação o gene *fur* não foi transcrito e, não havendo a expressão da Fur, não foi observada a complementação nas células H1780. Esta hipótese foi investigada, conforme descrito na seção seguinte.

4.4.3. Expressão da proteína Fur de *K. pneumoniae* em *E. coli* H1780

Para investigar se a não complementação no ensaio FURTA deveu-se à não transcrição do gene *fur* presente no vetor pGEM+*fur*_{antissense} e, conseqüentemente, à não expressão da proteína Fur, foram realizados experimentos de indução da expressão do gene com IPTG.

Após a indução da expressão, foi feita uma extração de proteínas totais frações solúveis e insolúveis, e estas foram analisadas após corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida. Conforme mostrado na Figura 10, a proteína Fur com 17,1 KDa não foi expressa, sobretudo após a indução da expressão com IPTG. Apenas a enzima lisozima com 14,7 KDa, presente no tampão de lise das células, foi observada.

A linhagem de *E. coli* H1780 possui o gene *fur* inativado e, portanto, não expressa a proteína Fur. Na ausência da proteína, o gene repórter *lacZ* não é reprimido e a enzima β -galactosidase é expressa, resultando em colônias vermelhas no meio MacConkey. O ensaio FURTA foi realizado com esta linhagem com o propósito de se investigar se o gene *fur* de *K. pneumoniae* complementa o gene *fur* inativado de *E. coli* H1780, o que resultaria em colônias incolores.

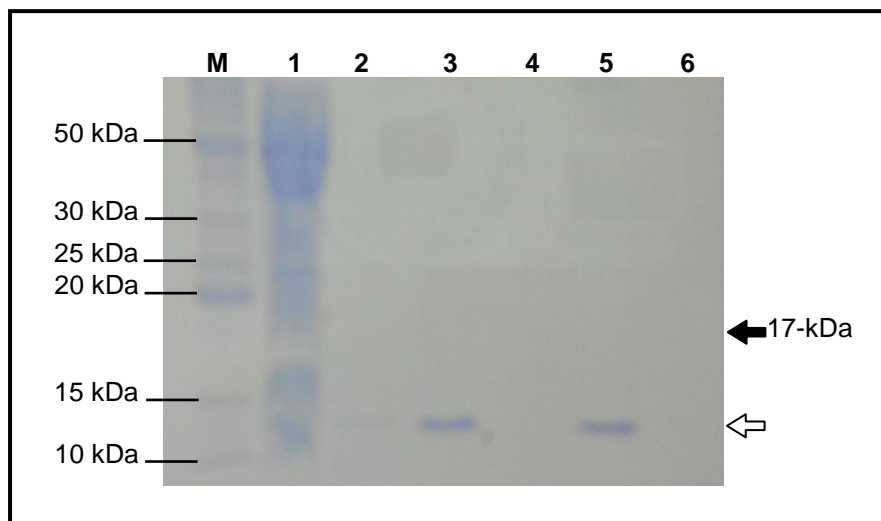


Figura 10. Gel de poliacrilamida mostrando as proteínas totais, frações solúveis e insolúveis, extraídas de *E. coli* H1780 não transformada, frações insolúvel (1) solúvel (2); *E. coli* H1780 transformada com o vetor pGEM+*fur*_{antisense} porém sem indução com IPTG, frações insolúvel (3) e solúvel (4); *E. coli* H1780 transformada com o vetor pGEM+*fur*_{antisense} e após a indução com IPTG, frações insolúvel (5) e solúvel (6). M, marcador de peso molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen). O resultado obtido não foi o esperado, pois a proteína Fur com tamanho de 17,1 kDa não foi observada na condição 5 ou 6 (após indução com IPTG, seta negra). A seta branca indica a banda correspondente à lisozima, presente no tampão de lise celular.

Os resultados obtidos mostram que não foi observada a complementação de *E. coli* H1780 porque, quando clonado no vetor pGEM[®]-T Easy na orientação antissense, o gene *fur* de *K. pneumoniae* não foi transcrito, conforme pôde ser constatado pela não expressão da proteína Fur de *K. pneumoniae* em H1780 (Figura 10). Sugere-se que em trabalhos futuros se realize o ensaio FURTA com *E. coli* H1780 transformada com vetores contendo o gene *fur* na outra orientação.

5. CONCLUSÕES

Por meio das análises de bioinformática foram identificados prováveis boxes Fur em cinco genes de *K. pneumoniae* que codificam reguladores de transcrição de grande relevância na patogenicidade da bactéria, pois estão associados com o sistema de captação de ferro (gene *fur*), formação de biofilme (gene *rstR*), ativação da expressão de fímbrias (gene *fimZ*) e mecanismo do *quorum-sensing* (gene *sdiA*).

Os prováveis boxes Fur foram validados pelo ensaio FURTA, confirmando que a expressão daqueles genes pode ser regulada por Fur.

A identificação e validação do box Fur no gene *fur* e o padrão de expressão deste gene induzido em condição de escassez de ferro e reprimido na condição repleta de ferro revelam que em *K. pneumoniae* a expressão da proteína Fur é auto-regulada.

Por meio da modelagem molecular por homologia foi possível construir um modelo tridimensional da proteína Fur de *K. pneumoniae*, utilizando-se como molde a proteína Fur tridimensional de *Vibrio cholerae*. O modelo gerado foi validado e poderá fornecer informações valiosas quanto ao mecanismo de ação do regulador Fur quando complexado às suas respectivas sequências reguladoras.

A complementação do gene *fur* mutante de *E. coli* H1780 não foi observada no ensaio FURTA porque o gene *fur* de *K. pneumoniae* não foi transcrito e a proteína Fur não foi expressa em H1780, possivelmente por que o gene estava clonado no vetor *pGEM[®]-T Easy* na orientação antissense.

6. REFERÊNCIAS

- AFONYUSHKIN, T.; VECEREK, B.; MOLL, I.; BLASI, U.; KABERDIN, V. R. Both RNase E and RNase III control the stability of *sodB* mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 5, p. 1678-1689, 2005.
- BALESTRINO, D.; HAAGENSEN, J. A.; RICH, C.; FORESTIER, C. Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 8, p. 2870-2880, 2005.
- BANIN, E.; VASIL, M. L.; GREENBERG, E. P. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, n. 31, p. 11076-11081, 2005.
- BARABINO, A. *Helicobacter pylori*-related iron deficiency anemia: a review. **Helicobacter**, v. 7, n. 2, p. 71-75, 2002.
- BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum-sensing. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, n. 6, p. 582-587, 1999.
- BUTCHER, J.; SARVAN, S.; BRUNZELLE, J. S.; COUTURE, J. F.; STINTZI, A. Structure and regulon of *Campylobacter jejuni* ferric uptake regulator Fur define apo-Fur regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 109, n. 25, p. 10047-10052, 2012.
- CABEZA, M. L.; AGUIRRE, A.; SONCINI, F. C.; VÉSCOVI, E. G. Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in *Salmonella enterica*. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 20, p. 7335-7342, 2007.
- CAMPOS, D. P.; SILVA, M. V.; MACHADO, J. R.; CASTELLANO, L. R.; RODRIGUES, V.; BARATA, C. H. C. Sepsis neonatal precoce: níveis de citocinas no sangue de cordão umbilical no diagnóstico e durante o tratamento. **J. Pediatr.**, v.86, n. 6, p. 509-514, 2010.

- CARDOSO, R. S.; SILVA, M. A. A percepção dos enfermeiros acerca da comissão de infecção hospitalar: desafios e perspectivas. **Texto contexto-enferm.**, v.13, p. 50-57, 2004.
- CHENG, H. Y.; CHEN, Y. S.; WU, C. Y.; CHANG, H. Y.; LAI, Y. C.; PENG, H. L. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 12, p. 3144-3158, 2010.
- CHOE, Y. H.; KIM, S. K.; SON, B. K.; LEE, D. H.; HONG, Y. C.; PAI, S. H. Randomized placebo-controlled trial of *Helicobacter pylori* eradication for iron-deficiency anemia in preadolescent children and adolescents. **Helicobacter**, v. 4, n. 2, p. 135-139, 1999.
- CHOE, Y. H.; LEE, J. E.; KIM, S. K. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on sideropenic refractory anaemia in adolescent girls with *Helicobacter pylori* infection. **Acta Paediatr.**, v. 89, n. 2, p. 154-157, 2000.
- COLE, S. P.; HARWOOD, J.; LEE, R.; SHE, R.; GUINEY, D. G. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 10, p. 3124-3132, 2004.
- COOKSLEY, C.; JENKS, P. J.; GREEN, A.; COCKAYNE, A.; LOGAN, R. P.; HARDIE, K. R. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 6, p. 461-469, 2003.
- DANIELLI, A.; RONCARATI, D.; DELANY, I.; CHIARINI, V.; RAPPUOLI, R.; SCARLATO, V. In vivo dissection of the *Helicobacter pylori* Fur regulatory circuit by genome-wide location analysis. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 13, p. 4654-4662, 2006.
- DELANY, I.; SPOHN, G.; RAPPUOLI, R.; SCARLATO, V. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. **Mol. Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 1297-1309, 2001.

- DELANY, I.; SPOHN, G.; PACHECO, A. -B. F.; IEVA, R.; ALAIMO, C.; RAPPUOLI, R.; SCARLATO, V. Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. **Mol. Microbiol.**, v. 46, n. 4, p. 1297-1309, 2002.
- DELANY, I.; IEVA, R.; ALAIMO, C.; RAPPUOLI, R.; SCARLATO, V. The iron-responsive regulator Fur is transcriptionally autoregulated and not essential in *Neisseria meningitidis*. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 20, p. 6032-6041, 2003.
- DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; SCARLATO, V. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microbiol.**, v. 52, n. 4, p. 1081-1090, 2004.
- DELANY, I.; GRIFANTINI, R.; BARTOLINI, E.; RAPPUOLI, R.; SCARLATO, V. Effect of *Neisseria meningitidis* Fur mutations on global control of gene transcription. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 7, p. 2483-2492, 2006.
- DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.
- DROPA, M.; LIVIA C.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; MURAKAMI, T.; CASSETTARI, V. C.; FRANCO, F.; GUIDA, S. M.; BALABAKIS, A. J.; PASSADORE, L. F.; SANTOS, S. R.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 51, n. 4, p. 203-209, 2009.
- ESCOLAR, L.; PÉREZ-MARTÍN, J.; LORENZO, V. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 20, p. 6223-6229, 1999.
- FASSBINDER, F.; VAN VLIET, A. H. M.; GIMMEL, V.; KUSTERS, J. G.; KIST, M.; BERESWILL, S. Identification of iron-regulated genes of *Helicobacter pylori* by a modified *Fur titration assay* (FURTA-Hp). **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 184, n. 2, p. 225-229, 2000.

- FERDELE, M. J.; BASSLER, B. L. Interspecies communication in bacteria. **J. Clin. Investig.**, v. 121, n. 9, p. 1291-1299, 2002.
- FERRAZ, L. F.; VERDE, L. C.; VICENTINI, R.; FELÍCIO, A. P.; RIBEIRO, M. L.; ALEXANDRINO, F.; NOVO, M. T.; GARCIA JÚNIOR, O.; RIGDEN, D. J.; OTTOBONI, L. M. Ferric iron uptake genes are differentially expressed in the presence of copper sulfides in *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain LR. **Antonie Van Leeuwenhoek.**, v. 99, n. 3, p. 609-617, 2011.
- FRANCO, M. R. G.; FILHO, H. H. C; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. **Clinics**, v. 65, n. 9, p. 825-829, 2010.
- GALES, A. C.; PIGNATARI, A. C.; JONES, R. N.; BARETTA, M.; SADER, H. S. Avaliação de atividades *in vitro* dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenens contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, n. 2, p.137-144, 1997.
- GHAFOURIAN, S.; SEKAWI, Z.; NEELA, V.; KHOSRAVI, A.; RAHBAR, M.; SADEGHIFARD, N. Incidence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients with urinary tract infection. **São Paulo Med. J.**, v. 130, n.1, p. 37-43, 2012.
- HALL H. K.; FOSTER J. W. The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. **J. Bacteriol.**, v.178, n. 19, p. 5683-5691, 1996.
- HAMMER, B. K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. **Mol. Microbiol.**, v. 50, n. 1, p. 101-104, 2003.
- HANTKE, K. Iron and metal regulation in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 172-177, 2001.
- HASTINGS, J. W.; GREENBERG, E. P. Quorum-sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 9, p. 2667-2668, 1999.

- HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário - Itu. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49, n. 1, p. 109-116, 2003.
- HEINRICH, J.; WIEGERT, T. Regulated intramembrane proteolysis in the control of extracytoplasmic function sigma factors. **Res. Microbiol.**, v.160, n. 9, p. 696-703, 2009.
- HUANG, S. -H.; WANG, C. -K.; PENG, H. -L.; WU, C. -C.; CHEN, Y. -T.; HONG, Y. -M.; LIN, C. -T. Role of the small RNA RyhB in the Fur regulon in mediating the capsular polysaccharide biosynthesis and iron acquisition systems in *Klebsiella pneumonia*. **BMC Microbiol.**, 12: 148, 2012.
- JOHNSON, M.; COCKAYNE, A.; WILLIAMS, P. H.; MORRISSEY, J. A. Iron-responsive regulation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* involves fur-dependent and fur-independent mechanisms. **J. Bacteriol.**, v. 187, v. 23, p. 8211-8215, 2005.
- KADNER, R. J. Regulation by iron: RNA rules the rust. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 20, p. 6870-6873, 2005.
- KANAMARU, K.; KANAMARU, K.; TATSUNO, I.; TOBE, T.; SASAKAWA, C. SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 805-816, 2000.
- LEE, J. H.; CHOE, Y. H.; CHOI, Y. O. The Expression of iron-repressible outer membrane proteins in *Helicobacter pylori* and its association with iron deficiency anemia. **Helicobacter**, v. 14, n. 1, p. 36-39, 2009a.
- LEE, J.; MAEDA, T.; HONG, S. H.; WOOD, T. K. Reconfiguring the quorum-sensing regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and *N*-acylhomoserine lactones. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 6, p. 1703-1716, 2009b.
- LIN, C. T.; WU, C. C.; CHEN, Y. S.; LAI, Y. C.; CHI, C., LIN, J. C.; CHEN, Y.; PENG, H. L. Fur regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition

- systems in *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 419-429, 2011.
- LITWIN, C. M.; CALDERWOOD, S. B. Role of iron in regulation of virulence genes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 2, p. 137-149, 1993.
- LIU, Q.; WANG, P.; MA, Y.; ZHANG, Y. Characterization of the *Vibrio alginolyticus* fur gene and localization of essential amino acid sites in Fur by site-directed mutagenesis. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 13, n. 1-3, p. 15-21, 2007.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOPES, F. M.; LÓPEZ, M. F. Impacto do sistema de aspiração traqueal aberto e fechado na incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica: revisão de literatura. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 21, n. 1, p. 80-88, 2009.
- LOPES, A. C.; VERAS, D. L.; LIMA, A. M.; MELO, R. C.; AYALA, J. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163-167, 2010.
- LUCCHETTI, G.; SILVA, J. S.; UEDA, S. M. Y.; PEREZ, M. C. D.; MIMICA, L. M. J. Infecções do trato urinário: análise da frequência e do perfil de sensibilidade dos agentes causadores de infecções do trato urinário em pacientes com cateterização vesical crônica. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, n. 6, p. 383-389, 2005.
- MARTINS, A. C.; PICOLI, S. U. Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 47, n. 4, p. 421-426, 2011.
- MARQUES, L. E. C.; OLIVEIRA, D. F.; MARQUES, M. M. M.; SILVA, A. R. A.; ALVES, C. R.; GUEDES, M. I. F. Resistance of *Klebsiella Pneumoniae* clinical isolates: linkage of outer membrane proteins (omps) with production ESBLs. **Braz. J. Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 467-469, 2011.

- MASSE, E.; GOTTESMAN, S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, n. 7, p. 4620-4625, 2002.
- MELLIN, J. R.; GOSWAMI, S.; GROGAN, S.; TJADEN, B.; GENCO, C. A. A novel fur- and iron regulated small RNA, NrrF, is required for indirect fur-mediated regulation of the *sdhA* and *sdhC* genes in *Neisseria meningitidis*. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 10, p. 3686-3694, 2007.
- MENEZES, E. A.; NASCIMENTO, K. M.; SOARES, K. P.; AMORIM, L. N.; LIMA NETO, J. G.; CUNHA, F. A. Avaliação da atividade *in vitro* do meropenem contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro expandido isoladas na cidade de Fortaleza, Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 3, p. 349-350, 2007.
- MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 47, n. 1, p. 24-31, 2011.
- MOURA, M. E. B.; RAMOS, M. N.; SOUSA, C. M. M.; OLIVEIRA, A.; ALVES, M. S. C. F. Infecção hospitalar no olhar de enfermeiros portugueses: representações sociais. **Texto contexto-enferm.**, v. 17, n. 4, p.743-749, 2008.
- MURPHY, E. R.; PAYNE, S. M. RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates *Shigella dysenteriae* virulence. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 7, p. 3470-3477, 2007.
- NEILANDS, J. B. Microbial iron compounds. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 50, p. 715-731, 1981.
- OGLESBY, A. G.; FARROW III, J. M.; LEE, J. -H.; TOMARAS, A. P.; GREENBERG, E. P.; PESCI, E. C.; VASIL, M. L. The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. **J. Bacteriol.**, v. 283, n. 23, p. 15558-15567, 2008.

- OLIVEIRA, T. F. L.; GOMES FILHO, I. S.; PASSOS, J. S.; CRUZ, S. S.; OLIVEIRA, M. T.; TRINDADE, S. C.; MACHADO, A. S.; COELHO, J. M. F.; SANTOS, C. M. L.; CERQUEIRA, E. M. M. Fatores associados à pneumonia nosocomial em indivíduos hospitalizados. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, n. 6, p. 630-636, 2011.
- OTTO, B. R.; VERWEIJ-VAN VUGHT, A. M.; MACLAREN, D. M. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 18, n. 3, p. 217-233, 1992.
- PANCERA, C. F.; COSTA, C. M. L.; HAYASSHI, M.; LAMELAS, R. G. Y.; CAMARGO, B. Sepsis grave e choque séptico em crianças com câncer: fatores preditores de óbito. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 50, n. 4, p. 439-443, 2004.
- PARKER, D.; KENNAN, R. M.; MYERS, G. S.; PAULSEN, I. T.; ROOD, J. I. Identification of a *Dichelobacter nodosus* ferric uptake regulator and determination of its regulatory targets. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 1, p. 366-375, 2005.
- PARKER, C. T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. **Cell Microbiol.**, v. 11, n. 3, p. 363-369, 2009.
- PECQUEUR, L.; D'AUTRÉAUX, B.; DUPUY, J. NICOLET, Y.; JACQUAMET, L.; BRUTSCHER, B.; MICHAUD-SORET, I.; BERSCH, B. Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 30, p. 21286-21295, 2006.
- PEREIRA, M. S.; SOUZA, A. C. S.; TIPPLE, A. F. V.; PRADO, M. A. A infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem. **Texto contexto-enferm.**, v. 14, n. 2, p. 250-257, 2003.
- PIRES, E. J. V. C.; SILVA JÚNIOR, V. V.; LOPES, A. C. S.; VERAS, D. L.; LEITE, L. E.; MACIEL, M. A. V. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 21, n. 4, p. 384-390, 2009.

- PODSCHUN, R.; ULLMANN U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.
- QUATRINI, R.; LEFIMIL, C.; HOLMES, D. S.; JEDLICH, E. The ferric iron uptake regulator (Fur) from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Microbiology**, v. 151, n. 6, p. 2005-2015, 2005.
- QUATRINI, R.; LEFIMIL, C.; VELOSO, A.; PEDROSO, I.; HOLMES, S.; JEDLICKI, E. Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, n. 7, p. 2153-2166, 2007.
- RAHMATI, S.; YANG, S.; DAVIDSON, A. L.; ZECHIEDRICH, E. L. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. **Mol. Microbiol.**, v. 43, n. 3, p. 677-685, 2002.
- RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 881-941, 2000.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol. Biol.**, v. 132, p. 365-386, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY**, 1989.
- SANT'ANNA, C. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Rev. Virtual de Química**, n. 1, v. 1, p. 49-57, 2009.
- SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto contexto-enferm.**, v. 13, p. 64-70, 2004.
- SCHNEIDER, T. D. Information content of individual genetic sequences. **J. Theor. Biol.**, v. 189, n. 4, p. 427-441, 1997.

- SHEIKH, M. A.; TAYLOR, G. L. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* ferric uptake regulator (Fur) reveals insights into metal co-ordination. **Mol. Microbiol.**, v. 72, n. 5, p. 1208-1220, 2009.
- SINEVA, E.; SHADRIN, A.; RODIKOVA, E. A.; ANDREEVA-KOVALEVSKAIA, Z. I.; PROTSENKO, A. S.; MAYOROV, S. G.; GALAKTIONOVA, D. Y.; MAGELKY, E.; SOLONIN, A. S. Iron regulates expression of *Bacillus cereus* hemolysin II via global regulator Fur. **J. Bacteriol.**, v. 194, n. 13, p. 3327-3335, 2012.
- SINGH, P. K. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. **Biometals**, v. 17, n. 3, p. 267-270, 2004.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CALIXTO-LIMA, L.; VITORINO, R. R.; PEREZ, M. C. A.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; GELLER, M. Sepse: atualidades e perspectivas. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 2011.
- STOJILJKOVIC, I.; BAUMLER, A. J.; HANTKE, K. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *E. coli* genes by a Fur titration assay. **J. Mol. Biol.**, v. 236, n. 2, p. 531-545, 1994.
- SUPERTI, S. V.; AUGUSTI, G.; ZAVASCKI, A. P. Risk factors for and mortality of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* nosocomial bloodstream infections. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 51, n. 4, p. 211-216, 2009.
- SUNTHARALINGAM, P.; CVITKOVITCH, D. G. Quorum-sensing in streptococcal biofilm formation. **Trends Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 3-6, 2005.
- TAGA, M. E.; BASSLER, B. L. Chemical communication among bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 2, p. 14549-14554, 2003.
- TORRES, V.J.; ATTIA, A.S.; MASON, W.J.; HOOD, M.I.; CORBIN, B.D.; BEASLEY, F.C.; ANDERSON, K.L.; STAUFF, D.L.; MCDONALD, W.H.; ZIMMERMAN, L.J.; FRIEDMAN, D.B.; HEINRICHS, D.E.; DUNMAN, P.M.; SKAAR, E.P. *Staphylococcus aureus* Fur regulates the expression of virulence factors that contribute to the pathogenesis of pneumonia. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 4, p. 1618-1628, 2010.

- TRAGANTE, C. R., CECCON, M. E. J. R.; FALCÃO, M. C.; SEITI, M.; SAKITA, N.; VIEIRA, R. A. Prevalência de sepse por bactérias Gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido em Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 26, n. 1, p. 59-63, 2008.
- TSUGAWA, H.; SUZUKI, H.; SATOH, K.; HIRATA, K.; MATSUZAKI, J.; SAITO, Y.; SUEMATSU, M.; HIBI, T. Two amino acids mutation of ferric uptake regulator determines *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 14, n. 1, p. 15-23, 2011.
- VAN HOUTT, R.; AERTSEN, A.; MOONS, P.; VANOIRBEEK, K.; MICHIELS, C. W. *N*-Acyl-*L*-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 256, n. 1, p. 83-89, 2006.
- VOLF, J.; SEVCIK, M.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; DAMBORSKY, J.; RYCHLIK, I. Role of SdiA in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium physiology and virulence. **Arch. Microbiol.**, v. 178, p. 94-101, 2002.
- WIJAYANTI, N.; KATZ, N.; IMMENSCHUH, S. Biology of heme in health and disease. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, n. 8, p. 981-986, 2004.
- WU, C. C.; LIN, C. T.; CHENG, W. Y.; HUANG, C. J.; WANG, Z. C.; PENG, H. L. Fur-dependent MrkHI regulation of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Microbiology**, v. 158, n. 4, p. 1045-1056, 2012.
- YEH, K. S.; HANCOX, L. S.; CLEGG, S. Construction and characterization of a *fimZ* mutant of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 23, p. 6861-6865, 1995.
- ZANOL, F. M.; PICOLI, S. U.; MORSCH, F. Detecção fenotípica de metalobetalactamase em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, n. 4, p. 309-314, 2010.