



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Biologia Celular – CEL
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

**O papel do metabolismo de carboidratos na expressão de fatores de virulência em
linhagens de *Escherichia coli* uropatogênicas**

Aluna: Rafaella Christina Rocha Moreira da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos

Brasília – DF

2022

“Cheguei à conclusão de que não existe nada melhor para o ser humano do que ser feliz no trabalho que realiza e desfrutar dos seus resultados; afinal, essa é a sua recompensa”.

(Eclesiastes 3:22)

DEDICATÓRIA

A todas as pessoas que de alguma maneira tocaram minha vida com a verdadeira liderança, ensinando-me o caminho por onde eu devo andar de maneira amorosa, bondosa, firme, paciente, cheia de esperança e perseverança necessárias a quem escolheu desempenhar tal responsabilidade com maestria. Que cada um de vocês possa olhar para o fruto de seu penoso trabalho e ficar satisfeito, tendo certeza que marcaram positivamente a minha vida pessoal e profissional.

“A verdadeira grandeza e a verdadeira liderança não se alcançam submetendo-se alguns seres humanos ao serviço de um, mas generosamente dando-se a si mesmo a serviço deles”.

(J. Oswald Sanders)

AGRADECIMENTOS

Desde tenra idade, fui ensinada a respeito da importância e da necessidade de dar honra a quem merece honra, reconhecendo e lembrando dos meus líderes e daquelas pessoas cujas vidas e ações marcaram-me. Desse modo, gostaria de expressar minha profunda gratidão aos que desempenharam este papel tão vital neste projeto:

Deus, cujas respostas, planos e direções nunca falham e sempre me levam muito além do que pedi ou pensei;

Maria José V. Rocha Moreira, minha avó, uma mulher sábia que encontrou o prazer e a coragem necessária para exercer seu papel de matriarca da família, ensinando os valores, os princípios e os caminhos para uma vida próspera e feliz nesta terra, conduzindo-me, aconselhando-me e corrigindo-me sempre que necessário. Sem você, eu não seria quem e o que sou hoje;

Rosalynnd V. Rocha Moreira, minha mãe, que vive a realidade de amar alguém mais do que a si mesmo todos os dias, fazendo tudo o que é possível para que eu seja grande diante de Deus e dos homens;

Rosalynne V. Rocha Moreira, minha tia, cujo amor prático demonstrado diariamente por mim me mostrou várias razões para que eu pudesse esperar e viver cada tempo e estação de Deus para minha vida humana e profissional, sem me deixar desistir dos meus sonhos e propósito;

Jorge V. Rocha Moreira e Fabiana P. Moreira, meus tios, que através de suas visões e prioridades acerca da família foram ao meu encontro quando me perdi de mim e me ensinaram que não importa quão empenhada eu seja, eu nunca serei uma ilha, um ser humano completo em si próprio, antes faço parte de um todo, de uma família que, apesar dos pesares, escolhe crescer junta, em amor. Através de seus exemplos, vocês me ensinaram a sempre ponderar e fazer as escolhas certas em lugar das escolhas fáceis.

Professora Dra. Tatiana Amabile de Campos, minha orientadora, cujo vínculo estabelecido e cuidado ao longo dos anos deixou marcas positivas, profundas, eternas e claramente reconhecíveis na minha vida pessoal e profissional, como várias pessoas já testemunharam ao olhar para nós enquanto convivemos. Nunca esqueça da

grande influência que você exerceu, exerce e exercerá em quem eu escolho ser todos os dias;

Ana Paula C. Almeida, Eduarda Gianni e Laura F. Gonçalves, que me permitiram compreender e viver a realidade contida na ideia de que as pessoas que estão ao seu lado importam mais do que os caminhos que precisarão ser percorridos. Saibam que cada uma de vocês, das histórias, lutas, pequenas alegrias, frustrações, lágrimas, aprendizados, conselhos e conversas regadas a café e bactérias contribuíram para me fazer diariamente feliz em meu ambiente de trabalho;

Professora Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues junto com toda a equipe do Laboratório de Referência Nacional de Enteropatógenos da Fundação Oswaldo Cruz, que consolidaram a base de conhecimentos bioquímicos necessária para o desenvolvimento desse trabalho antes mesmo que ele fosse concebido;

Professora Dra. Ana Flávia A. Parente, Professor Dr. Daniel M. P. Ardisson de Araújo e Professor Dr. Vicente de Paulo Martins por toda generosidade e simplicidade expressas no tempo em que vocês investiram me ensinando e me mostrando quais caminhos eu poderia seguir ao longo das análises desse projeto. Nunca esquecerei vossas atitudes, conhecimentos e tempo compartilhados comigo em meu favor;

Aos meus irmãos em Cristo cujas orações abraçaram meu coração e minha alma, carregando-me no colo em todos os momentos de dificuldades enfrentados ao longo do desenvolvimento deste projeto;

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Microbiana pela oportunidade e pelo suporte para a execução desse projeto;

As agências de fomento Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro prestado;

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho. Por meio de vossos exemplos claros e, por vezes, silenciosos, eu aprendi que tipo de pessoa, de líder e de amiga eu quero ser para cada pessoa que cruzar meu caminho.

RESUMO

Infecções no trato urinário (ITUs) são a causa mais frequente de infecções bacterianas em seres humanos. Estima-se que a cada ano, aproximadamente 150 milhões de pessoas são acometidas por essa patologia em todo o mundo. Responsável por 80%-90% dos casos, a enterobactéria Gram-negativa *Escherichia coli* uropatogênica (*Uropathogenic Escherichia coli* – UPEC), é o agente causador mais comum de ITUs adquiridas na comunidade. A capacidade de UPEC em sobreviver no trato urinário depende de sua fisiologia, metabolismo e de seus determinantes de virulência. Recentemente, foi demonstrado que o transporte e metabolismo de vários carboidratos estão associados à virulência em enterobactérias. Todavia, como o papel preciso da utilização de carboidratos na expressão e regulação da virulência bacteriana ainda não foi determinado, buscamos compreender o impacto que o metabolismo de diferentes fontes de carbono tem sobre a expressão de fatores de aptidão e virulência na patogênese de UPECs resistentes à múltiplas drogas (MDR), com ênfase na expressão das fímbrias tipo 1. O objetivo deste trabalho foi compreender o efeito que o uso de diferentes fontes de carbono tem sobre a expressão de mecanismos de virulência de linhagens UPECs MDR. Para este fim, quatro linhagens diferentes de UPECs MDR foram submetidas a determinação do perfil de resistência aos antibióticos, a análise da capacidade de sobrevivência e reprodução (*fitness* bacteriano), de expressar fímbrias tipo 1 funcionais, de formar biofilme utilizando diferentes fontes de carbono e de sobreviver em sangue e soro. Em condições anaeróbicas todas as UPECs analisadas utilizaram D-(-)-Sorbitol como fonte de carbono de alto rendimento. Três das quatro estirpes analisadas não utilizam D-(-)-Frutose como fonte de carbono para seu crescimento. Os dados obtidos através do Ensaio de Aglutinação de Levedura sugerem que o metabolismo de D-(-)-Frutose tem relação com a expressão de fímbrias tipo 1 funcionais na superfície celular de três das quatro estirpes analisadas. UPEC 76 não utilizou D-(-)-Frutose como fonte de carbono para seu crescimento ou para expressar fímbrias tipo 1 funcionais. Todas as UPECs analisadas são classificadas como produtoras moderadas de biofilme quando crescidas em N-acetil-D-glicosamina. Três das quatro estirpes apresentaram uma capacidade aumentada de sobreviver em sangue e soro ao utilizar N-acetil-D-glicosamina como fonte única de carbono. Em conjunto, nossos dados sugerem que o metabolismo de diferentes fontes de carbono (açúcares) modula a expressão de fatores

de virulência como o crescimento exacerbado, a expressão de fímbrias tipo 1 funcionais e a resistência ao soro em diferentes estirpes de UPECs MDRs.

Palavras chave: *Escherichia coli* uropatogênica, metabolismo de carboidrato, transporte de açúcar, virulência, *fitness*, fímbrias tipo 1

ABSTRACT

Urinary tract infections (UTIs) are the most common cause of bacterial infections in humans. It is estimated that approximately 150 million people worldwide are affected by this condition each year. Accounting for 80%-90% of cases, the Gram-negative enterobacterium Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the most common causative agent of community-acquired UTIs. The ability of UPEC to survive in the urinary tract depends on its physiology, metabolism, and virulence determinants. Recently, it has been demonstrated that the transport and metabolism of various carbohydrates are associated with virulence in enterobacteria. However, the precise role of carbohydrate utilization in the expression and regulation of bacterial virulence has not yet been determined. Therefore, we sought to understand the impact of different carbon sources' metabolism on the expression of fitness and virulence factors in the pathogenesis of multidrug-resistant (MDR) UPEC, with an emphasis on the expression of type 1 fimbriae. The aim of this study was to comprehend the effect of using different carbon sources on the expression of virulence mechanisms in MDR UPEC strains. To this end, four different MDR UPEC strains were subjected to antibiotic resistance profiling, analysis of survival and reproduction (bacterial fitness), expression of functional type 1 fimbriae, biofilm formation using different carbon sources, and survival in blood and serum. Under anaerobic conditions, all analyzed UPEC strains utilized D-(-)-sorbitol as a high-yield carbon source. Three out of the four strains did not use D-(-)-fructose as a carbon source for growth. Data obtained through the Yeast Agglutination Assay suggest that D-(-)-fructose metabolism is related to the expression of functional type 1 fimbriae on the cell surface of three out of the four strains analyzed. UPEC 76 did not utilize D-(-)-fructose as a carbon source for growth or for expressing functional type 1 fimbriae. All analyzed UPEC strains were classified as moderate biofilm producers when grown in N-acetyl-D-glucosamine. Three out of the four strains exhibited an increased ability to survive in blood and serum when utilizing N-acetyl-D-glucosamine as the sole carbon source. Taken together, our data suggest that the metabolism of different carbon sources (sugars) modulates the expression of virulence factors such as excessive growth, expression of functional type 1 fimbriae, and serum resistance in different MDR UPEC strains.

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli*, carbohydrate metabolisms, sugar transporters, *fitness*, virulence, type 1 fimbriae

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	3
AGRADECIMENTOS	4
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
INTRODUÇÃO.....	15
1. <i>Escherichia coli</i>	16
2. <i>Escherichia coli</i> uropatogênica.....	19
3. Infecções no trato urinário	19
4. Fatores de virulência.....	22
4.1. Adesinas	23
4.1.1. Fímbria tipo 1	24
4.1.2. Formação de biofilme.....	28
Resistência aos antimicrobianos	32
4.1.4 Sistema de aquisição de ferro (aerobactina).....	33
4.1.5 Resistência ao soro	35
5. Metabolismo	36
JUSTIFICATIVA.....	40
OBJETIVOS.....	40
1. Objetivo geral.....	40
2. Objetivos específicos	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
1. Linhagens bacterianas.....	41
2. Meios de cultura	42
2.1. Luria Bertani (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007).....	42
2.2. Meio Mínimo (adaptado de RUSSELL; SAMBROOK, 2001).....	43
2.3. Urina não filtrada (BOUATRA et al., 2013).....	44
3. Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos	45
4. <i>Fitness</i> bacteriano	46
5. Ensaio de Aglutinação de Levedura	48
6. Ensaio de Formação de Biofilme em Superfície de Poliestireno	48
7. Concentração Mínima Inibitória de Cloranfenicol.....	49
8. Capacidade de sobrevivência celular em biofilme na presença de cloranfenicol	50

9. Sobrevivência em sangue e soro humano.....	51
10. Análises estatísticas	51
10.1. Fitness bacteriano.....	51
10.2. Ensaio de aglutinação de levedura (3%)	52
10.3. Ensaio de Formação de Biofilme em Superfície de Poliestireno	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
1. <i>Fitness</i> bacteriano	53
2. Ensaio de Aglutinação de Levedura (3%)	59
3. Concentração Inibitória Mínima	61
4. Ensaio de Formação de Biofilme em Superfície de Poliestireno.....	62
4. Ensaio de sobrevivência celular em biofilme na presença do cloranfenicol	64
5. Ensaio de sobrevivência celular em sangue e soro	66
CONCLUSÃO.....	71
PERSPECTIVAS FUTURAS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
MATERIAL SUPLEMENTAR	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Patogênese das infecções do trato urinário.	Página 21
Figura 2 - Representação dos principais fatores de virulência associados à <i>Escherichia coli</i>.	Página 23
Figura 3 - Operon <i>fim</i>.	Página 25
Figura 4 - Estágios iniciais da invasão de uma célula epitelial da bexiga humana 5637 (BEC 5637) por uma cepa de UPEC.	Página 27
Figura 5 - Vias de sinalização e função dos TLRs.	Página 30
Figura 6 - Fórmula utilizada para calcular o tempo de geração das quatro linhagens de UPECs em diferentes meios de cultura.	Página 47
Figura 7 - Testes estatísticos utilizados ao longo do projeto.	Página 52
Figura 8 – UPEC MDR usa D-(-)-Sorbitol como fonte de carbono de alto rendimento em condições anaeróbicas.	Página 55
Figura 9 – O metabolismo de diferentes carboidratos utilizados como fontes únicas de carbono influencia a expressão de fímbrias tipo 1 funcionais na superfície de UPECs MDR oriundas de pacientes com ITU aguda.	Página 58
Figura 10 – Unidades formadoras de colônias (UFC) de UPECs MDR recuperadas imediatamente após o tratamento com cloranfenicol em doses inibitórias sob bactérias envoltas por biofilmes maduros.	Página 63
Figura 11 – Unidades formadoras de colônias recuperadas após a incubação dos isolados em um pool de sangue e soro humanos nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos.	Página 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações referentes as quatro linhagens bacterianas utilizados ao longo deste projeto.	Página 42
Tabela 2 - Informações referentes as fontes de carbono utilizadas ao longo do desenvolvimento deste projeto	Página 43
Tabela 3 - Antimicrobianos utilizados ao longo do desenvolvimento deste projeto.	Página 45
Tabela 4 – Perfil de resistência antimicrobiana	Página 61
Tabela 5 - Capacidade de formação de biofilme que diferentes linhagens de UPECs MDR apresentam em uma superfície de poliestireno.	Página 61

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: Transportadores de cassete de ligação de ATP

AIEC: *Escherichia coli* invasiva aderente

APEC: *Escherichia coli* patogênica aviária

ATP: Adenosina trifosfato

Ca²⁺: Cálcio

CCL2: Ligantes 2 de quimiocinas CC

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Cl⁻: Cloreto

CXCL1: Ligante 1 de quimiocina CXC

DAEC: *Escherichia coli* difusamente aderente

DAMPs: Padrões moleculares associados a danos

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

ECDC: Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

EPS: Substância polimérica extracelular

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC: *Escherichia coli* patogênicas extra intestinais

FAP-DF: Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal

FVs: Fatores de virulência

IPEC: *Escherichia coli* patogênicas intestinais

ITUs: Infecções no trato urinário

K⁺: Potássio

LB: Luria Bertani

MDR: resistência à múltiplas drogas

Mg²⁺: Magnésio

MICs: Concentrações inibitórias mínimas

MNEC: *Escherichia coli* associada à meningite

MSF: Superfamília facilitadora principal

Na⁺: Sódio

NaCl: Cloreto de sódio
NaOH: Hidróxido de sódio
NH₄⁺: Amônio
OMS: Organização Mundial da Saúde
PAI: Ilha de patogenicidade
PAMPs: Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS: Solução salina tamponada com fosfato
PDR: Pan-resistente
PO₄⁻: Fosfato
PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões
RAM: Resistência às drogas antimicrobianas
SEPEC: *Escherichia coli* associada à septicemia
SO₄⁻: Sulfato
ST: Sequence type
STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga
TLRs: Receptores do tipo Toll-like
UFC: Unidades formadoras de colônias
UPECs: *Escherichia coli* uropatogênica
XDR: Extensivamente resistente

INTRODUÇÃO

Infecções no trato urinário (ITUs) são a causa mais frequente de infecções bacterianas em seres humanos (CARRARO-EDUARDO; GAVA, 2012). Estima-se que a cada ano, aproximadamente 150 milhões de pessoas são acometidas por essa patologia em todo o mundo (STAMM; NORRBY, 2001). As ITUs são causadas por uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas e fungos (FLORES-MIRELES et al., 2015). Responsável por 80%-90% dos casos, a enterobactéria Gram-negativa *Escherichia coli* uropatogênica (*Uropathogenic Escherichia coli* – UPEC), é o agente causador mais comum de ITUs adquiridas na comunidade (TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017).

Clinicamente, as ITUs são categorizadas como não complicadas ou complicadas. ITUs não complicadas geralmente afetam indivíduos saudáveis e sem anormalidades estruturais ou neurológicas no trato urinário (FLORES-MIRELES et al., 2015), podendo se manifestar como infecções sintomáticas ou assintomáticas na bexiga (cistite), infecção renal aguda (pielonefrite), insuficiência renal e, em casos mais graves, como urosepsis (SCHWAB; JOBIN; KURTS, 2017). ITUs complicadas normalmente são associadas ao uso de cateteres, anormalidades estruturais ou neurológicas no trato urinário, imunossupressão ou exposição a antibióticos (FLORES-MIRELES et al., 2015).

UPECs apresentam estratégias que lhe permitem ter sucesso na invasão e colonização de seu hospedeiro, evitando sua detecção e eliminação pelo sistema de defesa, além de driblar sua eliminação por meio do uso de antibióticos. Flagelos, adesinas, sistema de aquisição de ferro (sideróforos), toxinas, formação de cápsulas e biofilmes, síntese de enzimas que inativam drogas, alterações mutacionais em proteínas alvo e bombas de efluxo de fármacos são exemplos frequentemente encontrados de tais estratégias (TOTSIKA et al., 2012; NIKAIDO, 2009).

A resistência às drogas antimicrobianas (RAM) é considerada uma das mais importantes ameaças à saúde global. Até o momento, os esforços para combater a RAM concentram-se em tentativas conjuntas de melhorar o diagnóstico, as práticas de prescrição de antibióticos e as estratégias de prevenção de infecções, todavia, o desenvolvimento clínico de novos antimicrobianos está quase sem perspectiva.

Portanto, novas estratégias são necessárias na luta contra a RAM já estabelecida e emergente (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Estudos fisiológicos demonstraram que a regulação da expressão dos fatores de virulência é controlada pela disponibilidade de nutrientes, e que o transporte e o metabolismo dos carboidratos são amplamente aceitos como base nutricional necessária para tal fim, tendo influência direta sobre o crescimento, colonização e manutenção de cepas de *E. coli* patogênicas (LE BOUGUÉNEC; SCHOULER, 2011). Em uma tentativa de demonstrar uma ligação entre o transporte e o metabolismo de vários carboidratos e a virulência em enterobactérias, análises transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas concentraram seus esforços para identificar vias metabólicas fundamentais associadas aos transportadores de nutrientes essenciais durante processos infecciosos desencadeados por bactérias, incluindo *E. coli* patogênica extra-intestinais como UPEC. Todavia, como na maioria dos casos os carboidratos metabolizados e o papel preciso de sua utilização na expressão e regulação da virulência bacteriana ainda não foram determinados, buscamos compreender o impacto que o metabolismo de diferentes fontes de carbono tem sobre a expressão de fatores de aptidão e virulência na patogênese de UPECs resistente à múltiplas drogas (MDR), dando ênfase na expressão das fímbrias tipo 1 (LE BOUGUÉNEC; SCHOULER, 2011).

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma espécie bacteriana versátil que compreende variantes comensais, capazes de sobreviver na microbiota de seus hospedeiros sem causar-lhe consequências negativas, à diferentes variantes patogênicas, capazes de provocar doenças intra ou extra intestinais em seus hospedeiros humanos e animais (AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012). Devido a esse amplo espectro de estilos de vida e fenótipos, *E. coli* é um organismo modelo adequado para estudar a evolução e a adaptação bacteriana a diferentes condições e nichos de crescimento (LEIMBACH; HACKER; DOBRINDT, 2013).

Inicialmente descrita pelo médico alemão Theodor Escherich, *E. coli* é uma espécie bacteriana, membro da família Enterobacteriaceae, que está taxonomicamente

localizada na subdivisão gama do filo Proteobacteria (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; LEIMBACH; HACKER; DOBRINDT, 2013). *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia facultativa, móvel, não esporulada, fermentadora de lactose com produção de gás, lisina descarboxilase e indol positivo, que é muito bem-sucedida não apenas no laboratório, mas principalmente na natureza, onde seu tamanho populacional total estimado está em torno de 10^{20} (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; TENAILLON et al., 2010). Os vários hospedeiros de *E. coli* têm diferentes tamanhos corporais, morfologias intestinais, dietas, tempos de retenção da digesta e microbiota. Em conjunto, essas características podem ter uma influência substancial na prevalência e densidade de *E. coli*, que variam de 0% a 100% e mais de 6 ordens de magnitude, respectivamente, entre as espécies hospedeiras (TENAILLON et al., 2010).

Apesar de ser tão bem-sucedida em diferentes ecossistemas, o hábitat primário da *E. coli* é o intestino dos animais vertebrados, onde é o organismo aeróbio predominante, vivendo em simbiose com o seu hospedeiro (TENAILLON et al., 2010). O corpo humano abriga diferentes unidades biológicas, altamente organizadas, formadas por células eucarióticas e pela microbiota, que inclui membros dos três domínios da vida (*Archaea*, *Bacteria* *Eukarya*) e os vírus (MILANI et al., 2017). No trato digestivo, as linhagens comensais de *E. coli* estão localizadas no intestino grosso, especialmente no ceco e no cólon. Elas residem na camada de muco que cobre as células epiteliais, são eliminadas no lúmen intestinal com o componente de muco degradado e finalmente são excretadas nas fezes atingindo o meio ambiente, onde podem sobreviver e transitar através do solo, da água e dos mais diversos alimentos e sedimentos abióticos (TENAILLON et al., 2010; LEIMBACH; HACKER; DOBRINDT, 2013).

E. coli está entre as primeiras espécies bacterianas a colonizar o intestino durante a infância, atingindo uma densidade populacional muito alta e predominante (superior a 10^7 unidades formadoras de colônia por grama de fezes) antes da expansão dos anaeróbios. Após dois anos, a densidade se estabiliza e permanece em torno de 10^8 unidades formadoras de colônia por grama de fezes até diminuir gradualmente nos idosos. As estirpes iniciais podem ser provenientes da microbiota fecal materna e da equipe de enfermagem da maternidade, já que o aumento da higiene nos hospitais e nas famílias que vivem em países industrializados reduziu a colonização precoce por *E. coli* (TENAILLON et al., 2010).

Subjacente à incrível diversidade metabólica e fenotípica de *E. coli*, está uma estrutura genômica muito dinâmica que, através de vários mecanismos genéticos e moleculares como mutações pontuais, inserções, deleções, transferência horizontal de genes e ação direta de elementos genéticos móveis (transposons, integrons, etc), estabeleceu um ambiente favorável para que algumas linhagens de *E. coli* se desviasse de seu *status* comensal na microbiota intestinal de mamíferos vertebrados, para assumir um curso mais patogênico, com capacidade de causar doenças dentro e fora do intestino (LEIMBACH; HACKER; DOBRINDT, 2013; AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012).

As linhagens patogênicas de *E. coli* podem ser divididas em *E. coli* patogênicas intestinais (IPEC) ou diarreio gênica, e *E. coli* patogênicas extra intestinais (ExPEC), dependendo do local onde causam infecção. Ambos são sub-categorizados em patótipos distintos, que são definidos como um grupo de linhagens de uma única espécie com certas características patogênicas. A classificação do patótipo é baseada na manifestação clínica da doença, nos fatores de virulência (FVs) envolvidos e no histórico filogenético. Os patótipos de IPEC mais proeminentes são: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC), *E. coli* invasiva aderente (AIEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Em contrapartida, *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada à meningite (MNEC), *E. coli* associada à septicemia (SEPEC) e *E. coli* patogênica aviária (APEC) são os patótipos de ExPEC mais comuns (LEIMBACH; HACKER; DOBRINDT, 2013; ABE et al., 2008).

Além dessa superestrutura genômica, diversos estudos relataram e confirmaram a existência de uma subestrutura genética bem estabelecida entre as populações de *E. coli*, o que possibilitou sua distribuição em grupos filogenéticos que diferem entre si não apenas no que diz respeito às características fenotípicas, genotípicas e ecológicas, mas também em nichos, história evolutiva e capacidade de causar doença. Essa divisão de estirpes de *E. coli* em diferentes grupos filogenéticos não ocorre de maneira aleatória, de modo que a maioria das variantes comensais pertencem ao grupo filogenético A ou B1, enquanto as estirpes patogênicas extra intestinais, que possuem mais fatores de virulência que as comensais, pertencem ao grupo B2 ou D (CLERMONT et al., 2013).

2. *Escherichia coli* uropatogênica

Escherichia coli uropatogênica (UPEC) é o patótipo ExPEC, oportunista, mais comumente associado a doenças humanas, sendo responsáveis pelas infecções no trato urinário (ITU) adquiridas na comunidade e por uma grande parte das ITUs nosocomiais, mobilizando custos médicos elevados (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

Originalmente, *E. coli* classificadas como uropatogênicas eram linhagens comensais que diferiram das demais linhagens presentes na microbiota intestinal por abrigar genes específicos associados à virulência, transportados por uma variedade de ilhas de patogenicidade (PAIs), bacteriófagos, plasmídeos e/ou transposons, que lhes fornecem uma vantagem evolutiva importante em sua capacidade de causar doenças (MOBLEY; DONNENBER; HAGAN, 2009; AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012).

Em indivíduos saudáveis e sem anormalidades estruturais ou neurológicas no trato urinário, UPEC utiliza vários fatores de virulência e aptidão para entrar, aderir, adquirir nutrientes essenciais, multiplicar-se em um ambiente hostil, causar danos nos tecidos e se disseminar no trato urinário (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2017). Genes individuais ou grupo de genes que codificam um único fator de virulência completo, não são suficientes para fazer com que uma bactéria cause doença, mas, se adicionarmos conjuntos complementares de fatores de virulência a eles, juntos poderão promover a sobrevivência e o crescimento bacteriano dentro do trato urinário em face de uma forte resposta imune inata do hospedeiro. O mesmo não ocorre de maneira prioritária em indivíduos com anormalidades estruturais no trato urinário ou com cateter, onde micro-organismos com baixa patogenicidade podem causar infecção, fazendo com que as propriedades das bactérias descritas não sejam essenciais (AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012).

3. Infecções no trato urinário

O modelo de infecção ascendente desenvolvido no final da década de 1970 por Thomas Stamey continua sendo o paradigma fisiopatológico dominante para a fisiopatologia das ITUs (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). As ITUs são iniciadas quando uropatógenos, que habitualmente residem no intestino, contaminam e colonizam a área periuretral da mucosa vaginal, de onde conseguem avançar para a uretra. Em seguida, há um movimento migratório para bexiga, onde interações complexas entre hospedeiro-patógeno determinam se eles conseguirão colonizar essa região ou se serão eliminados pela micção (FLORES-MIRELES et al., 2015). Ao se estabelecerem na bexiga, os uropatógenos sobrevivem invadindo células de seu epitélio, produzindo toxinas e proteases que liberam nutrientes que ali estão armazenados e sintetizando sideróforos para obtenção de ferro. Ao se multiplicar e superar a vigilância imunológica do hospedeiro, UPEC pode ascender aos rins, sendo impulsionadas por flagelos através das camadas de urina e mucopolissacarídeo, de onde possuem uma maior probabilidade de atingir a corrente sanguínea desencadeando bacteremia e urosepse (Figura 1) (FLORES-MIRELES et al., 2015; AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012).

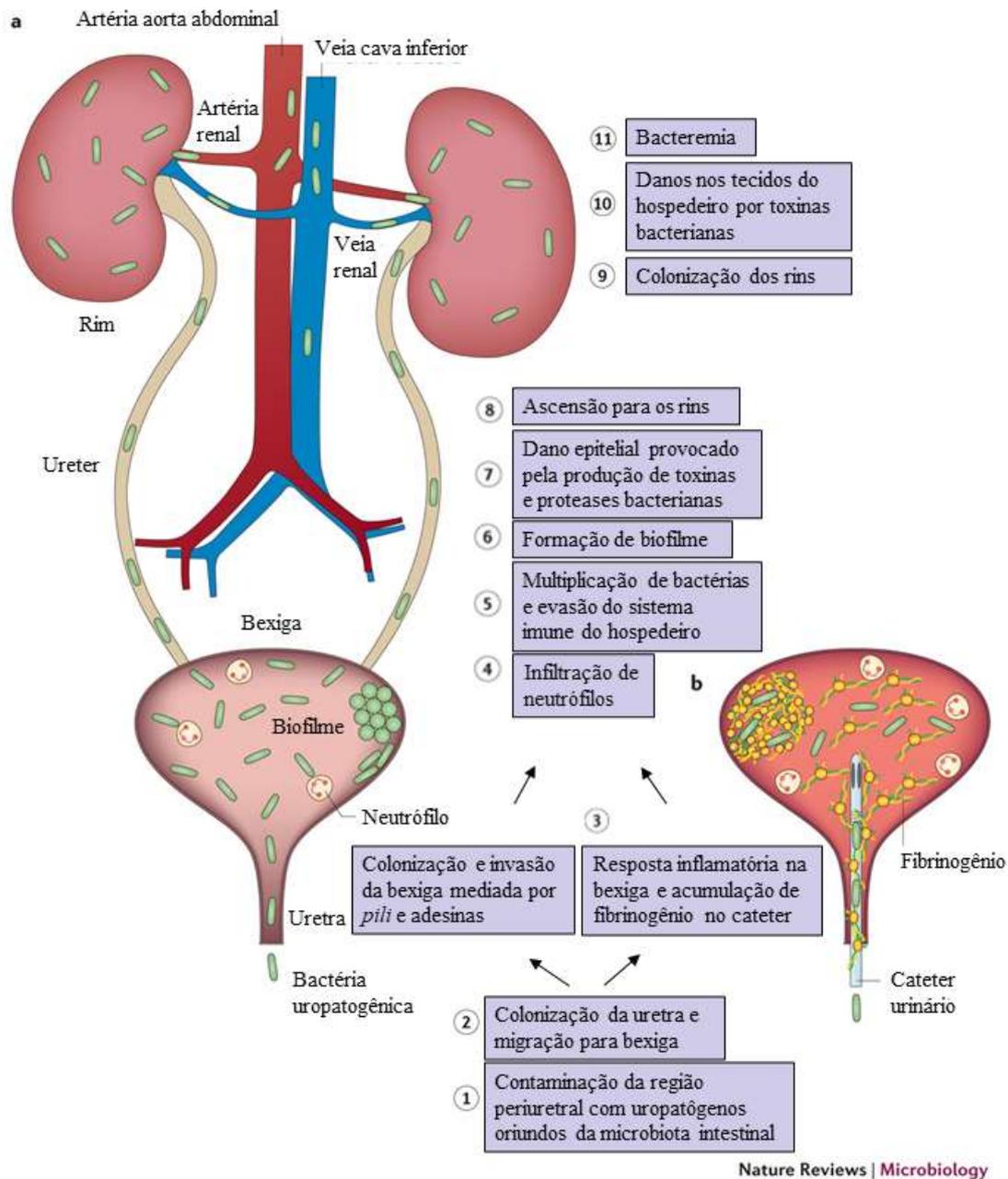


Figura 1 - Patogênese das infecções do trato urinário.

Fonte: FLORES-MIRELES et al., 2015

a. As infecções não complicadas do trato urinário (ITU) começam quando os uropatógenos que residem no intestino contaminam a área periuretral (etapa 1) e são capazes de colonizar a uretra. A migração subsequente para a bexiga (etapa 2) e a expressão de pili e adesinas resultam na colonização e invasão das células do uropélio (etapa 3). As respostas inflamatórias do hospedeiro, incluindo a infiltração de neutrófilos (etapa 4), começam a eliminar as bactérias extracelulares. Algumas bactérias evadem o sistema imunológico, seja pela invasão da célula hospedeira ou por alterações morfológicas que resultam em resistência aos neutrófilos. Essas bactérias sofrem multiplicação (etapa 5) e formação de biofilme

(etapa 6). Elas também produzem toxinas e proteases que induzem danos às células hospedeiras (etapa 7), liberando nutrientes essenciais que promovem a sobrevivência bacteriana e a ascensão aos rins (etapa 8). A colonização do rim (etapa 9) resulta na produção de toxina bacteriana e dano ao tecido do hospedeiro (etapa 10). Se não forem tratadas, as ITUs podem evoluir para bacteremia se o patógeno cruzar a barreira epitelial tubular nos rins (etapa 11). **b.** Os uropatógenos que causam ITUs complicadas seguem as mesmas etapas iniciais descritas para infecções não complicadas, incluindo colonização periuretral (etapa 1), progressão para a uretra e migração para a bexiga (etapa 2). No entanto, para que os patógenos causem infecção, a bexiga deve estar comprometida. A causa mais comum de uma bexiga comprometida é o cateterismo. Devido à robusta resposta imune induzida pelo cateterismo (etapa 3), o fibrinogênio se acumula no cateter, proporcionando um ambiente ideal para a fixação de uropatógenos que expressam proteínas de ligação ao fibrinogênio. A infecção induz a infiltração de neutrófilos (etapa 4), mas após sua ligação inicial aos cateteres revestidos de fibrinogênio, as bactérias se multiplicam (etapa 5), formam biofilmes (etapa 6), promovem danos epiteliais (etapa 7) e podem semear infecção dos rins (etapas 8 e 9), onde a produção de toxina induz dano tecidual (etapa 10). Se não forem tratados, os uropatógenos que causam ITUs complicadas também podem progredir para bacteremia cruzando a barreira de células epiteliais tubulares (etapa 11).

4. Fatores de virulência

Ao longo de sua história evolutiva, UPECs, através de eventos mutacionais e transferência horizontal de material genético entre bactérias, adquiriram e mantiveram estratégias que lhes permitem ter sucesso na invasão e colonização de seu hospedeiro, evitando sua detecção e eliminação pelo sistema de defesa, além de driblarem sua eliminação por meio do uso de antibióticos (VIEIRA, 2009; TOTSIKA et al., 2012; NIKAIDO, 2009).

A virulência bacteriana para o trato urinário é multifatorial, de modo que, além de ser diretamente influenciada por mecanismos genéticos, a expressão dos diferentes fatores de virulência que atuam em conjunto também pode ser modulada por sinais ambientais, incluindo disponibilidade nutricional e resposta do hospedeiro (WULLT et al., 2022). Fatores de virulência como flagelos, adesinas, sistema de aquisição de ferro (sideróforos), toxinas, formação de cápsulas e biofilmes, síntese de enzimas que inativam drogas, alterações mutacionais em proteínas alvo e bombas de efluxo de fármacos, são exemplos frequentemente encontrados de tais estratégias (Figura 2) (TOTSIKA et al., 2012; NIKAIDO, 2009).

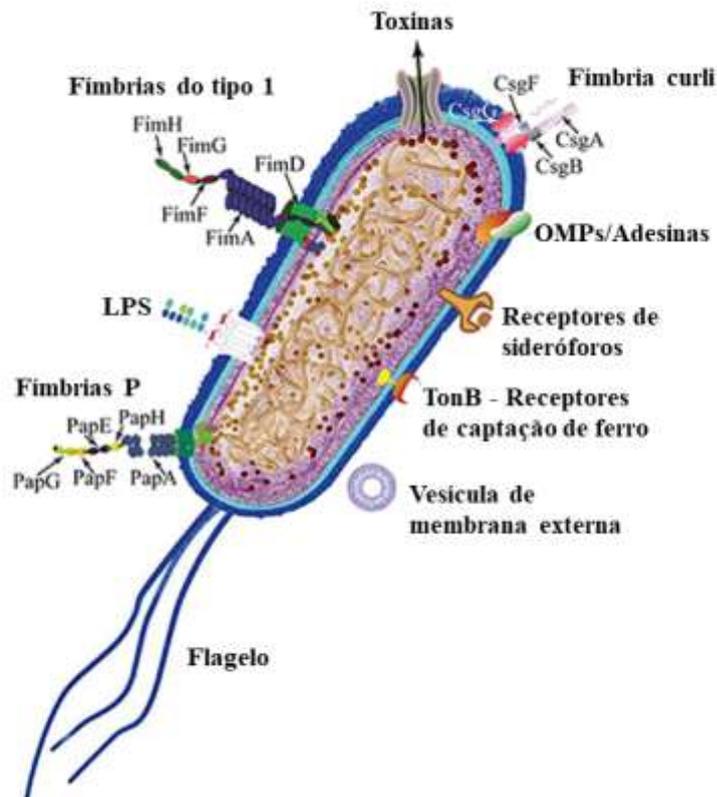


Figura 2 - Representação dos principais fatores de virulência associados à *Escherichia coli*.

Fonte: TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017

4.1. Adesinas

A colonização e a persistência de UPECs no trato urinário humano, estão diretamente associadas à sua capacidade de aderir ao uroepitélio, superando o efeito de lavagem do fluxo urinário. A adesão bacteriana é o evento chave, responsável por dar início a cada uma das etapas envolvidas na patogênese das ITUs. Essa adesão é baseada no reconhecimento entre os componentes da superfície bacteriana e os receptores específicos nos tecidos do hospedeiro. Em bactérias Gram-negativas como *E. coli*, apêndices filamentosos de superfície conhecidos como fímbrias, geralmente funcionam como organelas de adesão (Figura 2) (WESTERLUND et al., 1993).

Abundantemente encontrada entre as principais estratégias que lhe conferem patogenicidade, o grande repertório de sistemas de fímbrias fornece múltiplas especificidades de ligação e capacidade de colonizar vários locais ao longo do trato urinário às estirpes de UPECs (AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012). As múltiplas adesinas bacterianas que constituem os sistemas de fímbrias, reconhecem receptores ao longo do uroepitélio e medeiam a colonização. Dentre elas, destacam-se as fímbrias sensíveis à manose ou fímbrias tipo 1, que são associadas à cistite, sepse e meningite, e as fímbrias P, que são associadas à pielonefrite e urosepse (Figura 2) (FLORES-MIRELES et al., 2015; YOSIEF; WEISS; IYER, 2013).

4.1.1. Fímbria tipo 1

Em UPECs, as fímbrias sensíveis à manose, que também são conhecidas como fímbrias tipo 1, possibilitam a invasão da célula hospedeira, aumento na colonização, formação de biofilme, entre outros (PAK et al., 2001; TOTSIKA et al., 2012).

A produção de fímbrias tipo 1 requer oito genes localizados dentro do operon *fim*, que é controlado por um promotor invertível (*fimS*) e variação de fase (Figura 3). Os genes *fimA*, *fimF*, *fimG* e *fimH* codificam os quatro componentes proteicos das fímbrias tipo 1, com um polímero FimA formando a haste helicoidal e um único domínio FimH estrategicamente localizado na ponta distal de cada fímbrias (Figura 2 e 3) (KNIGHT; BOUCKAERT, 2009). A proteína FimH é ligada à haste através de cópias únicas de FimG e FimF, formando uma fibra de ponta curta e atarracada que medeia a ligação da bactéria aos resíduos de manose dos receptores presentes nas uroplaquinhas das células epiteliais da bexiga e do trato urinário inferior (Figura 2) (KNIGHT; BOUCKAERT, 2009; TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017; PAK et al., 2001). A montagem das fímbrias tipo 1 é mediada pela chaperona periplasmática FimC, juntamente com uma proteína de membrana externa formadora de poros (*usher*) conhecidas como OM FimD (Figura 2). Os genes *fimB* e *fimE* codificam recombinases sítio-específicas, que reconhecem as repetições invertidas de nove pares de base e flanqueiam o interruptor *fim* controlando a expressão de fímbrias tipo 1 (Figura 3) (KNIGHT; BOUCKAERT, 2009).

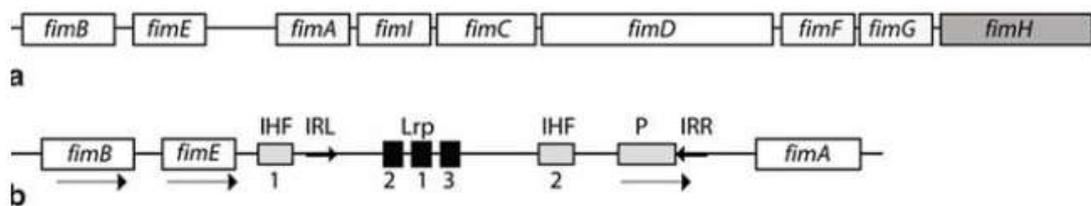


Figura 3 - Operon *fim*

Fonte: KNIGHT; BOUCKAERT, 2009.

a. Operon *fim*; **b.** Desenho esquemático de um locus *fim* com o interruptor *fim* na orientação ON e genes de recombinase. A direção da transcrição dos genes é mostrada (setas). Lrp é uma proteína reguladora que responde à leucina; IHF é um fator de integração do hospedeiro; IRL, é uma repetição invertida à esquerda; IRR, é uma repetição invertida à direita e P é o promotor de *fimA*.

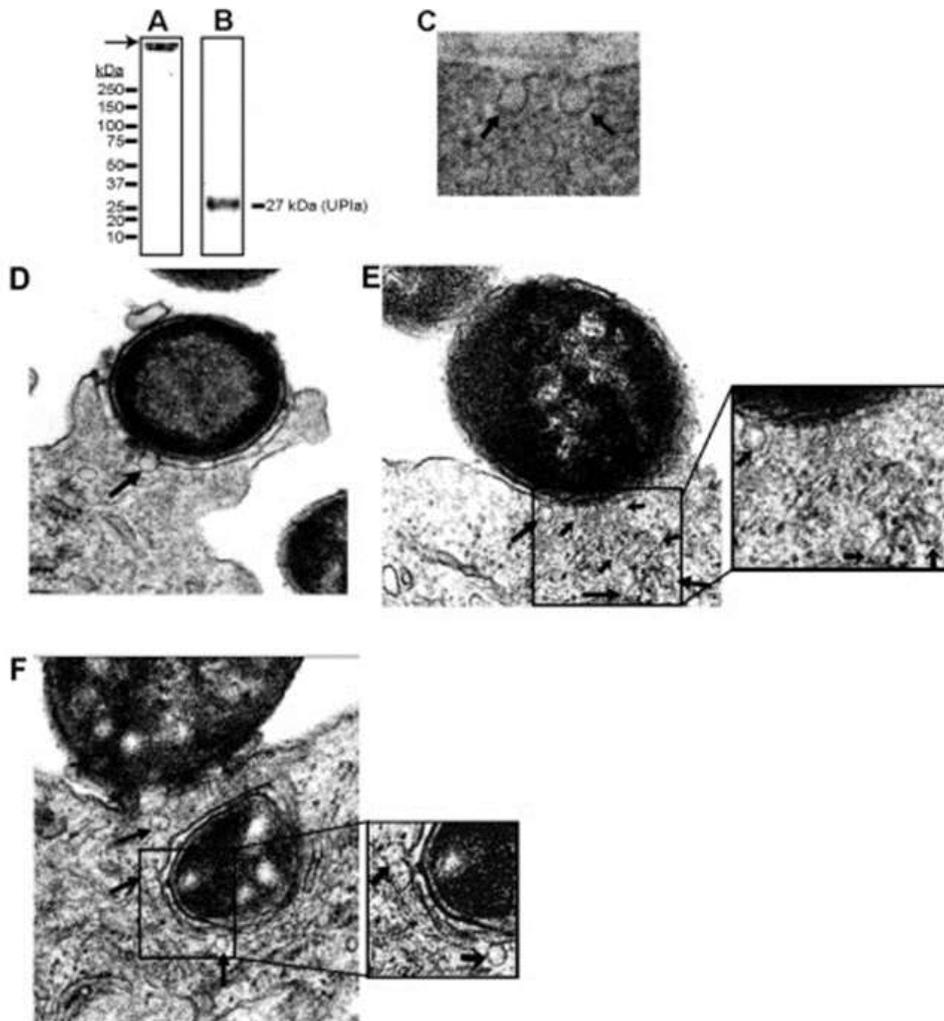
O urotélio é o tecido de revestimento do trato urinário que, além de ser altamente especializado, é coberto quase completamente por uroplaquinas. As uroplaquinas são glicoproteínas manosiladas encontradas na superfície das células uroepiteliais do epitélio da bexiga e do trato urinário inferior, que atuam como receptores para FimH no trato urinário inferior (UPIa e UPIb). As uroplaquinas UPIa e UPIb são proteínas integrais de membrana que, juntamente com UPII e UPIII, formam complexos em forma de anel com uma cavidade central de 3,7nm de largura na camada celular superficial altamente diferenciada da bexiga. A microscopia eletrônica de FimH adicionada a membranas unitárias assimétricas da bexiga forneceu evidências de que FimH se liga aos seis subdomínios internos das partículas de uroplaquinas de 16nm, nos locais onde a UPIa está localizada, com especificidade esteroquímica. Sob congelamento rápido, a microscopia eletrônica de gravação profunda demonstrou que as fímbrias tipo 1 parecem estar pelo menos parcialmente enterradas na região central dos complexos de uroplaquinas. Isso sugere que as cadeias de alta manose na UPIa estão expostas na superfície da cavidade central dos complexos de uroplaquinas, e que a ligação é acompanhada pela inserção parcial do fibrilo da ponta na cavidade. A interação de FimH com resíduos de manose expostos terminalmente em UPIa pode levar a grave consequência para as células hospedeira alvo, incluindo absorção e internalização bacteriana (KNIGHT; BOUCKAERT, 2009).

A ligação das fímbrias tipo 1 às uroplaquinas e as integrinas $\alpha_3\beta_1$, desencadeia uma cascata de transdução de sinal que promove a internalização do

patógeno por endocitose via cavéolas (DUNCAN et al., 2004; PELKMANS; HELENIUS, 2002). As cavéolas são estruturas dinâmicas, que podem ter várias morfologias e diferentes composições (THOMAS; SMART, 2008). Em cultura de células de tecido epitelial, as cavéolas geralmente aparecem como invaginações arredondadas da membrana plasmática, com 50 a 80nm de diâmetros, revestidas pela proteína caveolina-1, abertas ao meio extracelular e ligadas à actina cortical do citoesqueleto celular (Figura 4C). No urotélio, as cavéolas são um subtipo de microdomínios lipídicos conhecidos como jangadas ou balsas lipídicas. Elas são compostas por uma grande quantidade ordenada de lipídeos especializados (glicolipídios, esfingolipídios, colesterol, glicosilfosfatidilinositol, entre outros), com uma capacidade endocítica versátil e envolvimento direto em cascatas de transdução de sinais (DUNCAN et al., 2004).

Ao aprofundar os estudos a respeito do papel das jangadas lipídicas na invasão que UPECs realizam em células do uroepitélio, DUNCAN et al. (2004) observaram que, além de estabelecer interações entre FimH e uroplaquinas, UPECs também interagem com as caveolinas-1 adjacentes dando início à endocitose mediada por cavéolas, que é um processo independente de clatrina dependente de dinamina. Para invadir as células do epitélio da bexiga humana, diferentes interações com receptores de membrana extracelular ativam moléculas sinalizadoras membros da família Rho de GTPases, diretamente associadas às caveolinas-1: RhoA (fímbrias tipo 1 interagindo com uroplaquinas) ou Rac 1 (fímbrias tipo 1 interagindo com integrinas $\alpha_3\beta_1$) (NETHE et al., 2010). Por meio da polimerização dos filamentos de actina periféricos que fazem parte do citoesqueleto das células eucarióticas, RhoA ou Rac 1 promovem o seu rearranjo em forma de lamelipódio (projeção dos filamentos de actina), internalizando UPEC por um mecanismo de zíper, que consiste em uma bainha de membrana citoplasmática envolvendo a bactéria (Figura 4D) (FLORES-MIRELES et al., 2015; ALBERTS et al., 2010).

Figura 4 - Estágios iniciais da invasão de uma célula epitelial da bexiga humana 5637 (BEC 5637) por uma estirpe de UPEC



Fonte: DUNCAN, 2004.

A) *Western blot* específico da uroplaquinas UPIa de um lisado de células BEC 5637 humanas, que sofreu um processo de agregação devido à fervura, impossibilitando a visualização da banda que representava a uroplaquinas UPIa (~27kDa); **B)** *Western blot* específico da uroplaquinas UPIa de um lisado de células BEC 5637 humanas preparado em temperatura ambiente. Nele, é possível visualizar a banda que representa as proteínas de interesse (~27kDa), comprovando que de fato está acontecendo uma ligação entre as uroplaquinas e as fímbrias tipo 1; **C)** Micrografia eletrônica de transmissão mostrando cavéolas na superfície basolateral células BEC 5637 humanas (setas em preto); **D)** Micrografia eletrônica de transmissão onde é possível visualizar uma UPEC [*E. coli* ORN103 (pSH2)] aderida às caveolinas presentes na superfície das células BEC 5637 humanas (setas em preto); **E)** Micrografia eletrônica de

transmissão onde é possível visualizar a UPEC [*E. coli* ORN103 (pSH2)] aderida às caveolinas presentes na superfície das células BEC 5637 humanas, induzindo a formação de mais cavéolas e o rearranjo dos filamentos de actina do citoesqueleto celular, para favorecer ainda mais o processo de internalização que acabara de ser iniciado (Setas em preto); **F**) Micrografia eletrônica de transmissão onde é possível visualizar uma UPEC [*E. coli* ORN103 (pSH2)] aderida às caveolinas presentes na superfície das células BEC 5637 humanas e essa mesma UPEC em outro estado da infecção: já internalizada (Setas em preto).

4.1.2. Formação de biofilme

A colonização e translocação bacteriana ao longo do trato urinário mediante expressão de fatores de virulência como flagelos e fímbrias tipo 1 permite que UPEC conquiste o ambiente estéril estabelecido ao longo de todo o trato urinário, avançando com a infecção. Além de mediar a adesão inicial às células guarda-chuvas superficiais do urepitélio da bexiga do hospedeiro facilitando a invasão, as fímbrias tipo 1 promovem as interações necessárias para o início da formação e do desenvolvimento do biofilme.

Um biofilme é definido como um agregado de micro-organismos que vivem juntos, como uma comunidade, aderido à superfície e envolto por uma matriz polimérica, extracelular e adesiva, excretada pelas células que o constituem (SHARMA et al., 2016; MADIGAN et al., 2016). Durante a fase inicial do desenvolvimento do biofilme, a síntese dos flagelos é reprimida e a produção de fímbrias tipo 1 e *curli* é potencializada em resposta a estímulos ambientais (sinal associado ao contato com uma superfície, disponibilidade nutricional, pH, temperatura, entre outros), que desencadeiam um aumento na concentração do segundo mensageiro intracelular c-di-GMP, fazendo com que a bactéria abandone seu estilo de vida planctônico, migratório, e adote estilo de vida sésil, aderido ao uroepitélio da bexiga (TOLKER-NIELSEN, 2015; SHARMA et al., 2016).

Uma vez aderidas, tem-se início o processo de crescimento celular, que permite a formação de microcolônias. Proteínas autotransportadoras promovem a adesão célula a célula necessária para facilitar a auto agregação e a síntese de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que fornecem uma estrutura tridimensional ao biofilme. Essa estrutura é ideal para otimizar o sistema de

comunicação química conhecido como *quórum sensing*, para fixar as bactéria à superfície, otimizar as interações célula-célula, formar canais e pilares que permitem a troca de nutrientes e resíduos, e proteger as micro-organismos que ali estão retidos de inúmeras condições deletérias, incluindo dessecação, ataque do sistema imunológico do hospedeiro e ação de antimicrobianos, tenham eles uma origem natural ou não (JACKSON; SIMECKA; ROMEO, 2002; SHARMA et al., 2016).

À medida que cresce por meio do processo de divisão celular fora de seu hábitat natural, que em humanos é no intestino, UPEC desenvolve e, em alguns casos, secreta diferentes metabólitos e estruturas celulares que são prontamente reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os fragmentos de peptídeoglicanos oriundos do processo contínuo de remodelação de sua parede celular (BILLIPS; SCHAEFFER; KLUMPP, 2008).

Os receptores de reconhecimento de padrão são estruturas responsáveis por detectar componentes bacterianos evolutivamente conservados conhecidos como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e por desencadear respostas antimicrobianas que envolve a secreção de citocinas pró inflamatórias e o recrutamento de neutrófilos (BILLIPS; SCHAEFFER; KLUMPP, 2008). Os receptores do tipo Toll-like (TLRs) foram os primeiros receptores de reconhecimento de PAMPs e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) identificados no sistema imune inato de humanos (MIGUEL, 2019). Os TLRs são um modelo de glicoproteínas integrais de membrana do tipo 1, presentes na face externa da membrana citoplasmática de células eucarióticas (células do sistema imune, fibroblastos, células epiteliais, entre outras), dentro do retículo endoplasmático e na face interna das membranas do endossomo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MIGUEL, 2019). Do ponto de vista da infecção, os TLRs são responsáveis pelo reconhecimento precoce de lipopeptídios bacterianos (TLR1 e TLR2), peptídeoglicanos bacterianos (TLR2), lipopolissacarídeo (TLR4), flagelina bacteriana (TLR5) e lipopolipeptídios bacterianos (TLR2 e TLR6), com ajuda de moléculas acessórias, e dar início as cascatas de sinalização que induzem as respostas imunes (Figura 6) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

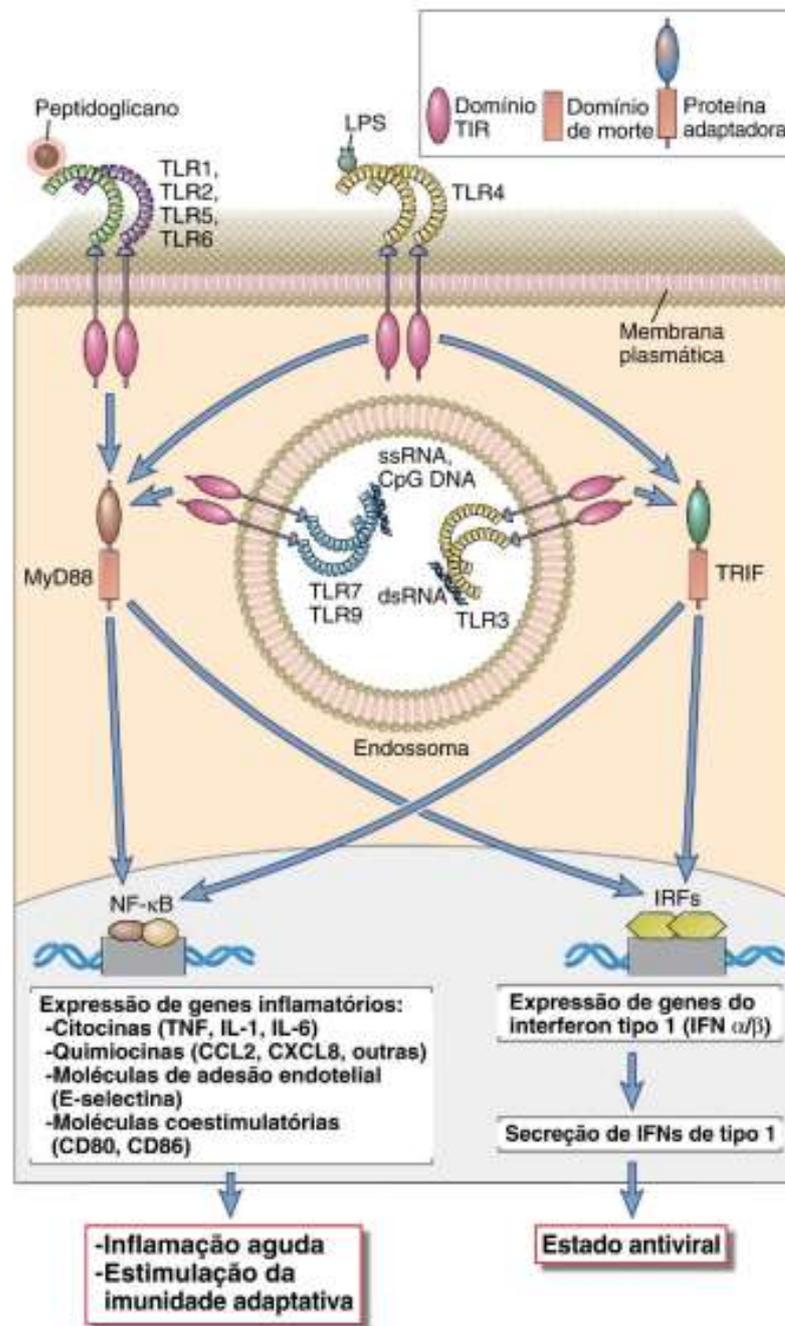


Figura 5 - Vias de sinalização e função dos TLRs.

Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015

Os TLRs 1, 2, 5 e 6 utilizam a proteína adaptadora MyD88 e ativam os fatores de transcrição NF-κB e AP-1 iniciando o recrutamento de neutrófilos, inflamação aguda e estimulação da imunidade adaptativa. O TLR 3 utiliza a proteína adaptadora TRIF e ativa os fatores de transcrição IRF3 e IRF7 desencadeando respostas antivirais. O TLR4 pode ativar ambas as vias. Os TLRs 7 e 9 presentes no endossomo utilizam MyD88 e ativam NF-κB e IRF7

As células epiteliais que revestem o trato urinário são a primeira linha de defesa às UPECs. Em resposta à infecção bacteriana, as células epiteliais da bexiga, as células α intercaladas e várias células residentes e recrutadas do sistema imune inato, funcionam como fonte inicial de peptídeos antimicrobianos e citocinas pró-inflamatórias no trato urinário (ABRAHAM; MIAO, 2015). Responsáveis por fornecerem a defesa inicial contra patógenos extracelulares, os peptídeos antimicrobianos que fazem parte da imunidade humoral inata e são solúveis no sangue e nos fluidos extracelulares (as pentraxinas, colectinas e ficolinas, por exemplo), opsonizam o micro-organismo de modo a otimizar a capacidade fagocitária dos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, além de recrutar mais fagócitos para o local da infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

As citocinas (fator de necrose tumoral, IL-1, IL-6 e IL-8) e as quimiocinas (CCL2 e CXCL8) são, frequentemente, as primeiras proteínas a serem secretadas na urina após a infecção e são importantes para o recrutamento de fagócitos para a bexiga ou tecido renal infectado. Após a infecção e o reconhecimento de PAMPs e DAMPs, uma população substancial de macrófagos que reside na submucosa do trato urinário (LY6C⁻) começam a secretar o ligante 1 de quimiocina CXC (CXCL1) para recrutar neutrófilos e ligantes 2 de quimiocinas CC (CCL2) para recrutar macrófagos LY6C⁺ (ABRAHAM; MIAO, 2015).

Os neutrófilos são as primeiras células imunes a serem recrutadas para a bexiga após infecções no trato urinário e têm papel predominante na eliminação bacteriana. Eles respondem ao ligante 1 da quimiocina CXC (CXCL1) e outros quimioatraentes produzidos por células epiteliais superficiais da bexiga, macrófagos e mastócitos residentes após ativação dos receptores de reconhecimento de padrões por vários produtos bacterianos. Ao extravasar e atingir a região epitelial, os neutrófilos recrutados necessitam da sinalização do fator de necrose tumoral local, cuja concentração foi aumentada graças à ação dos macrófagos LY6C⁺, para conseguir atravessar a membrana basal do epitélio e combater a infecção (ABRAHAM; MIAO, 2015).

Devido à barreira física imposta pela matriz extracelular que constitui o biofilme, o ataque de neutrófilos e macrófagos, as células que ali estão inseridas serão incapazes de erradicá-las completamente. A fagocitose ineficaz resultante deste processo implicará na liberação crônica de substâncias citotóxicas e proteolíticas pelo

hospedeiro, incluindo mais citocinas pró-inflamatórias, que contribuirão para um aumento no dano tecidual nos tecidos que circundam o biofilme formado, agravando a infecção. Além de desempenhar um papel importante na resistência a resposta imune inata promovida pelo hospedeiro, o biofilme confere resistência aos antimicrobianos em virtude de sua constituição, disposição e agregação diferenciada, impedindo a difusão e penetração do fármaco para o interior do biofilme (LOCK, 2015).

Resistência aos antimicrobianos

Nos últimos 20 anos, a resistência antimicrobiana emergiu rapidamente em escala global, espalhando-se de um país para o outro mais rapidamente do que se pensava (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020). Em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a resistência antimicrobiana como uma das 10 principais ameaças globais à saúde pública, despertando-nos para necessidade de melhorar a compreensão dos fatores críticos envolvidos na persistência e disseminação da resistência antimicrobiana, com o objetivo de ter perspectivas inovadoras sobre o desenvolvimento de estratégias antimicrobianas capazes de contornar o desenvolvimento constante de resistência (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al, 2022; CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

A resistência aos fármacos antimicrobianos e antivirais ocorre quando bactérias, vírus, fungos e parasitas adquirem a capacidade de contornar os mecanismos que uma ampla variedade de drogas usa contra eles, tornando as infecções cada vez mais difíceis ou impossíveis de tratar. O uso indevido e excessivo de antimicrobianos não apenas no ambiente clínico, mas também na agricultura, aquicultura, pecuária, medicina veterinária e controle de pragas, são os principais fatores que contribuem para o surgimento de patógenos resistentes a medicamentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al, 2022; CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

A resistência bacteriana aos antibióticos é o resultado da destruição ou modificação do antibiótico (produção, secreção e atuação de enzimas conhecidas como β -lactamases, por exemplo), alterações no alvo (substituições do alvo, mutações no local alvo, alterações enzimáticas no local alvo, proteção do local alvo, superprodução

do alvo ou desvio do alvo, por exemplo) e acúmulo reduzido de antibiótico, devido à redução da permeabilidade e/ou aumento do efluxo. Ela pode ser de natureza intrínseca (consequência direta ou indireta de propriedades inerentes a bactéria), adquirida (exibida quando uma bactéria previamente sensível adquire um mecanismo de resistência graças à uma mutação ou à aquisição de materiais genéticos por transferência horizontal de genes) ou adaptativa (resistência transitória a um ou mais antibióticos induzida por um sinal ambiental específico como estresse, estado de crescimento, pH, concentrações de íons, condições nutricionais, níveis sub-inibitórios de antibióticos, entre outros) (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Em relação aos perfis de resistências aos antimicrobianos encontrados em bactérias resistentes associadas à saúde pública, um grupo de especialistas internacionais se reuniu, por meio de uma iniciativa conjunta do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) e dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), e propôs três categorias antimicrobianas distintas para os testes de sensibilidades: MDR (foi definida como não suscetibilidade adquirida a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos), XDR (não suscetibilidade a pelo menos um agente em todas, exceto duas ou menos categorias de antimicrobianos, ou seja, isolados bacterianos permanecem suscetíveis a apenas uma ou duas categorias) e PDR (não suscetibilidade a todos os agentes em todas as categorias de antimicrobianos) (MAGIORAKOS et al., 2012).

A resistência antimicrobiana é uma das mais importantes ameaças à saúde global. Em 2019, a Organização Mundial de Saúde identificou 32 antibióticos em desenvolvimento clínico que atendem à sua lista de patógenos prioritários. Destes, apenas seis foram classificados como inovadores (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al, 2022). Além disso, novos antimicrobianos apresentam eficácia reduzida devido à capacidade de adaptação rápida dos micro-organismos. Portanto, novas estratégias são, sem dúvida, necessárias na luta contra a resistência antimicrobiana estabelecida e emergente (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

4.1.4 Sistema de aquisição de ferro (aerobactina)

Para que um micro-organismo tenha sucesso no processo de colonização e de crescimento populacional, é essencial que ele obtenha todos os nutrientes necessários através de seu hospedeiro, incluindo carbono orgânico, nitrogênio, oxigênio, íons metálicos, entre outros (RATLEDGE, 2007).

Em UPECs, as necessidades nutricionais para íons metálicos podem mudar de acordo com o ambiente em que a bactéria está. Os íons metálicos são cofatores críticos para cerca de 40% das enzimas com estruturas conhecidas. A análise de um subconjunto representativo de metaloenzimas bem conhecidas sugere que cofatores de metal catalisam a química redox para aproximadamente um terço das metaloenzimas, incluindo aquelas que são necessárias para as cadeias de transporte de elétrons durante a aerobiose e as que atuam na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio que ocorre especialmente durante a explosão respiratória de células fagocíticas durante infecções ativas, ajudando *E. coli* a tolerar o estresse oxidativo (superóxido dismutases, redutases, peroxidases e catalases, por exemplo). Quando os metais não estão envolvidos com catálise redox, eles podem ser utilizados para ativar um reagente, estabilizar um intermediário ou contribuir para a estrutura geral da proteína (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018).

Os patógenos podem adquirir todos os nutrientes de que necessitam do tecido do hospedeiro, exceto um, que é o ferro (RATLEDGE, 2007). Em condições ricas em oxigênio, o ferro ferroso solúvel (Fe^{2+}), que outrora fora encontrado abundantemente disponível graças a uma atmosfera pobre em oxigênio, foi oxidado a ferro férrico insolúvel (Fe^{3+}), que formam complexos estáveis com várias biomoléculas, reduzindo dramaticamente sua concentração e biodisponibilidade (WILSON et al., 2016).

Nos hospedeiros humanos, o ferro existe predominantemente como íons complexados com heme, proteínas, ou em complexos inespecíficos. A maioria das moléculas de heme existe dentro de complexos proteicos intracelulares, como hemoglobina, mioglobina e citocromos. A toxicidade associada aos íons de ferro livres, excedentes, é amplamente controlada pelo hospedeiro através do sequestro realizado por proteínas. Uma fração substancial do ferro não heme é ligada à ferritina intracelular. O ferro ligado à ferritina é mobilizado para a transferrina, uma proteína extracelular de ligação ao ferro, que pode ligar dois íons férricos para formar a forma circulante, não tóxica, predominante de ferro. Graças a esses e outros controles fisiológicos rigorosos

que asseguram que as células do hospedeiro tenham a quantidade de ferro necessária para garantir sua manutenção e sobrevivência, o teor de ferro da urina humana normalmente é muito baixo (aproximadamente 0,1µmol por litro), mesmo no estado não infectado, na ausência de estímulos inflamatórios. Para lidar com esses desafios, os micro-organismos submetidos a tal pressão seletiva adquiriram e estabeleceram, evolutivamente, sistemas de aquisição de ferro conhecidos como sideróforos (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018).

Sideróforos são moléculas quelantes de ferro férrico insolúvel (Fe^{3+}), de baixo peso molecular (< 1.000Da), produzidas em resposta à privação de ferro, que é um dos mecanismos primários de defesa do hospedeiro contra infecções. Como agentes quelantes, os sideróforos geralmente possuem poderes de ligação de ferro mais fortes do que as biomoléculas do hospedeiro que contém ferro, tornando-se aptos a sequestrá-lo (RATLEDGE, 2007). Embora novos sistemas putativos de aquisição de metais ainda estejam sendo descobertos em UPECs, a enterobactina e aerobactina são os mais estudados.

Aerobactina é um sideróforo do tipo hidroxamato, que tem uma baixa afinidade pelo ferro quando comparado a enterobactina. Codificada pelo operon *iucABCD* associado ao gene *iutA* (receptor de aerobactina férrica associado a membrana externa de bactérias Gram-negativas), a aerobactina possui uma hidrofobicidade menor e uma ausência de caráter aromático em relação à enterobactina, o que lhe fornece uma capacidade superior de sequestrar ferro da transferrina na presença da ação antibacteriana do soro, sendo de extrema importância para patogênese das infecções no trato urinário causadas por UPECs (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018).

4.1.5 Resistência ao soro

Está bem estabelecido que o soro humano normal possui atividade bactericida contra bactérias Gram-negativas. Sabe-se que anticorpos bactericidas e pelo menos alguns dos componentes do sistema complemento interagem com estruturas na membrana externa da célula bacteriana, montando uma importante linha de defesa do

hospedeiro contra infecções bacterianas (TAYLOR, 1976). Como consequência, a resistência à morte do soro é considerada uma importante propriedade de virulência das bactérias invasivas (NEMETH; MUCKLE, 1991).

A destruição bacteriana envolve o sistema complemento e a produção local de IgA da mucosa, direcionados contra a superfície bacteriana. Resposta imune sérica, específica e adquirida, é mediada por IgM e IgG e os anticorpos urinários (IgA secretora, IgM e IgG séricos) se ligam a estruturas bacterianas, como fímbrias e os antígenos O e K bacterianos, de modo a facilitar sua eliminação através do sistema complemento (CARRARO-EDUARDO; GAVA, 2012).

A resistência ao soro tem sido atribuída a vários fatores: lipopolissacarídeo, antígeno capsular K1 e a presença de proteínas de membrana externa codificadas por plasmídeo, como as proteínas TraT e iss. A proteína TraT é a principal proteína de membrana externa (peso molecular de 25kDa) encontrada em alto número de cópias na superfície da célula bacteriana. Acredita-se que essa proteína interfira na opsonização pela via alternativa do complemento, restringindo e alterando o padrão de deposição de C3 na membrana bacteriana, inibindo a fagocitose (NEMETH; MUCKLE, 1991).

A proteína TraT é codificada pelo gene *traT*, que é transportado no plasmídeo de resistência a antibióticos F e F-lile (R). Alguns estudos demonstraram que o antígeno capsular K1 está associado ao gene *traT* e acredita-se que esses dois fatores atuem juntos para proteger a *E. coli* da morte por soro. No entanto, a base de sua associação não é conhecida (NEMETH; MUCKLE, 1991).

5. Metabolismo

A capacidade que UPECs têm de sobreviver no trato urinário depende tanto de sua fisiologia e metabolismo quanto de seus determinantes de virulência (ALTERI; MOBLEY, 2015). A aptidão para invadir e colonizar diferentes locais do hospedeiro tem origem na natureza dinâmica de seu genoma, que apresenta uma grande flexibilidade para regular a expressão de proteínas necessárias à adaptação de seu metabolismo em um determinado ambiente, incluindo microambientes específicos em um mesmo hospedeiro, refletindo a composição nutricional de cada nicho, a competição

interbacteriana por fontes de carbono e energia, além da sobrevivência frente aos mecanismos de defesas contra os agentes bactericidas (PETTERSEN et al., 2016; ALTERI; MOBLEY, 2015).

O modelo de infecção ascendente requer que UPEC ocupe e atravesse com sucesso uma ampla variedade de microambientes hospedeiros (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). No intestino humano rico em fontes de carbono e outros nutrientes, o oxigênio pode ser baixo e a *E. coli* geralmente existe junto de um microbioma diversificado (ALTERI; MOBLEY, 2015). Após deixar a mucosa intestinal e iniciar a colonização do trato urinário, *E. coli* encontra diferenças significativas nas condições nutricionais, no microbioma, na superfície mucosa e nos níveis de oxigenação (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). Os ambientes luminiais do trato urinário consistem em urina e uma camada mucosa exposta à urina, sobrepondo populações de células epiteliais mais especializadas. Os componentes urinários desses ambientes apresentam variações substanciais de composição de íons, metabólitos, proteínas e células. Com a invasão tecidual, *E. coli* atinge espaços intersticiais e até mesmo sítios intracelulares, onde ocupam vesículas semelhantes a lisossomos ou formam comunidades bacterianas intracelulares semelhantes a biofilmes em células epiteliais. Células fagocíticas residentes e recrutadas, como neutrófilos e macrófagos, criam microambientes especializados adicionais, como fagolisossomos, que provavelmente são relevantes para infecção no trato urinário (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018).

A urina produzida por mamíferos é um biofluido translúcido e estéril formado nos rins, temporariamente armazenado na bexiga e excretado através da uretra pelo processo de micção. Em pessoas saudáveis, a urina possui uma quantidade elevada de metabólitos, tais como ureia (metabolismo de aminoácidos), creatinina (da creatinina muscular), ácido úrico (metabolismo dos ácidos nucleicos), produtos finais da degradação da hemoglobina (bilirrubina e urobilina) e metabólitos de vários hormônios, além das toxinas solúveis em água e outras substâncias estranhas ingeridas (pesticidas, fármacos e aditivos alimentícios, por exemplo) (BOUATRA et al., 2013). Concentrações relativamente menores de eletrólitos e osmólitos, dentro os quais destacam-se o sódio (Na^+), cloreto (Cl^-), potássio (K^+), amônio (NH_4^+), sulfato (SO_4^-), fosfato (PO_4^-), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), também são encontradas. Em quadros infecciosos, o crescimento do micro-organismo na urina imita o crescimento no

microambiente da bexiga e como as cepas de UPEC crescem rapidamente na urina, supõe-se que várias fontes de energia, carbono, nitrogênio, fosfato e enxofre como carboidratos, aminoácidos (livres e em peptídeos), nucleobases e ácidos graxos, estejam prontamente disponíveis (ALTERI; MOBLEY, 2015; REITZER; ZIMMERN, 2019).

A análise de um banco de dados do metaboloma da urina humana realizada por REITZER; ZIMMERN (2019) revelou que a concentração de aminoácidos livres é estimada entre 3 e 4 mM, e o total combinado de aminoácidos disponíveis com aqueles associados em peptídeos é estimado entre 5 e 7 mM. *E. coli* só possui vias metabólicas capazes de degradar metade desses aminoácidos, de modo que a concentração utilizável cai para cerca de 2 mM. Aproximadamente 90% dos aminoácidos utilizáveis, contém três carbonos, o que significa que a urina contém cerca de 6 mM de átomos de carbono disponíveis para geração de energia a partir do metabolismo de aminoácidos. Em contrapartida, a união dos numerosos carboidratos presentes em baixas concentrações na urina humana, junto com a diversidade de vias metabólicas aeróbicas e anaeróbicas capazes de degradar tal categoria de compostos orgânicos que *E. coli* tem, assegura uma concentração de carboidratos utilizáveis substancialmente maior que a dos aminoácidos (a concentração de carboidratos livres é de pelo menos 4,3 mM, e a soma dos átomos de carbono de carboidratos é de cerca de 25 mM). Desse modo, apesar de diferentes estudos sugerirem que UPEC utiliza os aminoácidos como fonte de carbono primária durante infecções no trato urinário, graças a sua capacidade de importar aminoácidos e pequenos peptídeos encontrados na urina de maneira ativa e essencial (perda de função em enzimas associadas ao metabolismo de aminoácidos ou de proteínas de transporte de tais compostos gerou impacto negativo direto na aptidão de tais bactérias), junto com a observação de que a perda completa de diferentes enzimas associadas a glicólise e outras vias diretamente associadas a ela (ramo oxidativo da via das pentoses fosfato e a via Entner-Doudoroff) não causou prejuízos a aptidão, a contribuição do catabolismo de carboidratos para o metabolismo energético e a virulência durante as infecções no trato urinário não deve ser subvalorizada ou descartada (ALTERI; MOBLEY, 2015; CHAN; LEWIS, 2022 e REITZER; ZIMMERN, 2019).

Uma série de estudos fisiológicos demonstrou que a regulação da expressão dos fatores de virulência é controlada pela disponibilidade de nutrientes, e que o transporte e o metabolismo dos carboidratos são amplamente aceitos como base nutricional necessária para tal fim, que tem influência direta sobre o crescimento,

colonização e manutenção de cepas de *E. coli* patogênicas. Dezenas de famílias de transportadores primários e secundários, estruturalmente diversos e funcionais, que permitem a absorção de nutrientes essenciais, foram devidamente descritas e classificadas dentro de superfamílias, incluindo a superfamília de transportadores de cassete de ligação de ATP (transportadores ABC) e a superfamília facilitadora principal (LE BOUGUÉNEC; SCHOULER, 2011).

Os transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC) são proteínas de membrana ubíquas, que existem de maneira conservada em todos os organismos e micro-organismos estudados até aqui. Em bactérias, os transportadores ABC importam e exportam uma grande variedade de materiais através da bicamada lipídica, estando diretamente envolvidos na captação de nutrientes e na secreção de toxinas e agentes antimicrobianos (CHEN, 2013). Como transportadores ativos primários, os transportadores ABC acoplam o transporte de um substrato contra um gradiente de concentração à hidrólise de ATP, o que lhes permite mediar a captação de diferentes açúcares, incluindo glicose, sacarose, glicosamina, frutose, 2-desoxiglicose, manose, N-acetilglicosamina, maltose, entre outros (LE BOUGUÉNEC; SCHOULER, 2011).

A superfamília facilitadora principal (MSF) também envolve proteínas de membrana ubíquas que facilitam o transporte de diferentes substratos através da bicamada lipídica, estando diretamente envolvidos na captação de aminoácidos (D-alanina, por exemplo), sideróforos (moléculas sequestradoras de ferro), β -galactosídeos (lactose), intermediários de algumas vias metabólicas (piruvato, ácidos de açúcares, pentoses, etc), além de participar da exportação de aminoácidos e seus produtos metabólicos, peptídeos bacterianos, nucleotídeos e drogas antimicrobianas (REDDY et al., 2012). Como transportadores ativos secundários, os co-transportadores que fazem parte dessa superfamília acoplam o transporte do substrato à dissipação do gradiente eletroquímico secundário (SHILTON, 2015).

Em uma tentativa de compreender a relação entre o transporte e o metabolismo de vários carboidratos e a virulência em enterobactérias, análises transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas concentraram seus esforços para identificar vias metabólicas fundamentais associadas aos transportadores de nutrientes essenciais durante processos infecciosos desencadeados por bactérias, incluindo *E. coli* patogênica extra intestinais como UPEC. Todavia, como na maioria dos casos os carboidratos metabolizados e o papel preciso de sua utilização na expressão e regulação

da virulência bacteriana ainda não foram determinados, buscamos avaliar o impacto que o metabolismo de diferentes fontes de carbono tem sobre a expressão de fatores de aptidão e virulência na patogênese de UPECs MDR, com ênfase na expressão das fímbrias tipo 1 (LE BOUGUÉNEC; SCHOULER, 2011).

JUSTIFICATIVA

A maioria dos casos de ITUs tem sido tratada de maneira segura e eficaz por meio do uso empírico de antimicrobianos. Contudo, o surgimento e a disseminação de linhagens de UPECs MDR tem tornado o tratamento cada vez mais ineficaz, limitando as opções terapêuticas para um tratamento definitivo e prolongando o tempo de tratamento, além de levar ao aumento da intensidade dos sintomas que, em casos mais graves, pode levar o paciente ao óbito (IOVLEVA et al., 2017).

Estima-se que 700.000 mortes são atribuídas à resistência antimicrobiana, anualmente, em todo o mundo, e isso pode aumentar para 10 milhões de mortes por ano até 2050 (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020). No Brasil, UPECs MDR já foram associadas a ITUs comunitárias em várias regiões, incluindo o Distrito Federal (GONÇALVES et al., 2016; MOREIRA DA SILVA et al., 2017). Neste contexto, o entendimento de como a nutrição e o metabolismo de UPECs MDR interferem em seus mecanismos de virulência e patogenicidade é crucial para elucidar novas informações a respeito da fisiopatologia de isolados clínicos de *E. coli*, bem como para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é compreender o efeito que o uso de diferentes fontes de carbono tem sobre a expressão de mecanismos de virulência e de patogenicidade de linhagens UPECs MDR.

2. Objetivos específicos

- Determinar a aptidão que as linhagens de UPECs MDR apresentam de utilizar diferentes fontes de carbono para sobreviver e se reproduzir;
- Observar o efeito da utilização de diferentes fontes de carbono na expressão de fímbria tipo 1 por UPECs MDR;
- Determinar o efeito da utilização de diferentes fontes de carbono na produção de biofilme bacteriano;
- Identificar a consequência que o uso de diferentes fontes de carbono tem no efeito protetor de biofilme bacteriano aos antimicrobianos;
- Verificar o efeito da utilização de diferentes fontes de carbono na expressão de genes de virulência associados à colonização bacteriana (fímbrias, sistemas de captação de ferro e de resistência ao soro).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens bacterianas

Quatro linhagens de UPECs MDR pertencentes à coleção microbiológica do Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (LAMP/IB-UnB), foram utilizadas ao longo deste trabalho.

As UPECs MDR foram isoladas a partir da urocultura de diferentes pacientes no Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB) e foram identificadas via VITEK-2 (Vitek MAS; BioMerieux Vitek System, Hazelwood, MO, EUA) pelo Centro de Patologia Clínica do HUB/UnB. Posteriormente, elas foram submetidas a classificação filogenética, a determinação de seus fatores de virulência (MOREIRA DA SILVA et al., 2017) e dos perfis de resistência aos antimicrobianos (Tabela 1). Todas as

estirpes isoladas foram mantidas a -80 °C em Caldo Luria Bertani (LB) contendo 25% de glicerol.

Tabela 1 - Informações referentes as quatro linhagens bacterianas utilizados ao longo deste projeto.

Linhagens	Origem da amostra	Classificação filogenética	Resistência antimicrobiana	ST	Genes de virulência
UPEC 32	Interno*	A	MDR	ST-1725	<i>aer, traT</i>
UPEC 174	Externo**	B1	MDR	ST-179	<i>aer, pap, traT</i>
UPEC 76	Externo	B2	MDR	ST-131	<i>aer</i>
UPEC 214	Externo	D	MDR	A definir	<i>aer, pap, traT</i>

*: pacientes que adquiriram ITUs dentro do ambiente hospitalar; **: pacientes com ITUs oriundos da comunidade.

2. Meios de cultura

2.1. Luria Bertani (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007)

Luria Bertani (Sigma Aldrich) é um meio de crescimento microbiano amplamente utilizado para manutenção e rápida propagação de *E. coli*. Ele é constituído por:

Triptona	10,00g
Cloreto de sódio P.A.-ACS – NaCl	10,00g
Extrato de levedura	05,00g
Água destilada q.s.p – H ₂ O	1000,00mL
pH	6,8-7,2

O ajuste do pH foi realizado mediante uso do hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 1M. Sempre que necessário, foram adicionados 1,5 g de ágar a cada 100 mL de LB para solidificá-lo.

Independentemente de seu estado físico, o meio de cultura sempre foi esterilizado em autoclave a 120 °C durante 20 minutos antes de ser utilizado.

2.2. Meio Mínimo (adaptado de RUSSELL; SAMBROOK, 2001)

Amplamente utilizado em experimentos cujo principal objetivo é a observação da fisiologia celular e a expressão gênica (PALIY; GUNASEKERA, 2007), o Meio Mínimo M9 (M9) é um meio de crescimento microbiano formado por elementos inorgânicos conhecidos como sais minerais mínimos M9, que pode ser suplementado com diferentes aminoácidos, vitaminas e fontes de carbono, a depender da escolha do pesquisador. Para realizar o preparo de uma solução estoque na concentração de 20X, foram utilizados os sais abaixo:

Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. – KH_2PO_4	60,00 g
Fosfato de potássio dibásico anidro P.A. – K_2HPO_4	14,00 g
Sulfato de amônio P.A. - $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$	20,00 g
Sulfato de magnésio P.A.-ACS – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	02,00 g
Água destilada q.s.p. – H_2O	1000,00 mL

Para realização dos experimentos, a solução estoque foi diluída para concentração de 1X mediante uso de água destilada estéril e suplementada com 2% dos açúcares abaixo:

Tabela 2 - Informações referentes as fontes de carbono utilizadas ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Nome	Fórmula empírica	Classificação	Fabricante
D-(-)-Arabinose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	Monossacarídeo	Sigma Aldrich
D-(-)-Frutose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Monossacarídeo	Sigma Aldrich

D-(+)-Galactose	$C_6H_{12}O_6$	Monossacarídeo	Sigma Aldrich
D-(+)-Glicose	$C_6H_{12}O_6$	Monossacarídeo	Sigma Aldrich
β -Lactose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Dissacarídeo	Sigma Aldrich
D-(+)-Maltose monohidratado	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	Dissacarídeo	Sigma Aldrich
N-Acetil-D- Glicosamina	$C_8H_{15}NO_6$	Monossacarídeo	Sigma Aldrich
D-(+)-Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Dissacarídeo	Sigma Aldrich
D-(-)-Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	Monossacarídeo	Sigma Aldrich
D-(+)-Trealose dihidratada	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$	Dissacarídeo	Sigma Aldrich

Sempre que necessário, foram adicionados 1,5 g de ágar a cada 100 mL do meio mínimo M9 (1X) para solidificá-lo. Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 120 °C durante 20 minutos, resfriado e devidamente suplementado com o açúcar de interesse previamente esterilizado por filtração (0,22 μ M), até atingir a concentração de 2%.

2.3. Urina não filtrada (BOUATRA et al., 2013)

A urina produzida por mamíferos é um biofluido translúcido e estéril formado nos rins, temporariamente armazenado na bexiga e excretado através da uretra pelo processo de micção. Em pessoas saudáveis, a urina possui uma quantidade elevada de metabólitos, tais como ureia (metabolismo de aminoácidos), creatinina (da creatinina muscular), ácido úrico (metabolismo dos ácidos nucleicos), produtos finais da degradação da hemoglobina (bilirrubina e urobilina) e metabólitos de vários hormônios, além das toxinas solúveis em água e outras substâncias estranhas ingeridas (pesticidas, fármacos e aditivos alimentícios, por exemplo). Em contrapartida, os eletrólitos como íons sódio, cloreto e bicarbonato, e moléculas orgânicas como aminoácidos e glicose aparecem em concentrações menores, mesmo que grande quantidade seja filtrada pelos

capilares glomerulares (ALTERI; MOBLEY, 2015; REITZER; ZIMMERN, 2019; HALL, 2011).

As amostras de urina humana foram coletadas de três voluntários, adultos, saudáveis, do sexo feminino, maiores de dezoito anos, mediante uso de coletores de urinas estéreis de dois litros e coletores de urinas estéreis de 80 mL. As amostras obtidas foram homogeneizadas em um Balão de Erlenmeyer estéril (proporção de 1:1), distribuídos em alíquotas de 50 mL em Tubo Falcon estéril e armazenados a -20 °C até uso posterior. Antes de cada análise, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, homogeneizada por inversões suaves para diluir o precipitado e testada para crescimento microbiológico em placas de LB Ágar.

3. Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas pelo Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB) com o VITEK-2 para os seguintes fármacos: amicacina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, cefalotina, cefuroxima, cefuroxima axetil, ceftriaxona, cefepima, ciprofloxacina, ertapenem, gentamicina, meropenem, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, norfloxacina, piperacilina-tazobactam e sulfametoxazol (MOREIRA DA SILVA, 2017).

Posteriormente, o perfil de resistência aos antimicrobianos das quatro linhagens de UPECs foi confirmado por difusão em disco (Kirby-Bauer). Para isso, foram cultivados 100 µL de cada uma das quatro linhagens isoladas e mantidas a -80 °C em Caldo Luria Bertani (LB) contendo 50% de glicerol, em 5ml de LB durante 18 horas. Em seguida, 100 µl das amostras previamente inoculadas foram cultivadas em Ágar Mueller-Hinton (TENDENCIA, 2004), e os discos de papel contendo concentrações conhecidas dos agentes antimicrobianos de interesse (Tabela 3) foram colocados sobre sua superfície respeitando o espaçamento necessário para a difusão do fármaco. Durante a incubação de 18 horas, o agente se difunde do disco para o ágar estabelecendo um gradiente de concentração – quanto maior a distância de difusão do composto químico a partir do disco de papel, menor é a concentração do agente (MADIGAN et al., 2016). Transcorrido o tempo de incubação a 37 °C, os resultados obtidos após a leitura do tamanho dos halos de inibição foram utilizados para classificar as linhagens como sensível, intermediário ou resistente, de acordo com as

especificações do fabricante dos discos utilizados (Sensidisc DME – Diagnósticos Microbiológicos Especializados).

Tabela 3 - Antimicrobianos utilizados ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Nome	Sigla	Classes antimicrobianas
Amoxicilina/Ácido clavulânico	AMC2/1	Penicilina antipseudomonal
Ciprofloxacina	CIP	Fluoroquinolona
Ceftriaxona	CFX	Cefalosporina de espectro estendido
Cloranfenicol	CLO30	Fenicóis
Linezolida	LNZ10	Oxazolidinonas
Meropenem	MEM10	Carbapenêmico
Nitrofurataína	F300	Nitrofuranos
Piperaciclina/Tazobactam	PIT36	Penicilina antipseudomonal
Teicoplanina	TEC30	Teicoplanina
Tetraciclina	TE30	Tetraciclina

4. *Fitness bacteriano*

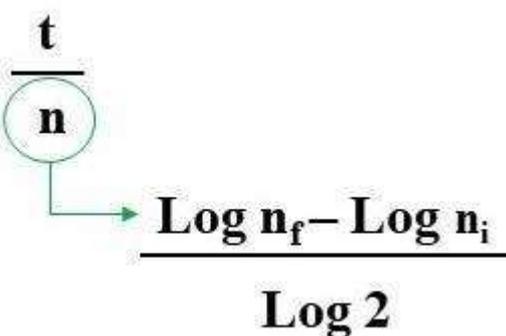
A curva de crescimento de cada uma das quatro linhagens selvagens foi elaborada com o objetivo de analisar sua capacidade de sobrevivência e reprodução utilizando diferentes fontes de carbono (*fitness bacteriano*). Para isso, as linhagens selvagens foram cultivadas nos diferentes meios de cultura e mantidas em condições estáticas e aeróbicas, a 37 °C, até que o valor de sua DO₆₀₀ (densidade óptica a 600 nm) estivesse entre 0,1 e 0,3 (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007). Os valores das DO₆₀₀ foram medidos no Pharmacia LKB Ultrospec III Spectrofotometer (Pharmacia, LKB; DG Apeldoorn, Netherlands) e todas as amostras cujo valor da DO₆₀₀ estava em torno de 0,3 foram inoculadas em 100 µL de seu respectivo meio de cultura estéril, previamente distribuído em uma placa de microtitulação de 96 poços estéril, na proporção de 1:1 (V_{final} = 200 µL/poço). A placa foi incubada a 37 °C, em condições aeróbicas e estática, por 24 horas, tendo os valores da DO₆₀₀ mensurados a cada 30 minutos no SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC; San Jose, California, EUA).

Todas as curvas de crescimento foram realizadas em triplicata e confirmadas através da técnica de semeadura em estria nos respectivos meios de cultura sólido (Figura S2).

Os parâmetros escolhidos para caracterizar fisiologicamente nossas células foram a massa por mililitro, a massa celular média e o tempo de geração. A massa por mililitro é proporcional ao valor da DO₆₀₀ medido no Pharmacia LKB Ultrospec III Spectrofotometer (Pharmacia, LKB; DG Apeldoorn, Netherlands). A massa celular média foi calculada, em unidades arbitrárias, como a razão do valor da DO₆₀₀ para o número de células por mililitro (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007), e o tempo de geração foi calculado como demonstrado na Figura 8.

A massa celular média é conhecida por variar fortemente de acordo com o meio de crescimento que está sendo utilizado, sendo maior em meios que suportam um crescimento rápido como o LB. A diferença na massa celular média durante o crescimento em estado estacionário em meios ricos e meios mínimos podem exceder um fator de cinco, tornando-a um indicador sensível do estado fisiológico das células bacterianas (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007). Em conjunto, essas informações nos permitem compreender as diferenças observadas nos valores da DO₆₀₀ utilizadas para realização da curva de crescimento nos diferentes meios de cultura.

Figura 6. Fórmula utilizada para calcular o tempo de geração das quatro linhagens de UPECs em diferentes meios de cultura.

$$g = \frac{t}{n}$$

$$\frac{\text{Log } n_f - \text{Log } n_i}{\text{Log } 2}$$

A partir de dados de números de células obtidos mediante curva de crescimento, o tempo de geração (g) foi calculado como um período de tempo em horas (t), dividido pelo número de gerações (n) neste mesmo período. O valor de “n” é obtido pelo logaritmo na base 10 do número final de células, subtraído do número inicial, dividido pelo logaritmo de 2 na base 10.

Fonte: MADIGAN, et al. 2016

5. Ensaio de Aglutinação de Levedura

Para investigar a expressão de fímbrias tipo 1 funcionais nas linhagens bacterianas em análises, testamos sua reatividade à manose através do Ensaio de Aglutinação de Levedura. Para isso, cada uma das quatro linhagens foi previamente cultivada nos respectivos meios de cultura (Tabela 2) e mantidas a 37 °C, sob agitação (180 rpm), até atingirem a fase estacionária de seu crescimento. Em seguida, os valores da DO₆₀₀ foram medidos e todas as amostras cujo valor da DO₆₀₀ ≤ 0,6 foram concentradas 60x em solução salina tamponada com fosfato (PBS) na concentração de 1X e com pH 7,2. A suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (3%) foi adicionada em cada poço de uma placa de 96 poços com fundo chato (40 µL), e as suspensões de células bacterianas devidamente concentradas foram diluídas em série na proporção de 1:2 (40 µL). Após 30 minutos de incubação em gelo, a aglutinação foi monitorada visualmente e o título de aglutinação foi determinado como o poço mais diluído em que a aglutinação foi observada (KLEMBERG et al., 2021). Todos os Ensaio de Aglutinação de Levedura foram realizados em triplicata e em triplicata biológica.

6. Ensaio de Formação de Biofilme em Superfície de Poliestireno

Considerando que a formação do biofilme é uma das principais estratégias usadas por linhagens de UPECs durante o estabelecimento e a manutenção de sua patogênese, e que ela costuma ser iniciada logo após a adesão celular a uma superfície através da ação de múltiplas fímbrias, incluindo as fímbrias tipo 1 (FLORES-MIRELES et al., 2015; PAK et al., 2001; TOTSIKA et al., 2012), as quatro linhagens bacterianas foram submetidas ao Ensaio de Formação de Biofilme em Superfície de Poliestireno em LB e M9 (1X) suplementado com os açúcares citados anteriormente na concentração de 2% (Tabela 2).

Cada uma das quatro linhagens de UPECs selvagens foi cultivada nos respectivos meios de cultura e mantidas a 37 °C, sob condições estáticas e aeróbicas, até que o valor de sua DO₆₀₀ estivesse entre 0,1 e 0,3. Em seguida, todas as amostras cujo valor da DO₆₀₀ estava em torno de 0,3 foram inoculadas em 100µL de seu respectivo

meio de cultura estéril, previamente distribuído em uma placa de microtitulação de 96 poços estéril, na proporção de 1:1 ($V_{\text{final}} = 200 \mu\text{L}/\text{poço}$). A placa foi incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, em condições aeróbicas e estática, por 24 horas. Transcorrido o tempo de incubação, o sobrenadante de cada poço foi descartado e os poços foram lavados com $200 \mu\text{l}$ de solução salina de Cloreto de Sódio (NaCl) na concentração de 0,9%, com $\text{pH} = 7,2$. O biofilme foi fixado por meio da adição de $200 \mu\text{L}$ de metanol que atuou sobre ele por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida em temperatura ambiente até secar. Quando seco, o biofilme fixado foi corado com cristal violeta de Huker na concentração de 2% ($200 \mu\text{L}$ por 05 minutos), que teve o seu excesso lavado com água corrente. A placa foi deixada em temperatura ambiente até secar antes do biofilme ser ressolubilizado por meio da adição de $200 \mu\text{L}$ de Ácido Acético Glacial (33%). Para quantificar a biomassa do biofilme, os valores da DO_{570} de cada poço foram mensurados no SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC; San Jose, California, EUA). Com o objetivo de minimizar os erros e fornecer uma análise de dados mais confiável, todos os Ensaio de formação de biofilme em superfície de poliestireno foram realizados em triplicata e em triplicata biológica, na presença dos seus respectivos controles negativos (STEPANOVIC et al., 2007).

7. Concentração Mínima Inibitória de Cloranfenicol

Para determinar os valores de concentração mínima inibitória, cada uma das quatro linhagens de UPECs selvagens foi cultivada nos respectivos meios de cultura e mantidas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, sob condições estáticas e aeróbicas, até que o valor de sua DO_{600} estivesse entre 0,1 e 0,3. Ao atingir o valor da DO_{600} em torno de 0,3, $10 \mu\text{L}$ de cada amostras foi inoculado em uma placa de microtitulação com 96 poços contendo $90 \mu\text{L}$ dos respectivos meios de cultura, estéreis, complementados com o antibiótico de interesse diluído em série (cloranfenicol na concentração de $25 \mu\text{g}/\text{mL}$). Transcorrido o tempo de incubação de 24 horas, a turbidez foi avaliada usando o leitor de placas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC; San Jose, California, EUA) a 600 nm , para determinar a concentração mínima de antibiótico necessária para inibir o crescimento bacteriano. O experimento foi realizado em triplicata e a concentração mínima inibitória

observada foi confirmada através da técnica de semeadura em estria nos respectivos meios de cultura sólido complementado com antibiótico.

8. Capacidade de sobrevivência celular em biofilme na presença de cloranfenicol

Para verificar se o metabolismo de diferentes fontes de carbono tem impacto na tolerância aos antibióticos proporcionada pela produção do biofilme, o Ensaio de Formação de Biofilme em Superfície de Poliestireno foi complementado com o tratamento com antibiótico (MATYSIK; KLINE, 2019; STEPANOVIC et al., 2007).

Cada uma das quatro linhagens de UPECs selvagens foi cultivada nos respectivos meios de cultura e mantidas a 37 °C, sob condições estáticas e aeróbicas, até que o valor de sua DO₆₀₀ estivesse entre 0,1 e 0,3. Em seguida, todas as amostras cujo valor da DO₆₀₀ estava em torno de 0,3 foram inoculadas em 250 µL de seu respectivo meio de cultura estéril, previamente distribuído em uma placa para cultura de célula de 24 poços estéril, na proporção de 1:1 ($V_{\text{final}} = 500 \mu\text{L}/\text{poço}$). A placa foi incubada a 37 °C, em condições aeróbicas e estáticas por 24 horas. Transcorrido o tempo de incubação, o sobrenadante de cada poço foi descartado e os poços foram lavados com 500 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS na concentração de 1X e com pH de 7,2), para remover as células não aderentes. Após a lavagem, os respectivos meios de cultura estéreis acrescidos de antibiótico (cloranfenicol na concentração de 25 µg/ml) foram adicionados em cada poço ($V_{\text{final}} = 500 \mu\text{L}/\text{poço}$). A placa foi incubada a 37 °C, em condições aeróbicas e estáticas por mais 24 horas. Em seguida, o sobrenadante de cada poço foi descartado e os poços foram lavados duas vezes com 500 µL de PBS (1X; pH = 7,2) para que todo o meio de cultura com antibiótico fosse devidamente removido. Depois de adicionar 500 µL de PBS (1X; pH = 7,2) em cada poço, a placa foi vedada com parafilme e submetida à sonicação (Branson Ultrasonic Bath – Quick Start Guide) para desaderir o biofilme formado do fundo de cada poço (dois tratamentos de 10 segundos intercalados por um intervalo de 30 segundos). Os sobrenadantes foram coletados e submetidos a diluição seriada de modo a permitir que a viabilidade bacteriana fosse quantificada por enumeração de UFC em LB ágar.

9. Sobrevivência em sangue e soro humano

A capacidade que cada uma das diferentes linhagens de UPEC possui de sobreviver e se reproduzir em sangue total humano e soro humano foram determinadas como descrito por DELEO et al. (2017). Para isso, os isolados de UPECs MDR de origem clínica foram submetidos ao crescimento estático, individual, em M9 (1X) suplementado com 2% de D-(-)-Frutose, D-(+)-Glicose, N-acetil-D-glicosamina e D-(-)-Sorbitol por 18 horas a 37 °C. Transcorrido o prazo, um total de 10^7 cel/mL foi inoculado em 550 μ L de um pool de sangue total humano heparinizado e 550 μ L de soro humano obtidos a partir de três doadores saudáveis, homogeneizados suavemente por inversão e devidamente aliquotados na proporção de 1:1. A cada 30 minutos, uma amostra de 10 μ L foi retirada, diluída quatro vezes em 90 μ L de solução salina de cloreto de sódio (NaCl) na concentração de 0,85% e plaqueadas em LB ágar para posterior contagem de UFC/mL. As placas foram submetidas a um crescimento estático a 37 °C por 18 horas antes da contagem.

10. Análises estatísticas

10.1. Fitness bacteriano

Para analisar se houve diferença estatística significativa entre a capacidade de sobrevivência e reprodução que cada uma das linhagens selvagens apresentou em diferentes meios de cultura, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis (Figura 7). O teste de Kruskal-Wallis, Teste H de Kruskal-Wallis ou Análise de Variância de um fator em postos, é um método estatístico, não paramétrico (n número de observações de cada grupo ≤ 20 e teste de Shapiro-Wilk com valor de $p = 0,05$), utilizado para comparar as medianas de três ou mais grupos de amostras independentes ou não pareadas (Vargas, 2012).

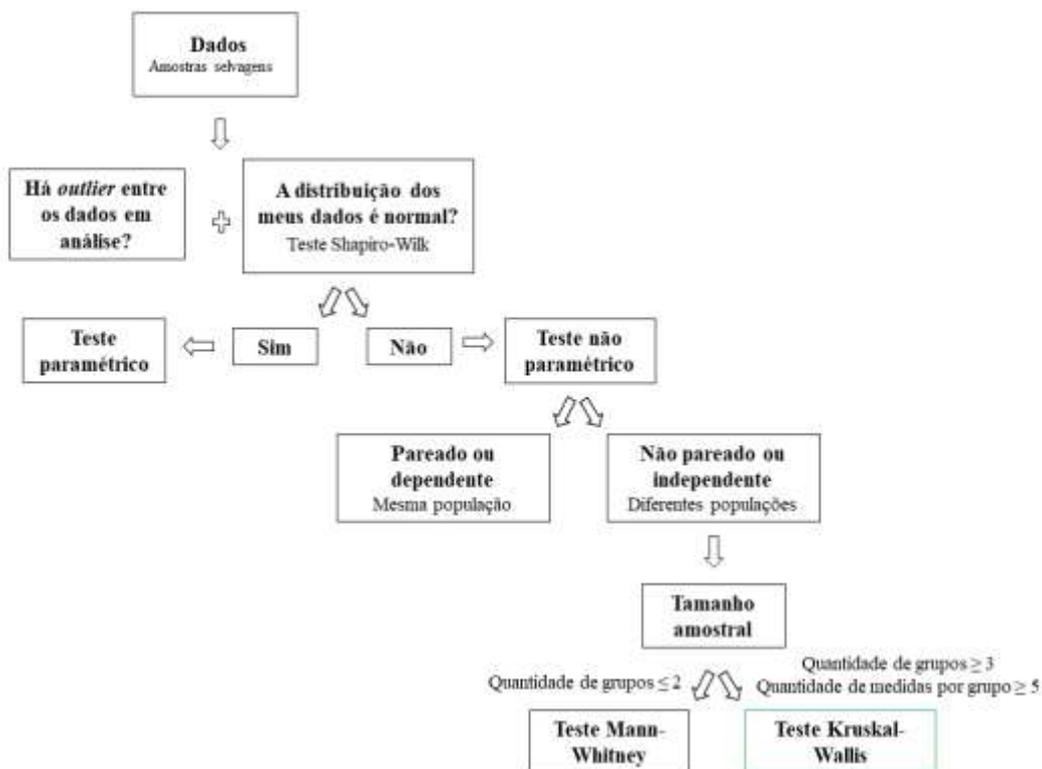
Em seguida, caso o teste de Kruskal-Wallis tenha rejeitado a hipótese nula (H_0 = não houve diferença ou relação significativa entre as populações analisadas) e aceito a hipótese alternativa (H_1 = há uma diferença ou relação significativa entre as

populações analisadas), as populações em que isso ocorre foram submetidas ao teste de comparações múltiplas de Dunn.

O teste de Dunn ou teste post-hoc de Dunn é utilizado para comparar diferentes populações, sempre aos pares, com a intenção de elucidar onde estão as diferenças estatísticas significativas observadas pelo teste de Kruskal-Wallis dentro das populações analisadas, independente de quantos pares precisem ser formados e analisados.

É importante ressaltar que em todas as análises, o valor de “ p ” foi de 0,05. A presença de diferenças significativas do ponto de vista estatístico ($p < 0,05$) confirma que as linhagens em análise apresentam uma capacidade de sobreviver e se reproduzir diferentes entre os meios comparados, e sua ausência ($p > 0,05$) indica que tais linhagens apresentam uma aptidão semelhante nos diferentes meios analisados.

Figura 7 - Testes estatísticos utilizados ao longo do projeto.



10.2. Ensaio de aglutinação de levedura (3%)

Para analisar se houve diferença estatística significativa entre a aglutinação de cada uma das linhagens selvagens em diferentes meios de cultura, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,05$), com base nos valores mínimos de titulação com aglutinação positiva, seguido pelo teste de Dunn, conforme descrito anteriormente. Como os testes citados anteriormente são classificados como não paramétrico, os resultados dessas análises foram demonstrados mediante uso de gráficos box-plot.

10.3. Ensaio de Formação de Biofilme em Superfície de Poliestireno

STEPANOVIC et al. (2007) recomendou que os resultados obtidos tenham sua média calculada para que possam ser expressos em números, e que sua interpretação seja realizada com base em um valor de corte capaz de separar as estirpes produtoras de biofilme das não produtoras de biofilme. Para isso, os valores das médias aritméticas e os desvios padrão dos valores de DO_{570nm} foram calculados para todas as estirpes testadas e seus respectivos controles negativos. Em seguida, os valores de corte foram estabelecidos como três vezes o valor do desvio padrão das médias dos controles negativos. O valor usado para classificar se uma estirpe é produtora ou não produtora de biofilme foi definido como o valor da média aritmética das estirpes testadas reduzido pelo valor de corte. Para facilitar a interpretação dos resultados, as estirpes foram divididas em quatro categorias:

- Não produtora de biofilme (-): A média das $DO \leq$ Valor de corte;
- Produtora de biofilme fraco (+): Valor de corte $<$ Média das $DO \leq 2$ (valor de corte);
- Produtora de biofilme moderado (++) : 2 (valor de corte) $<$ Média das $DO \leq 4$ (valor de corte);
- Produtora de biofilme forte (+++) : 4 (valor de corte) $<$ Média das DO .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. *Fitness* bacteriano

Inicialmente, a capacidade de sobrevivência e reprodução que diferentes linhagens de UPECs MDR apresentam ao longo do tempo foi avaliada em doze meios de cultura diferentes: LB, urina não filtrada e M9 (1X) suplementado com 2% de D-(-)-Arabinose, D-(-)-Frutose, D-(+)-Galactose, D-(+)-Glicose, β -Lactose, D-(+)-Maltose monohidratado, N-Acetil-D-Glicosamina, D-(+)-Sacarose, D-(-)-Sorbitol e D-(+)-Trealose dihidratada (Tabela S1, Figura S1).

Dos doze meios de cultura utilizados, seis foram selecionados para uma caracterização mais profunda: LB, urina não filtrada e M9 (1X) suplementado com 2% de D-(-)-Frutose, D-(+)-Glicose, N-Acetil-D-Glicosamina e D-(-)-Sorbitol.

O caldo Luria-Bertani é um meio de cultura que permite o crescimento rápido e bons rendimentos para muitas espécies bacterianas, graças ao fornecimento de carbono e nitrogênio a partir de aminoácidos catabolizáveis – não açúcares, o que fez dele uma das duas bases principais de comparação do desempenho das diferentes linhagens de UPEC MDR utilizadas ao longo deste trabalho (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007).

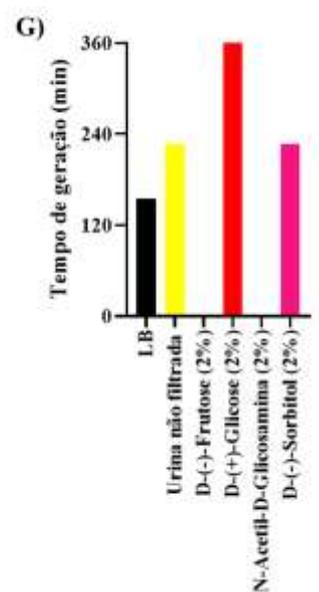
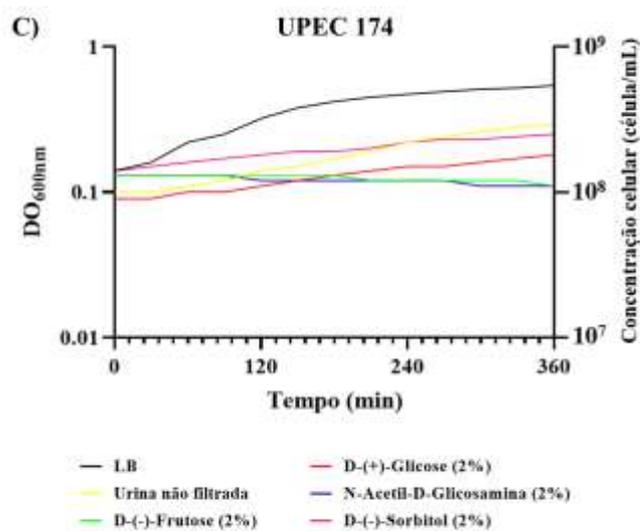
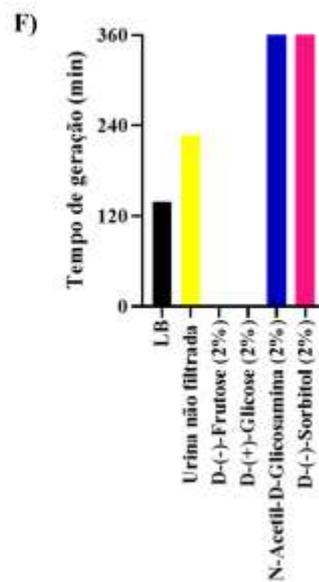
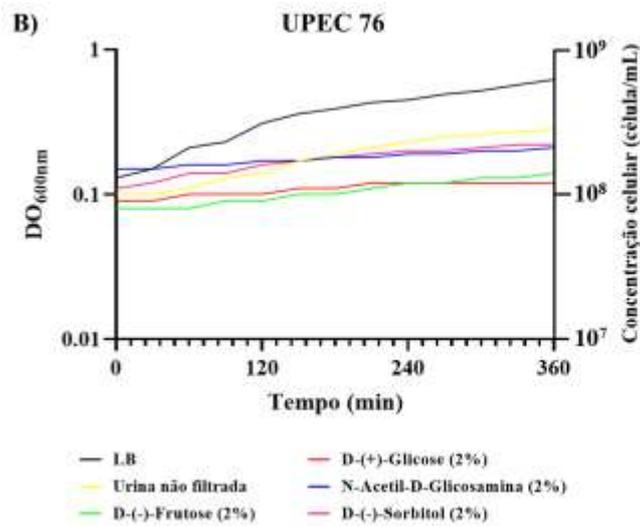
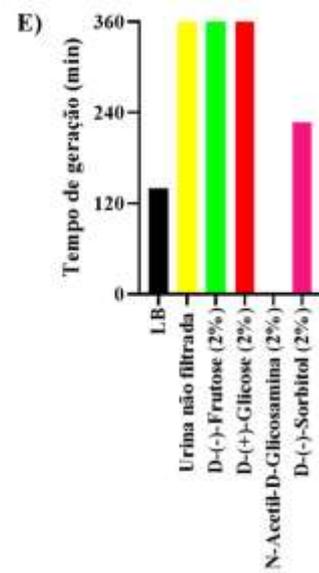
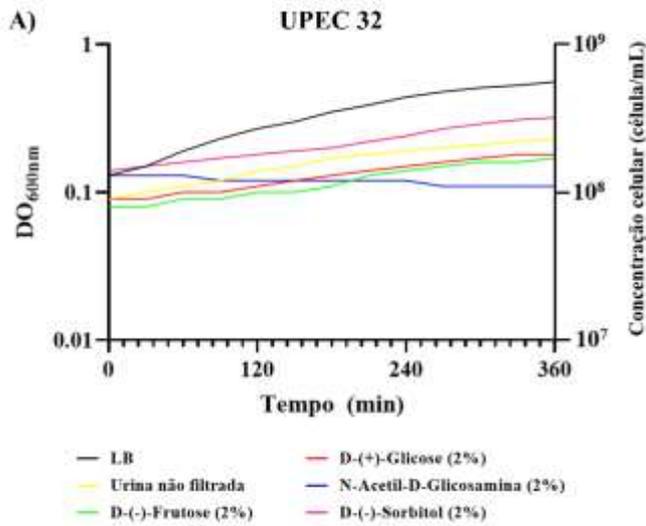
A urina rica em nitrogênio produzida por mamíferos e temporariamente armazenada na bexiga foi utilizada como meio de cultura adequado para simular as condições que as UPECs MDR em análise encontram no hospedeiro *in vivo*. Todavia, uma contaminação detectada no segundo estoque armazenado fez com que ela fosse utilizada em três dos sete ensaios realizados: Cinética de Crescimento, Ensaio de Aglutinação de Levedura (3%) e Ensaio de Formação de Superfície em Poliestireno.

D-(+)-Glicose é o monossacarídeo rico em energia potencial largamente utilizado por diferentes seres vivos como principal fonte de energia. Além de ser um excelente combustível, D-(+)-Glicose também é um precursor versátil, capaz de suprir uma variedade elevada de intermediários metabólicos em reações biossintéticas. Como monossacarídeo mais abundante encontrado na natureza e detentora de uma posição central no metabolismo de plantas, animais e muitos micro-organismos, incluindo *E. coli*, D-(+)-Glicose foi utilizada como a segunda base principal de comparação do desempenho das diferentes linhagens de UPEC MDR utilizadas ao longo deste trabalho (NELSON; COX, 2022).

D-(-)-Frutose, monossacarídeo derivado da digestão da sacarose oriunda de produtos produzidos à base de cana de açúcar largamente utilizados como base da dieta humana (HALL, 2011), faz parte do programa de regulação metabólica simples e flexível necessário para lidar com as mudanças ambientais enfrentadas por UPECs ao longo da trajetória ascendente das infecções no trato urinário atuando através de dois fatores de transcrições (*crp* e *cra*), o que fez dele um carboidrato de interesse.

D-(-)-Sorbitol é um soluto orgânico, ativo, compatível ou não perturbador, amplamente encontrado em células do epitélio superficial da bexiga e da medula renal, onde se acumula em níveis elevados em resposta às tensões osmóticas. Como osmólito orgânico, sua principal função é contrabalancear os estresses ambientais nas células, elevando a osmolaridade intracelular até igualá-la à alta osmolaridade extracelular, enquanto mantêm os níveis intracelulares de sódio e potássio e o volume celular próximos ao normal, contribuindo para a manutenção da estabilidade conformacional das proteínas e de outras macromoléculas, assegurando a integridade celular e tecidual. Além de seu papel ativo em resposta às tensões osmóticas e de sua biodisponibilidade como fonte de carbono secundária em processos de ITUs, o D-(-)-Sorbitol também atua como intermediário em uma variedade de vias bioquímicas, incluindo a da D-(-)-Frutose conferindo uma vantagem de aptidão dentro do trato urinário, o que fez dele um carboidrato de interesse (CONOVER et al., 2016; BURG et al., 1988).

E o N-Acetil-D-Glicosamina, monossacarídeo derivado da glicose que é abundantemente consumido como parte da dieta humana, que compõe as glicoproteínas, os glicosaminoglicanos e proteoglicanos encontrados em membranas mucosas do trato digestivo e urinário, onde estão diretamente envolvidos na interação patógeno-hospedeiro LUPO; INGERSOLL; PINEDA, 2021).



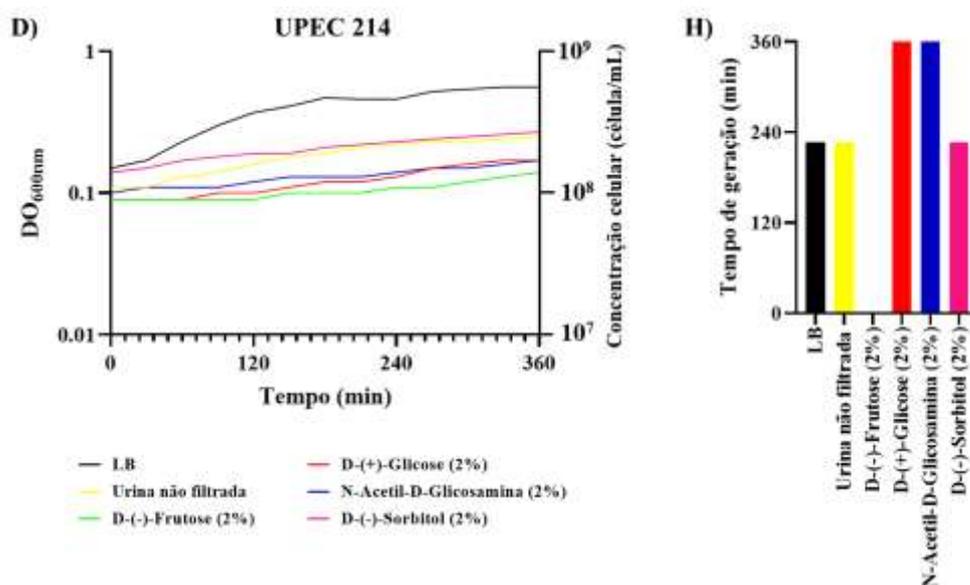


Figura 8 – UPEC MDR usa D-(-)-Sorbitol como fonte de carbono de alto rendimento em condições anaeróbicas. A) Cinética de crescimento de UPEC 32. B) Cinética de crescimento de UPEC 76. C) Cinética de crescimento de UPEC 174. D) Cinética de crescimento de UPEC 214. E) Tempo de geração da fase exponencial de UPEC 32. F) Tempo de geração da fase exponencial de UPEC 76. G) Tempo de geração da fase exponencial de UPEC 174. H) Tempo de geração da fase exponencial de UPEC 214. Todas as análises foram realizadas em LB, urina não filtrada e M9 (1X) suplementado com 2% de D-(-)-Frutose, D-(+)-Glicose, N-acetil-D-glicosamina e D-(-)-Sorbitol como fontes únicas de carbono. Além disso, as estirpes foram submetidas a crescimento estático, em condições anaeróbicas, a 37°C. As cinéticas de crescimento encontram-se representadas por valores de DO_{600nm} em escala logarítmica (Log₁₀) e concentração celular ao longo do tempo. A concentração celular referente aos valores de DO_{600nm} foram retiradas de SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007. Para determinar as diferenças estatísticas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ($p < 0,05$).

Em condições anaeróbicas e ricas em aminoácidos catabolizáveis (fonte de carbono e nitrogênio oriundos de não açúcares) semelhantes às encontradas ao longo do trato urinário, todas as UPECs analisadas apresentaram uma capacidade de sobreviver e se reproduzir superior em LB se comparado ao que foi observado em D-(+)-Glicose e D-(-)-Sorbitol como fonte única de carbono (Figura 8A-D). UPEC 32, 174 e 214 apresentou um tempo de geração menor em LB, indicando que apresentam um crescimento mais rápido em LB do que em D-(-)-Glicose e D-(-)-Sorbitol, o que corrobora a ideia de que UPECs capazes de utilizar os aminoácidos como fonte de carbono primária durante infecções no trato urinário possuem uma vantagem competitiva significativa (Figura 8E, G-H, respectivamente) (CHAN; LEWIS, 2022). UPEC 76 mostrou-se incapaz de utilizar D-(+)-Glicose para seu crescimento (Figura 8F).

Todas as estirpes de UPEC analisadas apresentaram uma cinética de crescimento superior em D-(-)-Sorbitol quando comparado com D-(+)-Glicose (Figura

8A-D). O tempo de geração em D-(-)-Sorbitol também foi menor do que o encontrado ao utilizar D-(+)-Glicose, indicando que UPEC 32, 174 e 214 apresentam um crescimento mais rápido ao usar o D-(-)-Sorbitol e não D-(+)-Glicose quando ambos estão disponíveis como fontes únicas de carbono (Figura 8E, G-H). Comportamento semelhante foi relatado por CONOVER et al. (2016) quando estes analisaram a estirpe referência para infecção urinária durante o processo de formação de IBCs seis horas após o início da infecção, o que nos levou a gerar a seguinte hipótese: Será que diferentes estirpes de UPEC MDR também utilizam o D-(-)-Sorbitol como fonte alternativa de carbono durante os estágios iniciais de ITU onde o crescimento exacerbado é uma das principais estratégias de virulência observadas?

MONOD (1942) demonstrou que a presença de uma fonte preferencial de carbono como D-(+)-Glicose inibe a absorção de uma fonte de carbono secundária como o D-(-)-Sorbitol. Todavia, o recente destaque que o uso dos polióis tem recebido na indústria alimentícia junto com o desempenho superior que diferentes estirpes de UPECs MDR apresentou ao utilizar D-(-)-Sorbitol como fonte única de carbono durante o estágio inicial de ITUs (CORDEIRO; CHAGAS; DALA-PAULA, 2021), se comparado ao que foi observado na presença de D-(+)-Glicose sob as mesmas condições, trouxe à tona a necessidade de examinar mais profundamente os respectivos perfis transcricionais durante tal fase de crescimento, utilizando estirpes saudáveis e mutantes para o metabolismo de D-(+)-Glicose e D-(-)-Sorbitol, além da realização de Ensaio de competição *in vitro* e *in vivo*.

Foi observado que as estirpes UPEC 76, 174 e 214 não utilizam D-(-)-Frutose para crescimento quando esta está disponível como única fonte de carbono (Figura 8F-H), o que nos levou a questionar: “Será que o D-(-)-Sorbitol que está sendo utilizado como fonte de carbono de alto rendimento durante a cinética de crescimento das UPECs analisadas está seguindo uma rota metabólica alheia a dos polióis que o converte em D-(-)-Frutose (BARREIROS; BOSSOLAN; TRINDADE, 2005)?” Para verificar esta hipótese, sugere-se o uso de mutagênese para o gene *srlD* em estirpes selvagens (gene responsável por codificar uma desidrogenase cuja principal função é converter D-sorbitol-6-fosfato em frutose-6-fosfato e vice-versa) combinado com um Ensaio de fluxo metabólico com o uso de carbono marcado (MCENTEE, 1977; GOMEZ; LE ROUX, 2018).

UPEC 32 e 174 não utilizam o N-acetil-D-glicosamina para crescimento, quando esta está disponível como única fonte de carbono (Figura 8E e G, respectivamente).

2. Ensaio de Aglutinação de Levedura (3%)

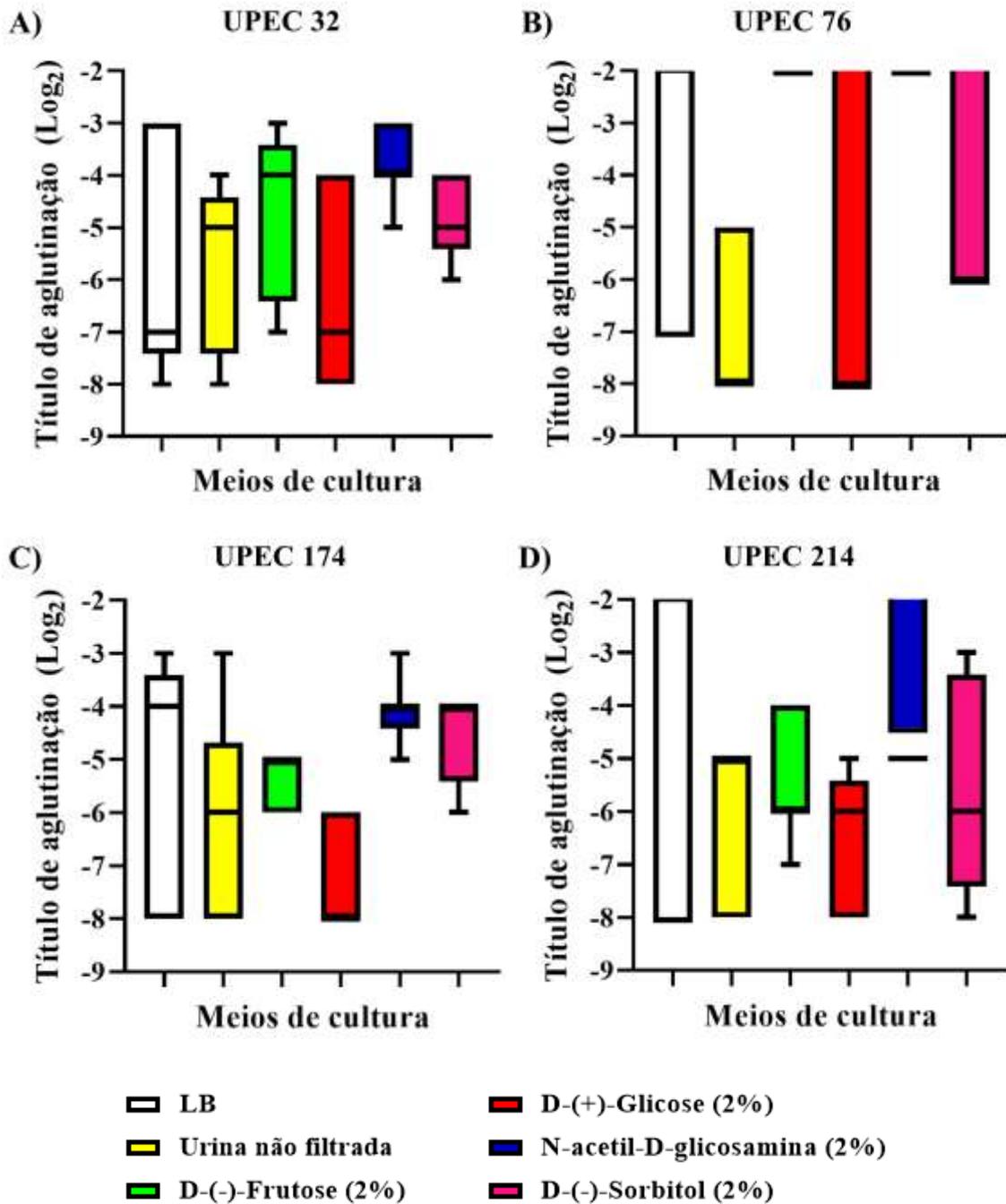


Figura 9 – O metabolismo de diferentes carboidratos utilizados como fontes únicas de carbono influencia a expressão de fímbrias tipo 1 funcionais na superfície de UPECs MDR oriundas de pacientes com ITU aguda. A) Aglutinação de levedura promovida por UPEC 32. B) Aglutinação de levedura promovida por UPEC 76. C) Aglutinação de levedura promovida por UPEC 174. D) Aglutinação de levedura promovida por UPEC 214. A levedura utilizada em todas as análises foi a *Saccharomyces cerevisiae* em uma concentração de 3%. Todas as análises foram realizadas em LB, urina não filtrada e M9 (1X) suplementado com 2% de D-(-)-Frutose, D-(+)-Glicose, N-acetil-D-glicosamina e D-(-)-Sorbitol como fontes únicas de carbono. Além disso, as estirpes foram submetidas a crescimento estático, em condições anaeróbicas, a 37°C Para determinar as diferenças estatísticas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ($p < 0,05$). A dispersão dos dados de cada condição analisada encontra-se representada por caixas; a linha central (segundo quartil) indica a mediana do meu conjunto de dados, e as linhas acima e/ou abaixo caixa assinalam os valores mínimos e máximos obtidos em cada condição, excetuando-se os *outliers* (valores discrepantes). O primeiro quartil ou quartil inferior (da linha inferior da caixa até a linha mediana) agrupa os menores valores obtidos e o terceiro quartil agrupa os maiores valores obtidos.

A expressão de fímbrias tipo 1 funcionais foi testada através do Ensaio de Aglutinação de Levedura.

UPECs 32, 76, e 174 apresentaram quantidades similares de fímbrias tipo 1 funcionais expressas em sua superfície celular quando crescida em LB, D-(+)-Glicose e D-(-)-Sorbitol (Figura 9A-C). Tal comportamento não foi observado quando UPEC 214 foi submetida às mesmas condições e análises, uma vez que ela apresentou uma quantidade maior de fímbrias tipo 1 funcionais expressas em sua superfícies quando cresceu na presença de D-(+)-Glicose e de D-(-)-Sorbitol como fontes únicas de carbono (Figura 9D).

O crescimento de UPEC 32, 76 e 214 em D-(+)-Glicose resultou em uma expressão de fímbrias tipo 1 funcionais análoga à observada na presença de D-(-)-Sorbitol (Figura 9A-B e D, respectivamente). Em contrapartida, quando UPEC 174 foi crescida em D-(+)-Glicose, ela expressou uma quantidade maior de fímbrias tipo 1 funcionais se comparado ao constatado após crescimento em D-(-)-Sorbitol (Figura 9C).

Na presença de D-(-)-Frutose e de N-acetil-D-glicosamina como fontes únicas de carbono, UPECs 32 e 174 expressam uma quantidade análoga de fímbrias tipo 1 funcionais em sua superfície se comparado ao que foi observado em LB, o que não ocorre com UPEC 214, que expressa uma quantidade superior de tal fator sob as mesmas condições (Figura 9A, C-D, respectivamente). Em conjunto, os dados sugerem que apesar de não utilizarem D-(-)-Frutose como fonte de carbono durante o crescimento exacerbado observado nas primeiras horas após a infecção, o metabolismo de tal açúcar está envolvido na expressão de fímbrias tipo 1 funcionais na superfície das estirpes 174 e 214 no mesmo período. É possível observar que o metabolismo de D-(-)-

Frutose contribui para expressão de fímbrias tipo 1 no caso da estirpe 32, que também utiliza tal açúcar como uma das fontes de carbono durante a fase exponencial de seu crescimento de maneira muito lenta (Figura 8E). UPECs 32, 174 e 214 expressaram fímbrias tipo 1 funcionais em sua superfície celular de maneiras similares quando foram crescidas em D-(-)-Frutose e D-(-)-Sorbitol (Figura 9A, C-D). O metabolismo de D-(-)-Frutose e N-acetil-D-glicosamina não resultou em uma expressão de fímbrias tipo 1 funcionais na superfície celular da UPEC 76 (Figura 9B).

A sobrevivência bacteriana e o estabelecimento da infecção requerem que os patógenos detectem e respondam aos estímulos ambientais de maneira rápida e apropriada. Embora não costumem ser considerados como determinantes de virulência, o metabolismo desempenha um papel vital durante a infecção no trato urinário, pois a modulação do metabolismo garante sua sobrevivência e replicação (HADJIFRANGISKOU et al., 2011). Além de fazer parte do programa de regulação metabólica simples e flexível necessário para lidar com as mudanças ambientais enfrentadas por UPECs ao longo da trajetória ascendente das infecções no trato urinário atuando através de dois fatores de transcrição (crp e cra), REITZER; ZIMMERN (2019) e LE BOUGUÉNEC; SCHOULER (2011) relataram que o metabolismo da D-(-)-Frutose também parece estar envolvido na expressão das fímbrias tipo 1, o que também foi observado ao longo deste trabalho.

Ao analisar a expressão de fímbrias tipo 1 funcionais na superfície das UPECs crescidas em N-acetil-D-glicosamina e D-(-)-Frutose como fontes únicas de carbono, foi constatado que UPEC 174 apresentou uma quantidade aumentada de tais estruturas ao utilizar N-acetil-D-glicosamina (Figura 9C), e que UPECs 32 e 214 se comportaram de maneiras semelhantes em ambos os contextos (Figura 9A e D, respectivamente). Se comparado com D-(+)-Glicose, UPECs 32 e 174 apresentaram uma expressão aumentada de fímbrias tipo 1 funcionais em N-acetil-D-glicosamina (Figura 9A e C, respectivamente). Tal comportamento não foi observado na UPEC 214 que teve um desempenho similar na presença de N-acetil-D-glicosamina e D-(+)-Glicose (Figura 9D).

3. Concentração Inibitória Mínima

Tabela 4 – Perfil de resistência antimicrobiana.

Linhagens	Resistência antimicrobiana	Classificação
UPEC 32	CIP, CFX, LNZ10, TEC30, TE30	MDR
UPEC 76	AMC2/1, CIP, CFX, LNZ10, PIT36, TEC30	MDR
UPEC 174	AMC2/1, CIP, CFX, LNZ10, TEC30, TE30	MDR
UPEC 214	CIP, CFX, LNZ10, TEC30, TE30	MDR

AMC2/1: Amoxicilina/Ácido clavulânico; CIP: Ciprofloxacina; CFX: Ceftriaxona; LNZ10: Linezolida; PIT36: Piperaciclina/Tazobactam; TEC30: Teicoplanina; TE30: Tetraciclina.

O perfil de resistência antimicrobiano das estirpes foi analisado e a resistência a múltiplos fármacos (MDR) foi definida como estirpes resistente a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012). Todas as linhagens bacterianas utilizadas ao longo deste trabalho foram classificadas como resistentes à múltiplas drogas.

4. Ensaio de Formação de Biofilme em Superfície de Poliestireno

Dada a relevância dos biofilmes para colonização e patogênese de UPECs e a relação direta que há entre as interações mediadas pelas fímbrias tipo 1 e o seu desenvolvimento, foi realizado um ensaio colorimétrico em placa de microtitulação para investigar se a utilização de diferentes fontes de carbono (açúcares) influencia a capacidade que tais micro-organismos possuem de formar biofilme.

Tabela 5 - Capacidade de formação de biofilme que diferentes linhagens de UPECs MDR apresentam em uma superfície de poliestireno.

	UPEC 32	UPEC 76	UPEC 174	UPEC 214
Luria Bertani	+	+	++	+
Urina não filtrada	-	-	+	+
D-(-)-Frutose	+	++	+	+

D-(+)-Glicose	+	+	-	-
β -Lactose	-	++	-	-
N-Acetil-D-Glicosamina	++	++	++	++
D-(+)-Sacarose	-	+	-	-
D-(-)-Sorbitol	-	+	-	-
D-(+)-Trealose dihidratada	+	++	+	+

Todos os açúcares foram usados como suplemento no Meio Mínimo M9 (1X), em uma concentração de 2%. Não produtoras de biofilme (-), produtoras fracas de biofilme (+), produtoras moderadas de biofilme (++), produtoras fortes de biofilme (+++).

Quando crescidas na presença de N-acetil-D-glicosamina como fonte única de carbono, todas as estirpes de UPEC analisadas foram classificadas como produtoras moderadas de biofilme (Tabela 5). É importante ressaltar que entre elas, as UPECs 32 e 174 não utilizaram tal açúcar como fonte única de carbono durante a fase exponencial de seu crescimento (Figura 8E e G, respectivamente), e que UPECs 76 e 214 o utilizaram de maneira muito lenta (Figura 8F e H). Além disso, com exceção da UPEC 76 que não apresentou nenhum título de aglutinação de levedura após ser crescida na presença do N-acetil-D-glicosamina como fonte de única de carbono (Figura 9B), todas as demais estirpes apresentaram uma expressão baixa de fímbrias tipo 1 funcionais em sua superfície (Figura 9A, C-D, respectivamente). Apesar de não utilizar D-(-)-Frutose para crescimento (Figura 8F) ou para otimizar a expressão de fímbrias tipo 1 funcionais em sua superfície celular quando este açúcar está disponível como fonte única de carbono (Figura 9B), UPEC 76 utiliza D-(-)-Frutose para otimizar sua produção de biofilme, sendo classificada como produtora de biofilme moderada (Tabela 5).

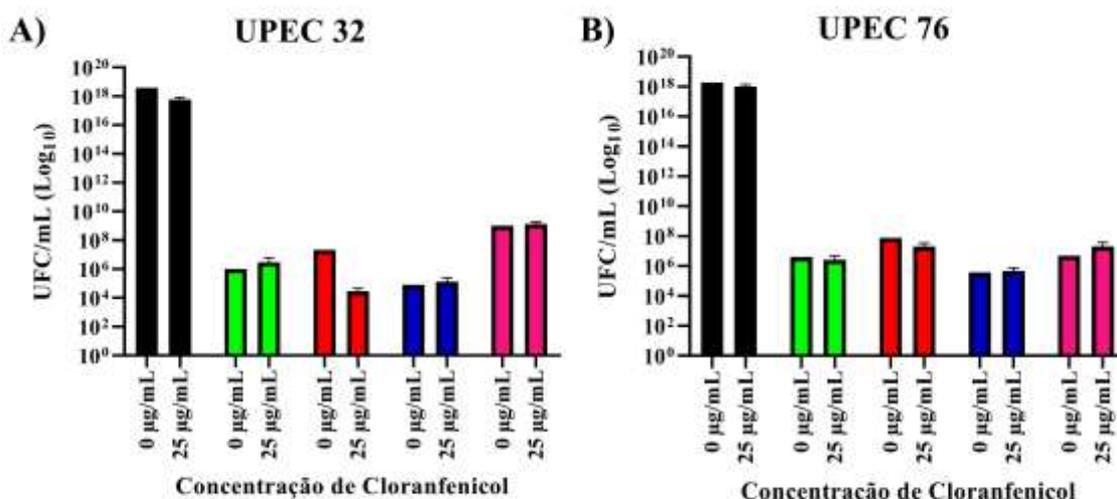
N-acetilglicosamina (GlcNAc), 2-acetamino-2-desoxi- β -D-glicose ou 2-(acetilamino)-2-desoxi-D-glicose (C₈H₁₅NO₆) é um monossacarídeo derivado da glicose que constitui polissacarídeos heterogêneos como glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, entre outros, em todos os sistemas do corpo humano (CHEN; SHEN; LIU, 2010). Glicoproteínas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos que contêm GlcNAc em sua composição podem ser encontrados em membranas mucosas do trato digestivo e urinário, onde estão diretamente envolvidos na interação patógeno-hospedeiro. A presença de N-acetil-D-glicosamina no núcleo de alta

manose presente na superfície luminal das células guarda-chuva da bexiga aumenta a afinidade entre FimH e os resíduos de manose, estabilizando a inserção terminal de manose na cavidade de ligação FimH-manose, o que tem um impacto direto em sua capacidade de produzir biofilme em uma infinidade de superfícies bióticas e abióticas (LUPO; INGERSOLL; PINEDA, 2021).

4. Ensaio de sobrevivência celular em biofilme na presença do cloranfenicol

Até o presente momento, em conjunto, os dados sugerem que o metabolismo de diferentes fontes únicas de carbono influencia a capacidade que diferentes estirpes de UPECs MDR de origem clínica possuem de produzir biofilme. Assim sendo, será que ele também interfere na tolerância aos antibióticos proporcionada pela produção do biofilme?

Para realização deste ensaio, as concentrações mínimas inibitórias de cada uma das linhagens em cada meio de cultura utilizado foram testadas e fixadas em 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura S3).



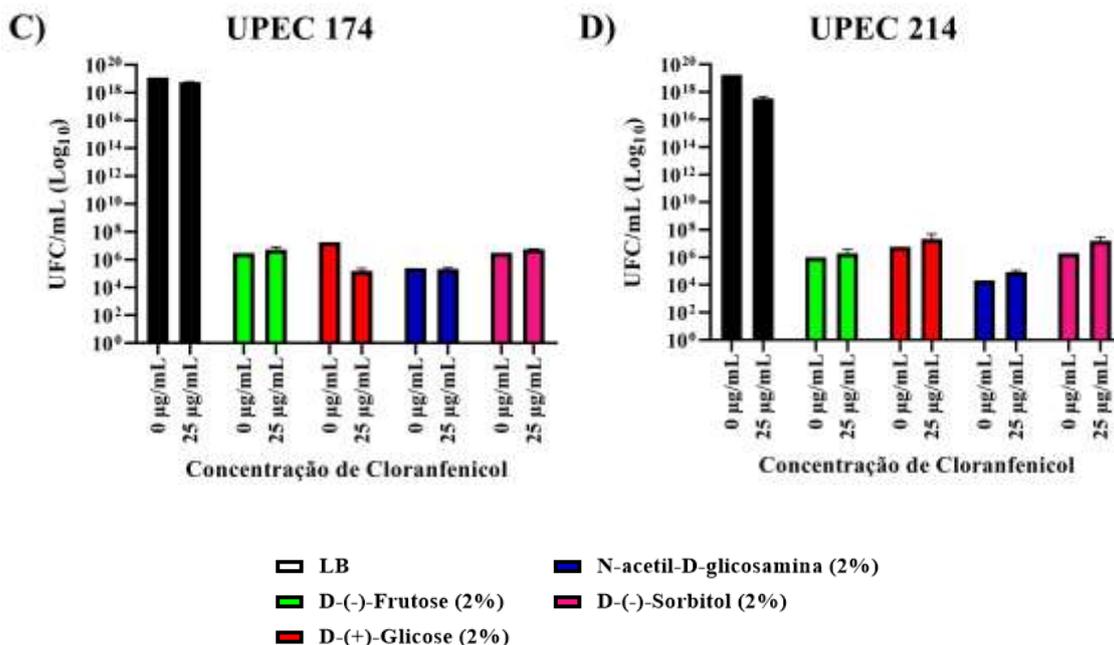


Figura 10 – Unidades formadoras de colônias (UFC) de UPECs MDR recuperadas imediatamente após o tratamento com cloranfenicol em doses inibitórias sob bactérias envolvidas por biofilmes maduros. A) Produção de biofilme realizada por UPEC 32. B) Produção de biofilme realizada por UPEC 76. C) Produção de biofilme realizada por UPEC 174. D) Produção de biofilme realizada por UPEC 214. O antibiótico utilizado ao longo do Ensaio de sobrevivência celular na presença de antibiótico foi o cloranfenicol na concentração de 25 µg/mL. Todas as análises foram realizadas em LB e M9 (1X) suplementado com 2% de D-(-)-Frutose, D-(+)-Glicose, N-acetil-D-glicosamina e D-(-)-Sorbitol como fontes únicas de carbono. Além disso, as estirpes foram submetidas a crescimento estático, em condições anaeróbicas, a 37 °C antes de serem semeadas em LB ágar e armazenadas a 37°C. Para determinar as diferenças estatísticas foi realizado o teste de Mann-Whitney U para comparar as diferenças entre a sobrevivência de células protegidas por biofilmes produzidos quando cultivadas em diferentes fontes de carbono, na presença e na ausência do cloranfenicol a 25 µg/mL ($p < 0,05$).

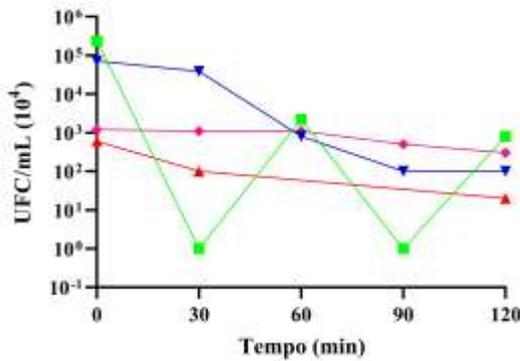
Foi observada uma tendência de aumento na sobrevivência de células envolvidas pelo biofilme quando todas as estirpes analisadas foram crescidas na presença de N-acetil-D-glicosamina e D-(-)-Sorbitol (Figura 10A-D). Esta mesma tendência foi observada quando UPECs 32, 174 e 214 foram crescidas na presença de D-(-)-Frutose (Figura 10A, C-D), e quando UPEC 214 foi crescida em D-(+)-Glicose (Figura 10D). Em conjunto, os dados obtidos corroboram as observações realizadas por PRATT; KOLTER (1998), que demonstrou que *E. coli* forma biofilme em várias superfícies abióticas de forma dependente de nutrientes, todavia, mais estudos são necessários para verificar se tal influência é exercida na quantidade de biofilme produzida, em sua constituição ou na combinação de ambas as variáveis.

Apesar das constatações que aqui estão relatadas, não foi observado nenhuma diferença estatística significativa entre a eficiência dos biofilmes produzidos pelas estirpes crescidas na presença de diferentes fontes de carbono.

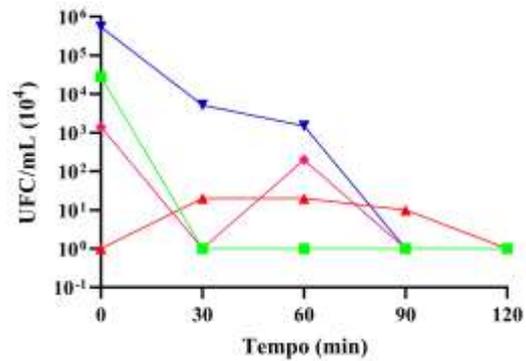
5. Ensaio de sobrevivência celular em sangue e soro

A sobrevivência que diferentes estirpes de UPECs MDR apresentam em sangue humano total e em soro foi observada através da contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) em cinco tempos de incubação: 0, 30, 60,

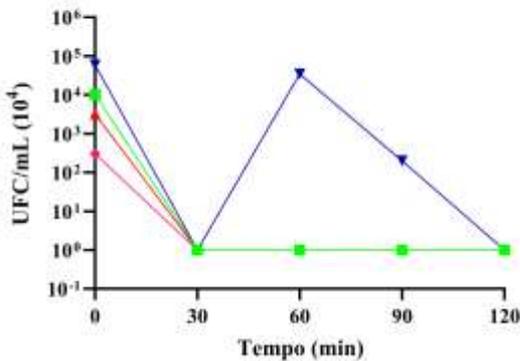
A) UPEC 32: Sangue



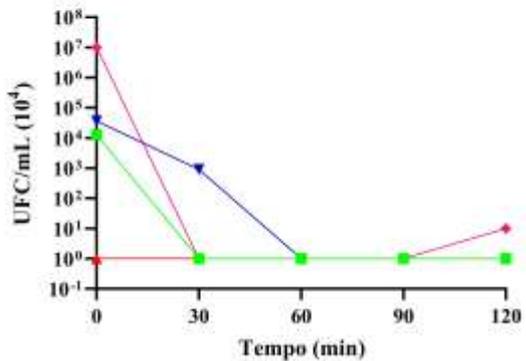
E) UPEC 32: Soro



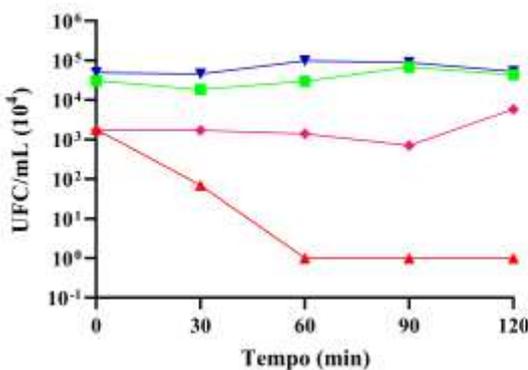
B) UPEC 76: Sangue



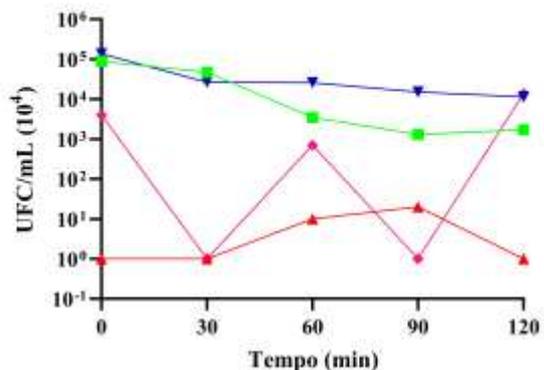
F) UPEC 76: Soro



C) UPEC 174: Sangue



G) UPEC 174: Soro



90 e 120 minutos.

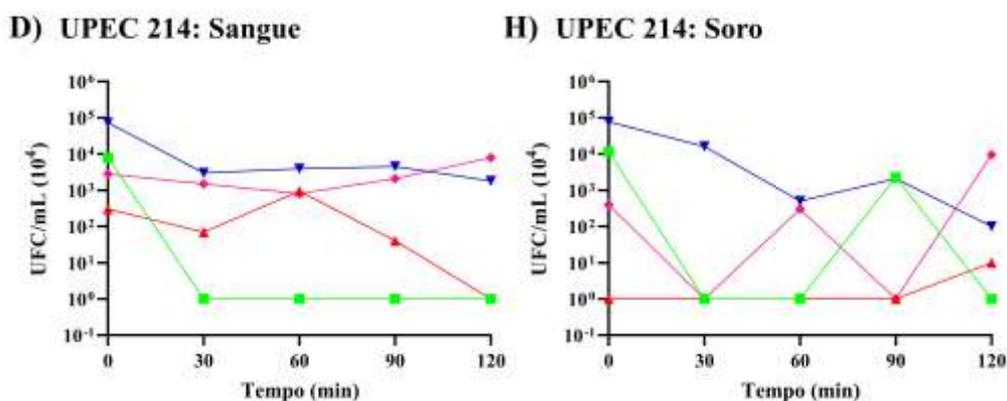


Figura 11 – Unidades formadoras de colônias recuperadas após a incubação dos isolados em um pool de sangue e soro humanos nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. A) Sobrevivência de UPEC 32 em sangue humano total. B) Sobrevivência de UPEC 76 em sangue humano total. C) Sobrevivência de UPEC 174 em sangue humano total. D) Sobrevivência de UPEC 214 em sangue humano total. E) Sobrevivência de UPEC 32 em soro humano. F) Sobrevivência de UPEC 76 em soro humano. G) Sobrevivência de UPEC 174 em soro humano. H) Sobrevivência de UPEC 214 em soro humano. Para essas análises, todas as estirpes foram previamente crescidas em M9 (1X) suplementado com 2% de D-(-)-Frutose, D-(+)-Glicose, N-acetil-D-glicosamina e D-(-)-Sorbitol como fontes únicas de carbono. Em seguida, todas as análises foram realizadas em um pool de sangue humano total e de soro humano obtidos a partir de três doadores saudáveis e suavemente homogeneizados na proporção de 1:1. Além disso, as estirpes foram submetidas a crescimento sob agitação (60rpm) a 37°C. As unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) encontram-se representadas em escala logarítmica (Log_{10}). Para determinar as diferenças estatísticas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ($p < 0,05$).

Quando crescida na presença de D-(-)-Frutose como fonte única de carbono, UPEC 32 apresentou dois momentos de adaptação caracterizado por intensa morte celular ($0 \leq t \leq 30$ minutos e $60 \leq t \leq 90$ minutos) e dois momentos de crescimento exponencial ($30 \leq t \leq 60$ minutos e $t \geq 90$ minutos) quando inserida em sangue humano total (Figura 11A). Ao ser inserida em soro humano, UPEC 32 crescida sob as mesmas condições apresentou um período inicial de morte celular intensa, mostrando-se incapaz de se adaptar à medida que o tempo passou (Figura 11E). O metabolismo de D-(-)-Frutose realizado pela UPEC 174 resultou na manutenção da quantidade celular ao longo do tempo quando ela foi inserida em sangue humano total, mas, ao ser inserida em soro humano, houve um declínio lento e gradual entre 30 e 90 minutos. A partir de 90 minutos, UPEC 174 mostrou-se capaz de manter sua concentração celular constante ao longo do tempo (Figura 11C). Em conjunto, estes dados sugerem que o metabolismo de D-(-)-Frutose realizado pela UPEC 32 e 174 possuem impacto sobre sua capacidade de adaptação e de expressão de fatores de virulência tais como produção de sideróforo

(fator de virulência responsável por sequestrar o ferro predominantemente encontrado como íons complexados com heme, proteínas, ou em complexos inespecíficos em tecidos humanos como o sangue) por ambas e produção de sideróforo e resistência ao soro pela UPEC 174. UPEC 76 (sangue e soro – Figura 11B e F) e UPEC 214 (sangue - Figura 11D) crescidas em D-(-)-Frutose apresentaram um período inicial de morte celular intensa, mostrando-se incapazes de se adaptarem à medida que o tempo passou. Quando UPEC 214 foi inserida em soro humano, ela apresentou um longo período de adaptação caracterizado por morte celular intensa ($0 \leq t \leq 60$ minutos), seguido de um crescimento acelerado ($60 \leq t \leq 90$ minutos), o que sugere que o metabolismo de D-(-)-Frutose realizado por esta estirpe pode estar diretamente envolvido em sua capacidade de adaptação e de expressão do fator de virulência relacionado a resistência ao soro (Figura 11H).

Quando D-(+)-Glicose foi a única fonte de carbono utilizada pela UPEC 32, ela apresentou um decaimento lento e constante em sua quantidade de células viáveis após ser inoculada em sangue humano total (Figura 11A). Em soro humano, UPEC 32 apresentou um crescimento lento ao longo da fase inicial ($0 \leq t \leq 30$ minutos), seguida de decaimento lento ao longo do tempo (Figura 11E). Um comportamento similar foi observado quando as análises foram realizadas para UPEC 174 em sangue humano total (Figura 11C) e em soro humano (Figura 11G), todavia, quando esta foi inoculada em sangue, a sua fase de declínio foi mais acelerada seguida de ausência de adaptação e em soro, o crescimento lento foi observado de forma um pouco mais tardia ($30 \leq t \leq 90$ minutos). Em conjunto, esses dados sugerem que apesar de apresentarem um grau relativamente baixo de resistência ao soro após terem crescido na presença de D-(+)-Glicose como fonte única de carbono, tal metabolismo não está relacionado a expressão de fatores de virulência relacionados a aptidão de tais estirpes em sangue humano total (aerobactina, por exemplo). Quando inserida em sangue humano total e soro humano, UPEC 76 mostrou-se incapaz de sobreviver e se adaptar à medida que o tempo passou (Figura 11B e F, respectivamente). Em sangue humano total, UPEC 214 apresentou um período de adaptação caracterizado por um declínio curto, lento e gradual da quantidade de células viáveis ($0 \leq t \leq 30$ minutos) seguido por uma fase de crescimento igualmente curta, lenta e gradual ($30 \leq t \leq 60$ minutos) mas, em soro humano, UPEC 214 apresentou uma fase de adaptação longa ($0 \leq t \leq 90$ minutos) seguida de uma fase de crescimento lento e gradual ($t \geq 90$ minutos) (Figura 11D e H, respectivamente). Esses

dados sugerem que D-(+)-Glicose não é a fonte de carbono preferencial usada por estirpes de UPECs MDR para aptidão em sangue humano total e soro humano.

O metabolismo de N-acetil-D-glicosamina realizado pela UPEC 32 resultou em um declínio gradual quando esta foi inserida em sangue humano total no intervalo de $0 \leq t \leq 90$ minutos. A partir de 90 minutos, UPEC 32 mostrou-se capaz de manter sua concentração celular constante ao longo do tempo (Figura 11A). Quando UPEC 76 foi crescida e analisada sob as mesmas condições, houve uma fase de adaptação caracterizada por um declínio intenso da quantidade celular seguida por uma fase de crescimento acelerado ($30 \leq t \leq 60$ minutos), mas, ao ser inserida em soro humano, houve um período inicial de morte celular intensa ($t \geq 60$ minutos) seguido de uma ausência de capacidade de adaptação e sobrevivência celular (Figura 11F). O crescimento da UPEC 174 na presença de N-acetil-D-glicosamina como fonte única de carbono resultou na manutenção da quantidade celular ao longo do tempo quando ela foi inserida em sangue e soro humano total (Figura 11C e G, respectivamente), e o crescimento e análise de UPEC 214 sob as mesmas condições resultou em um declínio gradual (Figura 11D e H). Como UPEC 32 e 174 não utilizam o N-acetil-D-glicosamina como fonte de carbono de alto rendimento para crescimento quando este está disponível como única fonte de carbono (Figura 8E e G, respectivamente), os dados sugerem que o metabolismo N-acetil-D-glicosamina está diretamente relacionado à expressão de fatores de virulência necessários para sobrevivência em sangue e soro humano (*aer* e *Trat*), uma vez que quando não assegura a manutenção da quantidade celular viável ao longo do tempo, ela retarda o processo de morte celular.

Além de todas as diferenças relatadas, foi observado que UPEC 174 possui uma capacidade de sobreviver e reproduzir superior em N-acetil-D-glicosamina se comparado ao que foi observado D-(+)-Glicose e D-(-)-Sorbitol quando analisada em sangue humano total (Figura 11C). UPEC 214 apresentou uma aptidão superior em N-acetil-D-glicosamina se comparado a D-(-)-Frutose quando analisada sob as mesmas condições (Figura 11D).

O metabolismo de D-(-)-Sorbitol resultou na manutenção da quantidade de células viáveis quando UPEC 32 foi inserida em sangue humano total (Figura 11A). Quando as mesmas condições foram observadas para UPEC 174, foi observado que após um período de adaptação caracterizado pela manutenção da quantidade de células viáveis ($0 \leq t \leq 90$ minutos) houve um período de crescimento lento ($t \geq 90$ minutos), o

que se assemelhou ao observado para UPEC 214 – a única diferença é que o período de adaptação foi de $0 \leq t \leq 60$ minutos e o de crescimento lento e constante foi a partir de 60 minutos (Figura 11C e D). Em conjunto, esses dados sugerem que o metabolismo de D-(-)-Sorbitol também está relacionado à expressão de fatores de virulência necessários para sobrevivência em sangue humano total em três das quatro estirpes analisadas. Quando inserida em sangue humano total, UPEC 76 apresentou um período inicial de morte celular intensa ($0 \leq t \leq 30$ minutos) mostrando-se incapazes de se adaptarem à medida que o tempo passou (Figura 11B). Em soro humano, UPEC 174 e 214 apresentaram comportamentos análogos, possuindo dois momentos de adaptação ($0 \leq t \leq 30$ minutos e $60 \leq t \leq 90$ minutos) e crescimentos distintos ($30 \leq t \leq 60$ minutos e $t \geq 90$ minutos), e UPEC 32 ($30 \leq t \leq 60$ minutos) e 76 ($t \geq 90$ minutos) demonstraram ter apenas um período de adaptação e crescimento (Figura 11G e H). Em conjunto, os dados sugerem que ao serem crescidas na presença de D-(-)-Sorbitol, todas as estirpes de UPECs MDR possuem uma capacidade aumentada de adaptação em soro humano, o que pode ocorrer graças a comunicação do seu metabolismo com o metabolismo de D-(-)-Frutose que faz parte do programa de regulação metabólica simples e flexível necessário para lidar com as mudanças ambientais enfrentadas por UPECs ao longo da trajetória ascendente das infecções no trato urinário (CONOVER et al., 2016; BURG et al., 1988).

O sangue é um tecido conjuntivo especializado constituído de células suspensas (eritrócitos, leucócitos e trombócitos) em um componente líquido conhecido como plasma. Por ser mantido em constante movimento ao longo de todo o corpo, o sangue atua como um veículo ideal para o transporte de diferentes substâncias entre as células (nutrientes, oxigênio, dióxido de carbono, resíduos, hormônios, calor, corpos imunológicos, entre outros), na regulação da temperatura corporal e na manutenção do equilíbrio ácido-básico e osmótico dos fluidos corporais (GARTNER; HIATT, 2007).

Em um indivíduo saudável, a absorção de nutrientes provenientes do sistema gastrointestinal consiste em várias centenas de gramas de carboidratos (mono e dissacarídeos), 100 g ou mais de gordura (ácidos graxos de cadeias curtas e médias), 50 a 100 g de aminoácidos (aminoácidos livres, di e tripeptídeos), 50 a 100 g de íons (ferro, magnésio, potássio, cálcio, etc) e entre 7 a 8 litros de água por dia, o que faz com que o sangue seja um meio rico para crescimento microbiológico. Responsável por 80% das calorias absorvidas sob a forma de carboidrato, D-(+)-Glicose é o carboidrato mais

abundante na dieta. Os outros 20% são compostos quase inteiramente por D-(+)-Galactose, monossacarídeo derivado do leite, e por D-(-)-Frutose, monossacarídeo derivado da digestão da sacarose oriunda de produtos produzidos à base de cana de açúcar (HALL, 2011). Todavia, uma mudança nos hábitos alimentares tem alterado drasticamente a disponibilidade nutricional, modulando a dinâmica de processos metabólico, imunológicos e inflamatórios inerentes ao hospedeiro (inflamação crônica seguida de dano tecidual inerente a distúrbios metabólicos como diabetes e obesidade, que aumentam a biodisponibilidade de N-acetil-D-glicosamina oriunda das glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos recém degradados no sangue, por exemplo), e a relação com o metabolismo (maior flexibilidade e diversidade metabólica) e a virulência bacteriana (crescimento exacerbado e expressão de fatores de virulência como fímbrias tipo 1, produção de sideróforos e resistência ao soro), favorecendo processos infecciosos.

Aerobactina é um sideróforo produzido em resposta à privação de ferro, que é um dos mecanismos primários de defesa do hospedeiro contra infecções, especialmente no sangue. Embora todos os isolados em análise contenham o gene responsável por codificar tal fator de virulência (*aer*) e três das quatro estirpes possuam o gene associado à resistência ao soro (*trat*), os dados sugerem que estirpes de UPECs MDR obtidas a partir de isolados clínicos de pacientes com quadro de ITUs agudas tendem a apresentar diferentes capacidades de resistir, sobreviver e se reproduzir em sangue humano total e soro humano, quando crescidas na presença de diferentes fontes únicas de carbono, mesmo diante da ausência de diferença estatística significativa entre os comportamentos elucidados.

CONCLUSÃO

As mudanças nos padrões dietéticos que caracterizam a chamada transição nutricional envolvem alterações quantitativas e qualitativas na dieta, incluindo elevado conteúdo energético, com maior participação de gorduras e açúcares de adição, crescimento no consumo de gordura saturada (maior parte de origem animal) e redução no consumo de fibras dietéticas, frutas, hortaliças e cereais. Em 1996, o Departamento de Agricultura Norte Americano definiu que o termo “açúcares de adição” inclui mono,

di e oligossacarídeos acrescentados em alimentos processados com o objetivo de provocar paladar agradável, melhor viscosidade, textura, cor e durabilidade, e preparações farmacêuticas para uso hospitalar envolvendo tratamento de distúrbios metabólicos como diabetes ou suplementação intravenosa. Entre eles, destacam-se os derivados ricos em glicose (açúcar refinado, açúcar mascavo, xarope de glicose, etc), frutose (xarope de milho rico em frutose, frutose líquida, edulcorante a base de frutose, mel, melaço, etc), sorbitol (balas de menta, goma de mascar, alimentos e sucos dietéticos, etc) e N-acetilglicosamina (GAINO; DA SILVA, 2011).

Em condições anaeróbicas todas as UPECs analisadas utilizaram D-(-)-Sorbitol como fonte de carbono de alto rendimento. Três das quatro estirpes analisadas não utilizam D-(-)-Frutose como fonte de carbono para seu crescimento. Os dados obtidos através do Ensaio de Aglutinação de Levedura sugerem que o metabolismo de D-(-)-Frutose tem relação com a expressão de fímbrias tipo 1 funcionais na superfície celular de três das quatro estirpes analisadas. UPEC 76 não utilizou D-(-)-Frutose como fonte de carbono para seu crescimento ou para expressar fímbrias tipo 1 funcionais. Todas as UPECs analisadas são classificadas como produtoras moderadas de biofilme quando crescidas em N-acetil-D-glicosamina. Três das quatro estirpes apresentaram uma capacidade aumentada de sobreviver em sangue e soro ao utilizar N-acetil-D-glicosamina como fonte única de carbono e duas delas não utilizaram tal açúcar para seu crescimento. Em conjunto, nossos dados sugerem que o metabolismo de diferentes fontes de carbono (açúcares) modula a expressão de fatores de virulência como o crescimento exacerbado, a expressão de fímbrias tipo 1 funcionais, a produção de biofilme e a resistência ao soro em diferentes estirpes de UPECs MDRs oriundas da comunidade, sugerindo que a abundância de fontes de carbono cujo metabolismo é incompleto e a taxa de absorção é menor (WELLS; VOSSELLER; HART, 2003), tem exercido uma pressão seletiva preocupante em enterobactérias de origem comensal como *E. coli*.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O entendimento de como a nutrição e o metabolismo de linhagens de UPECs MDR atua na coordenação da expressão de conjuntos complementares de

fatores de virulência é crucial para otimizar a compreensão e o manejo de sua patogênese, gerando o embasamento necessário para o futuro estabelecimento de abordagens terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por UPECs MDR.

O desempenho superior que diferentes estirpes de UPECs MDR apresentou ao utilizar diversas fontes únicas de carbono que não D-(+)-Glicose ao longo dos vários estágios das ITUs, trouxe à tona a necessidade de examinar mais profundamente a expressão gênica associada ao metabolismo e à expressão de fatores de virulência durante etapas chave de ITUs. Para isso, sugere-se o uso de PCR quantitativa utilizando estirpes selvagens e mutantes para os genes de interesse.

O uso do D-(-)-Sorbitol como fonte de carbono de alto rendimento durante as etapas iniciais de ITUs, antes mesmo do estabelecimento de UPECs MDR como complexos intracelulares de comunidades bacterianas, e o impacto que o metabolismo de tal açúcar gerou na expressão de fatores de virulência como produção de fímbrias tipo 1 funcionais, sobrevivência celular em biofilme na presença do cloranfenicol e sobrevivência em sangue e soro, elucidou a carência na compreensão de como se dá o uso do D-(-)-Sorbitol na expressão dos diferentes fatores de virulência de UPECs MDR. Nesse contexto, sugere-se uma descrição mais detalhada da rota metabólica do D-(-)-Sorbitol, e a construção e caracterização de linhagens nocautes e complementares para genes associados ao metabolismo do D-(-)-Sorbitol, com o intuito de verificar o efeito da deleção dos genes de interesse na expressão da fímbria tipo 1, produção de sideróforos, resistência ao soro e adesão e invasão em células epiteliais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular-Abbas 8ed-2*. Elsevier Ed Ltda, v. 8, 2015.

ABE, Cecilia M. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 397-406, 2008.

ABRAHAM, Soman N.; MIAO, Yuxuan. The nature of immune responses to urinary tract infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 655-663, 2015.

AGARWAL, J.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. **Indian journal of medical microbiology**, v. 30, n. 2, p. 141-149, 2012.

ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010.

ALTERI, Christopher J.; MOBLEY, Harry LT. Metabolism and fitness of urinary tract pathogens. **Metabolism and Bacterial Pathogenesis**, p. 215-230, 2015.

BARREIROS, Rodrigo Crespo; BOSSOLAN, Grasiela; TRINDADE, Cleide Enoir Petean. Fructose in humans: metabolic effects, clinical utilization, and associated inherent errors. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005.

BILLIPS, Benjamin K.; SCHAEFFER, Anthony J.; KLUMPP, David J. Molecular basis of uropathogenic *Escherichia coli* evasion of the innate immune response in the bladder. **Infection and immunity**, v. 76, n. 9, p. 3891-3900, 2008.

BOUATRA, Souhaila et al. The human urine metabolome. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73076, 2013.

BURG, Maurice B. et al. Sorbitol, osmoregulation, and the complications of diabetes. *The Journal of clinical investigation*, v. 81, n. 3, p. 635-640, 1988

CARRARO-EDUARDO, José Carlos; GAVA, Isabela Ambrosio. O uso de vacinas na profilaxia das infecções do trato urinário. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 34, n. 2, p. 178-183, 2012.

CHAN, Carly CY; LEWIS, Ian A. Role of metabolism in uropathogenic *Escherichia coli*. **Trends in Microbiology**, 2022

- CHAUDHURI, Roy R.; HENDERSON, Ian R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 214-226, 2012.
- CHEN, Jue. Molecular mechanism of the *Escherichia coli* maltose transporter. **Current opinion in structural biology**, v. 23, n. 4, p. 492-498, 2013.
- CHEN, Jeen-Kuan; SHEN, Chia-Rui; LIU, Chao-Lin. N-acetylglucosamine: production and applications. **Marine drugs**, v. 8, n. 9, p. 2493-2516, 2010.
- CLERMONT, Olivier et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental microbiology reports**, v. 5, n. 1, p. 58-65, 2013.
- CHRISTAKI, Eirini; MARCOU, Markella; TOFARIDES, Andreas. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of molecular evolution**, v. 88, n. 1, p. 26-40, 2020.
- CONOVER, Matt S. et al. Metabolic requirements of *Escherichia coli* in intracellular bacterial communities during urinary tract infection pathogenesis. *MBio*, v. 7, n. 2, p. e00104-16, 2016.
- CORDEIRO, Mírian Megda; CHAGAS, Thaynan Aparecida Bueno; DALA-PAULA, Bruno Martins. Polióis como substitutos à sacarose: obtenção, características químicas e implicações à saúde Polyols as substitutes for sucrose: production, chemical characteristics, and health implications.
- DELEO, Frank R. et al. Survival of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 in human blood. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e02533-16, 2017.
- DOI, Yohei; IOVLEVA, Alina; BONOMO, Robert A. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. **Journal of travel medicine**, v. 24, n. suppl_1, p. S44-S51, 2017.
- DUNCAN, Matthew J. et al. Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18944-18951, 2004.
- FLORES-MIRELES, Ana L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269-284, 2015.

GAINO, Natalia Moreno; DA SILVA, Marina Vieira. Consumo de frutose e impacto na saúde humana. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 88-98, 2011.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de histologia. 3^a. Ed. **Rio de Janeiro: Guanabara**, 2007.

GONÇALVES, Laura Fernandes et al. Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 6, p. 1-4, 2016.

HADJIFRANGISKOU, Maria et al. A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1516-1529, 2011

HALL, Isaac E. et al. Urine cystatin C as a biomarker of proximal tubular function immediately after kidney transplantation. **American journal of nephrology**, v. 33, n. 5, p. 407-413, 2011.

HALL, John E. **Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica**. Elsevier Health Sciences, 2011.

JACKSON, Debra W.; SIMECKA, Jerry W.; ROMEO, Tony. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 12, p. 3406-3410, 2002.

KLEMBERG, Vivian Souza et al. Trehalose metabolism influences in *Escherichia coli* strain MT78 type 1 fimbriae production. **Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada (13.: 2021: Porto Alegre). Anais. Porto Alegre: UFRGS, 2021.**, 2021.

KNIGHT, Stefan D.; BOUCKAERT, Julie. Structure, function, and assembly of type 1 fimbriae. **Glycoscience and Microbial Adhesion**, p. 67-107, 2009.

LE BOUGUÉNEC, Chantal; SCHOULER, Catherine. Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 1, p. 1-6, 2011.

LEIMBACH, Andreas; HACKER, Jörg; DOBRINDT, Ulrich. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. **Between pathogenicity and commensalism**, p. 3-32, 2013.

LOCK, Graziela de Araújo. Infecções bacterianas associadas a biofilmes em superfícies bióticas: critérios diagnósticos, tratamentos e perspectivas. 2015.

LUPO, Federico; INGERSOLL, Molly A.; PINEDA, Miguel A. The glycobiology of uropathogenic *E. coli* infection: the sweet and bitter role of sugars in urinary tract immunity. **Immunology**, v. 164, n. 1, p. 3-14, 2021.

MADIGAN, Michael T. et al. Microbiologia de Brock-14ª Edição. **Artmed Editora**, 2016.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MATYSIK, Artur; KLINE, Kimberly A. Streptococcus pyogenes capsule promotes microcolony-independent biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 201, n. 18, p. e00052-19, 2019.

MCENTEE, KEVIN. Genetic analysis of the Escherichia coli K-12 srl region. *Journal of Bacteriology*, v. 132, n. 3, p. 904-911, 1977.

MIGUEL, Mariana de Resende Damas Cardoso. Avaliação do papel dos receptores de reconhecimento de padrões Dectina-2 e Dectina-3 na infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis*. 2019.

MILANI, Christian et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 81, n. 4, p. e00036-17, 2017.

MOBLEY, Harry LT; DONNENBERG, Michael S.; HAGAN, Erin C. Uropathogenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, v. 3, n. 2, 2009.

MONOD, Jacques. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. 1942.

MOREIRA DA SILVA, Rafaella Christina Rocha et al. Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasília, Brazil. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 9, p. 61-67, 2017.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2022.

NEMETH, Judith; MUCKLE, C. Anne; LO, Reggie YC. Serum resistance and the traT gene in bovine mastitis-causing *Escherichia coli*. **Veterinary microbiology**, v. 28, n. 4, p. 343-351, 1991.

NETHE, Micha et al. Focal-adhesion targeting links caveolin-1 to a Rac1-degradation pathway. **Journal of cell science**, v. 123, n. 11, p. 1948-1958, 2010.

NIKAIDO, Hiroshi. Multidrug resistance in bacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 119-146, 2009.

OLIVEIRA, Rafael David de; GOMEZ, José Gregório Cabrera; CARRILLO LE ROUX, Galo Antonio. Design ótimo de experimentos empregando carbono marcado em *Pseudomonas sp.* LFM046. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 5, p. 4715-4718, 2018.

PALIY, Oleg; GUNASEKERA, Thusitha S. Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, p. 1169-1172, 2007.

PAULA, Cleber Jacob Silva de. Fatores de virulência, resistência antimicrobiana em isolados de *Escherichia coli* provenientes do trato genito-urinário de humano e das fezes de seus animais de companhia. 2012

PAK, Joanne et al. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 13, p. 9924-9930, 2001.

PELKMANS, Lucas; HELENIUS, Ari. Endocytosis via caveolae. **Traffic**, v. 3, n. 5, p. 311-320, 2002.

PETTERSEN, Veronika Kuchařová et al. Coordination of metabolism and virulence factors expression of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* purified from blood cultures of patients with sepsis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 9, p. 2890-2907, 2016.

PRATT, Leslie A.; KOLTER, Roberto. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285-293, 1998.

RATLEDGE, Colin. Iron metabolism and infection. **Food and nutrition bulletin**, v. 28, n. 4_suppl4, p. S515-S523, 2007.

REDDY, Vamsee S. et al. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. **The FEBS journal**, v. 279, n. 11, p. 2022-2035, 2012

REITZER, Larry; ZIMMERN, Philippe. Rapid growth and metabolism of uropathogenic *Escherichia coli* in relation to urine composition. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 1, p. e00101-19, 2019.

ROBINSON, Anne E.; HEFFERNAN, James R.; HENDERSON, Jeffrey P. The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. **Future microbiology**, v. 13, n. 07, p. 745-756, 2018.

RUSSELL SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Coldspring Harbour. 2001.

SEZONOV, Guennadi; JOSELEAU-PETIT, Danièle; D'ARI, Richard. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746-8749, 2007.

SUBASHCHANDRABOSE, Sargurunathan; MOBLEY, Harry LT. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. **Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management**, p. 235-261, 2017.

SCHWAB, Sebastian; JOBIN, Katarzyna; KURTS, Christian. Urinary tract infection: recent insight into the evolutionary arms race between uropathogenic *Escherichia coli* and our immune system. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 32, n. 12, p. 1977-1983, 2017.

SHARMA, G. et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 2, p. 309-319, 2016.

SHILTON, Brian H. Active transporters as enzymes: an energetic framework applied to major facilitator superfamily and ABC importer systems. **Biochemical Journal**, v. 467, n. 2, p. 193-199, 2015

STAMM, Walter E.; NORRBY, S. Ragnar. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. Supplement_1, p. S1-S4, 2001.

STEPANOVIĆ, Srdjan et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

TAYLOR, P. W. Immunochemical investigations on lipopolysaccharides and acidic polysaccharides from serum-sensitive and serum-resistant strains of *Escherichia coli* isolated from urinary-tract infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 405-421, 1976.

TENDENCIA, Eleonor. Disk diffusion method. In: **Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment**. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, 2004. p. 13-29.

TENAILLON, Olivier et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207-217, 2010.

TERLIZZI, Maria E.; GRIBAUDO, Giorgio; MAFFEI, Massimo E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1566, 2017.

THOMAS, Candice M.; SMART, Eric J. Caveolae structure and function. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 3, p. 796-809, 2008.

TOLKER-NIELSEN, Tim. Biofilm development. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 2, p. 3.2. 21, 2015.

TOTSIKA, Makrina et al. Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection. **Current drug targets**, v. 13, n. 11, p. 1386-1399, 2012.

VIEIRA, Mônica Aparecida Midolli. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

WELLS, L.; VOSSELLER, K.; HART, Gerald Warren. A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, p. 222-228, 2003.

WESTERLUND, Benita et al. P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* as multifunctional adherence organelles. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 278, n. 2-3, p. 229-237, 1993.

WILES, Travis J.; KULESUS, Richard R.; MULVEY, Matthew A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and molecular pathology**, v. 85, n. 1, p. 11-19, 2008.

WILSON, Briana R. et al. Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 12, p. 1077-1090, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. World health statistics 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. 2022

WULLT, Björn et al. The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. **International journal of antimicrobial agents**, v. 19, n. 6, p. 522-538, 2002.

YOSIEF H.O.; WEISS A.A.; IYER S.S. Capture of Uropathogenic *E. coli* by Using Synthetic Glycan Ligands Specific for the Pap-Pilus. **ChemBioChem**, v. 14, n. 2, p. 251-259, 2013.

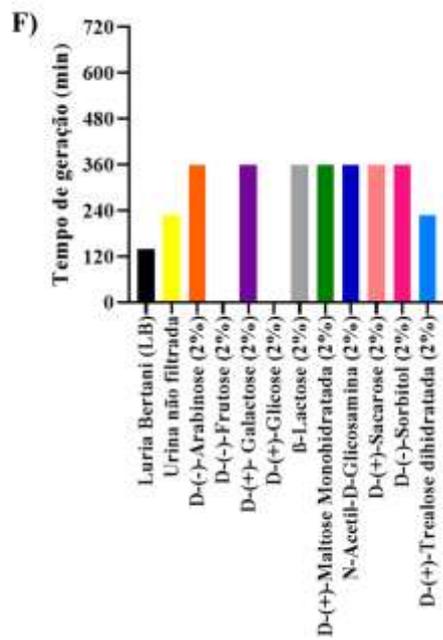
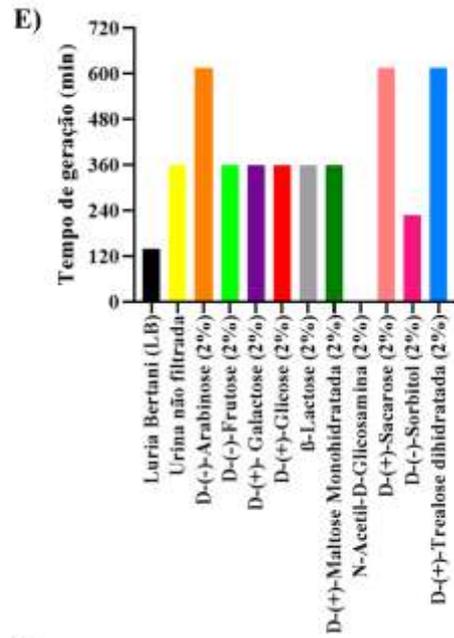
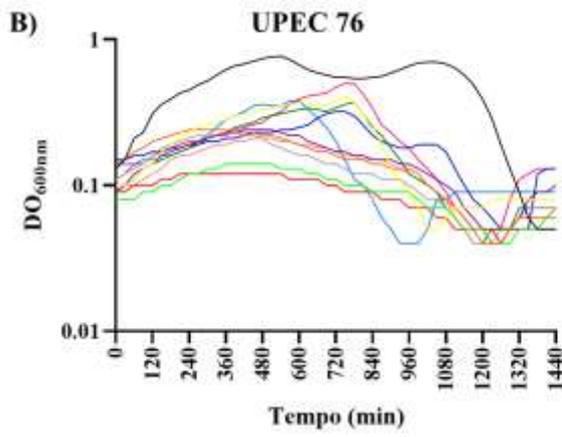
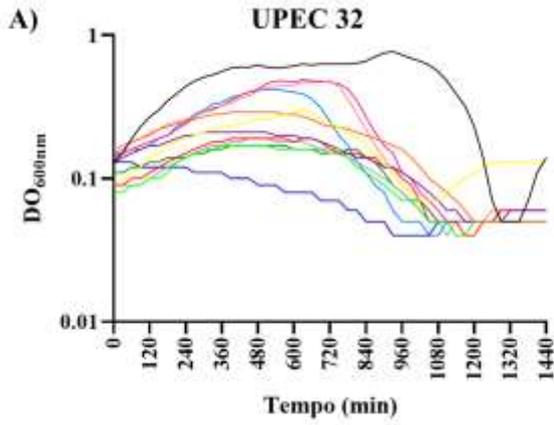
MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 – Meio de cultura utilizado por experimento.

	<i>Fitness</i> bacteriano	Concentração inibitória mínima	Aglutinação de levedura (3%)	Formação de biofilme em superfície de polipropileno	Concentração inibitória mínima de cloranfenicol	Sobrevivência celular em biofilme na presença de cloranfenicol	Sobrevivência em sangue e soro humano
LB	+	+	+	+	-	+	-
Urina não filtrada	+	-	+	+	-	-	-
D-(-)-Arabinose	+	-	-	-	-	-	-
D-(-)-Frutose	+	-	+	+	-	+	+
D-(+)-Galactose	+	-	-	-	-	-	-
D-(+)-Glicose	+	-	+	+	+	+	+

β-Lactose	+	-	-	+	-	-	-
D-(+)-Maltose Monohidratado	+	-	-	-	-	-	-
N-Acetil-D- Glicosamina	+	-	+	+	+	+	+
D-(+)-Sacarose	+	-	-	+	-	-	-
D-(-)-Sorbitol	+	-	+	+	+	+	+
D-(+)-Trealose dihidratada	+	-	-	+	-	-	-

Meio de cultura utilizado (+); Meio de cultura não utilizado (-)



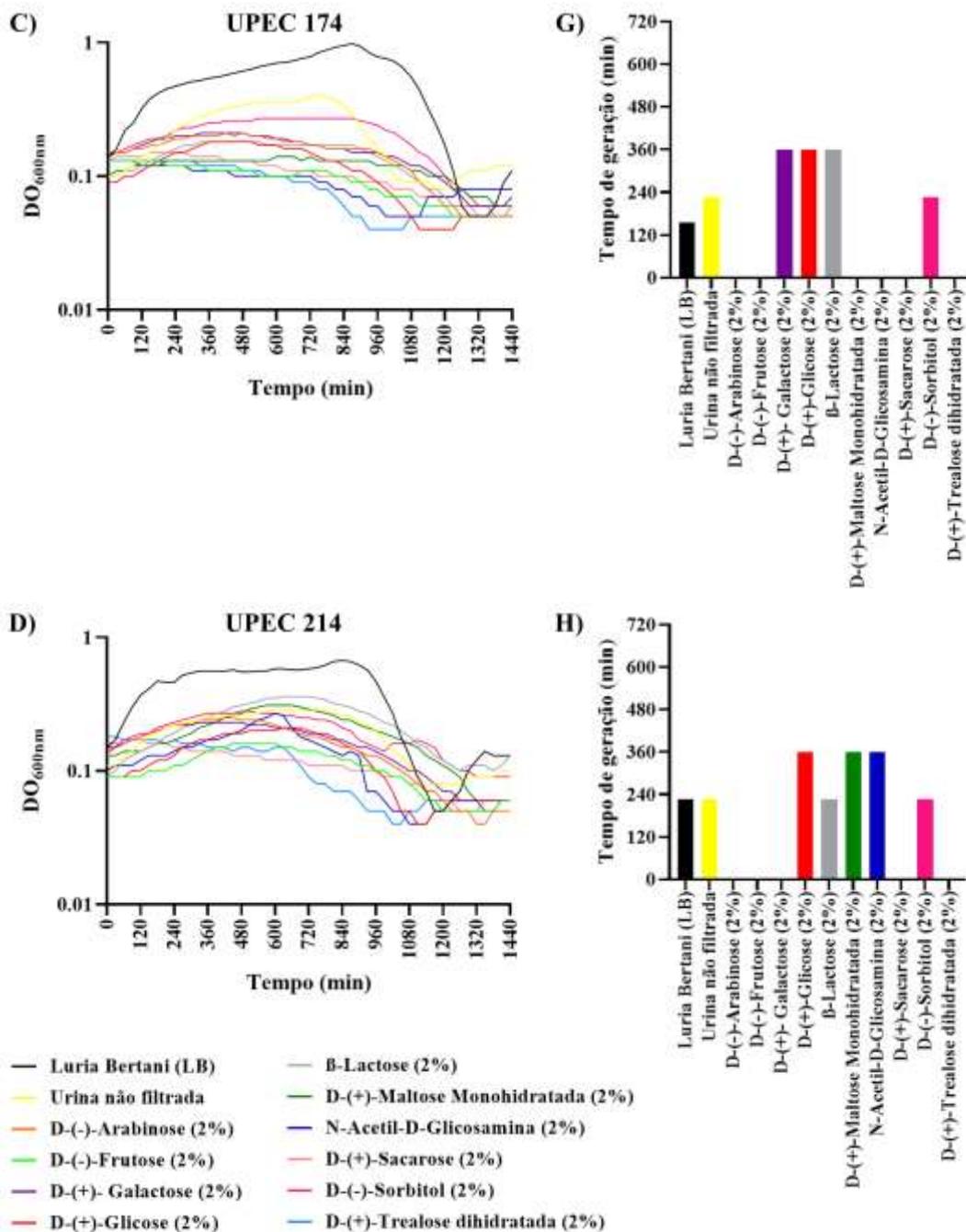
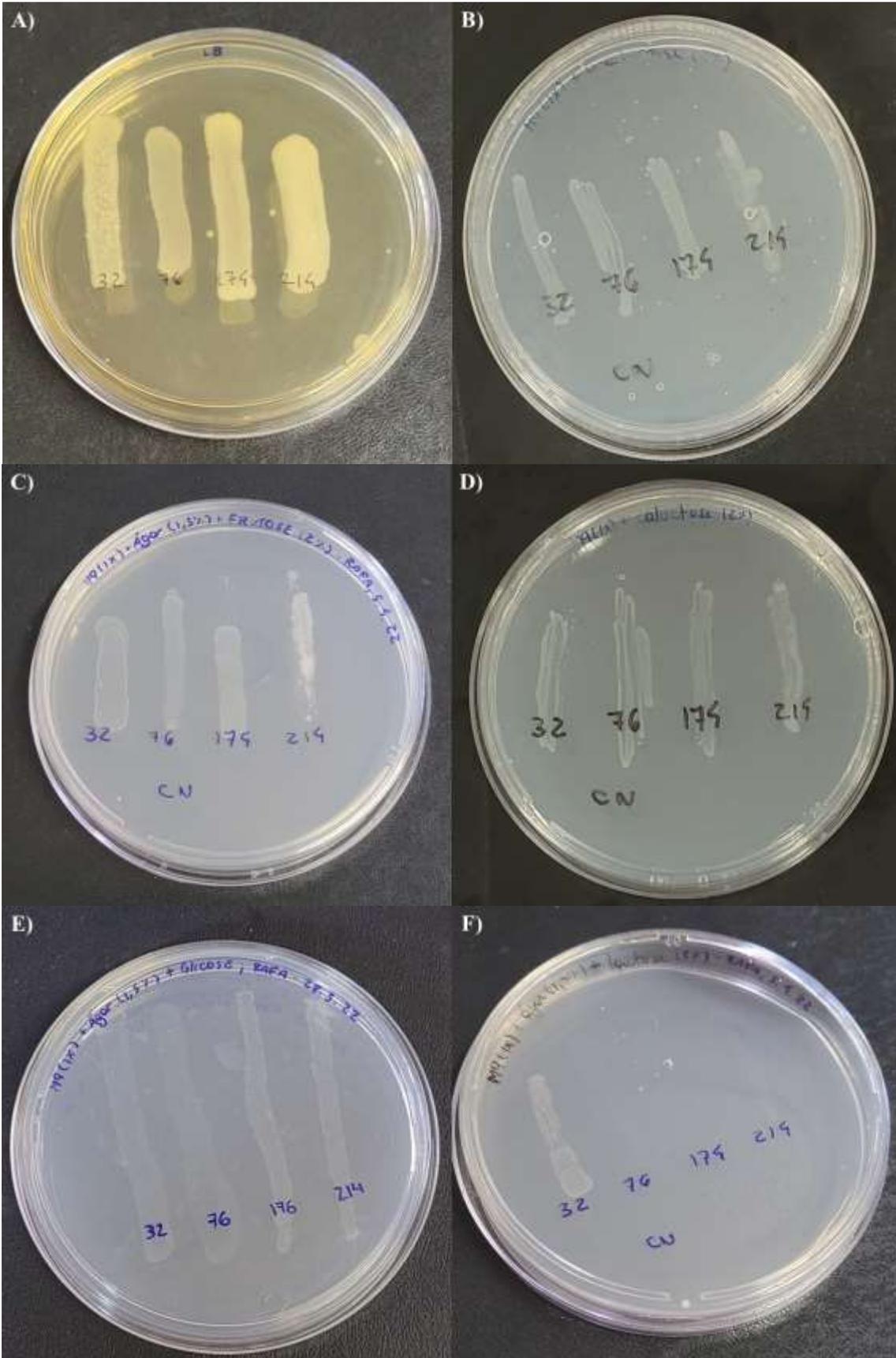


Figura S1 – UPEC MDR usa diferentes fontes únicas de carbono para crescimento em condições anaeróbicas. A) Cinética de crescimento de UPEC 32. B) Cinética de crescimento de UPEC 76. C) Cinética de crescimento de UPEC 174. D) Cinética de crescimento de UPEC 214. E) Tempo de geração da fase exponencial de UPEC 32. F) Tempo de geração da fase exponencial de UPEC 76. G) Tempo de geração da fase exponencial de UPEC 174. H) Tempo de geração da fase exponencial de UPEC 214. Todas as análises foram realizadas em LB, urina não filtrada e M9 (1X) suplementado com 2% de D-(-)-Arabinose, D-(-)-Frutose, D-(+)-Galactose, D-(+)-Glicose, β-Lactose, D-(+)-Maltose Monohidratada, N-acetil-D-glicosamina, D-(+)-Sacarose, D-(-)-Sorbitol e D-(+)-Trealose dihidratada como fontes únicas de carbono. Além disso, as estirpes foram submetidas a crescimento estático, em condições anaeróbicas, a 37°C. As cinéticas de crescimento encontram-se representadas por valores de DO_{600nm} em escala logarítmica (Log₁₀)



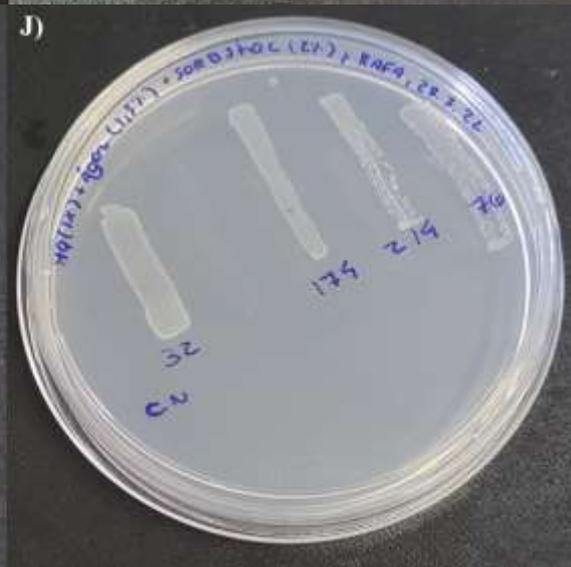
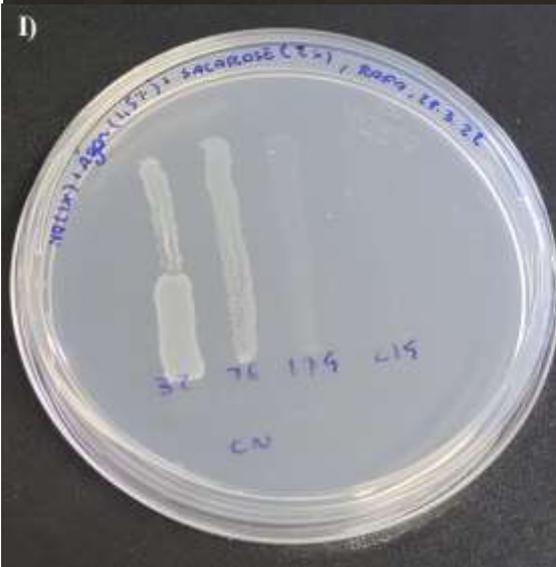


Figura S2 – Crescimento em estria das estirpes de UPECs MDR ao longo deste trabalho. A) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em LB. B) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em D-(-)-Arabinose. C) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em D-(-)-Frutose. D) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em D-(+)-Galactose. E) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em D-(+)-Glicose. F) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em β -Lactose. G) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em D-(+)-Maltose monohidratado. H) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em N-Acetil-D-Glicosamina. I) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em D-(+)-Sacarose. J) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em D-(-)-Sorbitol. K) Crescimento em estria das quatro estirpes de UPECs MDR em D-(+)-Trealose dihidratada. As estirpes foram submetidas a crescimento estático, em condições anaeróbicas, a 37 °C. As concentrações celulares foram padronizadas para 10^7 ($0,1 \leq DO_{600nm} \leq 0,2$) antes das estirpes serem submetidas ao crescimento em estria, estático, em condições anaeróbicas, a 37 °C por 18 horas.

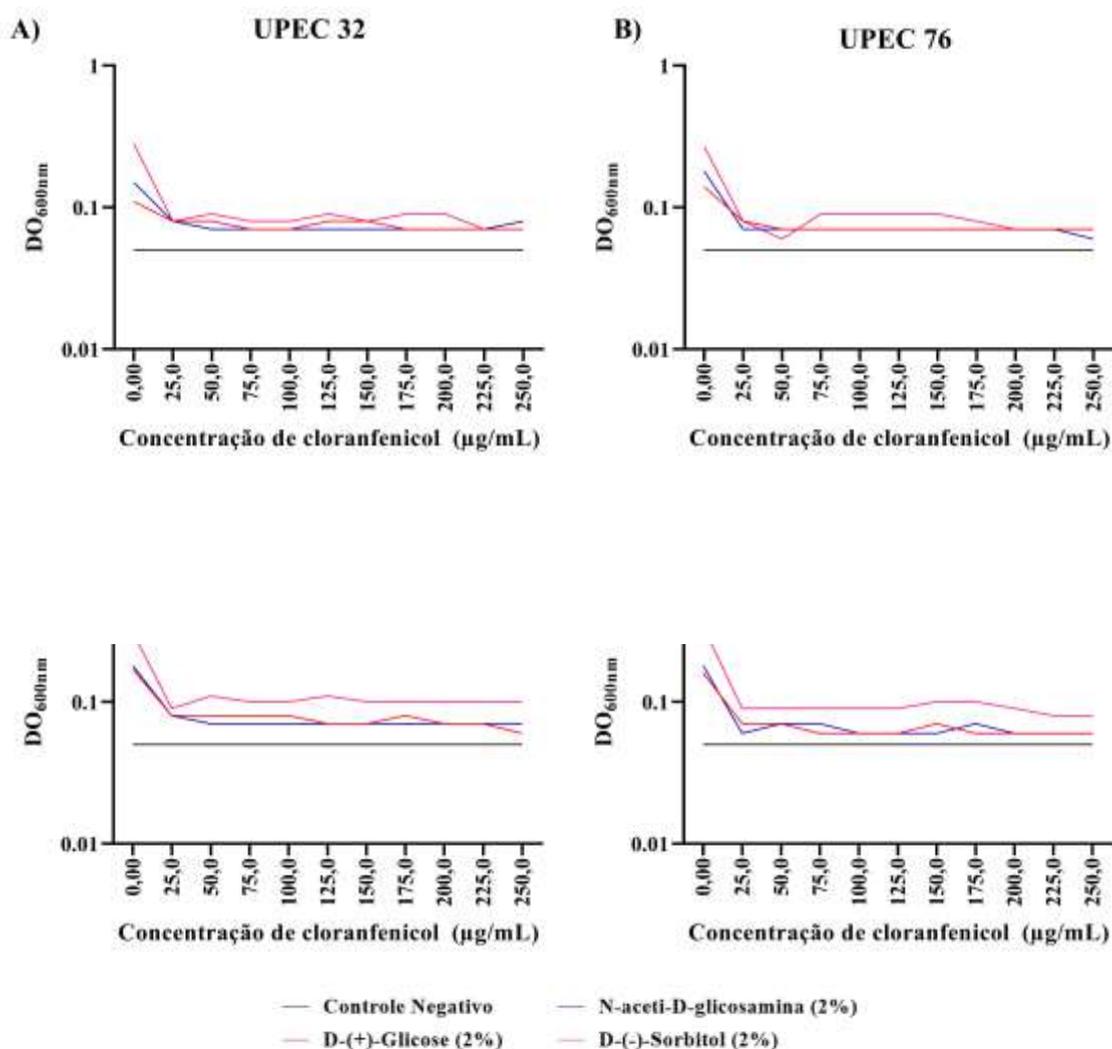


Figura S3 – O crescimento das estirpes de UPECs MDR utilizadas foi inibido na presença de 25 µg/mL de cloranfenicol. A) Concentração mínima inibitória da UPEC 32. B) Concentração mínima inibitória da UPEC 76. C) Concentração mínima inibitória da UPEC 174. D) Concentração mínima inibitória da UPEC 214. O antibiótico utilizado para determinação do CIM foi o cloranfenicol na concentração de 25 µg/mL. Todas as análises foram realizadas em M9 (1X) suplementado com 2% de D-(+)-Glicose, N-acetil-D-glicosamina e D-(-)-Sorbitol como fontes únicas de carbono. Além disso, as estirpes foram submetidas a crescimento estático, em condições anaeróbicas, a 37 °C e suas concentrações celulares foram padronizadas para 10^7 ($0,1 \leq DO_{600nm} \leq 0,2$) antes de serem submetidas ao crescimento em meio de cultura contendo 25 µg/mL de cloranfenicol.