

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

**ANA ÉRIKA INÁCIO GOMES**

**ESTUDO DO PAPEL DO REGULADOR FIMZ NA EXPRESSÃO  
DE FÍMBRIAS EM *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E NOS  
PROCESSOS DE ADESÃO E INVASÃO BACTERIANA**

Bragança Paulista  
2018

ANA ÉRIKA INÁCIO GOMES – R.A. 001201403321

**ESTUDO DO PAPEL DO REGULADOR FIMZ NA EXPRESSÃO  
DE FÍMBRIAS EM *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E NOS  
PROCESSOS DE ADESÃO E INVASÃO BACTERIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

**Área de Concentração:** Biologia Celular e Molecular de Microrganismos

**Orientador:** Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz

Bragança Paulista  
2018

QW 138.5.K5 Gomes, Ana Érika Inácio

G612e

Estudo do papel do regulador FimZ na expressão de fímbrias em *Klebsiella pneumoniae* e nos processos de adesão e invasão bacteriana / Ana Érika Inácio Gomes. - Bragança Paulista, 2018.

85 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Lúcio Fábio Caldas Ferraz.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Infecção do trato urinário. 3. Fímbrias bacterianas. 4. Interações hospedeiro-patógeno. I. Ferraz, Lúcio Fábio Caldas. II. Título.

## **BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Orientador:** Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz

### **Membros Titulares:**

1. Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz (orientador).
2. Profa. Dra. Thais Manzano Parisotto.
3. Profa. Dra. Raquel Girardello.
4. Ana Cristina Gales.
5. Ana Carolina de Mello Santos Gheller.

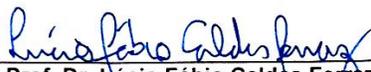
### **Membros Suplentes:**

1. Profa. Dr. Mario Angelo Claudino.
2. Dra. Cintia Rabelo de Paiva Caria.

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

**Data:** 27/08/2018.

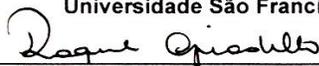
**GOMES, Ana Érika Inácio**, "Estudo do papel do regulador FIMZ na expressão de fimbrias em *Klebsiella Pneumoniae* e nos processos de adesão e invasão bacteriana" Tese defendida e aprovada no programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 27 de Agosto de 2018 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Lucio Fábio Caldas Ferraz  
Universidade São Francisco



Prof. Dra. Thaís Manzano Parisotto  
Universidade São Francisco



Prof. Dra. Raquel Girardello  
Universidade São Francisco



Prof. Dra. Ana Cristina Gales  
Universidade Federal de São Paulo



Prof. Dra. Ana Carolina de Mello Santos Gheller  
Universidade Federal de São Paulo

## **AGRADECIMENTOS**

- Agradeço ao Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz pela dedicada orientação.
- Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular e Microrganismos.
- Ao professor colaborador Dr. José Aires Pereira.
- Aos membros que compuseram a banca para avaliação dessa Tese.
- À Universidade São Francisco.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa ao qual este trabalho esteve vinculado.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudo de doutorado no Brasil (CAPES-PROSUP), e pela bolsa de estudo de doutorado sanduíche desenvolvida da Austrália (CAPES-PDSE/ Processo: 88881.135629/2016-01).
- À minha família pelo incentivo.
- À Deus.

## RESUMO

Infecções do trato urinário estão entre as infecções mais prevalentes do mundo e podem ser causadas pela presença de *Klebsiella pneumoniae* devido à expressão fímbrias que essa bactéria pode promover na superfície celular para auxiliar na sua sobrevivência no trato urinário. As fímbrias são importantes estruturas que medeiam a adesão e invasão da bactéria no epitélio da bexiga urinária, e estão sob a regulação de diferentes proteínas reguladoras. FimZ é regulador cujo papel está relacionado à expressão de fímbrias em *Salmonella Typhimurium*, mas em *K. pneumoniae*, é apenas um potencial regulador de fímbrias com função desconhecida. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar o possível *regulon* de FimZ em *K. pneumoniae* e investigar a atuação desse regulador em ensaios fenotípicos e no processo de interação patógeno-hospedeiro *in vivo*. Para identificar e caracterizar o possível *regulon* FimZ foram realizadas análises de bioinformática para identificação de sequências de ligação FimZ em genes fimbriais e confirmação dessas sequências pelo ensaio de motilidade eletroforética, além de análises por PCR quantitativo em tempo real. Para as investigações fenotípicas, foi gerada uma linhagem complementada com o gene *fimZ*, foram realizadas análises morfológicas das colônias, ensaios de aglutinação de levedura, motilidade, produção de cápsula, formação de biofilme e microscopia eletrônica de transmissão. A interação patógeno-hospedeiro *in vivo* foi investigada em modelo infecção do trato urinário em camundongos. Os resultados mostraram que FimZ reconhece sítios de ligação no *cluster fim* e *ecp* e modula a expressão das principais subunidades da fímbria indicando uma repressão sob os *clusters fim* e *fimZ*, e uma ativação sob *ecp*. A deficiência de FimZ modificou as características fenotípicas de *K. pneumoniae*, que possibilitou a produção de fímbrias tipo 1, uma extensão rudimentar, anulação de cápsula e maior formação de biofilme. Por outro lado, *K. pneumoniae* perde resistência *in vivo* e não forma comunidade bacteriana intracelular na bexiga na deficiência de FimZ. Dessa forma, a fímbria expressa na deficiência de FimZ indica ter múltiplos efeitos positivos sob as características fenotípicas investigadas. Porém, apesar da fímbria ser considerada um importante fator de virulência, a patogenicidade da bactéria mutante fimbriada é atenuada *in vivo*. Contudo, FimZ está relacionado à repressão de fímbrias em *K. pneumoniae*, e apresenta um papel estratégico na patogenicidade dessa bactéria. Porém, mais estudos são necessários para o entendimento desse mecanismo de regulação.

**Descritores:** *Klebsiella pneumoniae*. Infecção do trato urinário. Fímbrias bacterianas. Interações hospedeiro-Patógeno.

## ABSTRACT

Urinary tract infections are one of the most prevalent infections around the world and may be caused by the presence of *Klebsiella pneumoniae*. *K. pneumoniae* due to of the expressing fimbriae on the cell surface to assist in its survival in the urinary tract. Fimbriae are important structures that mediate the adhesion and invasion of the bacterium in the urinary bladder epithelium, and are under the regulation of different proteins. FimZ is a regulator whose role is related to the expression of fimbriae in *Salmonella* Typhimurium, but in *K. pneumoniae*, is only a regulator of fimbriae with unknown function. Thus, the objective of this study was to identify the possible regulon of FimZ in *K. pneumoniae* and to investigate the performance of this regulator in phenotypic assays and in the pathogen-host interaction process *in vivo*. To identify and characterize the possible FimZ regulon, bioinformatic analyzes were performed to identify FimZ binding sequences in fimbrial genes and confirmation of these sequences by the electrophoretic motility assay, in addition to quantitative real-time PCR analyzes. For the phenotypic investigations, a strain complemented with *fimZ* gene was generated, were carried out morphological analysis of the colonies, assays of yeast agglutination, motility, capsule production, biofilm formation and transmission electron microscopy. The pathogen-host interaction *in vivo* was investigated in a mouse urinary tract infection model. The results showed that FimZ recognizes binding sites in the *fim* and *ecp* clusters and modulates the expression of the major subunits of fimbria indicating a repression under the *fim* and *fimZ* clusters, and an activation under *ecp*. The deficiency of FimZ modified the phenotypic characteristics of *K. pneumoniae*, which allowed production of fimbriae type 1, a rudimentary extension, annulment of capsule and greater biofilm formation. On the other hand, *K. pneumoniae* loses resistance *in vivo* and does not form intracellular bacterial communities in the bladder in the FimZ deficiency. Thus, the fimbria expressed in the FimZ deficiency indicates to have multiple effects under the phenotypic characteristics investigated. However, although fimbriae are considered an important virulence factor, the pathogenicity of fimbriate mutant bacteria is attenuated *in vivo*. Therefore, FimZ is related to the repression of fimbriae in *K. pneumoniae*, and plays a strategic role in the pathogenicity of this bacterium. However, more studies are needed to understand the mechanism of regulation of this protein.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*. Urinary tract infection. Bacterial fimbriae. Host-Pathogen Interactions.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>DNA</b>               | Ácido desoxirribonucleico   |
| <b>DNase</b>             | Desoxirribonuclease   |
| <b>cDNA</b>              | Ácido desoxirribonucleico complementar  |
| <b>dNTPs</b>             | Desoxirribonucleotídeos trifosfato  |
| <b>DO</b>                | Densidade ótica   |
| <b>EDTA</b>              | Ácido etilenodiaminotetracético   |
| <b>EMSA</b>              | Ensaio de motilidade eletroforética   |
| <b>ESBLs</b>             | beta-lactamases de espectro estendido   |
| <b>GTPase</b>            | Enzima que hidroliza trifosfato de guanossina                                   |
| <b>IBC</b>               | Comunidade bacteriana intracelular  |
| <b>IPTG</b>              | Isopropil- $\beta$ -tiogalactosídeo   |
| <b>ITUs</b>              | Infecções do trato urinário   |
| <b>KPC</b>               | <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de enzima carbapenemase                  |
| <b>LB</b>                | Luria-bertani   |
| <b>mL</b>                | Mililitro   |
| <b>mM</b>                | Milimolar   |
| <b>nm</b>                | Nanômetro   |
| <b>ng</b>                | Nanograma   |
| <b>pb</b>                | Pares de bases  |
| <b>PCR</b>               | Reação em cadeia da polimerase  |
| <b>qRT-PCR</b>           | Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real                       |
| <b>RNA</b>               | Ácido ribonucleico  |
| <b>rpm</b>               | Rotações por minuto   |
| <b>UDG</b>               | Glicosilase de Uracil-DNA   |
| <b>UKP8</b>              | <i>Klebsiella pneumoniae</i> uropatogênica selvagem                             |
| <b>UKP8-</b>             | <i>Klebsiella pneumoniae</i> uropatogênica deficiência FimZ                     |
| <b>UKP8-C</b>            | <i>Klebsiella pneumoniae</i> uropatogênica completamente com o gene <i>fimZ</i> |
| <b>UPEC</b>              | <i>Escherichia coli</i> Uropatogênica   |
| <b><math>\mu</math>L</b> | Microlitro  |
| <b><math>\mu</math>g</b> | Micrograma  |
| <b>WHO</b>               | Organização Mundial da Saúde  |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 1.</b> Percurso do uropatógeno no trato urinário para a formação de comunidades bacterianas intracelulares (IBCs) ..... | 15 |
| <b>FIGURA 2.</b> Formação de IBC por <i>K. pneumoniae</i> no urotélio .....   | 19 |
| <b>FIGURA 3.</b> Principais fatores de virulência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....   | 21 |
| <b>FIGURA 4.</b> Estrutura da fímbria.....  | 26 |
| <b>FIGURA 5.</b> RNA intron inserido no gene <i>fimZ</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . .....                                  | 34 |
| <b>FIGURA 6.</b> Região codificante do gene <i>fimZ</i> para a complementação do gene.....  | 35 |
| <b>FIGURA 7.</b> Organização gênica do <i>cluster fimZ</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                                  | 37 |
| <b>FIGURA 8.</b> Purificação da proteína FimZ recombinante de <i>K. pneumoniae</i> .....  | 48 |
| <b>FIGURA 9.</b> FimZ reconhece sítios de ligação em genes fimbriais de <i>K. pneumoniae</i> .....                                | 49 |
| <b>FIGURA 10.</b> FimZ modula a expressão de genes fimbriais em <i>K. pneumoniae</i> .....  | 51 |
| <b>FIGURA 11.</b> Análise da unidade transcricional do <i>cluster fimZ</i> .....  | 53 |
| <b>FIGURA 12.</b> Complementação do gene <i>fimZ</i> em linhagem deficiente-FimZ .....  | 57 |
| <b>FIGURA 13.</b> Modificação macroscópica das colônias de UKP8- <i>fimZ</i> .....  | 58 |
| <b>FIGURA 14.</b> Deficiência do regulador FimZ promove maior produção de fímbrias .....  | 60 |
| <b>FIGURA 15.</b> Deficiência do regulador FimZ promove aumento da formação de biofilme em UKP8- <i>fimZ</i> . .....              | 62 |
| <b>FIGURA 16.</b> Cápsula mucoviscosa é inibida em UKP8- <i>fimZ</i> .....  | 64 |
| <b>FIGURA 17.</b> Colonização da bexiga urinária no modelo de UTI em camundongo .....   | 66 |
| <b>FIGURA 18.</b> Análise morfohistológica da bexiga urinária no modelo de UTI.....   | 67 |
| <b>FIGURA 19.</b> Formação de comunidade bacteriana intracelular no urotélio.....   | 68 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>TABELA 1.</b> <i>Clusters</i> gênicos de fímbrias em <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....   | 25 |
| <b>TABELA 2.</b> Principais reguladores da expressão de fímbrias.....  | 29 |
| <b>TABELA 3.</b> Linhagens bacterianas e plasmídeos usados nesse estudo. ....  | 33 |
| <b>TABELA 4.</b> <i>Primers</i> para geração e confirmação da cepa UKP8- <i>fimZ</i> complementada com o gene <i>fimZ</i> .....                  | 36 |
| <b>TABELA 5.</b> <i>Primers</i> utilizados na análise de transcrição policistrônica dos genes no <i>cluster fimZ</i> .....                       | 38 |
| <b>TABELA 6.</b> Sondas e <i>primers</i> utilizados no EMSA e clonagem do gene <i>fimZ</i> .....   | 40 |
| <b>TABELA 7.</b> <i>Primers</i> para reações de PCR convencional e PCR em tempo real.....  | 43 |
| <b>TABELA 8.</b> Identificação de sítios de ligação de FimZ em genes de fímbrias de <i>K. pneumoniae</i> .....                                   | 47 |
| <b>TABELA 9.</b> Alinhamento de sequências nucleotídicas e proteicas de genes fimbriais de <i>S. Typhimurium</i> e de <i>K. pneumoniae</i> ..... | 55 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>13</b> |
| 1.1. Infecção do trato urinário .....   | 13        |
| 1.2. Rearranjos do citoesqueleto, invasão e formação de comunidades intracelulares .....  | 16        |
| 1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....   | 19        |
| 1.4. Mecanismos de regulação da expressão de fímbrias tipo 1 em <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                                    | 25        |
| 1.5. Regulação de fímbrias tipo 1 pela proteína FimZ .....  | 29        |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | <b>32</b> |
| 2.1. Objetivo geral .....   | 32        |
| 2.2. Objetivos específicos .....  | 32        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>33</b> |
| 3.1. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultura .....   | 33        |
| 3.2. Identificação e caracterização do <i>cluster fimZ</i> de <i>K. pneumoniae</i> e do provável <i>regulon</i> do FimZ .....         | 37        |
| 3.2.1. Organização gênica do <i>cluster fimZ</i> de <i>K. pneumoniae</i> .....  | 37        |
| 3.2.2. Alinhamento de sequências nucleotídicas e proteicas de <i>S. Typhimurium</i> e <i>K. pneumoniae</i> .....                      | 38        |
| 3.2.3. Identificação e validação de sítios de ligação do regulador FimZ em genes que codificam fímbrias em <i>K. pneumoniae</i> ..... | 38        |
| 3.3. Análise da expressão de genes fimbriais de <i>K. pneumoniae</i> por PCR em tempo real .....                                      | 42        |
| 3.4. Caracterização fenotípica das linhagens UKP8, UKP8- <i>fimZ</i> , UKP8-C .....   | 43        |
| 3.4.1. Análise da morfologia das colônias .....   | 43        |
| 3.4.2. Investigação da extensão sobre a placa por ensaio de motilidade .....  | 43        |
| 3.4.3. Investigação da expressão de fímbrias por ensaio de aglutinação de levedura .....  | 44        |
| 3.4.4. Investigação da produção de cápsula .....  | 44        |
| 3.4.5. Investigação da formação de biofilme .....   | 44        |
| 3.4.6. Visualização das células por Microscopia Eletrônica de Transmissão .....   | 45        |
| 3.5. Investigação da interação patógeno-hospedeiro <i>in vivo</i> com as UKP8 e UKP8- <i>fimZ</i> .....                               | 45        |
| 3.5.1. Indução e análise da infecção em camundongos por modelo de UTI .....   | 45        |
| 3.5.2. Análise morfo-histológica do epitélio da bexiga urinária por H&E .....   | 46        |
| 3.6. Análise estatística .....  | 46        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>47</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.1. FimZ reconhece sítios de ligação e modula a expressão de genes fimbriais .....  | 47        |
| 4.2. Linhagem <i>K. pneumoniae</i> deficiente-FimZ tem o gene <i>fimZ</i> restabelecido .....  | 56        |
| 4.3. Interrupção de <i>fimZ</i> modificou características das colônias UKP8- <i>fimZ</i> e possibilitou uma motilidade rudimentar .....                | 57        |
| 4.4. Deficiência de FimZ desencadeia a produção de apêndices de superfície bacteriana e permitiu maior formação de biofilme em UKP8- <i>fimZ</i> ..... | 59        |
| 4.5. Produção de cápsula polissacarídica é anulada em UKP8- <i>fimZ</i> .....  | 64        |
| 4.6. UKP8- <i>fimZ</i> perde resistência <i>in vivo</i> e não forma IBC na bexiga urinária em comparação à UKP8 .....                                  | 65        |
| <b>5. CONCLUSÃO.....</b>   | <b>71</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>72</b> |
| <b>7. ANEXOS .....</b>   | <b>85</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Infecção do trato urinário

Infecções do trato urinário (ITUs) estão entre as infecções mais prevalentes (TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017), as quais são causadas principalmente pela bactéria *Escherichia coli* uropatogênica, chamada de UPEC (do inglês, *uropathogenic E. coli*) (FLORES-MIRELES et al., 2015). No entanto, *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria que também causa ITUs em humanos (GUPTA et al., 2001; GARCIA et al., 2013; CUNHA et al., 2016; MIRZAILI et al., 2018) em diferentes locais do mundo.

Em uma distribuição geográfica, *K. pneumoniae* aparece como o segundo patógeno mais identificado na América do Sul em regiões no Brasil (CUNHA et al., 2016; REIS et al., 2016) e um local da América Central (MATUTE et al., 2004). Mas na América do Norte, *E. coli* é o principal foco de estudo em ITUs (FOXMAN, 2014; AILES et al., 2018; UKAH et al., 2018). Porém, *K. pneumoniae* também é apontada como uma relevante bactéria em países no continente Europeu, Asiático, Africano e Oceania; em países como a França, onde é identificada em terceiro lugar (MALMARTEL; GHASAROSSIAN, 2016), e no Kuwait, Egito, e Austrália é identificada em segundo lugar (SEWIFY et al., 2016; SALAH et al., 2016; OSTHOFFA et al., 2015). Na Ásia, *K. pneumoniae* se destaca com quase o dobro do número de isolados de ITUs no Irã (MIRZAILI et al., 2018) e, é foco de estudos relacionados à ITUs em outras regiões deste continente e na América do Sul (CÓRDOVA et al., 2012; MANJULA et al., 2014; MIRZAILI et al., 2018).

No entanto, diferente de *E. coli* que é responsável por grande parte de ITUs na comunidade, *K. pneumoniae* se destaca em ITUs associadas à assistência à saúde (YANG et al., 2010). Na comunidade, as ITUs podem ser identificadas em qualquer idade, podendo ter início no período neonatal até à fase adulta, porém acometendo com mais frequência indivíduos do sexo feminino, com infecções assintomáticas e recorrentes (ANVISA). Fatores como relação sexual (CHUNG; ARIANAYAGAM; RASHID, 2010; FOXMAN, 2014), obesidade e diabetes (FOXMAN, 2014) são elementos contribuintes para uma ITU comunitária. Por outro lado, as ITUs associadas à assistência à saúde estão relacionadas a procedimentos invasivos como cateterismo vesical ou procedimentos no trato urinário (ANVISA). Para a ocorrência dessas ITUs, fatores associados como imunodeficiência do paciente (LEVINSON; JAWETZ, 2005), procedimentos invasivos, extensos períodos de internação hospitalar (MOURA et al., 2007) e uso prolongado de cateter urinário (HEILBERG; SCHOR, 2003; FOXMAN, 2014), são condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Em adição, enquanto ITUs na comunidade exibem

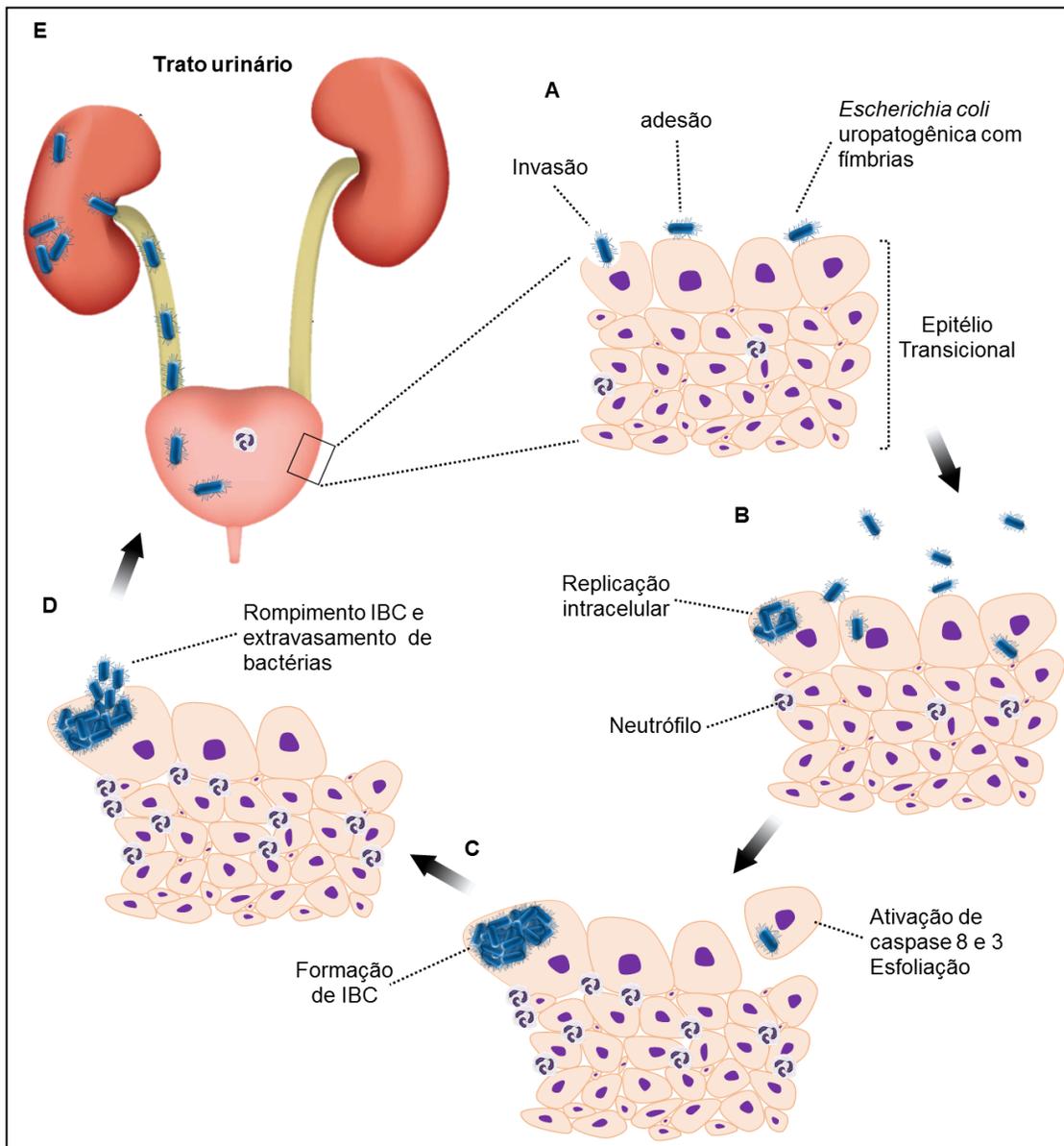
baixa prevalência de bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (do inglês *Extended-spectrum beta-lactamase*, ESBLs) (YANG et al., 2010), ITUs associadas à assistência à saúde estão relacionadas a bactérias produtoras de ESBLs, sendo *K. pneumoniae* o principal patógeno produtor dessas enzimas (BOUASSIDA et al., 2016). Beta-lactamase são enzimas específicas capazes de hidrolisar antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e contribuir na sobrevivência de bactérias sensíveis a esses antibióticos (TAVARES, 2001).

Uma ITU ocorre a partir de uma colonização bacteriana no tecido – que pode acontecer pelo uso de cateter urinário e contaminação na região periuretral, por exemplo – o uropatógeno migra para a bexiga por meio da adesão (FLORES-MIRELES et al., 2015) mediada pelas fímbrias adesivas (FIGURA 1) (ROSEN et al., 2008a). Uma vez na bexiga, além das fímbrias promover a fixação na célula epitelial de bexiga urinária, a fímbria também favorece o desencadeamento de invasão celular (FIGURA 1) (WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2007).

A adesão é um evento essencial da primeira etapa da ITU (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008), na qual é mediada pelas fímbrias e/ou pilli, que são responsáveis pelo reconhecimento de receptores específicos localizados na membrana externa das células hospedeiras, devido à adesina presentes no topo da fímbria (ROSEN et al., 2008a). As adesinas FimH das fímbrias do tipo 1 são as principais proteínas que possibilitam o reconhecimento e adesão, através da ligação em diversas estruturas na superfície das uroteliais da bexiga, tais como em receptores uroplaquinas contendo manose, receptores CD44, integrinas e proteínas da matriz extracelular (STAHLHUT et al., 2009; JORGENSEN; SEED, 2012).

Após a etapa de adesão, um processo de sinalização ocorre e a bactéria pode ser internalizada através da membrana da célula urotelial, que permite a entrada da bactéria na célula (JORGENSEN; SEED, 2012). Essa etapa de invasão é um processo crítico que requer passos importantes discutidos na próxima revisão de literatura.

Uma vez dentro da célula hospedeira, as bactérias se replicam, podendo evoluir para comunidades bacterianas intracelulares, chamadas de IBC (do inglês, *Intracellular Bacterial Community*) (FIGURA 1) (ANDERSON et al., 2003; JUSTICE et al., 2004). Como consequência de uma multiplicação exacerbada, o IBC pode se romper, e um maior número de bactérias pode ter a chance de alcançar mais facilmente os rins e, assim, a corrente sanguínea (FIGURA 1). No período em que a bactéria se mantém internalizada, proteínas e enzimas são sintetizadas para a captação de nutrientes, como a produção de sideróforos, para captação de ferro (FLORES-MIRELES et al., 2015).



**FIGURA 1. Percurso do uropatógeno no trato urinário para a formação de comunidades bacterianas intracelulares (IBCs).** (A) Uma infecção do trato urinário (ITU) pode ocorrer por uma contaminação periuretral, por uropatógenos que migram pela uretra até o epitélio da bexiga urinária, para aderir e invadir células epiteliais hospedeiras. Ambos os processos de adesão e invasão, ativam células do sistema imune. (B) Após uma colonização e invasão bem-sucedida, as bactérias se replicam intracelularmente e, assim, ativam mais células de defesa no local, como o recrutamento de neutrófilos. (C) A replicação intracelular evolui para a formação de comunidade bacteriana intracelular (IBC). Na tentativa de diminuir a carga bacteriana e manter a homeostase, a célula epitelial pode entrar em apoptose por ativação de caspase 8 e 3 para esfoliar o epitélio. (D) Após um crescimento exacerbado das bactérias no IBC, esse IBC é rompido, com morte da célula epitelial, para o extravasamento de bactérias para meio extracelular. (E) Assim, com um maior número de uropatógenos, essas bactérias têm maior chance de migrar e alcançar facilmente os rins e a corrente sanguínea. Fonte: Figura adaptada de Rosen et al. (2007, pág. 1950).

## 1.2. Rearranjos do citoesqueleto, invasão e formação de comunidades intracelulares

Alguns patógenos são capazes de induzir sua própria captação por células hospedeiras não-fagocíticas, como a célula do urotélio (WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2007). Esses patógenos geralmente assim o fazem ao interferir no citoesqueleto das células hospedeiras (DRAMSI; COSSART, 1998; PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006), favorecendo assim, a invasão celular.

O citoesqueleto é uma complexa rede de filamentos proteicos que se estende ao longo de todo o citoplasma das células eucarióticas, sendo composto basicamente das proteínas actina e tubulina que se polimerizam para formar filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários (ALBERTS et al., 2010). O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica e em constante reorganização, o que lhe confere um papel fundamental na definição do formato e arcabouço celulares e em processos celulares tais como motilidade, divisão celular, fagocitose, adesão às células vizinhas e à matriz extracelular, dentre outros. Esta constante remodelação do citoesqueleto está associada à polimerização e despolimerização de microtúbulos e filamentos de actina, processo esse que envolve várias proteínas e moléculas sinalizadoras, incluindo filaminas, actininas, moléculas de adesão do tipo e-caderina e integrinas, componentes da matriz extracelular, pequenas GTPases, quinases, etc (ALBERTS et al., 2010). As GTPases da família Rho destacam-se como uma das principais moléculas sinalizadoras da reorganização do citoesqueleto, sobretudo as GTPases RhoA, Rac1 e Cdc42 (RIDLEY, 2006).

A habilidade em invadir células hospedeiras decorre justamente da capacidade que alguns patógenos têm em manipular as vias de sinalização da reorganização do citoesqueleto (DRAMSI; COSSART, 1998; PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006). Esses patógenos induzem a ativação de quinases e pequenas GTPases da família Rho que estão associados à polimerização e despolimerização de microtúbulos e filamentos de actina, desencadeando projeções da membrana celular no local de interação com a bactéria e favorecendo, assim, sua própria captação pelas células hospedeiras (DRAMSI; COSSART, 1998; PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006).

Dois mecanismos de invasão bacteriana mediados por manipulação do citoesqueleto são conhecidos: o mecanismo “zipper” e o mecanismo “trigger” (DRAMSI; COSSART, 1998). Patógenos como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Shigella flexneri* e *Helicobacter pylori* invadem as células hospedeiras pelo mecanismo “trigger”, segundo o qual um sistema de secreção do tipo III ou IV injeta proteínas efetoras diretamente no citosol das células hospedeiras. Essas proteínas efetoras desencadeiam uma intensa reorganização do citoesqueleto, fazendo com que protrusões da membrana e estruturas do tipo filopódios e

lamelipódios sejam formadas na superfície das células hospedeiras, o que promove a entrada da bactéria (PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006). Por outro lado, patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Yersinia pseudotuberculosis* invadem as células hospedeiras pelo mecanismo “zipper”. Este mecanismo é mediado pela adesão da bactéria às células alvos, no qual a interação entre as estruturas da superfície bacteriana (invasinas e adesinas, por exemplo) com receptores da superfície da célula hospedeira que ativa as vias de sinalização do citoesqueleto da célula hospedeira, desencadeando rearranjos na membrana plasmática ao redor do sítio de aderência da bactéria, resultando no engolfamento e invasão dos patógenos (DRAMSI; COSSART, 1998; PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006).

Dentre os patógenos que invadem células hospedeiras pelo mecanismo “zipper” estão linhagens de *E. coli* uropatogênicas (UPECs) (WANG; LIANG; KONG, 2008). Nestes patógenos a etapa de adesão às células uroteliais da bexiga é um dos pré-requisitos para que a invasão ocorra. Para tal, as fímbrias tipo 1 desempenham função preponderante em razão de seu duplo papel em mediar não apenas a adesão, mas também em desencadear a invasão celular (WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2007).

Além de garantir a ancoragem das bactérias nas células alvo, a interação da adesina FimH de UPECs com os receptores da célula hospedeira ativa uma série de moléculas sinalizadoras do citoesqueleto, sobretudo as quinases de adesão focal (FAKs), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e as GTPases da família Rho (MARTINEZ et al., 2000; MARTINEZ; HULTGREN, 2002; ETO et al., 2007; SIVICK; MOBLEY, 2010). A ativação coordenada destas moléculas leva a uma reorganização do citoesqueleto no local de aderência da bactéria que culmina com a internalização da bactéria aderida pelo mecanismo “zipper”.

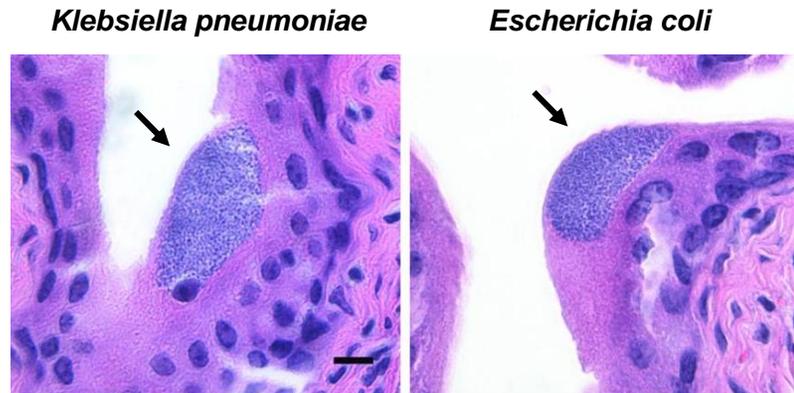
Uma vez no ambiente intracelular, as bactérias rapidamente se replicam, formando uma comunidade bacteriana intracelular (IBC) (ANDERSON et al., 2003; JUSTICE et al., 2004). As IBCs são comunidades de células bacterianas organizadas numa matriz polissacarídica e com propriedades semelhantes ao biofilme (ANDERSON et al., 2003; ROSEN et al., 2007), podendo conter  $10^3$  células bacterianas viáveis em um IBC precose, em uma única célula epitelial (DURAIWAMY et al., 2018). Da fase inicial de formação, que se inicia nas 3 primeiras horas após a invasão, até uma fase mais tardia, as IBCs passam por sucessivas etapas de maturação. As etapas de maturação e os períodos de duração variam de acordo com a linhagem bacteriana e o tipo de célula hospedeira. As alterações mais proeminentes ocorrem no tamanho e composição da estrutura e no formato das bactérias, que passam da típica morfologia em bastonetes para um formato filamentoso. No estado máximo de maturação, que ocorre por volta de 12 horas após a invasão, as IBCs se expandem de tal maneira que passam

a ocupar quase que a totalidade do citoplasma das células hospedeiras (ANDERSON et al., 2003; HUNSTAD; JUSTICE, 2010). Neste estágio, as bactérias da periferia das IBCs podem, eventualmente, se desprender e se dispersar para o lúmen da bexiga, atingindo células uroteliais vizinhas e iniciando novo ciclo de formação de IBCs (JUSTICE et al., 2004). Dias após a invasão, e num estágio final de maturação, as IBCs progridem para um reservatório quiescente de bactérias. Neste estágio latente as UPECs são capazes de persistir na bexiga meses após a infecção inicial, atuando como fonte para infecções urinárias crônicas e recorrentes (MULVEY, SCHILLING; HULTGREN, 2001; MYSOREKAR; HULTGREN, 2006).

A capacidade de UPECs em invadir células uroteliais da bexiga e produzir IBCs constitui-se em um importante fator na patogênese das infecções do trato urinário. Isto porque a permanência no ambiente intracelular confere maiores chances de sobrevivência do patógeno, já que, neste ambiente, estarão protegidos da resposta imune do hospedeiro (HUNSTAD; JUSTICE, 2010), da ação de antimicrobianos (BLANGO; MULVEY, 2010) e do próprio fluxo urinário da bexiga (ANDERSEN et al., 2012). Além disso, conforme exposto acima, a maturação das IBCs tende a resultar em um reservatório de bactérias que é responsável por infecções recorrentes (ROSEN et al., 2007).

No entanto, assim como UPECs são formadores de IBC em modelo de ITU em camundongo, *K. pneumoniae* também é capaz de formar IBCs após 6 e 24 horas de infecção, porém em menor quantidade que *E. coli* (ROSEN et al., 2008a) (FIGURA 2).

A adaptação dos patógenos no ambiente intracelular requer a expressão de vários genes e fatores de virulência. O desenvolvimento de UPECs em IBCs requer a expressão de fímbrias tipo 1 (WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2007), proteína OmpA de membrana externa (NICHOLSON; WATTS; HUNSTAD, 2009), lipopolissacarídeo (LPS) e cápsula de polissacarídeo dentro das células da bexiga hospedeira (ANDERSON et al., 2010). A replicação intracelular das UPECs e a maturação das IBCs dependem também da expressão de alguns genes, tais como *surA*, *leuX* e *fimH* (JUSTICE et al., 2006; WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2007; HANNAN et al., 2008). Além disso, a expressão de alguns genes do sistema de captação de ferro, como *cirA*, *fepA*, *iroN*, *entF* e *tonB*, e genes de virulência, como *fliC*, *yfaL*, *kpsD*, *hlyA* e *cnf1*, encontram-se induzidos nas IBCs (REIGSTAD; HULTGREN; GORDON, 2007; BERRY; KLUMPP; SCHAEFFER, 2009).



**FIGURA 2. Formação de IBC por *K. pneumoniae* no urotélio.** Análise histológica do epitélio da bexiga urinária de camundongo mostra formação de comunidade bacteriana intracelular (IBC) por *K. pneumoniae* após 6 horas de infecção, morfológicamente idêntico ao IBC formado por *E. coli* no urotélio no mesmo período. Fonte: figura de Rosen et al. (2008a, pág. 3340).

### 1.3. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae, responsável principalmente por infecções em feridas cirúrgicas, no trato respiratório e geniturinário (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Essa bactéria tem se tornado uma das mais prevalentes em ITUs relacionadas à assistência à saúde (GARCIA et al., 2013) devido a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) promovidas por ela (BOUASSIDA et al., 2016). Além disso, *K. pneumoniae* tem sido causadora de infecções mais graves e invasivas, como meningite, endoftalmite, abscesso hepático e sepse (WILLIAMS; TOMAS, 1990; FUNG et al., 2002; FUNG; LIN; LIN, 2012).

*K. pneumoniae* é uma das principais causadoras de infecções relacionadas à assistência à saúde, acometendo indivíduos com fatores de predisposição, tais como idade avançada, diabetes e doença respiratória, por exemplo (LEVINSON; JAWETZ, 2005). Em hospitais, dentre os casos mais comuns de infecção hospitalar pela *K. pneumoniae* estão a sepse e as infecções dos tratos respiratório e urinário (NOGUEIRA et al., 2009; BARROS et al., 2012). Nesses ambientes hospitalares, linhagens de *K. pneumoniae* que produzem enzima carbapenemase (KPC) são cepas multirresistentes que estão sendo constantemente identificadas (TUMBARELLO et al., 2012), e atualmente reconhecidas como um dos patógenos mais prevalentes e emergentes pela Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization*, WHO) (WHO, 2017). Essas linhagens KPC são muito resistentes por serem produtoras da enzima betalactamase, que confere resistência aos antibióticos betalactâmicos (SEIBERT et al., 2014). *Klebsiella* está na lista de patógenos prioritários resistentes a

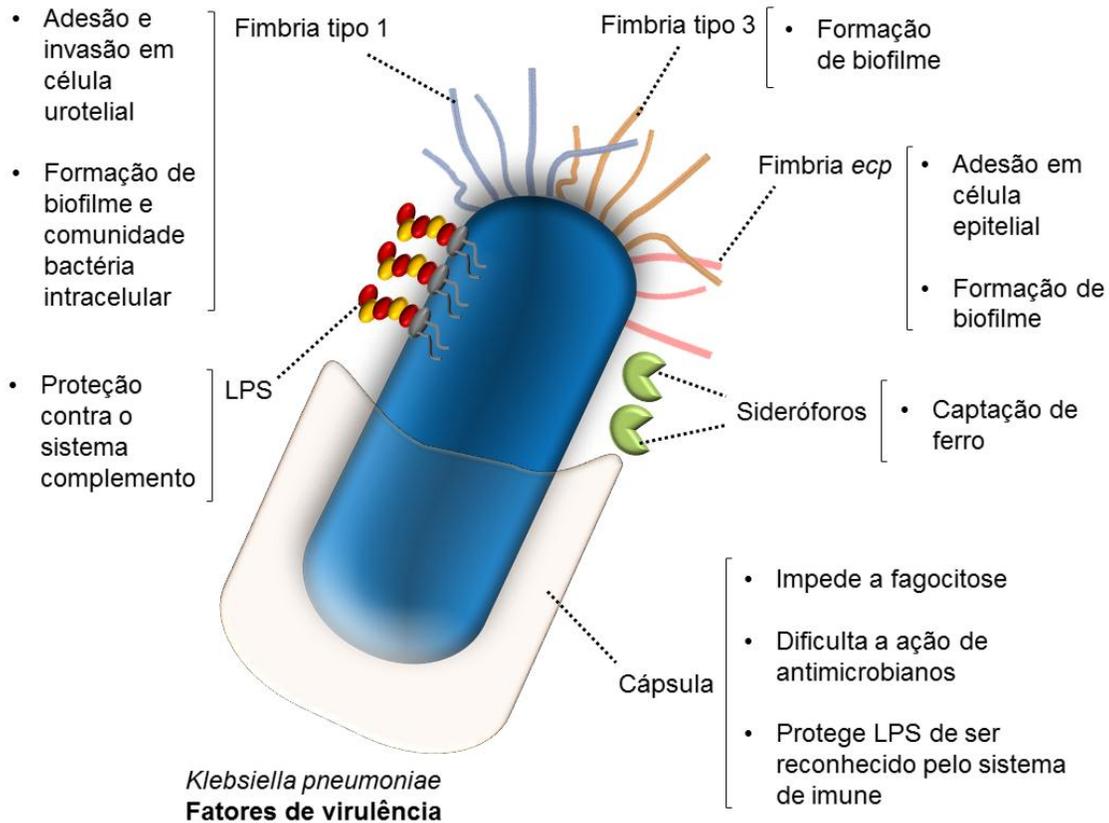
antibióticos como “prioritários 1, crítico”, dentro do grupo de bactérias Enterobacteriaceae com resistência à carbapenem, de acordo com a publicação feita no início de 2017 pela WHO.

Além da resistência encontrada em linhagens de *K. pneumoniae*, essa bactéria também possui fatores de virulência que contribuem para a sua sobrevivência dentro do hospedeiro. Estruturas da superfície bacteriana são importantes fatores de virulência em *K. pneumoniae*, tais como sideróforos, lipopolissacarídeo, cápsula polissacarídica (TOMÁS et al., 1986; CORTES et al., 2002; PAN et al., 2011; HSIEH et al., 2012), e fímbrias adesivas (TARKKANEN et al., 1992; CORTES et al., 2002; LEE et al., 2006) (FIGURA 3).

Sideróforos são moléculas com afinidade ao ferro, e que exerce uma função de capturar esse elemento livre no meio para a bactéria (PACZOSA; MECSAS, 2016) (FIGURA 3). O ferro é um nutriente essencial para o funcionamento de muitos processos celulares para as bactérias, sendo para *K. pneumoniae* um elemento importante na regulação da transcrição gênica (MACIEL, 2012), na adesão e invasão (SANTOS, 2016), e durante processos de infecção (PACZOSA; MECSAS, 2016). Porém, o ferro também é um elemento requisitado pelas células do hospedeiro, e normalmente não é encontrado livre no plasma. Assim, captação de ferro por *K. pneumoniae* é realizada através da secreção de sideróforos (KREWULAK; VOGEL, 2008).

*K. pneumoniae* é capaz de expressar diferentes tipos de sideróforos, como enterobactina, yersiniabactina e aerobactina e salmochelina (PACZOSA; MECSAS, 2016). Mas, o sideróforo mais competente para se ligar ao ferro é a enterobactina (CRUMBLISS; HARRINGTON, 2009). Esse sideróforo é mais conservado e também o principal meio de captação de ferro por algumas linhagens *K. pneumoniae* (PODSCHUN et al., 1993).

Para a internalização do ferro, receptores específicos de membrana externa reconhecem os sideróforos, e possibilitam o transporte dessa molécula contendo o ferro (sideróforo férrico) para o espaço periplasmático, onde proteínas transportadoras periplasmáticas acolhem o complexo até a membrana interna para a internalização para o citoplasma, para a separação das moléculas (KREWULAK; VOGEL, 2008), e a distribuição do ferro para diferentes funções. Esta internalização do ferro requer energia, que é gerada pelo sistema de proteínas da membrana interna TonB, ExbB e ExbD (KREWULAK; VOGEL, 2008).



**FIGURA 3. Principais fatores de virulência de *Klebsiella pneumoniae*.** *K. pneumoniae* possui quatro principais fatores de virulência, sendo: fímbrias (tipo 1, tipo 3, e do *cluster ecp*), lipopolissacarídeo (LPS), sideróforo e cápsula. As *fímbrias* estão presentes na membrana da bactéria e são responsáveis pela adesão da célula bacteriana, sendo as fímbrias do tipo 1 associadas à adesão em células epiteliais da bexiga urinária e conseqüentemente invasão, formação de comunidade bacteriana intracelular (IBC) e biofilme, as fímbrias tipo 3 mais associadas à formação de biofilme, e as fímbrias *ecp* associada à adesão em célula epitelial e formação de biofilme. *LPS* está ancorado na membrana externa da bactéria e pode proteger contra o sistema complemento do hospedeiro. *Sideróforos* são moléculas secretadas para a captação de ferro no meio extracelular para o ferro ser utilizado pelas bactérias para: nutrição, transcrição gênica, adesão e invasão, disseminação, etc. *Cápsula* envolve toda a superfície da bactéria e oferece resistência à fagocitose, aos peptídeos antimicrobianos, e protege o LPS de ser reconhecido pelo sistema imune.

Quando dentro da bactéria, o ferro pode modular a transcrição gênica como um cofator do regulador transcricional Fur (do inglês, *ferric uptake regulator*). A regulação ocorre quando o regulador Fur e o íon ferroso ( $Fe^{+2}$ ) formam um complexo, e este complexo reconhece e se liga em sequências nucleotídicas específicas, denominadas boxes Fur, localizadas na região promotora dos genes alvos. A sequência nucleotídica dos boxes Fur é um palíndromo de 19 pares de bases formado por 2 repetições invertidas de 9 pb ricas em adeninas e timinas, tal como GATAATGAT-a-ATCATTATC (ESCOLAR; PÉREZ-MARTÍN; DE LORENZO, 1999). No

seu mecanismo clássico de ação, o regulador Fur complexado ao ferro (Fur+Fe) se liga na região promotora dos genes alvos e impede a ligação da RNA polimerase (RNAP), levando à repressão da transcrição desses genes alvos. Na ausência de ferro, como ocorre em condições de escassez de ferro, o complexo não é formado e não se liga na região promotora dos genes alvos, liberando esta região para a ligação da RNAP e a transcrição dos genes. No entanto, o Fur+Fe não atua apenas como um repressor, como mostrado no mecanismo clássico, mas ele também pode atuar como um ativador de transcrição, como mostrado no estudo a seguir.

No estudo realizado por Maciel (2012), o gene *mrkA* (*cluster* de fímbrias tipo 3) de *K. pneumoniae* foi mais expresso na condição rica em ferro, indicando que Fur+ferro atua positivamente na expressão desse *cluster*. Por outro lado, a expressão do gene *fimA* (*cluster fim*, que codifica fímbrias do tipo 1) foi mais expresso na ausência de ferro em *K. pneumoniae*, indicando que Fur+ferro atuam como um repressor nesse *cluster*. Assim, o ferro pode atuar positivamente ou negativamente na expressão de genes fimbriais.

Em um outro estudo, Santos et al. (2016) mostrou que a expressão do gene *fimZ* (*cluster fimZ*, novo *cluster* de fímbrias tipo 1) em *K. pneumoniae* foi significante maior em condição de escassez de ferro, indicando que Fur atua como um repressor em condição rica em ferro. Ainda nesse estudo, em ensaio de interação (cultivo de bactérias com células eucarióticas hospedeiras), *K. pneumoniae* aderiu e invadiu células epiteliais humanas de bexiga urinária com mais intensidade em condição rica em ferro, e a replicação das bactérias dentro das células hospedeiras foi possível apenas em condições ricas em ferro (SANTOS et al., 2016). Assim, isso mostra que ferro tem uma atividade importante no processo de expressão de genes fimbriais, e na potencialização da adesão, invasão e multiplicação da bactéria.

Outra estrutura muito importante na virulência de *K. pneumoniae* é o lipopolissacarídeo (LPS). LPS é uma estrutura de lipídeos e carboidratos presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas e pode proteger contra o sistema complemento do hospedeiro (MERINO et al., 1992; VEMULAPALLI et al., 2000) (FIGURA 3). Estruturalmente, LPS é composto por um lipídio A, um *core* oligossacarídeo e o antígeno polissacarídeo O (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O lipídio A é uma estrutura mais conservada (SERRATO, 2010), localizado na membrana externa da bactéria e com a função de ancorar o LPS. Porém, após a lise da membrana bacteriana, o lipídio A, também chamado de endotoxina, é liberado, podendo induzir uma resposta imune. Já o *core* oligossacarídeo é formado pelo *core* interno e externo que confere extensão e estabilidade ao LPS (OKUDA et al., 2016). Presente na parte mais externa do LPS, o antígeno O é uma cadeia repetitiva e variada de glicanos capaz de induzir uma resposta imune no hospedeiro (OKUDA et al., 2016) e de atuar como um defensor da célula

bacteriana, impossibilitando o reconhecimento pelo sistema complemento (MERINO et al., 1992; VEMULAPALLI et al., 2000).

Em *K. pneumoniae*, o antígeno O se destaca em infecções emergentes, como o abscesso hepático piogênico (HSIEH et al., 2014) e pela resistência à resposta antibacteriana do hospedeiro (FANG et al., 2016). Nove grupos antigênicos O foram identificados em *K. pneumoniae*, mas os mais frequentes são os antígenos O1, O2, O3 e O5 (HANSEN et al., 1999). Dentre eles, o antígeno O1 se destaca na resistência ao soro e à colonização e disseminação em órgãos internos, incluindo no desenvolvimento de abscessos hepáticos piogênico (HSIEH et al., 2012).

Outro fator de virulência muito importante e característico de isolados de *K. pneumoniae* é a produção de cápsula polissacarídica, uma estrutura de consistência mucoide presente em toda a superfície da bacteriana. A cápsula polissacarídica oferece resistência ao sistema complemento (ÁLVAREZ et al., 2000), à fagocitose (DOMENICO et al., 1994), aos peptídeos antimicrobianos (CAMPOS et al., 2004) aos fatores bactericidas presentes no soro (PODSCHUN et al., 1993), e protege o LPS de ser reconhecido pelo sistema imune (PACZOSA; MECSAS, 2016) (FIGURA 3).

Oitenta sorotipos capsulares, denominados antígenos K, já foram identificados em *K. pneumoniae* (PAN et al., 2008), sendo que os sorotipos K1 e K2 se destacam em bactérias com alto grau de patogenicidade. Linhagens com o sorotipo K1 ou K2 apresentam elevada produção de mucopolissacarídeos, o que confere à bactéria um fenótipo de hiper mucoviscosidade (HMV) (DOMENICO et al., 1994) e uma maior resistência dentro do hospedeiro quando comparada a linhagens de outros sorotipos (LEE et al., 2006). Linhagens de *K. pneumoniae* positivas para o sorotipo capsular K1 ou K2 e para o fenótipo HMV estão associadas a infecções severas e invasivas, como abscesso hepático piogênico, septicemia e endoftalmite (FANG et al., 2004; LEE et al., 2006; WISKUR; HUNT; CALLEGAN, 2008).

Em *K. pneumoniae* a cápsula polissacarídica é expressa pelo *cluster* gênico *cps* (SHU et al., 2009), no qual pode ser regulado pelo ativador transcricional codificado pelo gene plasmidial *mpA* (CHENG et al., 2010; HSU et al., 2011). Assim, *mpA* pode ter uma ação ativadora sob o sorotipo K1. Foi relatado que os genes *wzy* e *mpA* estão associados a linhagens de *K. pneumoniae* com o fenótipo HMV (YU et al., 2006) e linhagens positiva para o gene *mpA* e para o HMV podem estar relacionadas a infecção do trato urinário (LIN et al., 2010). No Brasil, o primeiro relato de uma cepa de *K. pneumoniae* (hipervirulenta ST23) positiva para o sorotipo K1, para o gene *mpA* e para o fenótipo de HMV foi mostrado em uma paciente diagnosticada com abscesso hepático, bacteremia e meningite, e sem histórico de contato com países onde

existe um alto número de casos de *K pneumoniae* hiper mucoviscosa, como a Ásia (COUTINHO et al., 2014).

Outro componente essencial para a patogenicidade de *K. pneumoniae* é a fímbria adesiva. As fímbrias são estruturas essenciais para a etapa da adesão, pois auxiliam no processo de adesão da bactéria às células hospedeiras e, assim, no processo infeccioso de *K. pneumoniae* (MATATOV et al., 1999; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2009). Além de superfície biótica, as fímbrias também se aderem em superfícies abióticas, que quando combinadas com cápsula polissacarídica, podem promover a formação do biofilme (LANGSTRAAT; BOHSE; CLEGG, 2001; DI MARTINO et al., 2003; BODDICKER et al., 2006).

Biofilme é a formação de um aglomerado de células bacterianas, podendo ser heterogêneas, sob uma superfície (DONLAN, 2001). Essas células bacterianas são organizadas em diversas camadas celulares, agem como uma comunidade e produzem polímeros extracelulares para proteção das bactérias e captação de nutrientes (DONLAN, 2001). Devido ao arranjo do biofilme, bactérias crescidas nesse microambiente tem menos susceptibilidade aos antimicrobianos e são mais persistentes no processo infeccioso (DONLAN, 2001).

As fímbrias do tipo 1 e do tipo 3 são os dois tipos principais de fímbrias estudadas em *K. pneumoniae* (FIGURA 3). As fímbrias do tipo 3 são transcritas pelo *cluster* gênico *mrk* em *K. pneumoniae*, no qual o gene *mrkA* é a principal proteína estrutural desta fímbria (ALLEN; GERLACH; CLEGG, 1991) (TABELA 1). As fímbrias do tipo 3 promovem a adesão em células epiteliais da traqueia, pulmão e rins (HORNICK et al., 1992), e são fundamentais no processo de formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2009; SCHROLL et al., 2010). Junto com as fímbrias do tipo 3, as fímbrias tipo 1 também desempenham um papel essencial na formação do biofilme, participando na colonização e persistência do patógeno no hospedeiro (LANGSTRAAT; BOHSE; CLEGG, 2001; BODDICKER et al., 2006; SCHROLL et al., 2010). Ambas as fímbrias são necessárias para a colonização eficiente em cateteres de silicone (STAHLHUT et al., 2012), desempenhando, portanto, um papel importante no desenvolvimento de infecções nosocomiais em pacientes cateterizados. Além disso, as fímbrias tipo 1 são fundamentais para a infecção do trato urinário, devido a adesão que as adesinas FimH proporcionam em células uroteliais da bexiga (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008). As fímbrias tipo 1 são sintetizadas pelo *cluster* *fim* (TABELA 1), e mais detalhes sobre o *cluster* dessa fímbria serão abordados na próxima revisão de literatura.

Além dos *clusters* *mrk* e *fim*, *K. pneumoniae* possui *clusters* fímbriais ainda não caracterizados no seu genoma. Dentre eles, *ecp* é um conjunto de genes caracterizado em *E. coli* e que também foi identificado em *K. pneumoniae* (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013)

(FIGURA 3). Nesse *cluster* (TABELA 1), o gene *ecpR* é um potencial regulador da transcrição do *cluster*, e *ecpA* é o gene que transcreve a principal subunidade proteica da fímbria em *K. pneumoniae* (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013). Em *K. pneumoniae* linhagem MHG78578, *ecpR* e *ecpA* é identificado nos *locus* KPN\_00290 (gene *yfeK*) e KPN\_00291 (gene *ykgZ*), e possui 87% e 89% de identidade quando alinhado com o *ecpR* e *ecpA* de *E. coli* strain K-12 substr. MG1655 (GenBank: NC\_000913.3) (análise realizada nesse estudo). Já Alcántar-Curiel et al. (2013) mostraram que 96% das cepas de *K. pneumoniae* analisadas possuíam o gene *ecpA*. Nesse estudo, os autores sugerem no final que *ecp* pode ser um novo *cluster* essencial para a adesão de *K. pneumoniae*, uma vez que os genes deste *cluster* atuam na adesão da bactéria em células epiteliais e da formação de biofilme em vidro.

**TABELA 1.** *Clusters* gênicos de fímbrias em *Klebsiella pneumoniae*.

| <b>Cluster</b>                                 | <b>Atividade</b>  | <b>Referências</b>            |
|--|---|-------------------------------|
| <b>mrK</b><br>Genes: <i>mrKA-B-C-D-F</i>       | Expressa fímbrias tipo 3 em superfície abiótica, como em cateteres. | Allen; Gerlach; Clegg, 1991   |
| <b>fim</b><br>Genes: <i>fimA-I-C-D-F-G-H-K</i> | Expressa fímbrias tipo 1 e responsável pela adesão em ITU.          | Struve; Bojer; Krogfelt, 2008 |
| <b>ecp</b><br>Genes: <i>ecpR-A-B-C-D-E</i>     | Novo <i>cluster</i> de fímbrias, não caracterizado.                 | Alcántar-Curiel et al., 2013  |
| <b>fimZ</b><br>Genes: <i>fimZ-A-I-D</i>        | Novo <i>cluster</i> de fímbrias tipo 1, não caracterizado.          | Neste estudo                  |

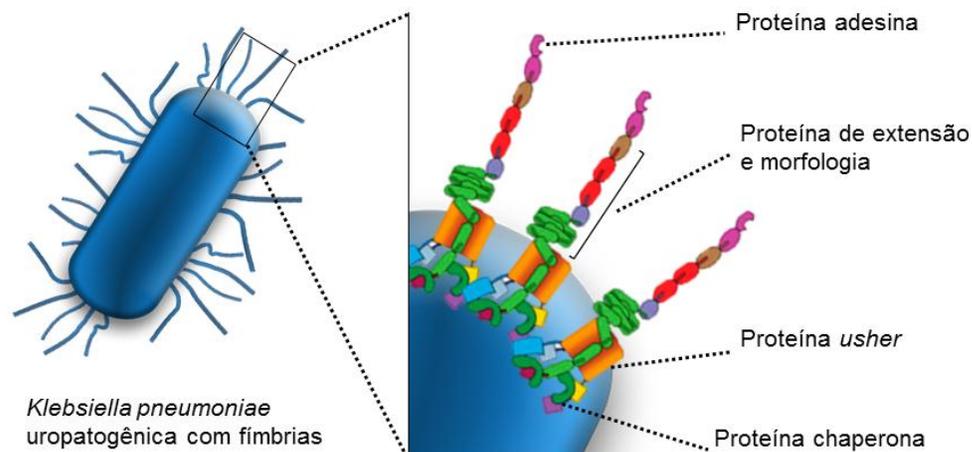
#### 1.4. Mecanismos de regulação da expressão de fímbrias em *Klebsiella pneumoniae*

A análise no genoma anotado de *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 (número de acesso GenBank CP000647.1) revela a presença de, pelo menos, onze *clusters* gênicos envolvidos com a síntese de fímbrias adesivas. Em função dos múltiplos *clusters* gênicos de fímbrias, a regulação da expressão destas estruturas em *K. pneumoniae* é um mecanismo altamente intrincado e integrado, que envolve a participação de reguladores de transcrição, de proteínas que se ligam ao DNA, de um mecanismo de variação de fase, e depende até mesmo de níveis intracelulares de di-GMP e AMP cíclicos. Para uma revisão abrangente do assunto, vide Snyder e colaboradores (2005), Clegg, Wilson e Johnson (2011) e Schwan (2011).

Muito do que se conhece sobre regulação da expressão de fímbrias tipo 1 em Enterobacteriaceae advém de estudos com *Escherichia coli*. Os *clusters* gênicos de síntese de

fímbrias de *K. pneumoniae* apresentam organização gênica similar à encontrada em *E. coli* (CLEGG et al., 1985; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008). Além disso, as fímbrias expressas por *K. pneumoniae* apresentam homologia àquelas expressas por linhagens de *E. coli* uropatogênicas (GERLACH; CLEGG; ALLEN, 1989). Portanto, dada as semelhanças estrutural e organizacional, presume-se que muito dos mecanismos de regulação descritos em *E. coli* também sejam observados em *K. pneumoniae*.

Em *K. pneumoniae*, o principal *cluster* gênico de expressão de fímbrias do tipo 1 é o *cluster* gênico *fim* (TABELA 1). Este *cluster* é composto dos genes *fimA-I-C-D-F-G-H-K*, que codificam toda a estrutura proteica da fímbria tipo 1 de *K. pneumoniae*, formada das seguintes subunidades: a proteína FimA, que é a principal subunidade da fímbria, as proteínas FimF e FimG, que são as subunidades estruturais menores, a adesina FimH, que reconhece estruturas celulares que contém manose, e as proteínas FimC e FimD, respectivamente uma chaperona periplasmática e uma proteína *usher* na membrana externa (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008) (FIGURA 4). O papel do produto do gene *fimI* ainda é desconhecido, e o gene *fimK* codifica um regulador transcricional que será abordado adiante.



**FIGURA 4. Estrutura da fímbria.** A estrutura da fímbria tem como base uma proteína de *usher* que sustenta a fímbria na membrana externa da bactéria, promove a passagem e a montagem das subunidades para compor a fímbria, proteínas chaperonas que transportam proteínas de extensão até a proteína de ancoragem, proteínas de extensão e morfologia da fímbria, e a proteína adesina que reconhece receptores de membrana celular do hospedeiro.

Vários mecanismos de regulação da expressão de fímbrias tipo 1 em *K. pneumoniae* têm sido descritos, sendo o principal deles determinado por um mecanismo conhecido como de variação de fase (VAN DER WOUDE; BÄUMLER, 2004).

A região promotora do *cluster fim* está presente numa região denominada elemento *fimS*, que está localizado entre o gene *fimA*, primeiro gene do *cluster*, e os genes *fimB* e *fimE*, que codificam DNA recombinases. A orientação do elemento *fimS* pode sofrer inversões mediadas pelas recombinases FimE e FimB, num mecanismo conhecido por variação de fase (VAN DER WOUDE; BÄUMLER, 2004) (TABELA 2). De acordo com a orientação, a região promotora pode ser posicionada imediatamente adjacente ao *cluster fim* (posição “on”), ativando a expressão das fímbrias; ou pode ser posicionada distante do *cluster fim* (posição “off”), levando à inativação da expressão. Struve, Bojer e Krogfelt (2008) mostraram que o mecanismo de variação de fase pode modular a expressão de fímbrias, de acordo com sinais ambientais e dependendo do sítio anatômico em que a bactéria estiver localizada. Segundo os autores, *K. pneumoniae* apresentam o elemento *fimS* na orientação “on” quando estão colonizando o trato urinário, o que promoveria a adesão da bactéria nas células uroteliais. Por outro lado, apresentam o elemento *fimS* na orientação “off” quando estão colonizando os tratos respiratório e intestinal, locais onde o fenótipo fimbriado pode trazer desvantagens. A expressão de fímbrias tipo 1 em ambientes repletos de fagócitos, como o sangue e pulmão, potencializaria a adesão dos fagócitos às bactérias (BERNHARD; GBARAH; SHARON, 1992), além de reduzir a habilidade do patógeno em penetrar a camada de muco intestinal (MCCORMICK et al., 1993).

Além das recombinases FimB e FimE, o processo de inversão da orientação do elemento *fimS* depende da participação de proteínas que se ligam ao DNA, como IHF (do inglês, *integration host factor*; EISENSTEIN et al., 1987) e Lrp (do inglês, *leucine-responsive protein*; KELLY et al., 2006) (TABELA 2). Estas proteínas se ligam em sítios específicos no elemento *fimS* e promovem o posicionamento adequado de sequências repetidas invertidas necessárias para a recombinação (SCHWAN, 2011).

Alguns fatores de transcrição também participam da regulação da expressão de fímbrias tipo 1 de forma indireta, ao modular a expressão dos genes *fimB* e *fimE*. Este é o caso, por exemplo, dos reguladores RpoS (DOVE; SMITH; DORMAN, 1997), H-NS (O’GARA & DORMAN, 2000) e OmpR (RENTSCHLER et al., 2013) (TABELA 2). Estes reguladores se ligam à região promotora dos genes *fimB* ou *fimE*, regulando a expressão desses genes e, indiretamente, a expressão do *cluster fim*.

Estudo conduzido em nosso laboratório mostrou que a expressão de fímbrias tipo 1 em *K. pneumoniae* pode ser indiretamente regulada pelo regulador transcricional Fur, por intermédio

do ferro (MACIEL, 2012) (TABELA 2). Nesse estudo foi identificada uma sequência consenso de ligação do regulador Fur na região promotora do gene *fimE*. O regulador Fur modula a expressão de genes-alvo quando complexado ao íon ferroso. Assim, os níveis de ferro encontrados no meio podem modular a expressão de fímbrias de modo indireto, ao regular a expressão da recombinase FimE (MACIEL, 2012).

Além dos níveis de ferro, a expressão de fímbrias tipo 1 também é modulada de acordo com os níveis intracelulares da molécula sinalizadora AMP cíclico (AMPc). O AMPc atua quando complexado a proteína receptora de AMPc (CRP, do inglês *camp receptor protein*). O complexo CRP-AMPc é capaz de interferir tanto no processo de variação de fase quanto na atividade do promotor de *fimA*, levando à repressão da expressão de fímbrias tipo 1 (MÜLLER et al., 2009). Presume-se que este tipo de mecanismo de regulação de fímbrias também esteja presente em *K. pneumoniae*, visto que já foi demonstrado o papel regulador de CRP-AMPc na expressão de cápsula polissacarídica nesta bactéria (LIN et al., 2013).

Além do mecanismo de variação de fase, a expressão de fímbrias tipo 1 também é regulada por fatores de transcrição que se ligam diretamente na região promotora do *cluster fim*. Um dos fatores é o regulador FimK codificado *fimK*, único gene do *cluster fim* encontrado apenas em *K. pneumoniae*, e ausente em *E. coli*. Segundo Rosen et al. (2008a) (TABELA 2). FimK atua como um fator inibidor da expressão de fímbrias e da formação de biofilme, uma vez que linhagens mutantes para este gene apresentam elevado nível de expressão de fímbrias e formação de biofilme. Os autores sugerem ainda um possível papel do regulador FimK na expressão de outros fatores de virulência de *K. pneumoniae* envolvidos com a infecção do trato urogenital. No entanto, Wang e coautores (2013) atribuem o efeito inibidor do regulador FimK ao envolvimento de di-GMP cíclico na atividade de fosfodiesterase deste regulador. Segundo estes autores, a região N-terminal de FimK contém um domínio do tipo hélice-volta-hélice que se liga ao elemento *fimS* e desempenha um papel positivo, e não negativo, na expressão de fímbrias tipo 1 (WANG et al., 2013). Wang e colegas (2013) propõe, ainda, que FimK pode regular a expressão do *cluster fim* em cooperação com proteínas IHF e Lrp, ou ainda com algum outro regulador tal como FimZ, como ocorre em *S. Typhimurium* (TABELA 2).

**TABELA 2.** Principais reguladores da expressão de fímbrias.

| Reguladores | Atividade  | Referências                  |
|-------------|--|------------------------------|
| FimE e FimB | Recombinases/variação de fase <i>on-off</i>  | Van Der Woude; Baumler, 2004 |
| IHF         | Participa da variação de fase <i>on-off</i>  | Eisenstein et al., 1987      |
| Lrp         | Participa da variação de fase <i>on-off</i>  | Kelly et al., 2006           |
| H-NS        | Participa da variação de fase <i>on-off</i>  | O’Gara; Dorman, 2000         |
| OmpR        | Participa da variação de fase <i>on-off</i>  | Rentschler et al., 2013      |
| Fur         | Inibidor/ativador de fímbrias em <i>K. pneumoniae</i>  | Maciel, 2012                 |
| FimK        | Inibidor de fímbrias e formação de biofilme/Presente em <i>K. pneumoniae</i> e ausente em <i>E. coli</i> | Rosen et al., 2008a          |
| FimZ        | Ativador em <i>S. Typhimurium</i>  | Yeh; Tinker; Clegg, 2002     |

### 1.5. Regulação de fímbrias tipo 1 pela proteína FimZ

Dentre os membros da família Enterobacteriaceae, é em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que o papel de FimZ na regulação da expressão de fímbrias tipo 1 está bem mais caracterizado. FimZ em *S. Typhimurium* é um regulador positivo da expressão de fímbrias tipo 1 do *cluster fim*, com ligação específica na região promotora do gene *fimA* (YEH; TINKER; CLEGG, 2002). Tal descoberta foi feita quando uma mutação no gene *fimZ* de *S. Typhimurium* propiciou o fenótipo não fimbriado e baixo nível da expressão do *cluster fim*, e a complementação do gene *fimZ* restabeleceu o fenótipo fimbriado em *S. Typhimurium* (YEH; HANCOX; CLEGG, 1995).

O *cluster fim* de *S. Typhimurium* é composto pelos genes *fimA-I-C-D-H-F-Z-Y-W*, e é muito conservado nessa linhagem (BÄUMLER et al., 1997; CLEGG; PURCELL; PRUCKLER, 1987). Os genes *fimA-I-C-D-H-F* são responsáveis pela parte estrutural da fímbria, e *fimZ-Y-W* são responsáveis pela regulação da expressão da fímbria e são transcritos em direção oposta ao restante do *cluster* (TINKER; CLEGG, 2000; TINKER; HANCOX; CLEGG, 2000; YEH; HANCOX; CLEGG, 1995).

O *cluster fim* possui homologia com os genes fimbriais do *cluster fim* de *E. coli*. Porém, o mecanismo de regulação de síntese de fímbrias em *S. Typhimurium* difere substancialmente do que ocorre em *E. coli* (CLEGG; HANCOX; YEH, 1996). A região promotora do *cluster fim* de *S.*

*S. Typhimurium* não é uma sequência de DNA com inversão de variação de fase, como ocorre com o elemento *fimS* de *E. coli* (CLEGG; HANCOX; YEH, 1996). Além disso, *S. Typhimurium* não possui homólogos das enzimas DNA recombinases FimE e FimB, responsáveis por catalisar a inversão de *fimS*. A expressão do *cluster fim* em *S. Typhimurium* é modulada por reguladores codificados pelos genes *fimZ*, *fimY* e *fimW* (TINKER; CLEGG, 2000; TINKER; HANCOX; CLEGG, 2000; YEH; HANCOX; CLEGG, 1995).

FimZ é um regulador que ativa a expressão do *cluster fim*, ao se ligar na região promotora do gene *fimA* (YEH; TINKER; CLEGG, 2002), ao passo que FimY e FimW atuam respectivamente como coativador e repressor por meio de interações proteína-proteína com FimZ (TINKER; CLEGG, 2000; TINKER; HANCOX; CLEGG, 2000). A atuação de FimZ e FimY é sugerida como essencial para essa a transcrição de *fimA* (YEH; HANCOX; CLEGG, 1995). Porém, FimZ é a proteína que estabelece a ligação no sítio de ligação em *S. Typhimurium* (YEH; HANCOX; CLEGG, 1995), e FimY é a proteína que contribui para FimZ regular o *cluster fim* (TINKER; CLEGG, 2000). Além disso, possivelmente FimZ e FimY podem atuar como ativadores independentes no *cluster*, porém ambos podem interagir na expressão dos seus genes (SAINI; PEARL; RAO, 2009).

Por outro lado, FimW é um regulador que reprime a expressão do *cluster fim* (TINKER; HANCOX; CLEGG, 2000), atuando na repressão do gene *fimY* (SAINI; PEARL; RAO, 2009). Assim, FimY induz a expressão do gene *fimW*, e o regulador FimW reduz a expressão do gene *fimY* e, conseqüentemente, do gene *fimZ* (SAINI; PEARL; RAO, 2009). Isso sugere que FimY pode ter um duplo papel em *S. Typhimurium*, atuando como ativador do *cluster fim*, do gene *fimZ* e do seu próprio gene, e como repressor de todos eles, por induzir a expressão do repressor FimW (SAINI; PEARL; RAO, 2009).

De acordo com Yeh, Tinker e Clegg (2002), em *S. Typhimurium* o sítio de ligação do regulador FimZ na região promotora do gene *fimA* está localizado entre os nucleotídeos -50 a -100 a montante do sítio de início da transcrição do gene. Segundo os autores, o sítio é composto de duas repetições em tandem (repetidas em sequência) composta por 7 nucleotídeos (sequência AATAAGA-N19-AATAAGA), sendo que FimZ se liga em pelo menos em uma das repetições. Ainda de acordo com os autores, pelo menos 1 cópia da repetição de 7 nucleotídeos é encontrada na região promotora do gene *fimZ*, indicando que FimZ regula não apenas o *cluster fim*, mas também a expressão de seu próprio gene.

Por outro lado, diferente de *S. Typhimurium* que possui o papel do regulador FimZ bem caracterizado, não há estudos na literatura descrevendo o papel do regulador FimZ de *K. pneumoniae*. Porém, em nosso laboratório, análises preliminares de bioinformática indicaram a

presença de uma sequência repetitiva direta composta de 7 nucleotídeos e localizada a 64 nucleotídeos a montante do códon iniciador do gene *fimA* de *K. pneumoniae*, o que vai de encontro com as características desta sequência (repetição em tandem, números de nucleotídeos que a compõe, localização) descritas por Yeh, Tinker e Clegg (2002).

Em *K. pneumoniae*, o gene que codifica o regulador FimZ, gene *fimZ*, está localizado próximo a um *cluster* gênico de síntese de fímbrias provavelmente do tipo 1, porém ainda não caracterizado em *K. pneumoniae* (WU et al., 2009). Além disso, FimZ é considerado um regulador por possuir um domínio chamado hélice-volta-hélice, que é típico de proteína que se liga no DNA. No entanto, FimZ é somente um potencial regulador da expressão de fímbrias tipo 1 em *K. pneumoniae*, pois ainda são escassos os estudos de caracterização do papel deste regulador na síntese de fímbrias.

Dessa forma, considerando que as fímbrias são importantes mediadores de infecções do trato urinário causadas por *K. pneumoniae* (ROSEN et al., 2008b; STAHLHUT et al., 2012), e que FimZ é um potencial regulador transcricional de fímbrias, torna-se importante o estudo e a caracterização da atuação do regulador FimZ na expressão de fímbrias em *K. pneumoniae*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Identificar o possível *regulon* de FimZ em *Klebsiella pneumoniae* e investigar a atuação desse regulador na expressão de fímbrias, por meio de ensaios fenotípicos e ensaios *in vivo* da interação patógeno-hospedeiro.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Identificar e caracterizar possíveis sequências regulatórias de FimZ (*regulon* do FimZ):
  - a. Identificar, por meio de análises de bioinformática, possíveis sequências de ligação do regulador FimZ de genes fimbriais.
  - b. Confirmar a ligação do regulador FimZ nas sequências identificadas, por meio do ensaio mobilidade eletroforética (EMSA).
2. Caracterizar fenotipicamente as linhagens de *K. pneumoniae* selvagem, deficiente-FimZ e complementada-FimZ:
  - a. Analisar através de análises morfológicas das colônias, ensaios de aglutinação de levedura, motilidade, produção de cápsula formação de biofilme, e microscopia eletrônica de transmissão.
3. Analisar a interação patógeno-hospedeiro por meio de ensaios *in vivo* com modelos animais infectados com as linhagens *K. pneumoniae* selvagem e deficiente-FimZ:
  - a. Induzir infecção urinária em modelo ITU em camundongo com as linhagens selvagem e deficiente-FimZ de *K. pneumoniae*;
  - b. Analisar por cortes histológicos o epitélio da bexiga urinária de camundongos infectados com as linhagens selvagem e deficiente-FimZ de *K. pneumoniae*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultura

Para a realização deste estudo foram utilizadas três cepas de *K. pneumoniae*: 1) uma cepa selvagem de *K. pneumoniae* uropatogênica (cepa UKP8), que foi isolada de uma infecção do trato urinário humano, 2) uma cepa mutante deficiente em FimZ (cepa UKP8-*fimZ*) gerada a partir de UKP8, e 3) a cepa mutante UKP8-*fimZ* complementada com o gene *fimZ* (cepa UKP8-C). Os detalhes das estirpes bacterianas e dos plasmídeos empregados neste estudo estão listados na Tabela 3.

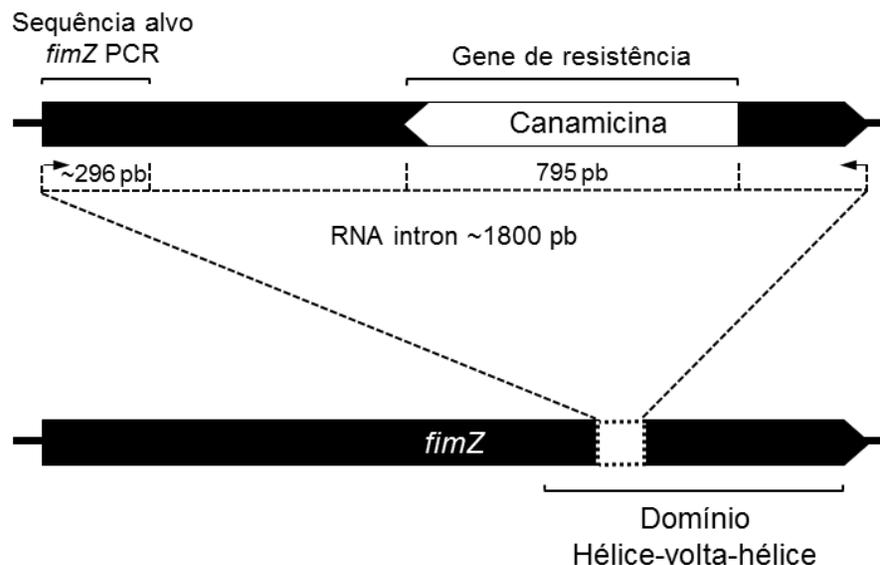
**TABELA 3.** Linhagens bacterianas e plasmídeos usados nesse estudo.

| Linhagens                             | Descrição   | Referência        |
|---------------------------------------|---|-------------------|
| UKP8                                  | <i>Klebsiella pneumoniae</i> Uropatogênica, isolado 8 (cepa selvagem; sensível a canamicina)  | Lab. clínico      |
| UKP8- <i>fimZ</i>                     | Linhagem UKP8 com o RNA intrônico (contendo o gene <i>Can<sup>r</sup></i> ) inserido na região codificante do gene <i>fimZ</i> (cepa mutante para o gene <i>fimZ</i> ; resistente a canamicina) | Gomes, 2014       |
| UKP8-C                                | Linhagem UKP8- <i>fimZ</i> transformada com o vetor pCR_Eri <sup>r</sup> + <i>fimZ</i> (cepa mutante, complementada com o gene <i>fimZ</i> ; resistente a canamicina e eritromicina)            | Este estudo       |
| <i>E. coli</i> DH5α                   | Linhagem de <i>Escherichia coli</i> utilizada para clonagens  | Este estudo       |
| <i>E. coli</i> BL21                   | Linhagem de <i>Escherichia coli</i> utilizada para a expressão de FimZ  | Este estudo       |
| <b>Plasmídeos</b>                     |   |                   |
| pCR2.1_Eri <sup>r</sup>               | Vetor pCR2.1-TOPO ( <i>ThermoFisher</i> ) clonado com o gene de resistência a Eritromicina (Eri <sup>r</sup> )  | Profa. Bertoncini |
| pCR2.1_Eri <sup>r</sup> + <i>fimZ</i> | Vetor pCR2.1_Eri <sup>r</sup> clonado com o gene <i>fimZ</i> ; foi utilizado para a complementação do gene <i>fimZ</i> na linhagem UKP8- <i>fimZ</i>  | Este estudo       |
| pET-28a                               | Vetor utilizado para a expressão do gene <i>fimZ</i> na linhagem de <i>E. coli</i> BL21   | Este estudo       |

Amp<sup>r</sup>, resistência à Ampicilina; Cm<sup>r</sup>, resistência à Cloranfenicol; Eri<sup>r</sup>, resistência à Eritromicina; Can<sup>r</sup>, resistência à Canamicina. Lab. clínico, Instituto de Prevenção e Diagnóstico, Brasil. Profa. Bertoncini, Professora Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini (Universidade São Francisco).

A linhagem UKP8-*fimZ*, mutante para o gene *fimZ*, foi gerada previamente por Gomes (2014), através do sistema de nocaute gênico *Targetron*. Nesse sistema de nocaute gênico é utilizado um vetor plasmidial que contém todas as informações para a geração de um RNA

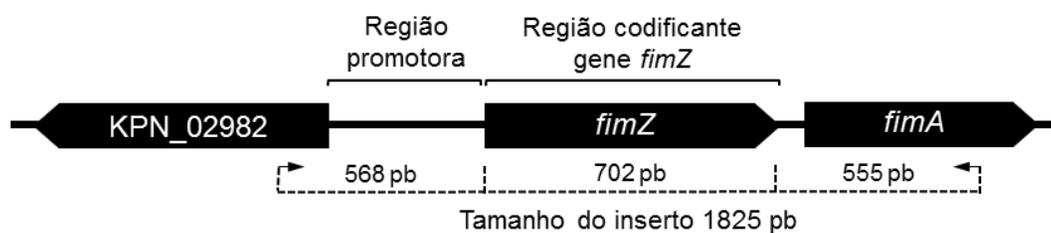
intrônico e da expressão de uma transcriptase reversa. Este RNA intron e enzima formam um complexo – chamado de complexo proteína-RNA (RNP) – que reconhece sequências específicas no gene alvo, fazendo com que o RNA intron seja inserido neste local do gene alvo de modo específico. O RNA intron apresenta um tamanho aproximado de 1800 pb, e é composto por: 1) uma sequência alvo de aproximadamente 296 pb e amplificada previamente por PCR a partir da sequência nucleotídica do gene *fimZ*, 2) a região codificante do gene *Can<sup>r</sup>*, que confere resistência a canamicina, com tamanho de 795 pb, e 3) mais 750 pb restantes. No processo de nocaute gênico pelo *TargetTron* o RNA intron é inserido na porção final do gene *fimZ*, mais precisamente na região do gene que codifica o domínio hélice-volta-hélice (FIGURA 5). Assim, o nocaute gênico é obtido por meio da inserção de um fragmento de 1800 pb (o RNA intron) dentro da região codificante do gene, resultando em uma proteína FimZ truncada. A Figura 5 ilustra o tamanho do RNA intron inserido no gene *fimZ* no genoma de *K. pneumoniae*. A sequência alvo foi desenhada pelo programa *TargetTron*<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich), e as etapas para a geração da cepa mutante foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, e conforme descrito por Gomes (2014).



**FIGURA 5. RNA intron inserido no gene *fimZ* de *Klebsiella pneumoniae*.** Esse RNA intron apresenta um tamanho aproximado de 1800 pb, sendo composto: 1) por uma sequência alvo de aproximadamente 296 pb, amplificada previamente por PCR a partir de sequências do gene *fimZ*, 2) a região codificante do gene *Can<sup>r</sup>*, que confere resistência a canamicina, contendo 795 pb, e 3) aproximadamente 750 pb restantes. No processo de nocaute gênico, o RNA intron foi inserido na porção final do gene *fimZ*, interrompendo a região do gene que codifica o domínio Hélice-volta-hélice do regulador FimZ. A identificação do sítio alvo de inserção do RNA intron no gene *fimZ* foi realizada pelo programa *TargetTron*<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich).

A linhagem UKP8-*fimZ* complementada (UKP8-C) foi gerada neste estudo, a partir da inserção, na cepa UKP8-*fimZ*, de um vetor recombinante contendo o gene *fimZ* de *K. pneumoniae*. Inicialmente toda a região codificante do gene *fimZ* de *K. pneumoniae* e mais regiões flanqueadoras foram amplificadas por PCR, utilizando-se os *primers* com2*fimZ*-F e *fimR* (TABELA 4), gerando um fragmento de DNA de 2426 pb. A amplificação foi realizada com o Kit *GoTaq® G2 Flexi* (Promega) contendo 1X de tampão, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM dos *primers*, 0,1 µg de DNA e 0,13 u/µl *GoTaq*, em volume final de 25 µL. As reações foram feitas no equipamento *GeneAmp® PCR System 9700* e consistiram de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos compostos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. A amplificação do fragmento de 2426 pb foi checada após eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Boráx.

O fragmento de 2426 pb foi purificado com o kit *Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System*, e digerido com as enzimas *HindIII* (10 unidades/µL Fermentas) e *KpnI* (2,5 unidades/µL Fermentas) a 37°C durante 2 horas. Após esta digestão foi gerado um fragmento de 1825 pb contendo uma região *upstream* de 568 pb (com a região promotora do gene *fimZ*), a região codificante do gene *fimZ*, e uma região *downstream* ao gene *fimZ*, de 555 pb (FIGURA 6). Assim, o tamanho da sequência para a complementação do gene *fimZ* possui 1825 pb.



**FIGURA 6. Região codificante do gene *fimZ* para a complementação do gene.** O fragmento para a complementação do gene *fimZ* possui um tamanho de 1825 pb, e contém a região codificadora e promotora de *fimZ* e regiões flanqueadoras *upstream* (568 pares de bases contendo a região promotora do gene) e *downstream* (555 pares de bases contendo a região terminadora de *fimZ* e uma porção inicial do gene *fimA*).

O vetor pCR2.1\_Eri<sup>r</sup>, que havia sido previamente clonado com o gene que confere resistência ao antibiótico eritromicina (TABELA 3), foi também digerido com *HindIII* e *KpnI*, para a clonagem do gene *fimZ*. A reação de ligação foi realizada na proporção 1:1; isto é, 200 ng do vetor linear pCR2.1\_Eri<sup>r</sup> e 200 ng do gene *fimZ* digerido, 1 U de enzima *T4 DNA ligase* e 1X de tampão de ligação, com o volume final de 10 µL. A reação de ligação foi realizada a 4 °C por 16 horas. Com a clonagem do gene *fimZ* no vetor pCR2.1\_Eri<sup>r</sup> foi gerado o vetor recombinante vector pCR2.1\_Eri<sup>r</sup>+*fimZ*. Este vetor recombinante foi, então, inserido na linhagem mutante UKP8 deficiente-FimZ pela técnica do choque térmico: incubação no gelo por 30 minutos, a 42 °C por 90 segundos e no gelo por 3 minutos. Imediatamente, foi adicionado meio LB líquido fresco (13 volumes) e incubada a 37°C e 200 r.p.m. por 1 hora. As células foram plaqueadas em LB ágar, incubadas a 37°C por 16 horas e selecionadas em placas contendo 50 µg/ml de eritromicina e 25 µg/ml de canamicina. A complementação do gene *fimZ* foi confirmado por amplificação do DNA plasmidial da linhagem complementada *fimZ* (UKP8-C) e DNA genômico da linhagem UKP8 utilizando os *primers* com*fimZ forward* (F) e *reverse* (R) (TABELA 4).

**TABELA 4.** *Primers* para geração e confirmação da cepa UKP8-*fimZ* complementada com o gene *fimZ*.

| <b>Primers</b>         | <b>Sequência 5'&gt;3'</b>                    | <b>Amplicon (pb)<sup>1</sup></b> | <b>Descrição</b>                               | <b>Referência</b> |
|------------------------|--|----------------------------------|--|-------------------|
| com2fimZ-F<br>fim-R    | AGCTAAGCTTCAGCCCGAG<br>GCTGCCACTGCAGATTTTC   | 2426                             | Complemento-<br>gene <i>fimZ</i>               | Este estudo       |
| comfimZ-F<br>comfimZ-R | TGAGCTTGCTGGTTGTTTTG<br>ACTCAACTTGCAAAGTGGCA | 1128                             | Complemento-<br>gene <i>fimZ</i><br>confirmado | Este estudo       |

1. Pares de bases (pb).

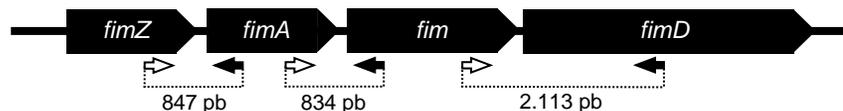
As cepas UKP8, UKP8-*fimZ* e UKP8-C foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura LB (*Lysogeny broth* Héli; Bertani, 2004) a 37°C sob agitação de 200 r.p.m.; para cultivo em condições estáticas foi utilizado meio LB sólido (contendo ágar). Quando necessários, antibióticos foram adicionados ao meio nas seguintes concentrações finais: 100 µg/ml de ampicilina, 30 µg/ml de canamicina, 25 µg/ml de cloranfenicol e 50 µg/ml de eritromicina. O crescimento bacteriano foi monitorado no espectrofotômetro *GeneQuant Pro* (Amersham Biosciences), por meio de leituras da densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm (D.O.<sub>600nm</sub>).

Os DNAs plasmidial e cromossômico foram extraídos respectivamente com os kits Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega) e Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.2. Identificação e Caracterização do *cluster fimZ* de *K. pneumoniae* e do provável *regulon* de FimZ

#### 3.2.1. Organização gênica do *cluster fimZ* de *K. pneumoniae*.

No genoma de *K. pneumoniae* o gene *fimZ* está localizado em um *cluster* gênico, aqui denominado *cluster fimZ*, composto dos genes *fimA*, *fim* e *fimD*, que codificam prováveis unidades fimbriais ainda não caracterizadas (FIGURA 7). Para saber se os genes do *cluster fimZ* estão organizados em *operon* – isto é, se são transcritos numa mesma unidade transcricional (um único RNA policistrônico) – reações de PCR foram realizadas utilizando pares de *primers* que anelam em cada uma das extremidades dos genes (FIGURA 7, setas brancas e pretas).



**FIGURA 7. Organização gênica do *cluster fimZ* de *Klebsiella pneumoniae*.** Os genes *fimA*, *fim* e *fimD* codificam prováveis unidades fimbriais. As setas brancas e pretas indicam os pares de *primers* utilizados para a confirmação da unidade transcricional dos genes. Estão indicados os respectivos tamanhos dos amplicons, em pares de bases (pb).

Para as reações de PCR foi utilizado, como *template*, cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de cepas UKP8, conforme protocolo descrito no item 3.5 do “Materiais e Métodos”. As reações de PCR foram realizadas com o Kit *Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) contendo 1X do tampão, 0,2 mM de dNTPs, 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 μM dos *primers* F e R, 0,1 μL de DNA e 0,4 u/μl *Platinum Taq*, com o volume final de 25 μL. A reação seguiu com uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos, pelo equipamento *GeneAmp® PCR System 9700*. Em seguida as bandas foram checadas em gel de agarose 1% LE em tampão Boráx pelo *Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software*. Os pares de *primers* utilizados e os respectivos amplicons estão listados na

Tabela 5. Os *primers* foram desenhados com o programa *Primer3* v. 0.4.0, de modo a apresentarem 60 °C de temperatura de anelamento.

**TABELA 5.** *Primers* utilizados na análise de transcrição policistrônica dos genes no cluster *fimZ*.

| Entre os genes            | Primers       | Sequência (5' > 3')  | Amplicon (pb) <sup>1</sup> | Referência  |
|---------------------------|---------------|----------------------|----------------------------|-------------|
| <i>fimZ</i> e <i>fimA</i> | <i>fimZ-F</i> | TTCAACAATTAGCCGCACTG | 847                        | Este estudo |
|                           | <i>fimA-R</i> | TTAGTGATAGGCGCCTCGTT |                            |             |
| <i>fimA</i> e <i>fim</i>  | <i>fimA-F</i> | GCCAGAAGTTGGGGTCAAT  | 834                        | Este estudo |
|                           | <i>fim-R</i>  | GCTGCCACTGCAGATTTTC  |                            |             |
| <i>fim</i> e <i>fimD</i>  | <i>fim-F</i>  | TATCCTGCAGTTCGCGATT  | 2.113                      | Este estudo |
|                           | <i>fimD-R</i> | GCGAGGGTAAATGCGGTAT  |                            |             |

1. Pares de bases (pb)

### 3.2.2. Alinhamento das sequências nucleotídicas e proteicas dos genes *fimZ* de *S. Typhimurium* e *K. pneumoniae*

Para saber se *FimZ* de *S. Typhimurium* e *K. pneumoniae* possui homologia, as sequências de nucleotídeos (n) e proteínas (p) foram alinhadas pela ferramenta BLASTn e BLASTp do NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*). Em adição, um alinhamento das sequências de *FimY* e *FimW* de *S. Typhimurium* foi realizado no genoma de *K. pneumoniae*. O alinhamento foi realizado com a sequência genômica de *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 (GenBank número de acesso CP000647.1), e a sequência de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (GenBank número de acesso NC\_003198.1).

### 3.2.3. Identificação e validação de sítios de ligação do regulador *FimZ* em genes que codificam fímbrias em *K. pneumoniae*.

Para realizar a busca de possíveis sítios em genes fimbriais em *K. pneumoniae*, análises de bioinformática foram empregadas para identificar os prováveis locais de ligação do regulador *FimZ* no genoma de *K. pneumoniae*. Essas análises foram realizadas tendo como base o sítio de ligação de *FimZ* de *S. Typhimurium*, sequência AATAAGA-N19-AATAAGA, identificado por

Yeh, Tinker e Clegg (2002). Os prováveis sítios de ligação foram pesquisados na região promotora e região codificante de genes que codificam fímbrias na sequência genômica da linhagem ATCC MGH78578 de *K. pneumoniae* (número de acesso *GenBank* CP000647.1).

Para validar os prováveis sítios de ligação FimZ, os sítios de FimZ identificados e a proteína FimZ isolada foram submetidos à técnica de ensaio de desvio de mobilidade eletroforética (EMSA). Para a realização dos ensaios, foram necessárias sondas dupla fita contendo a sequência nucleotídica dos prováveis sítios identificados, e a proteína FimZ de *K. pneumoniae* purificada.

Para a geração das sondas dupla fita foram utilizados oligonucleótidos complementares contendo as putativas sequências de ligação-FimZ (TABELA 6). Dois protocolos foram utilizados para a obtenção das sondas, por motivo de custo na montagem das sondas. Porém, ambos os protocolos de obtenção de sonda são viáveis. No protocolo 1, 10 µL dos oligonucleotídeos *forward* (F) e *reverse* (R) a 100 µM foi adicionado em 25 µL H<sub>2</sub>O ultra limpa e em 5 µL ao tampão de anelamento 10X (100 mM de cloreto de sódio, 50 mM de Tris-Ácido clorídrico pH 8.0, 10 mM de cloreto de magnésio e 1 mM de Ditiotretol), para então serem submetidas a termociclagem no equipamento *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems). As condições da termociclagem consistiram em uma temperatura inicial de 95 °C por 2 minutos seguida de uma temperatura final de acordo com a temperatura de anelamento dos oligos, por 30 minutos. A partir da temperatura inicial (95 °C) foi programado um decréscimo de 2 °C a cada ciclo, até que a temperatura atingisse a temperatura dos oligos, momento no qual a mistura foi mantida por 30 minutos. A visualização do anelamento foi feita em gel de agarose 3% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, submetido a eletroforese contendo 5 mM de tetraborato de lítio como tampão. O fragmento foi checado pelo *Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software* (BIO-RAD).

No protocolo 2, *primers* já obtidos pelo laboratório foram utilizados para a amplificação de fragmentos contendo o sítio de ligação de FimZ e montagem das sondas por reações de PCR. As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. A reação foi visualizada após corrida em gel de agarose 1% LE (Uniscience), contendo 5 mM de tetraborato de lítio como tampão, pelo *Gel Doc™*.

Para o EMSA, também foi necessário a obtenção da proteína FimZ de *K. pneumoniae*. Para isso, o gene *fimZ* foi amplificado a partir do DNA genômico de *K. pneumoniae* extraído com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification kit* (Promega), seguindo as instruções do

fabricante. Para esta amplificação, foram utilizados *primers*, cujas sequências nucleotídica tiveram os sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *XhoI* (*New England BioLabs*®) (TABELA 6). Isto foi necessário para facilitar a clonagem do produto amplificado no vetor de expressão pET-28a. Assim, tanto o gene *fimZ* quanto o vetor pET-28a foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* e purificados por meio da excisão de bandas em gel de agarose 1%, utilizando-se o kit *Wizard*® *SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega). Em seguida, o gene *fimZ* purificado foi clonado no vetor pET-28a por meio de reação de ligação com a enzima *T4 DNA ligase* e 1X de tampão de ligação (*New England BioLabs*®). O vetor recombinante pET-28a+gene *fimZ* foi utilizado na transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$ , e clones recombinantes foram obtidos por meio de minipreps com o kit *Wizard Plus SV Minipreps*.

**TABELA 6.** Sondas e *primers* utilizados no EMSA e clonagem do gene *fimZ*.

| Sonda/<br><i>primers</i>   | Sequência 5'-3'                 | Amplicon<br>(pb) | Descrição   | Referência  |
|----------------------------|---------------------------------|------------------|---|-------------|
| <i>Primer</i><br>fimA-F    | GGGACGATACGCGTTTGAT             | 200              | Provável sítio<br>de FimZ no<br><i>cluster fimZ</i> | Este estudo |
| <i>Primer</i><br>fimA-R    | TCAAACCGTTCAGTTAGGCC            |                  |   |             |
| <i>Primer</i><br>ecpR-F    | GCAGGTTTCTCCGCAAAG              | 98               | Provável sítio<br>de FimZ no<br><i>cluster ecp</i>  | Este estudo |
| <i>Primer</i><br>ecpR-R    | GATCGATTTCCGGCTGCAT             |                  |   |             |
| Oligo<br>fimA-F            | CACTCGGCTGAAATCTGAAATGCCTGGAA   | 44               | Provável sítio<br>de FimZ no<br><i>cluster fim</i>  | Este estudo |
| Oligo<br>fimA-R            | TCCAGGCATTTTCAGATTTTCAGCCGAGTGA |                  |   |             |
| <i>Primer</i><br>Ex-fimZ-F | CACGCATATGATGATCGTGCC           | 721              | Amplificação<br>do gene <i>fimZ</i>                 | Este estudo |
| <i>Primer</i><br>Ex-fimZ-R | GATCTCGAGTTATCCCCCTC            |                  |   |             |

*Primers* foram desenhados de modo a apresentar temperatura de anelamento de 60 °C nas reações de PCR. Os oligos complementares fimA-F e fimA-R foram anelados em equipamento termociclador, para obtenção de sonda dupla fita. Os prováveis sítios de ligação de FimZ na sonda fimA estão grifados. Para facilitar a clonagem do gene *fimZ*, os *primers* Ex-fimZ-F e Ex-fimZ-R foram desenhados de modo a conter os sítios de restrição de *NdeI* e *XhoI*, respectivamente (sequência grifada). Pb: pares de bases.

Para a expressão da proteína FimZ de *K. pneumoniae* foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com o vetor recombinante pET-28a contendo o gene *fimZ*. A indução da de FimZ ocorreu por meio da adição de 1 mM de IPTG por 3 horas a 37°C, após a *E. coli* atingir uma densidade óptica (D.O.) de 0.6 a 600 nm de comprimento de onda.

Para obter a proteína induzida, as células de *E. coli* foram centrifugadas a 800g por 5 min, 4°C e incubadas com o tampão de lise (5 mL do tampão de equilíbrio: 150 mM NaCl e 50 mM Tris; 5 mL de *B-Per*<sup>®</sup> *Bacterial Protein Extraction*, 2 µL DNase (1 u/µl) e 50 mM lisozima), por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram submetidas a 5 ciclos de sonicação por 30 segundos e descanso de 1 minuto, sob o gelo. Depois, o material foi centrifugado a 15.000 r.p.m., 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e adicionado na coluna para purificação por cromatografia de afinidade à níquel.

Para a purificação da proteína FimZ foi utilizada a coluna do kit *Pierce*<sup>®</sup> *Centrifuge Columns and Caps* (Thermo Scientific) e uma matriz de cromatografia de afinidade chamada Ni-NTA Agarose (Invitrogen), adicionada na coluna de acordo com o fabricante. Essa matriz é utilizada para a purificação de proteínas recombinantes contendo histidina, que se ligam à resina da matriz para serem eluídas depois por competição de imidazol. Após a coluna estar preparada, foi adicionado 3 mL do sobrenadante coletado após sonicação por coluna, e a coluna foi incubada 1 hora no gelo sob agitação leve. Após esse período, a coluna foi submetida à um *spin*, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o lacre da coluna foi rompido e 1 mL do tampão de equilíbrio (150 mM NaCl e 50 mM Tris) contendo de 5 mM a 300 mM de imidazol foi adicionado à coluna, e cada fração da eluição foi coletada para a visualização em poliácridamida. Nesse momento, a proteína FimZ foi eluída por afinidade com o competidor imidazol através do fluxo de gravidade.

Para retirar o imidazol ligado à proteína, foi realizado uma diálise por osmose. Nessa etapa, a proteína purificada com imidazol foi mantida dentro de uma membrana *SnakeSkin*<sup>®</sup> *Dialysis Tubing, 3,5K MWCO* (Thermo Scientific) contendo poros, e o tampão de diálise (100 mM Fosfato de sódio pH 7,2, 10%, glicerol e 100 mM NaCl) foi mantido fora da membrana dentro de um recipiente sob homogeneização, de acordo com o fabricante. A diálise foi mantida por 3 horas sob gelo, e todo o material foi coletado depois para averiguar a concentração da proteína determinada pelo método de *Bradford* (SAMBROOK et al., 1989). A proteína foi mantida à - 20°C para o ensaio EMSA.

Para a realização do EMSA as sondas montadas e a proteína FimZ (70 ng/µL) purificada foram incubadas com o tampão de ligação (60 mM de cloreto de sódio, 100 mM de Tris-Ácido clorídrico pH 8.0, 20 mM de cloreto de magnésio, 2 mM de Ditioneitol, 10% glicerol, 60 µg/mL albumina de soro bovino e 1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético) em gelo por 30 minutos, e aplicadas em gel 5% acrilamida (625 µL de 40% acrilamida, 5,5 mL de Borax, 18,75 µL de temed, 106,25 µL de persulfato de amônio) contendo 1X tampão Borax (Borato de Sódio a 4

mM e pH 9.0). Para a visualização do resultado, o gel foi incubado em tampão Borax contendo 10 µL de brometo de etídio por 15 minutos, e checado em *Gel Doc*<sup>TM</sup>.

### 3.3. Análise da expressão de genes fimbriais de *K. pneumoniae* por PCR em tempo real

Para investigar o papel do regulador FimZ na expressão de genes fimbriais, a expressão dos genes *fimZ* e *fimA* (*cluster fimZ*), *fimA* (*cluster fimA*), *ecpR* e *ecpA* (*cluster ecp*) e *mrkA* (*cluster mrk*) foi analisada por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) nas linhagens de *K. pneumoniae* UKP8 (selvagem, portadora do regulador FimZ) e UKP8-fimZ (deficiente para o regulador FimZ).

Para tal, as células de *K. pneumoniae*, cepas UKP8 e UKP8-fimZ, foram crescidas em LB sólido por 18 horas a 37°C de incubação. Após este período, as células foram coletadas para a extração de RNA total pelo Mini Kit *Trizol*<sup>®</sup> Max Bacterial RNA Isolation Kit (Ambion), conforme as instruções do fabricante.

Três microgramas do RNA total extraído foram utilizados no kit *ThermoScript*<sup>TM</sup> *RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis* (Invitrogen), de acordo com o protocolo. O cDNA sintetizado foi então quantificado em espectrofotômetro e utilizado nas reações de PCR em tempo real.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o kit *Platinum*<sup>®</sup> *SYBR*<sup>®</sup> *Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen) no equipamento *Real-Time PCR System 7500* (Applied Biosystems). Os dados foram analisados pelo *Sequence Detection Software* v1.3.1 (Applied Biosystems). O padrão de expressão relativo foi calculado pelo método  $\Delta\Delta C_T$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), e os dados foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de *Student*. O gene *rho* foi utilizado como referência endógena (GOMES et al., 2018).

A Tabela 7 lista os pares de *primers* utilizados nas análises por PCR em tempo real e os respectivos tamanhos dos amplicons. Os *primers* foram desenhados com o programa *Primer3* v. 0.4.0, de modo a apresentarem 60 °C de temperatura de anelamento.

**TABELA 7.** *Primers* para reações de PCR convencional e PCR em tempo real.

| <b>Primers</b> | <b>Sequência 5'-3'</b> | <b>Amplicon (pb)<sup>1</sup></b> | <b>Descrição</b>                        | <b>Referência</b> |
|----------------|------------------------|----------------------------------|---|-------------------|
| fimZ-F         | TTCAACAATTAGCCGCACTG   | 94                               | Gene <i>fimZ</i> (cluster <i>fimZ</i> ) | Este estudo       |
| fimZ-R         | ACTGGATCGGCAAGAATCTC   |                                  |   |                   |
| fimA-F         | GCCAGAAGTTGGGGTCAAT    | 99                               | Gene <i>fimA</i> (cluster <i>fimZ</i> ) | Este estudo       |
| fimA-R         | TTAGTGATAGGCGCTTCGTT   |                                  |   |                   |
| fim-F          | TATCCTGCAGTTCGCGATT    | 101                              | Gene <i>fim</i> (cluster <i>fimZ</i> )  | Este estudo       |
| fim-R          | GCTGCCACTGCAGATTTTC    |                                  |   |                   |
| fimD-F         | CCACTTCACCCATGACGAC    | 96                               | Gene <i>fimD</i> (cluster <i>fimZ</i> ) | Este estudo       |
| fimD-R         | GCGAGGGTAAATGCGGTAT    |                                  |   |                   |
| fimA-F         | CGTCGGTTTCAACATCCAG    | 100                              | Gene <i>fimA</i> (cluster <i>fim</i> )  | Este estudo       |
| fimA-R         | GGTGGTATTGCTGCTGTCG    |                                  |   |                   |
| ecpR-F         | GCAGGTTTCTCCGCAAAG     | 98                               | Gene <i>ecpR</i> (cluster <i>ecp</i> )  | Este estudo       |
| ecpR-R         | GATCGATTTCGGCTGCAT     |                                  |   |                   |
| ecpA-F         | AATATTATGGGCGGCAACCT   | 98                               | Gene <i>ecpA</i> (cluster <i>ecp</i> )  | Este estudo       |
| ecpA-R         | CCGCTGATGATGGAGAAAGT   |                                  |   |                   |
| mrkA-F         | GGCTGCTGGTGGCACTAAA    | 105                              | Gene <i>mrkA</i> (cluster <i>mrk</i> )  | Este estudo       |
| mrkA-R         | GCCAGGTAGCCCTGTTGTT    |                                  |   |                   |
| rho-F          | AACTACGACAAGCCGGAAAA   | 99                               | Gene <i>rho</i> (controle endógeno)     | Este estudo       |
| rho-R          | ACCGTTACCACGCTCCATAC   |                                  |   |                   |

1. Pares de bases (pb)

### 3.4. Caracterização fenotípica das linhagens UKP8, UKP8-*fimZ*, UKP8-C

#### 3.4.1. Análise da morfologia das colônias

Para analisar a morfologia das colônias macroscopicamente, foi aplicado 10 µL de cultura das linhagens bacteriana concentradas sob placa de ágar sangue contendo TSA e 5% de sangue de ovelha, e as células foram cultivadas a 37°C por 18 horas. A análise morfológica das colônias foi realizada de acordo com o manual *Bacterial colony morphology* (REYNOLDS; COLLEGE, 2011).

#### 3.4.2. Investigação da extensão sobre a placa por ensaio de motilidade

Para avaliar a motilidade das células foi aplicado o ensaio de motilidade (LOSENSKY et al., 2015). As bactérias foram cultivadas até atingirem D.O.<sub>600 nm</sub> de 0.4. Neste ponto, 10 µL da

cultura foi inoculado no centro de uma placa com meio LB semi-sólido (0,8% de ágar) e incubadas a 37°C por 120 horas. A extensão da bactéria sobre a placa foi mensurada a partir da área de extensão da colônia crescida após 120 horas, subtraída a área da colônia previamente aplicada sobre a placa.

#### 3.4.3. *Investigação da expressão de fímbrias por ensaio de aglutinação de levedura*

A investigação da expressão de fímbrias foi realizada pelo ensaio de aglutinação de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conforme Schembri e colaboradores (2005), porém com uma alteração. As estirpes bacterianas foram crescidas em placas de LB ágar a 37°C por 24, 48 e 72 horas para a otimização da expressão das fímbrias do tipo 1. Após, foram ressuscitadas sequencialmente em PBS 1X (137 mM de cloreto de sódio, 10 mM de Fosfato e 2,7 mM de cloreto de potássio pH 7,4) e padronizadas em D.O.<sub>600 nm</sub> de 0,6 ou 1,2. As células bacterianas padronizadas foram misturadas com 5% de células de levedura (Sigma-Aldrich) no volume 1:1 em placas de vidro *kline*, até que a aglutinação fosse evidenciada para registro. Para confirmar a ligação específica de manose por fímbrias do tipo 1, 1,5% da solução de D-manose (Sigma-Aldrich) foi misturada em volume igual com células bacterianas padronizadas, e depois com células de levedura.

#### 3.4.4. *Investigação da produção de cápsula*

Para a investigação da produção de cápsula polissacarídica, células bacterianas foram submetidas à coloração negativa (MOYES et al., 2009). Essa técnica de coloração permite a visualização da cápsula, carregada negativamente, pois ela não é marcada com a coloração utilizada, a tinta nanquim (ou tinta da china), também carregada negativamente. Assim, a cápsula é visualizada na cor branca. No ensaio, células crescidas em meio LB a 37°C, 200 r.p.m. até D.O.<sub>600 nm</sub> de 0,6 a 1,0 e o nanquim foram aplicadas sob uma lâmina em volume 1:1 e visualizadas em seguida no microscópio óptico Nikon i50, câmera acoplada Nikon Fis e *software* NIS-elements versão 3.0, em aumento de 1000X.

#### 3.4.5. *Investigação da formação de biofilme*

O ensaio de formação de biofilme foi realizado em microplacas de 96 poços de poliestireno, conforme descrito por Losensky et al. (2015). Após o cultivo das bactérias em LB líquido por 18 horas, 37°C e 200 r.p.m., uma alíquota contendo 10<sup>6</sup> células foi adicionada aos poços contendo 150 µL de LB, e novamente incubadas a 37°C por 3, 5 e 10 horas em

condições estáticas. Após as incubações, o excesso de cultura foi removido e foram aplicados 25 µL de violeta de cristal a 1% nos poços. Após incubação por 15 minutos à temperatura ambiente os poços foram lavados com água desionizada e o corante das bactérias aderidas foi eluído com 200 µL de etanol absoluto e mensurado por espectrofotômetro em D.O.<sub>550 nm</sub>.

#### 3.4.6. Visualização das células por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para analisar a morfologia das células mais detalhadamente, foi realizada microscopia eletrônica de transmissão (MET), de acordo com a literatura (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008). Após células bacterianas serem crescidas em placas de LB ágar a 37°C durante 18 horas, elas foram ressuspensas em 500 µL de 1X PBS e diluídas em volumes 1:2, 1:4 e 1:5 com PBS. Em seguida, uma grade de cobre reforçada com carbono revestida com *Formvar* (400 mesh) foi colocada sobre uma gota de cultura suspensa, com o lado do filme para baixo, por 2 minutos e depois sobre uma gota de ácido fosfotúngstico a 1,25% pH 6,5 (Sigma-Aldrich) por 15 segundos. O excesso de cultura e ácido na grade foi retirado com um pedaço de papel filtro. A microscopia eletrônica foi realizada pelo microscópio eletrônico LEO 906 a 60 kV.

### 3.5. Investigação da interação patógeno-hospedeiro *in vivo* com as UKP8 e UKP8-*fimZ*

#### 3.5.1. Indução e análise da infecção em camundongos por modelo de UTI

Infecções do trato urinário de camundongos foram promovidas com as cepas UPK8 e UPK8-*fimZ*, com o intuito de investigarmos a taxa de sobrevivência dessas cepas *in vivo*. Para o modelo de UTI utilizou-se o método de infecção transuretral descrito na literatura (REIS et al., 2011; THAI; THATHIREDDY; HSIEH, 2010). Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de 6-8 semanas (N= 5) obtidos do CEMIB, da UNICAMP. Todos os procedimentos com os camundongos seguiram as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais em Pesquisa da Universidade São Francisco (CIAEP/CONCEA nº 01.0226.2014; ANEXOS, página 79).

As bactérias foram cultivadas em LB sólido por 18 horas a 37°C para otimizar a expressão de fímbrias. Após isso, os animais foram inoculados com 50 µL das bactérias ressuspensas em tampão PBS 1X, em uma concentração final de  $5 \times 10^8$  UFCs (unidade formadora de colônias). Antes da inoculação os animais foram induzidos a micção por meio de massagens suaves na região inferior do abdômen, no sentido caudal. Em seguida, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina 20 mL/kg e cloridrato de xilazina 100 mL/kg em

volume 1:1, por via intraperitoneal. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, e um cateter 24-gauge (Angiocath), com diâmetro externo de 0,7 mm e contendo cloridrato de lidocaína em gel 2% na superfície, foi introduzido pela via transuretral seguindo três importantes passos: 1) posicionamento do cateter no eixo craniocaudal (3 mm); 2) alinhamento da uretra no eixo longitudinal; 3) acesso da luz da bexiga no eixo longitudinal (6 mm). Após a inoculação os animais foram posicionados em decúbito ventral e monitorados por 1 hora. Os animais permaneceram infectados por 6, 24 e 48 horas.

Para analisar a carga bacteriana no epitélio urinário, as bexigas dos camundongos foram coletadas após os períodos de incubação e homogeneizadas (*Precellys 24*, Bertin Technologies) em tubos de 2 mL contendo esferas de cerâmica de 1,4 mm (para tecido mole), contendo 1 mL de 1X PBS, por 40 segundos, com um intervalo de 5 segundos entre cada 20 segundos, e 5400 r.p.m. Em seguida, o material homogeneizado foi diluído por diluição seriada e 1 µL das diluições foi aplicada sobre placas de ágar-sangue para a contagem de UFC após 18 horas de incubação a 37°C.

### 3.5.2. Análise morfo-histológica do epitélio da bexiga urinária por H&E

Para investigar o epitélio da bexiga urinária dos camundongos infectados, o método de H&E (hematoxilina e eosina) foi aplicado e analisado por um especialista em citopatologia (Prof. Dr. José Aires Pereira, da Universidade São Francisco). As bexigas dos camundongos foram coletadas e processadas de acordo com as técnicas padrão de histologia. Os tecidos foram fixados em 10% de formalina neutra por mais de 72 horas, embutidos em parafina, cortados em secções de 5 µm de espessura, corados com H&E e analisados em microscópio ótico.

### 3.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir dos dados adquiridos de dois ou três experimentos independentes em triplicata, e os dados foram analisados pelo teste t ou ANOVA pelo programa *GraphPad Prism v7*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. FimZ reconhece sítios de ligação e modula a expressão de genes fimbriais

Em *S. Typhimurium*, FimZ é um regulador fimbrial que reconhece duas sequências AATAAGA repetitivas em tandem (uma após a outra), separadas por uma região intercalante composta de 20 nucleotídeos, e localizadas a 257 nucleotídeos a montante do códon ATG do gene *fimA* (Yeh, Tinker e Clegg, 2002) (TABELA 8). A partir dessa informação, foi utilizada a sequência AATAAGA para uma busca dessa sequência (ou homóloga) na região promotora e na região codificante de genes que codificam fímbrias em *Klebsiella pneumoniae*.

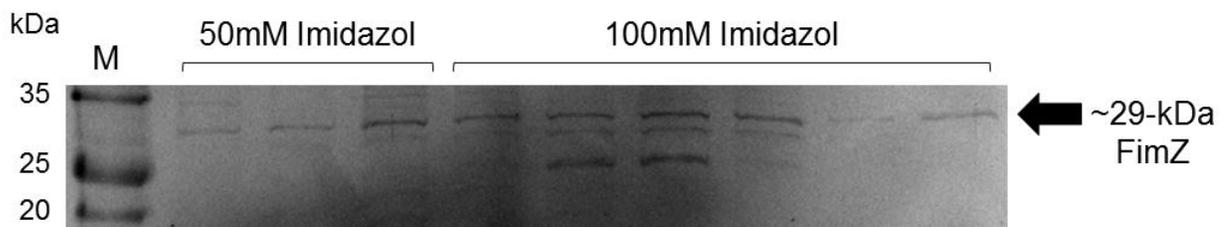
A sequência CTGAAAT foi identificada como uma repetição em tandem na região promotora do gene *fimA* do *cluster fim* de *K. pneumoniae*. Esta sequência está localizada a 64 nucleotídeos a montante do códon iniciador (ATG) do gene (TABELA 8), porém preserva pouca homologia à sequência descrita em *S. Typhimurium*, além de não apresentar uma região intercalante entre as sequências repetitivas. Sequências semelhantes a encontrada no *cluster fim* foram identificadas no *cluster ecp*. O sítio ATGGAAA foi identificado dentro da região codificante do gene *ecpR*, e distante 399 nucleotídeos a jusante do códon ATG de *ecpR* e distante 211 nucleotídeos do códon ATG do gene *ecpA*. E a mesma sequência ATGGAAA foi identificada como uma repetição em tandem, intercaladas por 5 nucleotídeos e localizadas próximas ao sítio ATG do gene *ecpA* (TABELA 8).

**TABELA 8.** Identificação de sítios de ligação de FimZ em genes de fímbrias de *K. pneumoniae*.

| Gene fimbrial <sup>1</sup>         | Sítio de ligação FimZ <sup>2</sup>   | Localização                    |
|------------------------------------|--|--------------------------------|
| <b><i>S. Typhimurium</i></b>       |  |                                |
| <i>fimA</i> ( <i>cluster fim</i> ) | <b>AATAAGATTAGACCCTTCTTATATCCAAATAAGA</b> –<br>257 nucleotídeos - <u>ATG</u> | Região promotora               |
| <b><i>K. pneumoniae</i></b>        |  |                                |
| <i>fimA</i> ( <i>cluster fim</i> ) | <b>CTGAAATCTGAAAT</b> – 64 nucleotídeos - <u>ATG</u>                         | Região promotora               |
| <i>ecpR</i> ( <i>cluster ecp</i> ) | <u>ATG</u> – 399 nucleotídeos - <b>ATGAAAA</b>                               | Região codificante             |
| <i>ecpA</i> ( <i>cluster ecp</i> ) | <b>ATGAAAAAGCGATGAAAA</b>  | Região promotora/Início<br>ATG |

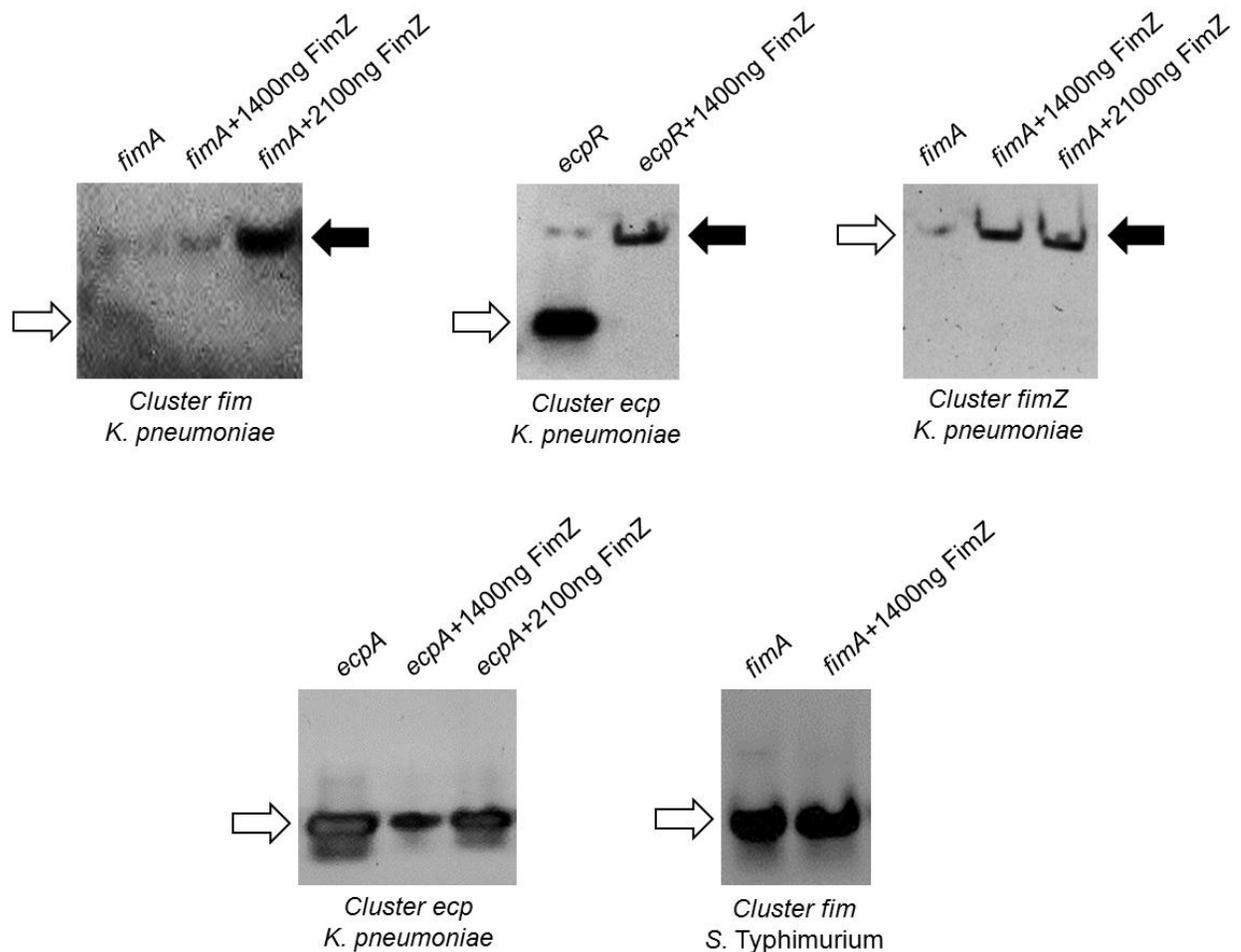
1. Nome do gene de acordo com a anotação da sequência genômica de *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 (GenBank número de acesso CP000647.1), e de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (GenBank número de acesso NC\_003198.1) 2. Sítios de ligação de FimZ estão em negrito. O códon iniciador de transcrição ATG está grifado.

O ensaio EMSA foi empregado para confirmar se esses prováveis sítios identificados nos genes fimbriais de *K. pneumoniae* são reconhecidos pela proteína FimZ. Primeiramente, a proteína FimZ de *K. pneumoniae* foi expressa e purificada gradativamente em tampões de eluição com concentrações de 50 mM e 100 mM de imidazol, obtendo-se a proteína eluída com o tamanho esperado de ~29-kDa (FIGURA 8).



**FIGURA 8. Purificação da proteína FimZ recombinante de *Klebsiella pneumoniae*.** A figura mostra um gel SDS-PAGE com a purificação da proteína FimZ recombinante. A proteína foi eluída em tampões de eluição contendo 50 mM e 100 mM de imidazol. A seta indica o tamanho esperado da proteína FimZ, com aproximadamente 29 kDa. A letra M indica o marcador de peso molecular em kDa (*BLUeye Prestained Protein Ladder*, GeneDirex).

Para o ensaio EMSA, além da proteína FimZ purificada foram utilizadas sondas de DNA contendo os prováveis sítios identificados nos genes acima. Estas sondas foram incubadas com o regulador FimZ purificado, e os complexos formados foram aplicados em gel de poliacrilamida. A Figura 9 mostra que FimZ interage com os sítios identificados nos genes *fimA* (*cluster fim*) e *ecpR* (*cluster ecp*), conforme é possível constatar pelo *shift* da banda na presença de 1400 ng ou 2100 ng de proteína FimZ, quando comparada à banda apenas com a sonda (sem *shift*). Em adição, FimZ parece interagir com o gene *fimA* (*cluster fimZ*), pois a banda apenas com o sítio, não está na mesma posição que a banda contendo a proteína FimZ mais o sítio (FIGURA 9). Porém, esse resultado não é uma afirmação de que realmente aconteceu uma interação, pois a banda apenas contendo o sítio não está visível no gel, e assim, não é possível observar o *shift* entre as duas bandas. Dessa forma, esse ensaio de interação deverá ser repetido para mais conclusões. Por outro lado, FimZ não interagiu com o sítio identificado no gene *ecpA* (*cluster ecp*), e o sítio de *S. Typhimurium* não foi reconhecido por FimZ de *K. pneumoniae* (FIGURA 9).



**FIGURA 9. FimZ reconhece sítios de ligação em genes fimbriais de *K. pneumoniae*.** Ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA) mostra interação com o *shift* da banda contendo 1400 ng ou 2100 ng de proteína FimZ com o sítio do gene *fimA* (*cluster fim*) e *ecpR* (*cluster ecp*) identificados (seta preta), e a banda apenas com a sonda (sem *shift*) (seta branca). FimZ parece interagir com o gene *fimA* (*cluster fimZ*), pois a banda apenas com o sítio (seta branca) não está na mesma posição que a banda contendo 1400 ng ou 2100 ng da proteína FimZ mais o sítio (seta preta). Porém não é possível observar o *shift* entre essa banda e a banda contendo o sítio do gene. FimZ não interage com o sítio identificado no gene *ecpA* (*cluster ecp*) (sem *shift*) (seta branca), e FimZ de *K. pneumoniae* não reconheceu o sítio de *S. Typhimurium* (sem *shift*) (seta branca).

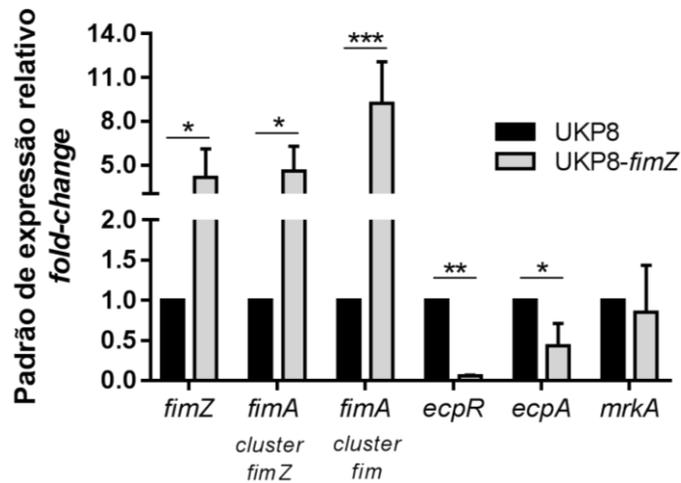
Os resultados obtidos mostram que a proteína FimZ de *K. pneumoniae* reconhece e interage com os sítios identificados em *fimA* (*cluster fim*) e *ecpR* (*cluster ecp*) através do ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA), e que essa ligação específica pode resultar na modulação da expressão desses genes. A interação de FimZ com o gene *fimA* parece aumentar conforme o aumento da quantidade de proteína aplicada, e esse aumento na interação é visto pelo *shift* da banda que se torna mais intenso à medida que aumenta a concentração da proteína. A

interação de FimZ na região promotora de *fimA* também foi observada em *S. Typhimurium* (YEH; TINKER; CLEGG, 2002). Já a interação no sítio de *ecpR* mostra uma interessante situação de modulação que a proteína pode alcançar. Devido o sítio de FimZ no *ecpR* estar mais próximo à região promotora do *ecpA*, FimZ também pode ter uma atividade moduladora sobre esse gene. Esse tipo de atividade, no qual a proteína pode ter atividade reguladora tanto no gene que possui o sítio de ligação da proteína na região terminal, quanto no gene adjacente, já foi descrito antes na literatura. Porém, apesar de FimZ não interagir com *ecpA* nessa primeira tentativa, novas investigações serão realizadas posteriormente. Além do gene *ecpA*, o gene *fimA* do *cluster fimZ* também será incluso.

Em seguida foi investigada a expressão de genes fimbriais nas cepas de *K. pneumoniae* selvagem e mutante para o gene *fimZ*. Para tal, a expressão dos genes *mrkA* (*cluster mrk*), *fimA* (*cluster fim*), *ecpA* e *ecpR* (*cluster ecp*), e *fimZ* e *fimA* (*cluster fimZ*), foi analisada nas linhagens UKP8 selvagem e deficiente-FimZ crescidas em LB ágar-sangue para potencializar a expressão de fímbrias. Os resultados mostram que na deficiência do regulador FimZ (cepa UKP8-*fimZ*) os genes *fimA*, tanto do *cluster fimZ* quanto do *cluster fim*, são significativamente mais expressos ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ , respectivamente), quando comparado a expressão na cepa selvagem (UKP8, FIGURA 10). Além disso, o gene *fimZ* também foi mais expresso na cepa deficiente ao regulador FimZ, com significância estatística de  $p < 0.05$ . Por outro lado, *ecpA* e *ecpR* foram menos expressos na deficiência do regulador FimZ ( $p < 0.05$ ), quando comparado ao padrão de expressão dos genes na cepa selvagem (UKP8, FIGURA 10). Já a expressão de *mrkA* foi indiferente na linhagem UKP8 e UKP8-*fimZ*, o que indicava que FimZ não atua na modulação desse gene.

Por outro lado, FimZ de *K. pneumoniae* não interagiu com o sítio de ligação de *S. Typhimurium*. Isso ocorreu possivelmente porque diferenças entre as proteínas e as sequências dos sítios são observadas. Uma possível explicação para que a ligação não tenha ocorrido é apontada na baixa homologia entre as sequências nucleotídica e proteica de FimZ de ambas as bactérias, mostrada no alinhamento das sequências da Tabela 8, e indicando que sequências do gene e a proteína FimZ são diferentes.

Além das sequências de FimZ, os tamanhos das proteínas são distintos. Em *K. pneumoniae*, como foi visto acima, FimZ apresenta um tamanho aproximado de 29-kDa, e já FimZ de *S. Typhimurium* apresenta 25-kDa (YEH; TINKER; CLEGG, 2002). Além dessas diferenças entre as proteínas, as bases nucleotídicas e a localização dos sítios nos genes *fimA* e *ecpR* de *K. pneumoniae* são diferentes comparadas em *S. Typhimurium*, sugerindo, que consequentemente, essas alterações exigiria uma ligação diferenciada.



**FIGURA 10. FimZ modula a expressão de genes fimbriais em *K. pneumoniae*.** A análise de PCR em tempo real mostrou que a linhagem mutante para o regulador FimZ (linhagem UKP8-*fimZ*) apresenta maior expressão dos genes *fimZ* e *fimA* do *cluster fimZ* ( $p < 0.05$ , \*) e do gene *fimA* do *cluster fim* ( $p < 0.005$ , \*\*\*), e menor expressão dos *ecpR* ( $p < 0.01$ , \*\*) e *ecpA* ( $p < 0.05$ , \*), quando comparado ao padrão de expressão observado na linhagem selvagem (UKP8). A expressão do gene *mrkA* não teve diferença em ambas as linhagens linhagem UKP8 e UKP8-*fimZ*. Os ensaios representam dois experimentos independentes, e as reações foram realizadas em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* e considerados estatisticamente significativos com valor de *p-value*  $\leq 0.05$ .

Já na investigação da expressão de genes fimbriais na presença e deficiência de FimZ, os resultados mostraram que FimZ pode inibir a expressão dos genes *fimZ* e *fimA* (*cluster fimZ* e *fim*), mas também pode ativar a expressão de *ecpR* e *ecpA* (*cluster ecp*). As análises de PCR em tempo real indicam que a deficiência de FimZ em *K. pneumoniae* possibilitou uma expressão muito maior dos genes *fimZ* e *fimA* (*cluster fimZ* e *fim*), indicando uma repressão pela FimZ nestes genes em *K. pneumoniae* selvagem. Essa mesma atividade repressora de FimZ foi vista em análises de cultivo de célula humana de bexiga urinária, por Santos (2016). Nesse estudo, após as mesmas linhagens estudadas aqui, UKP8 e UKP8-*fimZ*, serem co-cultivadas com células de bexiga urinária humana em ensaio de adesão celular, tiveram a expressão de *fimZ* (*cluster fimZ*) e *fimA* (*cluster fim*) analisadas por PCR em tempo real, no qual os resultados também mostraram que na deficiência de FimZ, esses genes são ativados, sugerindo, assim, que ocorre uma repressão dos genes na linhagem selvagem. Por outro lado, *ecpR* e *ecpA* aparecem reprimidos da deficiência de FimZ, sugerindo que esses genes são ativos na presença de FimZ. Mas, assim como foi visto uma atividade repressora para FimZ, essa atividade envolvida com ativação também já foi relatada anteriormente, mas em *S.*

Typhimurium, em que FimZ regula positivamente a expressão de fímbrias tipo 1 (YEH; HANCOX; CLEGG, 1995; SAINI; PEARL; RAO, 2009). Isso demonstra que FimZ possivelmente pode modular negativamente ou positivamente a expressão de genes de *clusters* fimbriais. Além disso, mesmo FimZ de *K. pneumoniae* não tendo homologia ao FimZ de *S. Typhimurium*, FimZ modula a expressão do *cluster fim*.

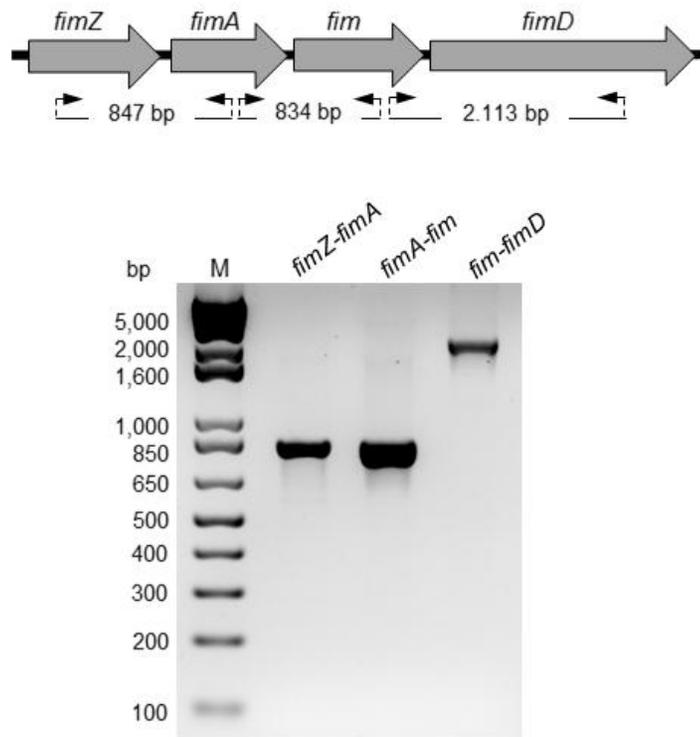
Além disso, assim como ocorre em *S. Typhimurium*, também em *K. pneumoniae*, FimZ modula a expressão do gene *fimA* do *cluster fim*, e também regula a expressão do seu próprio gene, *fimZ*. Mas diferente do FimZ de *S. Typhimurium*, que possui uma ação ativadora, FimZ de *K. pneumoniae* parece possuir um papel de repressor nesses genes. Por outro lado, FimZ ainda mostra uma atuação de ativador sobre o novo *cluster ecp*, que ainda não foi caracterizado em *K. pneumoniae*. Dessa forma, *ecpR* que codifica um potencial regulador da transcrição de fímbrias Ecp em *K. pneumoniae* (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013), possivelmente é regulado por FimZ.

A modulação dos genes na deficiência de FimZ analisados por PCR em real time, ainda mostra que não apenas os genes *fimA* (*cluster fim*) e *ecpR* (*cluster ecp*) possuem sítios de ligação para FimZ, mas todos os genes que tiveram sua expressão modulada significativamente nessa análise, também possuem um sítio de ligação, mas que não foi identificado. Ainda nas análises de PCR, é visto que *fimZ* e *fimA* (*cluster fimZ*) são expressos com valores muito semelhante entre eles, o que foi sugerido, que esses genes podem ser expressos em uma mesma unidade transcricional (em *operon*), em um primeiro momento.

Assim, os resultados obtidos mostram que o gene *fimZ* encontra-se induzido na cepa deficiente ao regulador FimZ, e esse padrão de expressão pode ser estendido aos outros genes que compõe o *cluster fimZ* (genes *fimA*, *fim* e *fimD*).

A Figura 11 mostra que houve a amplificação das regiões que intercalam cada um dos genes comprova que o *cluster fimZ*: fragmento de 847 pb entre *fimZ* e *fimA*, 834 pb entre *fimA* e *fim*, e 2.133 pb entre *fim* a *fimD*. Este resultado indica que os genes que compõe o *cluster fimZ* são transcritos como um único RNA policistrônico; isto é, que os genes *fimZ>fimA>fim>fimD* estão organizados em *operon* em *Klebsiella pneumoniae*.

Além disso, podemos afirmar que todo o *cluster fim* encontra-se induzido na cepa deficiente ao regulador FimZ, e não apenas o gene *fimA* (como mostra a Figura 10), pois resultados anteriores em nosso laboratório (MACIEL, 2012) mostram que os genes que compõe o *cluster fim* também estão organizados em *operon* e são transcritos como um único RNA policistrônico.



**FIGURA 11. Análise da unidade transcricional do cluster *fimZ*.** A amplificação em gel de agarose do cDNA dos genes que compõem o cluster *fimZ*, *fimZ*, *fimA*, *fim* e *fimD*, mostram mesmo tamanho analisadas *in silico*: de *fimZ* a *fimA* amplifica 847 pb, de *fimA* a *fim* amplifica 834 pb, e de *fim* a *fimD* amplifica 2.133 pb. M, marcador de peso molecular (1 Kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen).

Para saber se FimZ de *S. Typhimurium* e *K. pneumoniae* possui homologia, as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram alinhadas pela ferramenta BLASTn e BLASTp no programa NCBI, e um alinhamento das sequências de FimY e FimW foi realizado com o genoma de *K. pneumoniae*. A Tabela 9 mostra que o alinhamento entre as sequências de FimZ analisadas possui uma baixa cobertura de alinhamento (*query cover*) (2% entre o alinhamento das sequências de nucleotídeos e 29% entre as sequências de aminoácidos), e um alto *E-value* (0.16 entre o alinhamento das sequências de nucleotídeos e  $2e-09$  entre as sequências de aminoácidos).

A Tabela 9 também mostra o alinhamento entre FimY e FimW com o genoma de *K. pneumoniae*. No resultado foi observado um pareamento entre o gene *fimY* de *S. Typhimurium* e o gene *yegH* de *K. pneumoniae* (*query cover* = 8% e *E-value* = 0.90), e entre os aminoácidos de FimY de *S. Typhimurium* com os aminoácidos de uma provável proteína reguladora do tipo LuxR ainda não caracterizada em *K. pneumoniae* (ABR78671.1) (*query cover* = 12% e *E-*

*value=1.0*). Já o gene *fimW* de *S. Typhimurium* apresentou um alinhamento com o gene *araE* de *K. pneumoniae* (*query cover* =33% e *E-value*=0.21), e *FimW* de *S. Typhimurium* com os aminoácidos de uma provável proteína reguladora ainda não caracterizada em *K. pneumoniae* (ABR80163.1) (*query cover* =33% e *E-value*=2e-06). No entanto, apesar desse alinhamento identificado, os resultados mostram uma baixa porcentagem do *query cover* e um alto *E-value* em todas as análises (TABELA 9), sugerindo que possivelmente os reguladores *FimY* e *FimW* de *S. Typhimurium* não possuem homologia com os reguladores de *K. pneumoniae*.

**TABELA 9.** Alinhamento de sequências nucleotídicas e proteicas de genes fimbriais de *S. Typhimurium* e de *K. pneumoniae*.

| ALINHAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS <sup>1</sup> |                            |                    |                    |                                 |                             |                            |                                    |
|--|----------------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>             |                            |                    |                    |                                 |                             |                            |                                    |
|  | <i>Melhor hit (acerto)</i> | <i>Max Score</i>   | <i>Total Score</i> | <i>Query Cover</i> <sup>2</sup> | <i>E-value</i> <sup>3</sup> | <i>Ident.</i> <sup>4</sup> | <i>Acesso</i> <sup>6</sup>         |
|  | <b><i>fimZ</i></b>         | <b><i>fimZ</i></b> | 21.1               | 21.1                            | 2%                          | 0.16                       | 94% (15/16) <i>fimZ</i> /KPN_02983 |
| <b>S. Typhimurium</b>                    | <b><i>fimY</i></b>         | <b>CP000647.1</b>  | 31.9               | 122                             | 8%                          | 0.90                       | 95% (19/20) <i>yegH</i> /KPN_02516 |
|  | <b><i>fimW</i></b>         | <b>CP000647.1</b>  | 33.7               | 494                             | 33%                         | 0.21                       | 91% (21/23) <i>araE</i> /KPN_03264 |
| ALINHAMENTO DE AMINOÁCIDOS <sup>1</sup>  |                            |                    |                    |                                 |                             |                            |                                    |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>             |                            |                    |                    |                                 |                             |                            |                                    |
|  | <i>Melhor hit (acerto)</i> | <i>Max Score</i>   | <i>Total Score</i> | <i>Query Cover</i>              | <i>E- value</i>             | <i>Ident.</i>              | <i>Acesso</i> <sup>6</sup>         |
|  | <b>FimZ</b>                | <b>FimZ</b>        | 41.6               | 41.6                            | 29%                         | 2e-09                      | 35% (22/62) ABR78389.1             |
| <b>S. Typhimurium</b>                    | <b>FimY</b>                | <b>CP000647.1</b>  | 27.3               | 27.3                            | 12%                         | 1.0                        | 38% (11/29) ABR78671.1             |
|  | <b>FimW</b>                | <b>CP000647.1</b>  | 40.4               | 40.4                            | 33%                         | 2e-06                      | 27% (18/66) ABR80163.1             |

1. Alinhamento entre a sequência genômica de *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 (GenBank número de acesso CP000647.1), e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (GenBank número de acesso NC\_003198.1). 2. Porcentagem da sequência submetida ao programa que é coberta pelo alinhamento. 3. Parâmetro de confiança. 4. Identidade. 5. Melhor resultado de acordo com o *Score* resultante do alinhamento. 6. Melhor alinhamento de acordo com o *Score* resultante. ABR78389.1= putativo regulador transcricional da expressão de fímbrias, ABR78671.1= putativa proteína reguladora LuxR, ABR80163.1= putativo regulador.

Em *S. Typhimurium*, sabe-se que FimZ é uma proteína que regula a expressão de fímbrias tipo 1 diretamente, e que FimY é um ativador que favorece essa expressão, mas que também pode reprimi-la ao induzir a expressão do repressor FimW (SAINI; PEARL; RAO, 2009). Dessa forma, FimW parece reprimir FimY (SAINI; PEARL; RAO, 2009). Além disso, indiretamente através do aumento de FimY que é dependente dos níveis de FimZ, FimW possivelmente também pode ser ativado em níveis altos de FimZ (SAINI; PEARL; RAO, 2009). Contudo, não se pode excluir a possibilidade do gene *fimZ* ser reprimido por um outro regulador ainda não descrito.

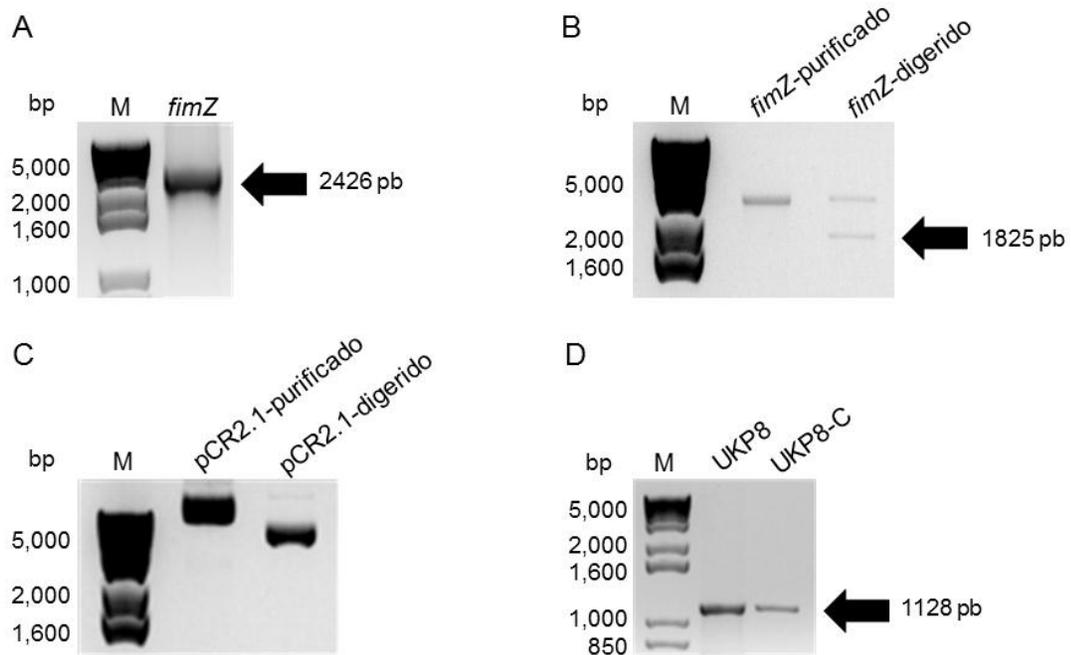
Porém, pelas análises de homologia pelo BLAST de nucleotídeo e proteína, *K. pneumoniae* não possui FimY e FimW anotados em *S. Typhimurium*, como visto na Tabela 8. No entanto, pode existir outros reguladores com a mesma função de FimY e FimW em *K. pneumoniae*, mas que não são conhecidos. Um possível regulador que pode atuar sob a expressão de *fimZ* em *K. pneumoniae*, é o regulador Fur. Pois Indícios mostram que o sítio regulatório para o regulador Fur que foi identificado na região promotora de *fimZ* é funcional, e Fur pode modular a expressão de *fimZ* positivamente (Gomes, 2014).

#### **4.2. Linhagem *K. pneumoniae* deficiente-FimZ teve o gene *fimZ* restabelecido**

Neste estudo foram utilizadas as cepas de *Klebsiella pneumoniae* UKP8 (cepa selvagem), UKP8-*fimZ* (cepa mutante, deficiente em FimZ) e UKP8-C (cepa mutante, porém complementada com o gene *fimZ*). A cepa mutante, UKP8-*fimZ*, havia sido previamente gerada por Gomes (2014), ao passo que a cepa complementada, UKP8-C, foi gerada neste estudo.

Para a geração da linhagem UKP8-C, primeiramente o gene *fimZ* foi amplificado a partir de uma linhagem selvagem de *K. pneumoniae*, gerando um produto de 2426 pb (FIGURA 12A). Em seguida *fimZ* foi purificado e digerido com as enzimas *HindIII* e *KpnI* onde gerou um fragmento de 1825 pb (FIGURA 12B). Além do gene, o vetor pCR2.1\_Eri<sup>r</sup> também foi purificado e digerido com as mesmas enzimas (FIGURA 12C). A clonagem do gene *fimZ* no vetor pCR2.1\_Eri<sup>r</sup>, bem como a transformação do pCR2.1 em células UKP8-*fimZ* foram bem-sucedidas (resultados não mostrados). A complementação do gene *fimZ* foi confirmada pela amplificação de 1128 pb do gene *fimZ* no DNA plasmidial extraído da linhagem complementada-UKP8-C, e no DNA genômico da linhagem UKP8 selvagem, usado como controle positivo (FIGURA 12D).

Após a obtenção de UKP8-C (cepa mutante, porém complementada com o gene *fimZ*), ensaios fenotípicos foram empregados nas cepas UKP8, UKP8-*fimZ* e UKP8-C, para investigarmos os impactos da deficiência do regulador FimZ em *Klebsiella pneumoniae*.

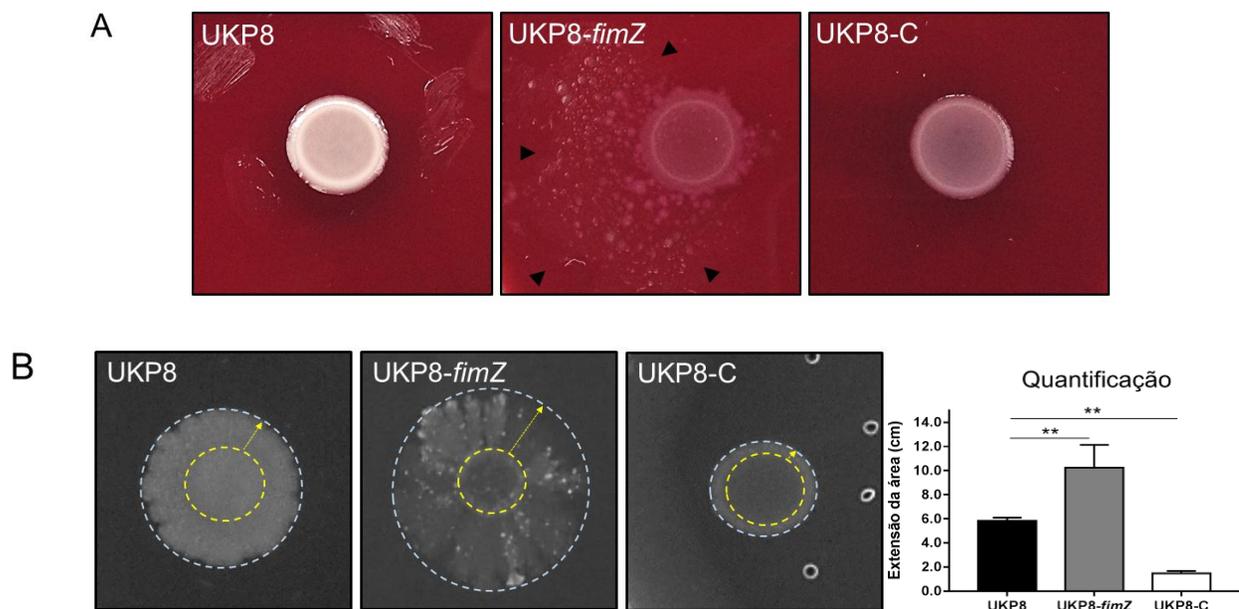


**FIGURA 12. Complementação do gene *fimZ* em linhagem deficiente-FimZ.** (A) Amplificação do fragmento de 2426 pb (seta preta) contendo o gene *fimZ* e regiões flanqueadoras. (B) Digestão do fragmento de 2426 pb com *Hind*III e *Kpn*I, gerando a banda de 1825 pb (seta preta). (C) Vetor pCR2.1\_Eri<sup>r</sup> purificado e digerido com *Hind*III e *Kpn*I. (D) Complementação de *fimZ* foi confirmado por PCR a partir da amplificação de 1128 pb de *fimZ* no DNA plasmidial de UKP8-C, e no DNA genômico de UKP8 (controle positivo) (seta preta). M, marcador de peso molecular (1 Kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen).

#### 4.3. Interrupção de *fimZ* modificou características das colônias UKP8-*fimZ* e possibilitou uma motilidade rudimentar

Nos ensaios fenotípicos, a análise da morfologia macroscópica das colônias das linhagens UKP8, UKP8-*fimZ* e UKP8-C foi realizada após cultivo em placas ágar-sangue e comparação das morfologias das colônias apresentadas. A Figura 13A mostra uma colônia representativa da linhagem UKP8 com forma circular, margem inteira, elevação alta e superfície suave e brilhante. Por outro lado, a linhagem UKP8-*fimZ* apresentou colônias com formato irregular, elevação plana, margem lobulada e superfície rugosa e opaca. Em adição, uma pequena propagação de UKP8-*fimZ* foi notada na placa. As características morfológicas

observadas na linhagem selvagem foram restabelecidas quase completamente na cepa UKP8-C complementada com o gene *fimZ*, que apresentou apenas colônias um pouco plana e com superfície fosca. Devido à extensão sobre a placa vista em colônias UKP8-*fimZ*, o ensaio de motilidade em placas de Agar semi-sólido, *soft*, foi aplicado para as três linhagens. Nesse ensaio, foi mostrado que as células UKP8-*fimZ* foram capazes de se estender na superfície (FIGURA 13B), e a área da extensão da bactéria foi determinada em centímetros, a partir do valor da área de extensão (valor total), menos a área da colônia previamente analisada quando aplicada sobre a placa. Nesta análise, o diâmetro da extensão da área de três réplicas UKP8-*fimZ* foi considerado uma motilidade quando comparado com a falta de disseminação da UKP8 ( $p < 0.005$ ). Inversamente, a UKP8-C teve uma extensão menor que a UKP8 ( $p < 0.005$ ), e perdeu um pouco da elevação alta e superfície e brilhante comparada a UKP8 (FIGURA 13B). Os resultados indicam que, após a interrupção do *fimZ*, as características das colônias de UKP8-*fimZ* foram modificadas, permitindo uma motilidade rudimentar sob a placa. Tais características são notadas apenas quando a bactéria é cultivada sob meio de cultura sólido.



**FIGURA 13. Modificação macroscópica das colônias de UKP8-*fimZ*.** (A) Colônias representativas mostram a morfologia da colônia UKP8 em forma circular, alta elevação, margem inteira e superfície brilhante suave; colônia UKP8-*fimZ* mostra forma irregular, elevação plana, margem lobulada e superfície áspera fosca, e pequena propagação na placa (cabeças de setas); A colônia UKP8-C foi restabelecida, mantendo apenas elevação plana e superfície fosca. (B) Ensaio de motilidade em placas de ágar-*soft* demonstrou que as células UKP8-*fimZ* são capazes de se estender na superfície, e a extensão da área foi quantificada em centímetros ( $p < 0.005$ ). Linhagem UKP8-C teve uma extensão menor que a UKP8 ( $p < 0.005$ ). As imagens representam dois experimentos independentes e em triplicata. Os dados foram analisados pelo ANOVA e considerados estatisticamente significativos com valor de  $p$ -value  $\leq 0.05$ .

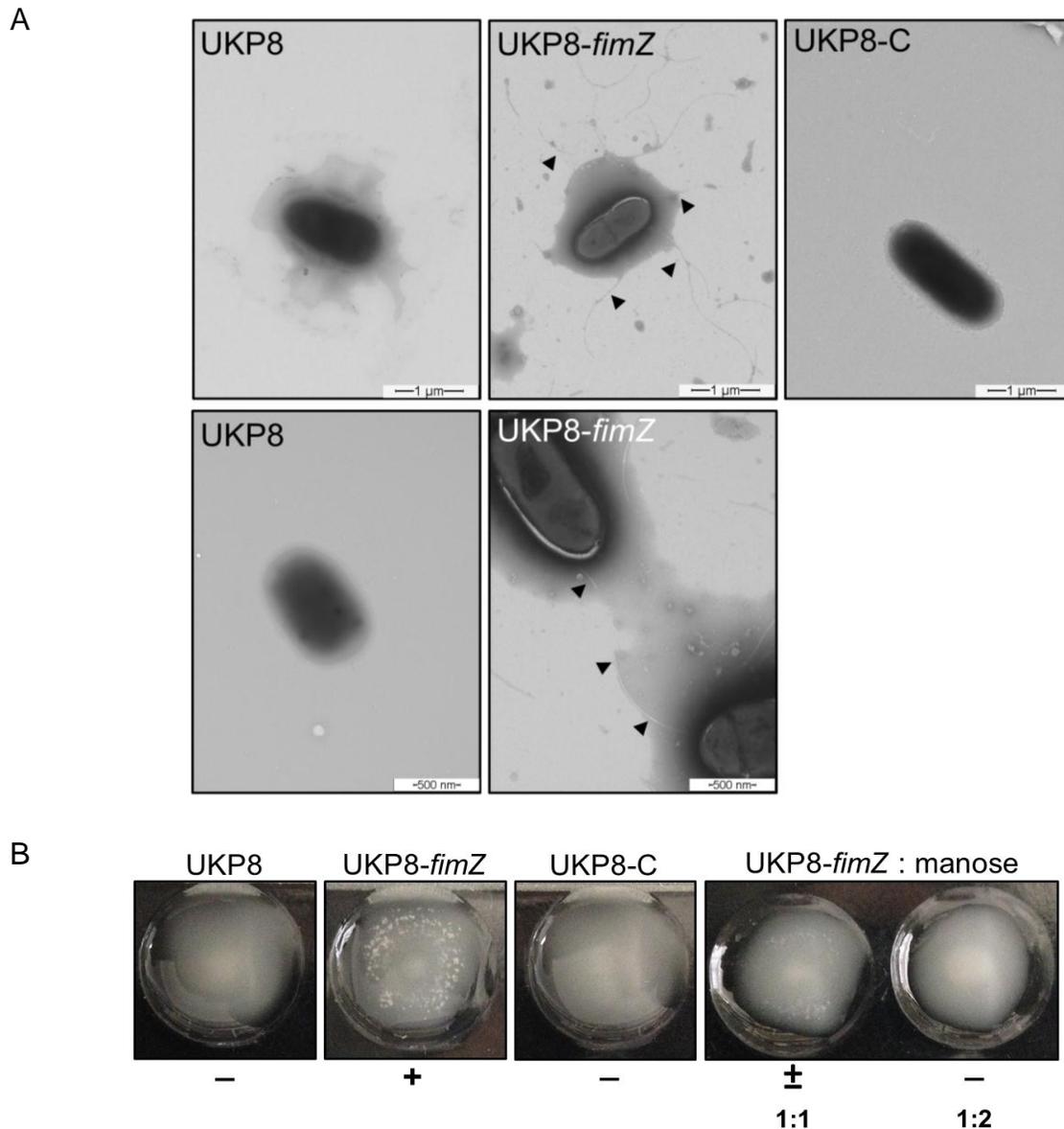
Apesar das alterações morfológicas observadas em UKP8-*fimZ*, o padrão de crescimento desta linhagem não difere drasticamente do padrão de crescimento da cepa selvagem, UKP8 (GOMES, 2014). Foi observado naquele estudo que a cepa selvagem UKP8 apresenta as fases *lag* e exponencial curtas, e a fase estacionária mais longa. Já a cepa UKP8-*fimZ* apresenta crescimento com as fases *lag* e exponencial longas, e a fase estacionária curta. Assim, isso mostra que UKP8-*fimZ* precisa de um tempo maior para se adaptar e iniciar a replicação, quando comparada a UKP8. Por fim, o crescimento da cepa UKP8-C foi restaurado no mesmo padrão do crescimento observado na cepa selvagem UKP8.

#### **4.4. Deficiência de FimZ desencadeou a produção de apêndices de superfície bacteriana e permitiu maior formação de biofilme em UKP8-*fimZ***

Devido as mudanças observadas na *K. pneumoniae* após a deficiência do gene *fimZ* em análise macroscópica, UKP8, UKP8-*fimZ* e UKP8-C também foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nas imagens, enquanto a linhagem UKP8 aparece sem apêndices superficiais (escala 1  $\mu$ m e 500 nm), a superfície celular da linhagem UKP8-*fimZ* está coberta por numerosos apêndices irregulares longos, flexíveis e com tamanhos maiores que 1  $\mu$ m (escala 1  $\mu$ m e 500 nm) (FIGURA 14A), e os filamentos desaparecem na superfície da linhagem UKP8-C (escala 1  $\mu$ m), sendo visivelmente semelhante à UKP8 (FIGURA 14A). O resultado por imagem indica que os apêndices são possivelmente estruturas similares as fímbrias/pili.

Para detectar se a expressão dos apêndices podem ser fímbrias tipo 1, ensaios de aglutinação de levedura foram realizados com linhagens UKP8, UKP8-*fimZ* e UKP8-C. Em resultado, a linhagem UKP8 não apresentou aglutinação em levedura, enquanto a linhagem UKP8-*fimZ* aglutinou prontamente em levedura após ser cultivada 48 horas em placa de LB ágar (FIGURA 14B). A aglutinação foi possível apenas após cultivo em meio sólido. O padrão de aglutinação observado na UKP8 foi restaurado na linhagem UKP8-C complementada. Para determinar se o padrão de aglutinação exibido por UKP8-*fimZ* foi devido a expressão de fímbria tipo 1, o ensaio também foi realizado na presença de D-manose antes da adição das células de levedura. Não foi observada aglutinação quando D-manose foi adicionada. Este resultado indica que os receptores ligados às fímbrias UKP8-*fimZ* foram bloqueados com a manose adicionada e impediram que as bactérias se ligassem às células de levedura. Quando a D-manose foi adicionada na proporção de 1:1, a aglutinação foi bloqueada parcialmente, enquanto na proporção de 1:2 a aglutinação foi bloqueada completamente. Desse modo, os resultados

revelam que os apêndices superficiais desencadeados pelo mutante *K. pneumoniae* podem ser fímbrias tipo 1, que o meio sólido foi importante para a ativação das fímbrias. Assim, FimZ poder atuar como um repressor da expressão de fímbrias tipo 1 em *K. pneumoniae*.



**FIGURA 14. Deficiência do regulador FimZ promove maior produção de fímbrias.** (A) Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão mostram a deficiência de estruturas superficiais em UKP8, presença de numerosos apêndices irregulares com tamanho maior que 1  $\mu\text{m}$  (cabeças de setas; barra de escala 2  $\mu\text{m}$ ) em UKP8-*fimZ*, uma interação através dos apêndices entre duas linhagens de UKP8-*fimZ* (cabeças de seta; barra de escala 1  $\mu\text{m}$ ) e perda dos apêndices e restabelecimento do padrão de UKP8 em UKP8-C. (B) Ensaio de aglutinação de levedura mostrou não aglutinação de UKP8 negativo (-), aglutinação de UKP8-*fimZ* positivo (+), não aglutinação de UKP8-C negativo (-). Células UKP8-*fimZ* suplementadas com D-manose antes de adicionar levedura teve a aglutinação parcialmente bloqueada ( $\pm$ ) na proporção 1:1 (bactéria:manose), e totalmente bloqueada (-) na proporção 1:2. As imagens representam dois experimentos independentes e em triplicata.

Assim, em comparação ao mutante *fimZ* de *S. Typhimurium* que é afimbriado (não possui fímbrias) e exibe baixo nível de expressão do *cluster fim* (YEH; HANCOX; CLEGG, 1995), o mutante *fimZ* de *K. pneumoniae* é fimbriado (possui fímbrias), e a expressão do *cluster fim* é ativada. Além disso, diferente da complementação do gene *fimZ* em *S. Typhimurium*, em que foi restaurado o fenótipo fimbriado (YEH; HANCOX; CLEGG, 1995), a complementação do gene *fimZ* em *K. pneumoniae* restabeleceu o fenótipo não fimbriado. Assim, inversamente, FimZ parece atuar de forma diferente nessas duas linhagens, sendo um ativador de fímbrias em *S. Typhimurium*, e um repressor de fímbrias em *K. pneumoniae*.

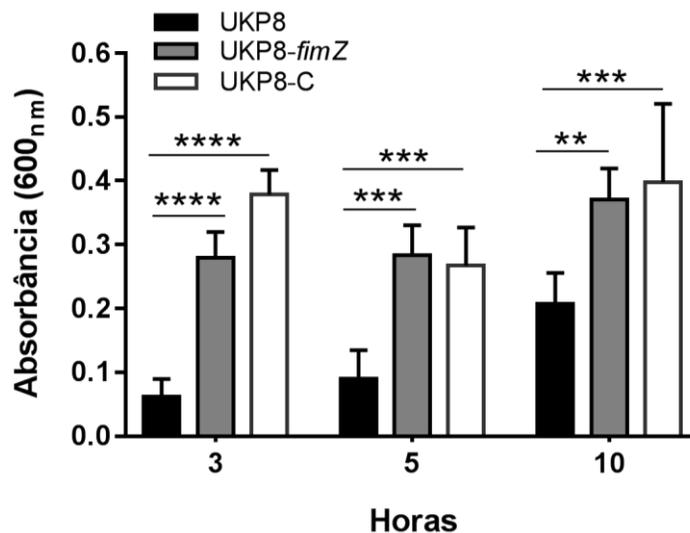
Em adição, com a repressão do *cluster ecp*, e a não modulação de expressão do *cluster mrK* (fímbrias tipo 3) após a interrupção de *fimZ*, as fímbrias produzidas na deficiência de FimZ não parecem ser expressas pelo *cluster ecp* e nem pelo *cluster mrK* (fímbrias tipo 3).

Por outro lado, os resultados do ensaio clássico de aglutinação apontam que as fímbrias produzidas são fímbrias do tipo 1, devido a especificidade dessas fímbrias de se ligar à manose (KROGFELT; BERGMANS; KLEMM, 1990; IIDA et al., 2001). Assim, pode ser considerada a hipótese de que essa fímbria tipo 1 pode ter sido expressa pelo *cluster fim*, ou ter tido a participação desse *cluster*, que foi super expresso na deficiência de FimZ. Porém, mais estudos são necessários para essa discussão.

Devido à revelação de fímbrias nessas investigações, é importante relatar aqui sobre o ensaio de motilidade mostrado na página 57. A ideia de que *K. pneumoniae* apresentou uma extensão rudimentar sobre a placa, aparece como uma ideia equivocada, pois células de *K. pneumoniae* são imóveis. No entanto, as fímbrias são estruturas que podem promover motilidade à bactéria através do mecanismo chamado de contração (do inglês, *twitching*) (KEARNS, 2010). Portanto, as fímbrias na superfície da linhagem de *K. pneumoniae* sugestivamente se estenderam para se aderir sob a superfície da placa, e se contraíram para puxar a célula até o local aderido. Dessa forma a adesão mediada pela fímbria é um evento importante na motilidade da célula (HORNICK et al., 1992).

As três linhagens também foram investigadas na formação de biofilme (FIGURA 15). Nesse ensaio, a formação de biofilme de UKP8-*fimZ* foi significativamente superior à UKP8, em 3 horas ( $p < 0.0001$ ), 5 horas ( $p < 0.001$ ) e 10 horas ( $p < 0.005$ ) de incubação (FIGURA 15). Já UKP8-C também formou biofilme em 3 horas ( $p < 0.0001$ ), 5 horas ( $p < 0.001$ ) e 10 horas ( $p < 0.001$ ) de incubação comparado à UKP8 (FIGURA 15). O valor da absorbância quantificado na formação de biofilme em DO600nm, obteve uma média ( $n=5$ ) de 0,0624 em 3 horas, 0,0902 em 5 horas, e 0,2072 em 10 horas para UKP8, e 0,28 em 3 horas, 0,2838 em 5 horas, e 0,371

em 10 horas para UKP8-*fimZ*. Já para a UKP8-C, o valor da absorbância obteve uma média de 0,378466667 em 3 horas, 0,267733333 em 5 horas, e 0,3982 em 10 horas. Não teve diferença significativa entre a formação de biofilme das linhagens UKP8-*fimZ* e UKP8-C. No geral, os resultados indicam que na presença de FimZ a expressão de fímbrias tipo 1 é reprimida e a formação de biofilme é minimizada em *K. pneumoniae*.



**FIGURA 15. Deficiência do regulador FimZ promove aumento da formação de biofilme em UKP8-*fimZ*.** Formação de biofilme em UKP8-*fimZ* foi superior a UKP8 após 3 horas ( $p < 0.0001$ , \*\*\*\*), 5 horas ( $p < 0.001$ , \*\*\*) e 10 horas ( $p < 0.005$ , \*\*) de incubação. UKP8-C formou biofilme em 3 horas ( $p < 0.0001$ , \*\*\*\*), 5 horas ( $p < 0.001$ , \*\*\*) e 10 horas ( $p < 0.001$ , \*\*\*) de incubação comparado à UKP8. Não teve diferença significativa na formação de biofilme entre as linhagens UKP8-*fimZ* e UKP8-C. A formação de biofilme foi realizada em dois ensaios independentes ( $n=5$ ), e os dados foram analisados pelo ANOVA e considerados estatisticamente significativos com valor de  $p\text{-value} \leq 0.05$ .

A formação de biofilme foi outro fenótipo analisado nesse estudo. Nele, foi visto que a deficiência de FimZ potencializou a formação de biofilme em *K. pneumoniae* mutante *fimZ*, o que levanta a hipótese de que possivelmente essa maior formação de biofilme foi devido às fímbrias (apontada como fímbrias tipo 1) presentes nessa linhagem. Essa observação apontada no presente estudo também foi relatada por outros autores, onde também se evidencia a influência da expressão das fímbrias tipo 1 na formação de biofilme em *K. pneumoniae* (STAHLHUT et al., 2012, MURPHY et al., 2013). Além disso, Stahlhut et al. (2012) mostraram que *K. pneumoniae* pode expressar fímbrias do tipo 1 ou tipo 3 na formação de biofilme em

cateter urinário, mas que apenas uma fímbria é expressa no processo infeccioso. Tal resultado observado por esse autor também foi observado no presente estudo nas análises de qRT-PCR, onde os resultados indicaram que enquanto o *cluster fim*, que expressa fímbrias do tipo 1, é ativado, o *cluster mrk*, que expressa fímbrias do tipo 3, não está ativado na cepa deficiente FimZ (UKP8-*fimZ*).

Por outro lado, a linhagem complementada com o gene *fimZ* (UKP8-C) mostrou a mesma quantidade de biofilme detectada na linhagem (UKP8-*fimZ*), mesmo não apresentando fímbrias nas imagens de microscopia e no ensaio de aglutinação de leveduras. Duas hipóteses, baseadas na literatura, podem responder a formação de biofilme na linhagem UKP8-C. Uma primeira hipótese seria que a hiperexpressão da proteína complementada FimZ estaria ativando a expressão de outros *operons* fimbriais, como os *clusters ecp* e *mrk* (de fímbrias tipo 3), que codificam outros tipos fimbriais. Em *K. pneumoniae* foi mostrado que a fímbria do tipo 3 é uma importante fímbria associada à formação de biofilme (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2009; SCHROLL et al., 2010), e que o *cluster ecp* também está envolvido na formação dessas estruturas (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013).

Na segunda hipótese, FimZ complementado poderia não estar regulando negativamente seu próprio *operon*, *fimZ*, e o *operon fim*, mesmo sem o aparecimento das fímbrias. Assim, pode ser que mesmo na presença do FimZ funcional, o *operon fimZ* esteja regulado positivamente – o que poderia explicar a duração da formação de biofilme similar à linhagem deficiente *fimZ*. Tais hipóteses poderão ser respondidas por análises de qRT-PCR a serem realizadas futuramente.

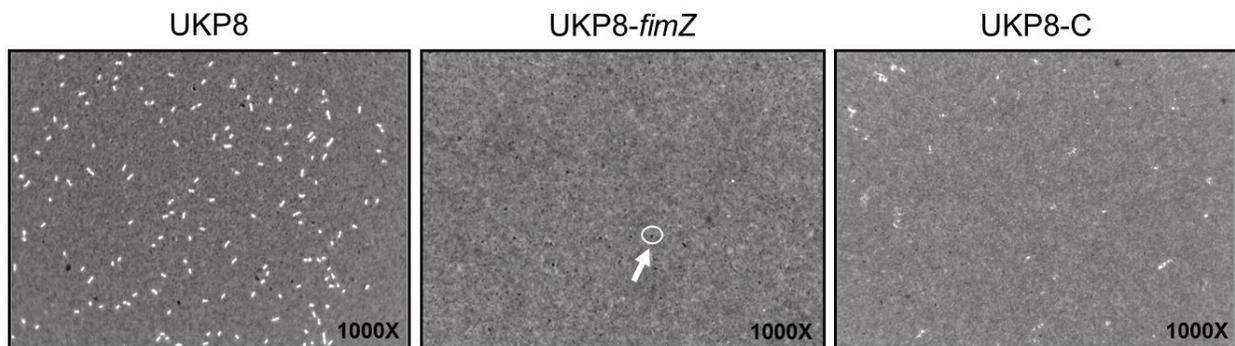
A fímbria, de fato, é uma importante estrutura para a formação de biofilme. No entanto, a cápsula também é outra estrutura responsável pelo desenvolvimento do biofilme (BALESTRINO et al., 2008). As fímbrias são essenciais nos primeiros passos da formação de biofilme (HORNICK et al., 1992), para promover a adesão na superfície. Após esse processo inicial de fixação, será a produção de cápsula que possibilitará a maturação desse biofilme e a proteção das células bacterianas contra agentes antimicrobianos (DOMENICO et al., 1994; BALESTRINO et al., 2008). Em adição, a cápsula no biofilme ainda contribui na agregação das bactérias e modula a adesão das bactérias nas superfícies (BALESTRINO et al., 2008). Dessa forma, a fímbria é citada como um importante evento inicial na formação do biofilme ao promover a adesão das bactérias (MURPHY et al., 2013), e que a cápsula possui um papel na modulação dessa adesão e na maturação do biofilme (BALESTRINO et al., 2008). Isso sugere que apesar de fímbrias e cápsulas contribuírem para a adesão das bactérias no biofilme, essa contribuição

ocorre em etapas distintas na formação do biofilme e, assim, são expressas em momentos distintos.

Um estudo realizado por Sahly et al. (2000) sugeriu que a cápsula é o fator implicante nos processos de adesão e invasão de *K. pneumoniae* em células epiteliais do hospedeiro. Além desse autor, Schembri et al. (2005) mostraram que a formação de biofilme mediada pela fímbria em cepas de *K. pneumoniae* foi retardada devido a expressão da cápsula. Dessa forma, a cápsula pode ser apontada como um implicador da principal atividade da fímbria, a adesão.

#### 4.5. Produção de cápsula polissacarídica é anulada em UKP8-*fimZ*

Para verificar se UKP8, UKP8-*fimZ* e UKP8-C são capazes de produzir cápsula polissacarídica, foi realizada uma coloração negativa com nanquim das células, que permite a visualização da cápsula envolta da célula na cor branca. Foi possível observar que UKP8 apresentou uma produção de cápsula envolta da bactéria (marcada em branco), ao passo, que UKP8-*fimZ* (seta branca) mostrou ausência de cápsula (não marcado em branco), e a linhagem UKP8-C recuperou parcialmente a cápsula marcada em branco, comparada com a UKP8 (FIGURA 16). Assim, o resultado mostra que a linhagem UKP8-*fimZ*, que possui elevada produção de fímbrias, não produz cápsula, sugerindo que na presença de fímbrias, a expressão de cápsula é inibida.



**FIGURA 16. Cápsula mucoviscosa é inibida em UKP8-*fimZ*.** Ensaio de visualização de cápsula polissacarídica após crescimento em D.O. de 0,8 e coloração negativa com nanquim mostra a cápsula marcada em branco envolta da linhagem UKP8, mostra a ausência de cápsula (seta branca) na linhagem UKP8-*fimZ*, e mostra a cápsula marcada em branco parcialmente restaurada na linhagem UKP8-C. As imagens representam experimentos independentes e foram fotografadas em aumento de 1000X.

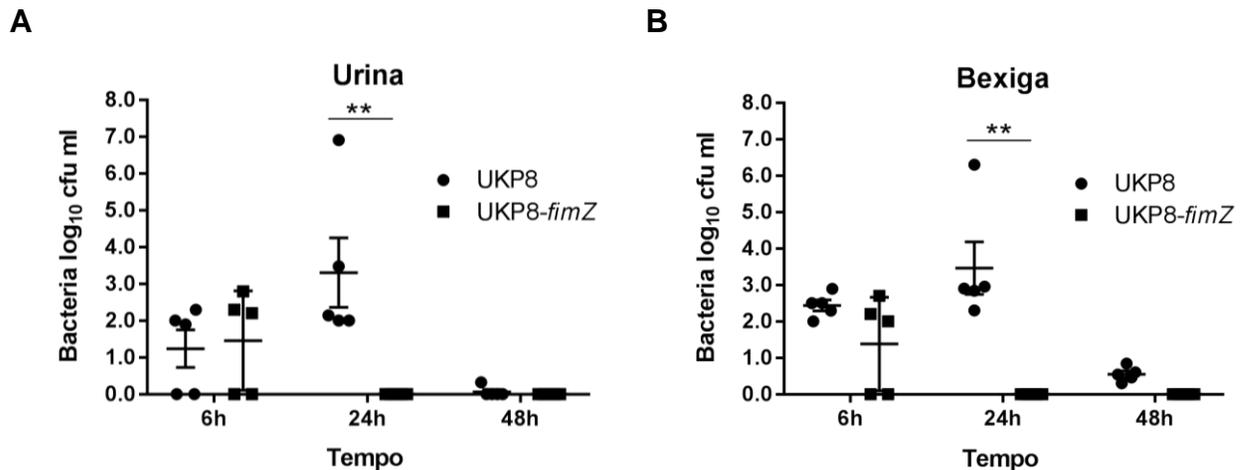
*K. pneumoniae* é uma linhagem que pode apresentar cápsula e fímbrias na superfície celular para auxiliar na sua sobrevivência e patogenicidade (SCHEMBRI et al., 2005). Por outro lado, alguns autores apontam que a relação entre cápsula e fímbria é inversa. Matatov et al., (1999) mostraram que isolados de *K. pneumoniae* de ITU expressaram fímbrias do tipo 1, ao passo que isolados de sepse produziram cápsula, na maioria das vezes. Schembri et al., (2005) também notaram que fímbria e cápsula são componentes incompatíveis em *K. pneumoniae*. A partir da detecção de fímbrias tipo 1 por aglutinação de levedura, os pesquisadores viram que a expressão de fímbrias tipo 1 é afetada pela expressão de cápsula, e que a produção da cápsula atrasou a aglutinação (ligação da subunidade FimH da fímbria à manose na superfície da levedura). No entanto, os autores viram que esse retardo na ligação não foi devido à influência da cápsula sob a regulação transcricional da fímbria na recombinação da variação do promotor *fim*, e nem na montagem ou síntese da fímbria. Os autores notaram que a cápsula promove uma interferência física sobre a fímbria. Além disso, esses autores também observaram que a formação de biofilme mediada por fímbria nos primeiros passos foi retardada pela expressão da cápsula.

Sahly et al. (2000) também foram outros autores que além de notarem que nenhuma das linhagens encapsuladas produziam fímbrias tipo 1 na superfície, também mostraram que a cápsula impede a adesão e invasão de *K. pneumoniae* em células epiteliais. Dessa forma, a expressão de fímbrias após a deficiência de FimZ, pode ter anulado a produção de cápsula visualizada anteriormente.

#### **4.6. UPK8-*fimZ* perde resistência *in vivo* e não forma IBC na bexiga urinária em comparação à UKP8**

Um modelo de infecção do trato urinário em camundongos com UPK8 e UPK8-*fimZ* foi empregado para a investigação da taxa de sobrevivência dessas linhagens de *K. pneumoniae* *in vivo*. A colonização das linhagens nas bexigas dos camundongos foi avaliada após 6 horas, 24 horas e 48 horas de inoculação. Às 6 horas, foi observada uma quantidade semelhante de UKP8 e UKP8-*fimZ* na urina e bexiga dos camundongos, e não houve diferenças significativas entre estas linhagens (FIGURA 17A e 17B). Em contraste, não houve carga bacteriana de UKP8-*fimZ* nem na urina nem na bexiga após 24 horas de inoculação (FIGURA 17A e 17B). Por outro lado, uma carga de UKP8 foi recuperada significativamente na urina em 24 horas ( $p < 0.05$ ) (FIGURA 17A), e na bexiga comparada à UKP8-*fimZ* ( $p < 0.05$ ) (FIGURA 17B). Em 48h pós-infecção, UKP8 não é encontrado na urina (FIGURA 17A), mas pode ser visto na bexiga, porém

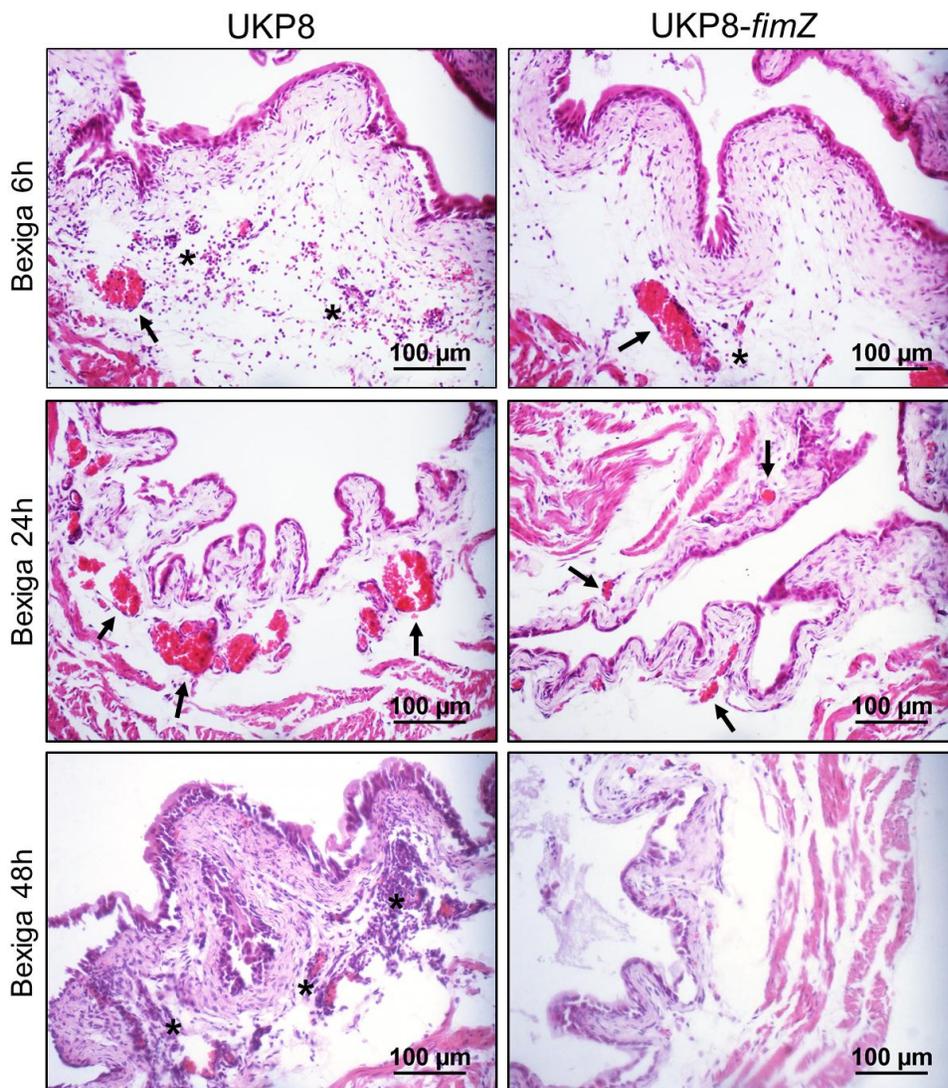
sem valor significativo em comparação à UKP8-*fimZ* (FIGURA 17B). A carga de UKP8-*fimZ* foi mantida nula na urina e na bexiga em 48 horas (FIGURA 17A e 17B).



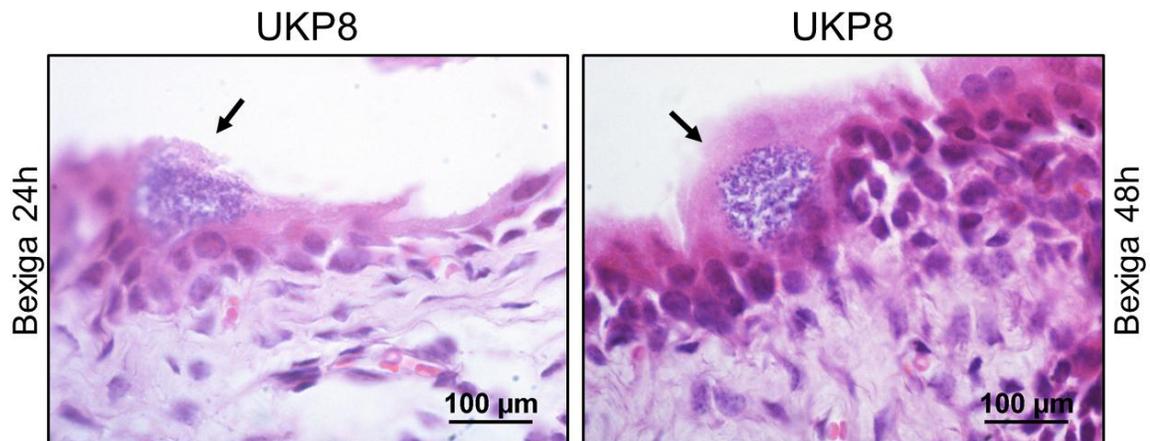
**FIGURA 17. Colonização da bexiga urinária no modelo de UTI em camundongo.** (A) A infecção na bexiga em camundongos BALB/c mostrou carga de UKP8 e UKP8-*fimZ* sem diferença estatística significativa após 6 horas, predominância apenas de UKP8 em 24 horas ( $p < 0.05$ ) e ausência de carga bacteriana em 48h na urina. (B) Na bexiga, após 6 horas uma carga de UKP8 e UKP8-*fimZ* é encontrada, mas sem diferença estatística significativa, e após 24 horas ( $p < 0.05$ ) e carga bacteriana em 48h na bexiga, sem estatística significativa. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes ( $n=5$ ), e os dados foram analisados pelo ANOVA e considerados estatisticamente significativos com valor de  $p\text{-value} \leq 0.05$ .

Esses resultados são também visualizados no ensaio de H&E (hematoxilina e eosina) dos tecidos da bexiga urinária de camundongos infectados por ambas as cepas. A Figura 18 demonstra em 6 horas pós-infecção com ambas as linhagens, um infiltrado de células inflamatórias, e uma hiperemia dos vasos sanguíneos da bexiga para permitir maior mobilização dessas células inflamatórias. Após 24 horas, a hiperemia é mais proeminente no tecido da bexiga infectado com UKP8 do que UKP8-*fimZ*, e uma migração abundante de células inflamatórias é vista apenas após a infecção com UKP8 em 48 horas (FIGURA 18).

Além disso, a linhagem do tipo selvagem UKP8 foi capaz de formar comunidades bacterianas intracelulares (IBCs) no urotélio em 24 horas e 48 horas após a infecção (FIGURA 19). Estes dados mostram que, ao contrário da colonização bem-sucedida da linhagem de tipo selvagem UKP8 na bexiga e da formação de IBCs uroteliais, a UKP8-*fimZ* diminui a capacidade de invadir e sobreviver dentro do hospedeiro.



**FIGURA 18. Análise morfohistológica da bexiga urinária no modelo de UTI em camundongo.** Ensaio H&E (hematoxilina e eosina) demonstra tecido da bexiga com hiperemia (seta) e leve infiltrado inflamatório (asterisco) em 6 horas pós-infecção com UKP8 e UKP8-*fimZ*. A hiperemia é permanente após 24 horas com UKP8 e UKP8-*fimZ*, e um alto infiltrado inflamatório é observado após 48 horas apenas com UKP8.



**FIGURA 19. Formação de comunidade bacteriana intracelular no urotélio.** Formação de IBC (comunidades bacteriana intracelulares) no urotélio (seta) é visto por UKP8 em 24 horas e 48 horas após a infecção.

Apesar dos fatores de virulência apresentados pelo mutante *fimZ* de *K. pneumoniae* na caracterização fenotípica neste estudo, e previamente analisada em ensaios de interação com células epiteliais de bexiga humana, onde havia apresentado uma maior adesão, e possibilitado a invasão da célula bacteriana (SANTOS, 2016) - o que são fatores favoráveis no desenvolvimento de ITU - a linhagem mutante perde resistência *in vivo*, e é eliminada rapidamente.

Pelo ensaio de UFC (unidade formadora de colônia) e H&E (hematoxilina e eosina) foi visto que a carga bacteriana da linhagem mutante *fimZ* de *K. pneumoniae* é anulada logo em 24 horas após a infecção na urina e na bexiga, e a linhagem induziu um leve infiltrado inflamatório até esse período. Porém, nenhuma inflamação foi encontrada em 48 horas pós-infecção, diferente da linhagem selvagem. A selvagem, por sua vez, apesar da inflamação mais acentuada no epitélio, foi capaz de invadir e formar IBC em células epiteliais em 24 e 48 horas pós-infecção. Isso mostra, portanto, que essa linhagem de *K. pneumoniae* uropatogênica é competente na formação de IBC em 24 horas de infecção, assim como mostrado por Rosen et al (2008a), porém mostrado em um tempo menor, logo em 6 horas de infecção.

A rápida eliminação da *K. pneumoniae* deficiente FimZ dentro do hospedeiro pode ser compreendida devido a ativação que a célula bacteriana fimbriada pode promover ao se ligar na célula hospedeira. Pois as fímbrias, além de promover a adesão, ela também ativa sistemas de defesa das células (ABRAHAM; MIAO, 2015), como a liberação de agentes antimicrobianos,

como a proteína pentraxina 3 (JAILLON et al., 2014) e a uromodulina (MO et al., 2004), no meio extracelular. Dentre suas funções, essas proteínas são encarregadas de reconhecer células invasoras pela ligação nas adesinas das fímbrias, retardar e bloquear o crescimento de bactérias (ABRAHAM; MIAO, 2015; PARAGAS et al., 2004), bloquear o contato do uropatógeno com a superfície da célula epitelial (MO et al., 2004), e opsonisar o uropatógeno para o recrutamento de células do sistema imune (JAILLON et al., 2014), logo no lumen da bexiga. Assim, uma vez que ocorre a ativação de antimicrobianos, a bactéria que não se aderiu ao epitélio é reconhecida e eliminada na urina (ABRAHAM; MIAO, 2015).

Nesse sentido, a super expressão de fímbrias pode ter aumentado a visibilidade da cepa no hospedeiro e estimulado um rápido recrutamento do sistema imunológico. Possivelmente, por esse motivo, a linhagem com fímbrias foi bem-sucedida apenas no ensaio *in vitro*, onde apenas células epiteliais de bexiga humana estavam presentes. No entanto, ainda não está muito claro como ocorre a opsonização da fímbria tipo 1 em patógenos por moléculas de reconhecimento. Dessa forma, estudos sobre o papel de antimicrobianos em ITU envolvendo bactérias mais resistentes, como *E. coli* e *K. pneumoniae*, são sugeridos.

Em adição, além da presença da fímbria ser um fator que poderia influenciar na rápida eliminação da *K. pneumoniae* deficiente FimZ dentro do hospedeiro, a ausência de cápsula, detectada nessa linhagem, também é outro fator que poderia contribuir para a eliminação da bactéria. Pois a cápsula, envolta de toda à célula bacteriana, protege e aumenta a capacidade da bactéria de evadir do sistema imune. Dessa forma, a eliminação rápida da cepa deficiente FimZ no epitélio da bexiga urinária pode ser justificada devido a visibilidade que a fímbria pode proporcionar e a diminuição de evasão que a ausência de cápsula pode promover.

Além disso, a formação de IBC por bactérias sugere que os uropatógenos invadam o epitélio para sobreviverem, se protegerem de agentes antimicrobianos e de células defensoras, e entre outras finalidades (FLORES-MIRELES et al., 2015). Porém, as células que conseguem se internalizar também podem ser eliminadas por outros mecanismos de defesa, como pela a descamação do epitélio para a eliminação do IBCs na urina, após a apoptose da célula epitelial (ABRAHAM; MIAO, 2015).

Por outro lado, apesar de formação de IBC em bactéria estar relacionada à adesão e invasão mediados pelas fímbrias (ROSEN et al., 2007; ROSEN et al., 2008a), as células que formaram IBC nesse estudo não apresentam fímbrias na microscopia eletrônica e nem no ensaio de aglutinação, mostrado assim, um resultado inverso comparado aos relatos de outros estudos. Mas, é importante considerar que a adaptação de *K. pneumoniae* selvagem já havia

sido estabelecida no trato urinário, e que as estratégias de sobrevivência são reguladas pela bactéria, de acordo com a necessidade no ambiente, para iludir o sistema imunológico.

Assim, devido a maquinaria que o trato urinário possui para se defender de invasores e manter um ambiente equilibrado, compreende-se que cepas patogênicas desenvolvem estratégias de sobrevivência em ambientes hostis somente quando necessário (JAILLON et al., 2014). Isso mostra que as bactérias controlam a expressão de um determinado fenótipo, e o utiliza quando apropriado.

Em suma, a expressão de fímbrias configura-se como um importante fator de patogenicidade bacteriana e, neste sentido, é de fundamental importância compreendermos os mecanismos que regulam a expressão deste fator de virulência.

Este estudo mostra que FimZ regula negativamente a expressão de genes fimbriais, pois na deficiência deste regulador (cepas mutantes para FimZ), *K. pneumoniae* apresenta um fenótipo hiperfimbriado. Por outro lado, apesar da fímbria ser considerada um importante fator de virulência, a bactéria mutante fimbriada apresenta sua patogenicidade atenuada nos ensaios *in vivo*, ao ser incapaz de reprimir a expressão dessas fímbrias. Desta forma, este estudo mostra que o regulador FimZ, ainda que seja um repressor transcricional, tem papel estratégico na patogenicidade de *K. pneumoniae*.

## 5. CONCLUSÃO

A relevância deste estudo consistiu em compreender a atuação de FimZ em *K. pneumoniae*, a qual pode ser resumida da seguinte forma:

- Proteína FimZ de *K. pneumoniae* reconhece sítios de ligação presentes na região promotora de genes fimbriais dos *clusters fim*, e modula negativamente a expressão dos *clusters* gênicos *fim* e *fimZ*, o que sugere que em *K. pneumoniae* o regulador FimZ atua como repressor da expressão de fímbrias nesses *clusters*.
- Os ensaios fenotípicos confirmaram o regulador FimZ como repressor da expressão de fímbrias, pois na deficiência deste regulador *K. pneumoniae* apresenta um fenótipo fimbriado (apontado como sendo fímbrias tipo 1), exibe maior formação de biofilme, e apresenta uma espécie de motilidade rudimentar.
- Os ensaios *in vivo* mostraram que, na deficiência do repressor de fímbrias FimZ, *K. pneumoniae* apresenta um fenótipo hiperfimbriado que resulta em perda da resistência da bactéria nos modelos animais de infecção urinária. A bactéria deficiente em FimZ foi rapidamente eliminada e foi incapaz de invadir e se replicar em células epiteliais da bexiga e de formar IBCs.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. N.; MIAO, Y. The nature of immune responses to urinary tract infections. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 15, n. 10, p. 655–663, 2015.

AILES, E. C.; SUMMERS, A. D.; TRAN, E. L.; GILBOA, S. M.; ARNOLD, K. E.; MEANEY-DELMAN, D.; REEFHUIS, J. Antibiotics dispensed to privately insured pregnant women with urinary tract infections - United States, 2014. **MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.**, v. 67, n. 1, p. 18-22, 2018.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.

ALCÁNTAR-CURIEL, M. D.; BLACKBURN, D.; SALDAÑA, Z.; GAYOSSO-VÁZQUEZ, C.; LOVINE, N.; DE LA CRUZ, M. A; GIRÓN, J. A. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 129-138, 2013.

ALLEN, B. L.; GERLACH, G. F.; CLEGG, S. Nucleotide sequence and functions of *mrk* determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 916-920, 1991.

ÁLVAREZ, D.; MERINO, S.; TOMÁS, J. M.; BENEDÍ, V. J., ALBERTÍ, S. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 2, p. 953-955, 2000.

ANDERSEN, T. E.; KHANDIGE, S.; MADELUNG, M.; BREWER, J.; KOLMOS, H. J., MØLLER-JENSEN, J. *Escherichia coli* uropathogenesis *in vitro*: invasion, cellular escape, and secondary infection analyzed in a human bladder cell infection model. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 5, p. 1858-1867, 2012.

ANDERSON, G. G.; GOLLER, C. C.; JUSTICE, S.; HULTGREN, S. J.; SEED, P. C. Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm like intracellular bacterial communities during cystitis. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 963- 975, 2010.

ANDERSON, G. G.; PALERMO, J. J.; SCHILLING, J. D.; ROTH, R.; HEUSER, J.; HULTGREN S. J. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. **Science**, v. 301, p. 105-107, 2003.

ANVISA. **Tratamento das principais infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde e a profilaxia antimicrobiana em cirurgia**. Disponível e: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo3/trato\\_urinario.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo3/trato_urinario.htm)>. Acesso em: 05 de setembro de 2018.

ANVISA. **Intervenções e medidas de prevenção e controle da resistência microbiana**. Disponível e: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo5/pre\\_urinario.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo5/pre_urinario.htm)>. Acesso em: 05 de setembro de 2018.

- BALESTRINO, D.; GHIGO, J.M.; CHARBONNEL, N.; HAAGENSEN, J.A.; FORESTIER, C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae in vitro* biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. **Environ. Microbiol.**, v. 10, p. 685-701, 2008.
- BARROS, L. M.; BENTO, J. N. C.; CAETANO, J. A.; MOREIRA, R. A. N.; PEREIRA, F. G. F.; FROTA, N. M.; ARAÚJO, T. M.; SOARES, E. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.**, v. 33, n. 3, p. 429-435, 2012.
- BÄUMLER, A. J.; GILDE, A. J.; TSOLIS, R. M.; VAN DER VELDEN, A. W. M.; AHMER, B. M. M.; HEFFRON, F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 317-322, 1997.
- BERNHARD, W.; GBARAH, A.; SHARON, N. Lectinophagocytosis of type 1 fimbriated (mannose-specific) *Escherichia coli* in the mouse peritoneum. **J. Leukoc. Biol.**, v. 52, p. 343-348, 1992.
- BERRY, R. E.; KLUMPP, D. J., SCHAEFFER, A. J. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 7, p. 2762-2772, 2009.
- BERTANI, G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 3, p. 595-600, 2004.
- BLANGO, M. G., MULVEY, M. A. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 5, p. 1855-1863, 2010.
- BODDICKER, J. D.; ANDERSON, R. A.; JAGNOW, J., CLEGG, S. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 4590-4597, 2006.
- BOUASSIDA, K.; JAIDANE, M.; BOUALLEGUE, O.; TLILI, G.; NAIJA, H.; MOSBAH, A. T. Nosocomial urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase uropathogens: Prevalence, pathogens, risk factors, and strategies for infection control. **Urol. Assoc. J.**, v. 10, n. 3-4, p. E87-93, 2016.
- CAMPOS, M. A.; VARGAS, M. A.; REGUEIRO, V.; LLOMPART, C. M.; ALBERTÍ, S.; BENGOCHEA, J. A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 12, p. 7107-7114, 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.
- CHUNG, A.; ARIANAYAGAM, M.; RASHID, P. Bacterial cystitis in women. **Aust. Fam. Physician.**, v. 39, n. 5, p. 295-298, 2010.
- CLEGG, S.; HANCOX, L. S.; YEH, K. S. *Salmonella typhimurium* fimbrial phase variation and FimA expression. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 2, p. 542-545, 1996.

- CLEGG, S.; HULL, S.; HULL, R.; PRUCKLER, J. Construction and comparison of recombinant plasmids encoding type 1 fimbriae of members of the family *Enterobacteriaceae*. **Infect. Immun.**, v. 48, p. 275-279, 1985.
- CLEGG, S.; PURCELL, B. K.; PRUCKLER, J. Characterization of genes encoding type 1 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, and *Serratia marcescens*. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 281-287, 1987.
- CLEGG, S.; WILSON, J.; JOHNSON, J. More than one way to control hair growth: regulatory mechanisms in Enterobacteria that affect fimbriae assembled by the Chaperone/Usher pathway. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 9, p. 2081-2088, 2011.
- CÓRDOVA, E.; LESPADA, M. I.; GÓMEZ, N.; PASTERÁN, F.; OVIEDO, V.; RODRÍGUEZ-ISMAEL, C. Clinical and epidemiological study of an outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in Buenos Aires, Argentina. **Microbiol. Clin.**, v. 30, n. 7, p. 376-379, 2012.
- CORTES, G.; BORREL, N.; ASTORZA, B.; GOMEZ, C.; SAULEDA, J., ALBERTÍ, S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2583-2590, 2002.
- COUTINHO, R. L.; VISCONDE, M. F.; DESCIO, F. J.; NICOLETTI, A. G.; PINTO, F. C. L.; DA SILVA, A. C. R.; RODRIGUES-COSTA, F.; GALES, A. C.; FURTADO, G. H. C. Community-acquired invasive liver abscess syndrome caused by a K1 serotype *Klebsiella pneumoniae* isolate in Brazil: a case report of hypervirulent ST23. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 970-971, 2014.
- CRUMBLISS, A. L.; HARRINGTON, J. M. Iron sequestration by small molecules: thermodynamic and kinetic studies of natural siderophores and synthetic model compounds. **Adv. Inorg. Chem.**, v. 61, p. 179-250, 2009.
- CUNHA, M. A.; ASSUNÇÃO, G. L.; MEDEIROS, I. M.; FREITAS, M. R. Antibiotic resistance patterns of urinary tract infections in a northeastern Brazilian capital. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 58, n. 2, p. 1-4, 2016.
- DI MARTINO, P.; CAFFERINI, N.; JOLY, B., DARFEUILLE-MICHAUD, A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Res. Microbiol.**, v. 154, p. 9-16, 2003.
- DOMENICO, P.; SALO, R. J.; CROSS, A. S.; CUNHA, B. A. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4495-4499, 1994.
- DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.
- DOVE, S. L.; SMITH, S. G. J.; DORMAN, C. J. Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS. **Mol. Gen. Genet.**, v. 254, p. 13-20, 1997.
- DRAMSI, S., COSSART, P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 14, p. 137-166, 1998.

DURAIKWAMY, S.; CHEE, J. L. Y.; CHEN, S.; YANG, E.; LEES, K.; CHEN, S. L. Purification of intracellular bacterial communities during experimental urinary tract infection reveals an abundant and viable bacterial reservoir. *Infect Immun.*, v. 86, n. 4, p. e00740-17, 2018.

EISENSTEIN, B. I.; SWEET, D. S.; VAUGHN, V.; FRIEDMAN, D. I. Integration Host Factor is required for the DNA inversion that controls phase variation in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 84, p. 6506-6510, 1987.

ESCOLAR, L.; PÉREZ-MARTÍN, J.; LORENZO, V. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 6223-6229, 1999.

ETO, D. S.; JONES, T. A.; SUNDSBAK, J. L.; MULVEY, M. A. Integrin mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. **PLoS Pathog.**, v. 3, p. e100, 2007.

FANG, C. T.; CHUANG, Y. P.; SHUN, C. T.; CHANG, S. C.; WANG, J. T. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 697-705, 2004.

FANG, C. T.; SHIH, Y. J.; CHEONG, C. M.; YI, W. C. Rapid and accurate determination of lipopolysaccharide O-Antigen types in *Klebsiella pneumoniae* with a novel PCR-based O genotyping method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 54, v. 3, p. 666-675, 2016.

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

FOXMAN, B. Urinary tract infection syndromes occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infect. Dis. Clin.**, v. 28, p. 1-13, 2014.

FUNG, C.-P.; CHANG, F.-Y.; LEE, S.-C.; HU, B.-S.; KUO, B.I.-T.; LIU, C.-Y.; HO, M., SIU, L.K. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? **Gut.**, v. 50, p. 420-424, 2002.

FUNG, C. P.; LIN, Y. T.; LIN, J. C. *Klebsiella pneumoniae* in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscess. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 18, n. 8, p. 1322-1325, 2012.

GARCIA, L. M.; CÉSAR, I. C. O.; BRAGA, C. A.; SOUZA, G. A. A. D.; MOTA, E. C. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogasresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. **Rev. Epidemiol. Control. Infect.**, v. 3, n. 2, p. 45-49, 2013.

GERLACH, G. F.; CLEGG, S.; ALLEN, B. L. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 3, p. 1262-1270, 1989.

GOMES, A. E. I. **Construção e caracterização fenotípica e molecular de uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* mutante para o gene regulador da expressão de fímbrias.** 2014. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2012.

GOMES, A. E. I.; STUCHI, L. P.; SIQUEIRA, N. M. G.; HENRIQUE, J. B.; VICENTINI, R.; RIBEIRO, M. L.; DARRIEUX, M.; FERRAZ, L. F. CALDAS. Selection and validation of reference

genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using reverse transcription quantitative real-time PCR. **Sci. Rep.**, v. 8, p. 1, 2018.

GUPTA, K.; HOOTON, T. M.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. Patient-initiated treatment of uncomplicated recurrent urinary tract infections in young women. **Ann. Intern. Med.**, v. 135, n. 1, p. 9-16, 2001.

HANNAN, T. J.; MYSOREKAR, I. U.; CHEN, S. L.; WALKER, J. N.; JONES, J. M.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J.; SEED, P. C. Leux tRNA-dependent and -independent mechanisms of *Escherichia coli* pathogenesis in acute cystitis. **Mol. Microbiol.**, v. 67, p. 116-128, 2008.

HANSEN, D. S.; MESTRE, F.; ALBERTÍ, S.; HERNÁNDEZ-ALLÉS, S.; ÁLVAREZ, D.; DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A.; GIL, J.; MERINO, S.; TOMÁS, J. M.; BENEDÍ, V. J. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 56-62, 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.

HORNICK, D. B.; ALLEN, B. L.; HORN, M. A.; CLEGG, S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1577-1588, 1992.

HSIEH, P. F.; LIN, T. L.; YANG, F. L.; WU, M. C.; PAN, Y. J.; WU, S. H.; WANG, J. T. Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, e33155, 2012.

HSIEH, P. F.; WU, M. C.; YANG, F. L.; CHEN, C. T.; LOU, T. C.; CHEN, Y. Y.; WU, S. H.; SHEU, J. C.; WANG, J. T. D-Galactan II is an immunodominant antigen in O1 lipopolysaccharide and affects virulence in *Klebsiella pneumoniae*: implication in vaccine design. **Front. Microbiol.**, v. 608, n. 5, p. 1-14, 2014.

HSU, C-R.; LIN, T-L.; CHEN, Y-C.; CHOU, H-C., WANG, J-T. The role *Klebsiella pneumoniae rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. **Microbiol.**, v. 157, p. 3446-3457, 2011.

HUNSTAD, D. A.; JUSTICE, S. S. Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 64, p. 203-221, 2010.

IIDA, K.; MIZUNOE, Y.; WAI, S. N.; YOSHIDA, S. Type 1 fimbriation and its phase switching in diarrheagenic *Escherichia coli* strains. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, n. 3, 489-495, 2001.

JAILLON, S.; MOALLI, F.; RAGNARSDOTTIR, B.; BONAVITA, E.; PUTHIA, M.; RIVA, F.; BARBATI, E.; NEBULONI, M.; CVETKO KRAJINOVIC, L.; MARKOTIC, A.; VALENTINO, S.; DONI, A.; TARTARI S.; GRAZIANI, G.; MONTANELLI, A.; DELNESTE, Y.; SVANBORG, C.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. The humoral pattern recognition molecule PTX3 is a key component of innate immunity against urinary tract infection. **Immunity.**, v. 40, n. 4, p. 621-632, 2014.

JORGENSEN, I.; SEED, P. C. How to make it in the urinary tract: A tutorial by *Escherichia coli*. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 10, p. e1002907, 2012.

JUSTICE, S. S.; HUNG, C.; THERIOT, J. A.; FLETCHER, D. A.; ANDERSON, G. G.; FOOTER, M. J., HULTGREN, S. J. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 1333-1338, 2004.

JUSTICE, S. S.; LAUER, S. R.; HULTGREN, S. J., HUNSTAD, D. A. Maturation of intracellular *Escherichia coli* communities requires SurA. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 4793-4800, 2006.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nat. Rev. Microbiol.**, n. 8, v. 9, p. 634-644, 2010.

KELLY, A.; CONWAY, C. O.; CROININ, T.; SMITH, S. G. J.; DORMAN, C. J. DNA Supercoiling and the Lrp protein determine the directionality of *fim* switch DNA inversion in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 5356-5363, 2006.

KOHAYAGAWA, Y.; NAKAO, K.; USHITA, M.; NIINO, N.; KOSHIZAKI, M.; YAMAMORI, Y.; TOKUYASU, Y.; FUKUSHIMA, H. *pyogenic* liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae* genetic serotype K1 in Japan. **J. Infect. Chemother.**, v. 4, n. 15, p. 248-251, 2009.

KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. D. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochim. Biophys. Acta.**, V. 1778, n. 9, p.1781-1804, 2008.

KROGFELT, K. A.; BERGMANS, H.; KLEMM, P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 6, p. 1995-1998, 1990.

LANGSTRAAT, J.; BOHSE, M.; CLEGG, S. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5805-5812, 2001.

LEE, H.-C.; CHUANG, Y.-C.; YU, W.-L.; LEE, N.-Y.; CHANG, C.-M.; KO, N.-Y.; WANG, L.-R.; KO, W.-C. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates in patients with community-acquired bacteraemia. **J. Int. Med.**, v. 259, p. 606-614, 2006.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 632, 2005.

LIN, C. T.; CHEN, Y. C.; JINN, T. R.; WU, C. C.; HONG, Y. M.; WU, W. H. Role of the cAMP-dependent carbon catabolite repression in capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e54430, 2013.

LIN, W.-H.; WANG, M.-C.; TSENG, C.-C.; KO, W.-C.; WU, A.-B.; ZHENG, P.-X., WU, J.-J. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing community-acquired urinary tract infections. **Infection**, v. 38, n. 6, p. 459-464, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Method. Methods.**, n. 25, v. 4, p. 402-408, 2001.

LOSENSKY, G.; Vidakovic, L.; Klingl, A.; Pfeifer, F.; Fröls, S. Novel pili-like surface structures of *Halobacterium salinarum* strain R1 are crucial for surface adhesion. **Front. Microbio.**, v. 5, n. 755, p. 1-11, 2015.

MACIEL, C. M. M. **Investigação do papel do repressor Fur na regulação da expressão de genes que codificam fímbrias em *Klebsiella pneumoniae***. 2012. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2010.

MALMARTEL, A.; GHASAROSSIAN, C. Epidemiology of urinary tract infections, bacterial species and resistances in primary care in France. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 35, n. 3, p. 447-451, 2016.

MANJULA, N. G.; MATH, G. C.; NAGSHETTY, K.; PATIL, S. A.; GADDAD, S. M.; SHIVANNAVAR, C. T. Antibiotic Susceptibility Pattern of ES $\beta$ L Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Urine Samples of Pregnant Women in Karnataka. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 8, n. 10, p. DC08-DC11, 2014.

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

MARTINEZ, J. J.; HULTGREN, S. J. Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 4, p. 19-28, 2002.

MATATOV, R.; GOLDHAR, J.; SKUTELSKY, E.; SECHTER, I.; PERRY, R.; PODSCHUN, R.; SAHLY, H.; THANKAVEL, K.; ABRAHAM, S. N.; OFEK, I. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, n. 1, p. 123-130, 1999.

MATUTE, A. J.; HAK, E.; SCHURINK, C. A.; MCARTHUR, A.; ALONSO, E.; PANIAGUA, M.; VAN ASBECK, E.; ROSKOTT, A. M.; FROELING, F.; ROZENBERG-ARSKA, M.; HOPELMAN, I. M. Resistance of uropathogens in symptomatic urinary tract infections in León, Nicaragua. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 23, n. 5, p. 506-509, 2004.

MCCORMICK, B. A.; KLEMM, P.; KROGFELT, K. A.; BURGHOFF, R. L.; PALLESEN, L.; LAUX, D. C.; COHEN, P. S. *Escherichia coli* F-18 phase locked 'on' for expression of type 1 fimbriae is a poor colonizer of the streptomycin-treated mouse large intestine. **Microb. Pathog.**, v. 14, p. 33-43, 1993.

MERINO, S.; CAMPRUBI, S.; ALBERTI, S.; BENEDI, V. J.; TOMAS, J. M. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2529-2535, 1992.

MIRZAI, M.; JAMSHIDI, S.; ZAMANZADEH, M.; MARASHIFARD, M.; MALEK HOSSEINI, S. A. A.; HAEILI, M.; JAHANBIN, F.; MANSOURI, F.; DARBAN-SAROKHALIL, D.; KHORAMROOZ, S. S. Determination of *gyrA* and *parC* mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with UTI in Iran. **J. Glob. Antimicrob. Resist.** pii: S2213-7165(18)30084-5, 2018.

MO, L.; ZHU, X. H.; HUANG, H. Y.; SHAPIRO, E.; HASTY, D. L.; WU, X. R. Ablation of the Tamm-Horsfall protein gene increases susceptibility of mice to bladder colonization by type 1-fimbriated *Escherichia coli*. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v. 286, n. 4, p. F795-802, 2004.

- MOURA, M. E. B.; CAMPELO, S. M. A.; BRITO, F. C. P.; BATISTA, O. M. A.; ARAÚJO, T. M. E.; OLIVEIRA, A. D. S. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 60, n. 4, p. 416-421, 2007.
- MOYES, R. B.; REYNOLDS, J.; BREAKWELL, D. P. Preliminary Staining of Bacteria: Negative Stain. **Curr. Protoc. Microbiol.**, v. Appendix 3, p. Appendix 3F, 2009.
- MÜLLER, M.C.; ABERG, A.; STRASEVIČIENE, J.; EMÓDY, L.; UHLIN, B. E.; BALSALOBRE, C. Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e1000303, 2009.
- MULVEY, M. A.; SCHILLING, J. D.; HULTGREN, S. J. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4572-4579, 2001.
- MURPHY, C. N.; MORTENSEN, M. S.; KROGFELT, K. A.; CLEGG, S. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. **Infect. Immun.**, v. 81, n. 8, p. 3009-3017, 2013.
- MYSOREKAR, I. U.; HULTGREN, S. J. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 14170-14175, 2006.
- NICHOLSON, T. F.; WATTS, K. M., HUNSTAD, D. A. OmpA of uropathogenic *Escherichia coli* promotes postinvasion pathogenesis of cystitis. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 5245-5251, 2009.
- NOGUEIRA, P. S.; MOURA, E. R.; COSTA, M. M.; MOURA, E. R. F.; COSTA, M. M. F.; MONTEIRO W. M. S.; BRONDI, L. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Rev. Enferm. UERJ.**, v. 17, n. 1, p. 96-101, 2009.
- OKUDA, S.; SHERMAN, D. J.; SILHAVY, T. J.; RUIZ, N.; KAHNE, D. Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane: the PEZ model. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 14, n. 6, p. 337-345, 2016.
- O'GARA, J. P.; DORMAN, C. J. Effects of local transcription and H-NS on inversion of the *fim* switch of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 36, p. 457-466, 2000.
- OSTHOFFA, M.; MCGUINNESSA, S. L.; WAGENA, A. Z.; EISEN, D. P. Urinary tract infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria: identification of risk factors and outcome predictors in an Australian tertiary referral hospital. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 34, p. 79-83, 2015.
- PACZOSA, M. K., MECASAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.
- PAN, Y.-J.; FANG, H.-C.; YANG, H.-C.; LIN, T.-L.; HSIEH, P.-F.; TSAI, F.-C.; KEYNAN, Y.; WANG, J.-T. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 7, p. 2231-2240, 2008.

PAN, Y.-J.; LIN, T.-L.; HSU, C.-R.; WANG, J.-T. Use of a Dictyostelium model for isolation of genetic loci associated with phagocytosis and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 997-1006, 2011.

PARAGAS, N.; KULKARNI, R.; WERTH, M.; SCHMIDT-OTT, K. M.; FORSTER, C.; DENG, R.; ZHANG, Q.; SINGER, E.; KLOSE, A. D.; SHEN, T. H.; FRANCIS, K. P.; RAY, S.; VIJAYAKUMAR, S.; SEWARD, S.; BOVINO, M. E.; XU, K.; TAKABE, Y.; AMARAL, F. E.; MOHAN, S.; WAX, R.; CORBIN, K.; SANNA-CERCHI, S.; MORI, K.; JOHNSON, L.; NICKOLAS, T.; D'AGATI, V.; LIN, C. S.; QIU, A.; AL-AWQATI, Q.; RATNER, A. J.; BARASCH, J.  $\alpha$ -Intercalated cells defend the urinary system from bacterial infection. **J. Clin. Invest.**, v. 124, n. 7, p. 2963-2976, 2004.

PODSCHUN, R.; SIEVERS, D.; FISCHER, A.; ULLMANN, U. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 1415-1421, 1993.

PODSCHUN, R.; ULLMANN U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

REIS, A. C.; SANTOS, S. R.; SOUZA, S. C.; SALDANHA, M. G.; PITANGA, T. N.; OLIVEIRA, R. R. Ciprofloxacin resistance pattern among bacteria isolated from patients with community-acquired urinary tract infection. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 58, n. 53, p. 1-6, 2016.

REIS, L. O.; SOPENA, J. M. G.; FÁVARO, W. J.; MARTIN, M. C.; SIMÃO, A. F. L.; REIS, R. B.; ANDRADE, M. F.; DOMENECH, J. D.; CARDO, C. C. Anatomical features of the urethra and urinary bladder catheterization in female mice and rats. An essential translational tool. **Acta Cir. Bras.**, v. 26, n., p. 106-110, 2011.

REIGSTAD, C. S.; HULTGREN, S. J.; GORDON, J. I. Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 21259-21267, 2007.

RENTSCHLER, A. E.; LOVRICH, S. D.; FITTON, R.; ENOS-BERLAGE, J.; SCHWAN, W. R. OmpR regulation of the uropathogenic *Escherichia coli fimB* gene in an acidic/high osmolality environment. **Microbiol.**, v. 159, p. 316-327, 2013.

REYNOLDS, J.; COLLEGE, R. Bacterial colony morphology. **Biol.**, 2421, p. 1-6, 2011.

PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v. 124, p. 715-727, 2006.

RIDLEY, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. **Trends Cell Biol.**, v. 16, n. 10, p. 522-529, 2006.

ROSEN, D. A.; HOOTEN, T. M.; STAMM, W. E.; HUMPHREY, P. A., HULTGREN, S. J. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. **PLOS Med.**, v. 4, p. e329, 2007.

ROSEN, D. A.; PINKNER, J. S.; JONES, J. M.; WALKER, J. N.; CLEGG, S.; HULTGREN, S. J. Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 7, p. 3337-3345, 2008a.

ROSEN, D. A.; PINKNER, J. S.; WALKER, J. N.; ELAM, J. S.; JONES, J. M.; HULTGREN, S. J. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 7, p. 3346-3356, 2008b.

SAHLY, H.; PODSCHUN, R.; OELSCHLAEGER, T. A.; GREIWE, M.; PAROLIS, H.; HASTY, D.; KEKOW, J.; ULLMANN, U.; OFEK, I.; SELA, S. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 12, p. 6744-6749, 2000.

SAINI, S.; PEARL, J. A.; RAO, C. V. Role of FimW, FimY, and FimZ in regulating the expression of type i fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 9, p. 3003-3010, 2009.

SALAH, M.; AZAB, M.; HALABY, H.; HANORA, A. Mutations in  $\beta$ -lactamases detected in multidrug resistant Gram-negative bacteria isolated from community acquired urinary tract infections in Assiut, Egypt. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 10, n. 46, p. 1938-1943, 2016.

SANTOS, T. P. **Caracterização genotípica e fenotípica de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de infecções do trato urinário e análise *in vitro* dos processos de adesão e invasão de células hospedeiras.** 2016. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2014.

SCHEMBRI, M. A.; BLOM, J.; KROGFELT, K. A.; KLEMM, P. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 8, p. 4626-4633, 2005.

SCHROLL, C.; BARKEN, K. B.; KROGFELT, K. A.; STRUVE, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 179, 2010.

SCHWAN, W. R. Regulation of *fim* genes in uropathogenic *Escherichia coli*. **World J. Clin. Infect. Dis.**, v. 1, n. 1, p-17-25, 2011.

SEIBERT, G.; HÖRNER, R.; MENEGHETTI, B. H.; RIGHI, R. A.; DAL FORNO, N. L. F.; SALLA, A. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein**, n. 12, v. 3, p. 282-286, 2014.

SERRATO, R. V. **Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas.** 2008. 138 p. Tese. (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

SEWIFY, M.; NAIR, S.; WARSAME, S.; MURAD, M.; ALHUBAIL, A.; BEHBEHANI, K.; AL-REFAEI, F.; TISS, A. Prevalence of urinary tract Infection and antimicrobial susceptibility among diabetic patients with controlled and uncontrolled glycemia in Kuwait. **J. Diabetes Res.**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

SIVICK, K. E.; MOBLEY, H. L. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 2, p. 568-585, 2010.

SHU, H.-Y.; FUNG, C.-P.; LIU, Y.-M.; WU, K.-M.; CHEN, Y.-T.; LI, L.-H.; LIU, T.-T.; KIRBY, R.; TSAI, S.-F. Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Microbiol.**, v. 155, p. 4170-4183, 2009.

SNYDER, J. A.; HAUGEN, B. J.; LOCKATELL, C. V.; MARONCLE, N.; HAGAN, E. C.; JOHNSON, D. E.; WELCH, R. A.; MOBLEY, H. L. T. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 7588-7596, 2005.

STAHLHUT, S. G.; TCHESNOKOVA, V.; STRUVE, C.; WEISSMAN, S. J.; CHATTOPADHYAY, S.; YAKOVENKO, O.; APRIKIAN, P.; SOKURENKO, E.V.; KROGFELT, K. A. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 21, p. 6592-6601, 2009.

STAHLHUT, S. G.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; REISNER, A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 65, n. 2, p. 350-359, 2012.

STRUVE, C.; KROGFELT, K. A. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* studies. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 218, p. 149-154, 2003.

STRUVE, C.; BOJER, M.; KROGFELT, K. A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 9, p. 4055-4065, 2008.

STRUVE, C.; BOJER, M.; KROGFELT, K. A. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 11, p. 6592-6601, 2009.

TARKKANEN, A. M.; ALLEN, B. L.; WILLIAMS, P. H.; KAUPPI, M.; HAAHTELA, K.; SIITONEN, A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; CLEGG, S.; KORHONEN, T. K. Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1187-1192, 1992.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos para clínicos**. 3ª ed. rev. atual. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 79.

TERLIZZI, M. E.; GRIBAUDO, G.; MAFFEI, M. E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 1566, 2017.

THAI, K. H.; THATHIREDDY, A.; HSIEH, M. H. Transurethral induction of mouse urinary tract infection. **Jove Jour. Visual. Exper.**, p. 1-4, 2010.

TINKER, J. K.; CLEGG, S. Characterization of FimY as a coactivator of type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3305-3313, 2000.

TINKER, J. K.; HANCOX, L. S.; CLEGG, S. FimW is a negative regulator affecting type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 435-442, 2000.

TOMÁS, J.M.; BENEDÍ, V.J.; CIURANA, B., JOFRE, J. Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. **Infect. Immun.**, v. 54, p. 85-89, 1986.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R., CASE, C. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TUMBARELLO, M.; VIALE, P.; VISCOLI, C.; TRECARCHI, E. M.; TUMIETTO, F.; MARCHESE, A.; SPANU, T.; AMBRETTI, S.; GINOCCHIO, F.; CRISTINI, F.; LOSITO, A. R.; TEDESCHI, S.; CAUDA, R.; BASSETTI, M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clin. Infect. Dis.**, n. 55, v. 7, p. 943-950, 2012.

UKAH, U. V.; GLASS, M.; AVERY, B.; DAIGNAULT, D.; MULVEY, M. R.; REID-SMITH, R. J.; PARMLEY, E. J.; PORTT, A.; BOERLIN, P.; MANGES, A. R. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Escherichia coli* and development of community-acquired urinary tract infections. **Epidemiol Infect.**, v. 146, n. 1, p. 46-57, 2018.

VAN DER WOUDE, M. W.; BÄUMLER, A. J. Phase and antigenic variation in bacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 581-611, 2004.

VEMULAPALLI, R.; H. E, Y.; BUCCOLO, L. S.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N.; SCHURIG, G. G. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* genes results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3927-3932, 2000.

WANG, H.; LIANG, F. X.; KONG, X. P. Characteristics of the phagocytic cup induced by uropathogenic *Escherichia coli*. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 56, p. 597-604, 2008.

WANG, Z. C.; HUANG, C. J.; HUANG, Y. J.; WU, C. C.; PENG, H. L. FimK regulation on the expression of type 1 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43S3. **Microbiol.**, v. 159, p. 1402-1415, 2013.

WILLIAMS, P.; TOMAS, J. M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 1, p. 196-204, 1990.

WRIGHT, K. J.; SEED, P. C.; HULTGREN, S. J. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. **Cell Microbiol.**, v. 9, p. 2230-2241, 2007.

WISKUR, B. J.; HUNT, J. J.; CALLEGAN, M. C. Hypermucoviscosity as a virulence factor in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 49, n. 11, p. 4931-4938, 2008.

WHO. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.** Disponível e: <<http://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 10 de julho de 2018.

WU, K.-M.; LI, L.-H.; YAN, J.-J.; TSAO, N.; LIAO, T.-L.; TSAI, H.-C.; FUNG, C.-P.; CHEN, H.-J.; LIU, Y.-M.; WANG, J.-T.; FANG, C.-T.; CHANG, S.-C.; SHU, H.-Y.; LIU, T.-T.; CHEN, Y.-T.; SHIAU, Y.-R.; LAUDERDALE, T.-L.; SU, I.-J.; KIRBY, R., TSAI, S.-F. Genome sequencing and

comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 14, p. 4492-4501, 2009.

YANG, Y. S.; KU, C. H.; LIN, J. C.; SHANG, S. T.; CHIU, C. H.; YEH, K. M.; LIN, C. C.; CHANG, F. Y. Impact of Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* on the outcome of community-onset bacteremic urinary tract infections. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 43, n. 3, p. 194-199, 2010.

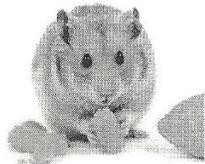
YEH, K. S.; HANCOX, L. S.; CLEGG, S. Construction and characterization of a *fimZ* mutant of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 23, 6861-6865, 1995.

YEH, K. S.; TINKER, J. K.; CLEGG, S. FimZ binds the *Salmonella typhimurium fimA* promoter region and may regulate its own expression with FimY. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, n. 1, p. 1-10, 2002.

YU, W.-L.; KO, W. C.; CHENG, K.-C.; LEE, H.-C.; KE, D.-S.; LEE, C.-C.; FUNG, C.-P., CHUANG, Y.-C. Association between *mpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, n. 10, p. 1351-1358, 2006.

## 7. ANEXOS

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.



### COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL EM PESQUISA - CEUA

#### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Projeto de Pesquisa:** GERAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO POR CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PATOGÊNICAS E MUTANTES PARA GENES DE VIRULÊNCIA.

**ÁREA DE CONHECIMENTO:** Genética Molecular e de Microorganismos

**Autor(es):** Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz; Ana Érica Inácio Gomes

**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**Protocolo:** 004.04.2015

**IP. CIUCA:** 200.225.122.34

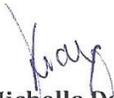
**CIAEP/CONCEA Nº:** 01.0226.2014

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa- CEUA, da Universidade São Francisco, analisou em reunião ordinária no dia 30/04/2015 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer:** Aprovado. Recomenda-se substituir o termo sacrifício por eutanásia.

  
**Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini**

**Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa**  
**Universidade São Francisco**

Campus Bragança Paulista  
Campus Campinas - Unidade Cambuí  
Campus Campinas - Unidade Swift  
Campus Itatiba  
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825  
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370  
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321  
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015  
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978