

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

João Pedro Stepan Wagner

**A função do operon do metabolismo de β -glicosídeos na aptidão e virulência da cepa de
Escherichia coli extraintestinal MT78.**

Porto Alegre

2019

João Pedro Stepan Wagner

**A função do operon do metabolismo de β -glicosídeos na aptidão e virulência da cepa de
Escherichia coli extraintestinal MT78**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências biológicas.

Orientadora: Fabiana Horn

Co-orientador: Daniel Brisotto Pavanelo

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

STEPAN WAGNER, JOÃO PEDRO

A função do operon do metabolismo de β -glicosídeos na aptidão e virulência da cepa de *Escherichia coli* extraintestinal MT78. / JOÃO PEDRO STEPAN WAGNER. -- 2019.

34 f.

Orientadora: Fabiana Horn.

Coorientador: Daniel Brisotto Pavanelo.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. ExPEC. 2. Microbiologia molecular. 3. Metabolismo de β -glicosídeos. 4. Virulência. 5. MT78. I. Horn, Fabiana, orient. II. Brisotto Pavanelo, Daniel, coorient. III. Título.

*"Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros
de gigantes."*

- Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, por tudo.

Às minhas avós, aos meus padrinhos e a minha prima Duda.

A todos meus amigos e colegas de laboratório, Rosana, Tobias, Simone, Vivian e Letícia, por todos os momentos juntos, toda ajuda e suporte.

Aos meus amigos Luís, Douglas, Dener, Roberta, Renata, Nikolas, Camila, Igor e Cristiane sem vocês o curso não teria sido o mesmo, o apoio e a companhia de vocês foi essencial pra mim.

A todos do grupo escoteiro Marechal Osório 56 RS, por me proporcionar experiências incríveis com as quais pude aprender muito.

Ao meu amigo Cláudio por compreender minha ausência.

À Nádia, por todo carinho e compreensão.

Ao meu co-orientador Daniel, pelos ensinamentos, pela paciência, didática e compreensão ao longo do tempo que trabalhamos juntos e pela disposição sempre que precisei de ajuda ao longo desse projeto.

À minha orientadora, Fabiana, pela oportunidade da iniciação científica, que me proporcionou experiências de aprendizado tão importantes quanto qualquer aula que tive durante o curso mas, principalmente pela confiança, apoio e tolerância ao longo desses anos.

RESUMO

O operon *bgl* codifica as enzimas responsáveis pelo metabolismo de β -glicosídeos, como salicina e arbutina, na bactéria *Escherichia coli*. Entretanto, estudos apontam uma possível relação deste operon com a virulência de *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC). Em estudos anteriores, um mutante da ExPEC aviária MT78, que teve operon *bgl* deletado, apresentou atenuação da virulência tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que sugere uma influência do operon na virulência desta cepa. O objetivo deste estudo foi analisar a influência do operon *bgl* na virulência da cepa MT78 e tentar elucidar os mecanismos pelos quais essa influência pode estar ocorrendo. Primeiramente, a funcionalidade do operon *bgl* na cepa MT78 foi confirmada através de testes de fermentação de β -glicosídeos e, então, o mutante MT78 Δ *bgl* foi submetido a testes fenotípicos para adesinas e motilidade. Constatou-se que não há alteração na produção de fímbria do tipo 1, porém há redução na motilidade do mutante. Verificou-se também que a cepa MT78 é capaz de hemaglutinação resistente à manose, mas o ensaio não foi capaz de quantificar se há alteração na hemaglutinação no mutante MT78 Δ *bgl* em comparação à selvagem. Outro mutante estudado, o MT78 *bglB*::Tn5 (20E12), apresentou uma atenuação na virulência ainda maior que o MT78 Δ *bgl*, além de não expressar fímbria do tipo 1. Afim de verificar se possuía outras mutações que explicassem o fenótipo observado, ele foi recriado por meio de outra técnica. Confirmou-se então, pelo novo mutante, que a inserção do transposon Tn5 apenas no gene *bglB* foi responsável por abolir a expressão de fímbria do tipo 1, o que pode explicar a maior atenuação da adesão e invasão *in vitro* a células não-fagocitárias. Por fim, deu-se início à tentativa de criação de complementados do mutante MT78 Δ *bgl* com diferentes combinações dos genes do operon, que podem ajudar a elucidar os mecanismo(s) pelo(s) qual(is) o operon *bgl* influencia a virulência em ExPEC.

ABSTRACT

The *bgl* operon encodes enzymes responsible for the metabolism of β -glycosides, such as salicin and arbutin, in *Escherichia coli*. In addition to its metabolic role, studies indicate a possible relationship of this operon with virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC). In our previous studies, a mutant of the avian ExPEC strain MT78 that had the *bgl* operon deleted showed attenuation of virulence both *in vitro* and *in vivo*. Therefore, the aim of this study was to analyze the influence of *bgl* operon on virulence of the MT78 strain and try to elucidate the mechanisms by which this influence occurs. The functionality of *bgl* operon in MT78 strain was first confirmed by fermentation of β -glycosides. Then, the MT78 Δ *bgl* mutant was subjected to a few distinct phenotypic tests for adhesins and motility. It was found that there was no change in type 1 fimbriae production, but there was a reduction in the motility of the mutant compared to the wild type. It was also found that the MT78 strain was capable of mannose-resistant hemagglutination, but the assay was not sensitive enough to quantify if there was a change in hemagglutination in the MT78 Δ *bgl* mutant. Another mutant studied, MT78 *bglB*::Tn5 (20E12), showed an even greater attenuation in virulence than MT78 Δ *bgl*, and did not produce type 1 fimbriae. In order to verify if 20E12 had other Tn5 insertions that could explain its phenotype, the mutant was recreated by another technique. The new mutant confirmed that the Tn5 insertion only into the *bglB* gene was sufficient to abolish type 1 fimbriae expression, which may explain the observed greater attenuation of adhesion and invasion in non-phagocytic cell assays. Finally, attempts are under way to complement the mutant MT78 Δ *bgl* with distinct combinations of the genes of the operon, that will help to elucidate the mechanisms by which the *bgl* operon influences virulence in ExPEC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–Ilustração do operon <i>bgl</i> da cepa MT78 e seus mutantes.....	13
Figura 2– Teste de fermentação de β -glicosídeos.....	22
Figura 3 – Título de aglutinação.....	23
Figura 4 – Representação do fenótipo de hemaglutinação observado.....	24
Figura 5 – Motilidade em ágar semi-sólido.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>Escherichia coli</i>	9
1.2 <i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal	9
1.3 Adesinas	10
1.4 Colibacilose e avicultura brasileira	11
1.5 A cepa MT78	12
1.6 O Operon <i>bgl</i> e o metabolismo de β -glicosídeos	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Cepas bacterianas, plasmídeos e primers.	15
3.2 Recriação do mutante MT78 20E12	17
3.3 Complementação do mutante MT78 Δ <i>bgl</i>	18
3.4 Criação dos mutantes MT78 Δ <i>bgl::bglG</i> e MT78 Δ <i>bgl::bglGFB</i>	18
3.5 Ensaio de aglutinação em levedura	19
3.7 Fermentação de β -glicosídeos	20
3.8 Ensaio de motilidade	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 O operon <i>bgl</i> da cepa MT78 é funcional, porém críptico.	21
4.2 O mutante MT78 Δ <i>bgl</i> não apresentou alteração no título de aglutinação de levedura	22
4.3 O mutante 20E12 não foi capaz de aglutinar eritrócitos humanos	23
4.5 A recriação do mutante 20E12 confirmou o fenótipo causado pela inserção do transposon tn5 no gene <i>bglB</i>	25
4.6 Complementação do mutante MT78 Δ <i>bgl</i>	26
4.7 Criação dos mutantes MT78 Δ <i>bgl::bglG</i> e MT78 Δ <i>bgl::bglGFB</i>	27
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	28
6. REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1 *ESCHERICHIA COLI*

As *Escherichia coli* são bactérias gram negativas tipicamente comensais que colonizam o trato digestivo de diversos animais, inclusive dos humanos. Comumente vivem em uma relação de benefício mútuo com seu hospedeiro; entretanto há grupos que adquiriram fatores de virulência que os permitiram melhor se adaptarem a novos nichos, circunstancialmente causando doenças aos hospedeiros.

Dependendo da combinação dos fatores de virulência e das doenças causadas, as *E. coli* podem ser classificadas em diferentes patotipos. As *E. coli* patogênicas intestinais (InPEC) causam essencialmente diarreias, e incluem as *Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC), entero-hemorrágicas (EHEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroagregativas (EAEC), enteroinvasivas (EIEC) e de aderência difusa (DAEC). As *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC) são responsáveis por diversas infecções fora do trato gastrointestinal, incluindo infecções do trato urinário, meningite neonatal e sepse em humanos, infecções em cães e gatos de estimação, e em animais de criação, como suínos e aves.

1.2 *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL

As ExPEC mais bem estudadas são as *E. coli* uropatogênicas (UPEC), as causadoras de meningite/sepse (NMEC) e as patogênicas aviárias (APEC). Apesar de diferenciadas em patotipos, que refletem o local de onde foram isoladas, estudos mostram grandes similaridades filogenéticas e de perfis de virulência entre cepas patogênicas humanas e aviárias, o que sugere um potencial zoonótico das cepas APEC (Moulin-Schouler 2007; Tivendale *et al.* 2010) e aumenta o interesse no estudo de seus mecanismos de virulência.

Há também uma alta similaridade entre cepas ExPEC e cepas de *E. coli* comensais (Dobrint *et al.* 2011), o que reforça a hipótese de que em geral as ExPEC são patogênicas facultativas, vivem no intestino como comensais, onde seus genes de virulência podem conferir vantagens na colonização e, uma vez fora do intestino, essas cepas podem colonizar

outras regiões por acaso e causar infecções. Sperandio (2012) também ressalta a possibilidade de que a virulência de cepas de *E. coli* seja ao acaso, que na verdade confirmam uma vantagem na competição por fontes de carbono durante a colonização do intestino, e enfatiza a importância do estudo da relação entre metabolismo de carbono e a virulência para entender as interações patógeno-hospedeiro e possíveis implicações terapêuticas.

1.3 ADESINAS

As adesinas podem ser classificadas em adesinas fimbriais e afimbriais (Dziva and Stevens 2008).

A fimbria mais comum em ExPEC é a fimbria do tipo 1, codificada por um operon de 9 genes (*fim*). A proteína FimA, com cerca de mil cópias repetidas interligadas, é responsável pelo “corpo” da fimbria. As proteínas FimF, FimG e FimH, com uma única unidade por fimbria, formam a estrutura da “ponta”, sendo FimH a mais externa e responsável pelo reconhecimento de manose, que promove a aderência da bactéria às superfícies mucosas (Klemm *et al.* 2010).

A fimbria P é outra fimbria importante para ExPEC, é codificada pelo operon *pap*. Em humanos está ligada a infecção e colonização dos rins (pielonefrite) por UPEC (Sauer *et al.*, 2000). Em aves, estaria associada à colonização dos órgãos internos depois do estabelecimento da infecção inicial (Pourbakhsh *et al.* 1997, La Ragione and Woodward, 2002).

Das adesinas afimbriais, a adesina Tsh (temperature-sensitive haemagglutinin) é mais importante para APEC por contribuir para as primeiras etapas da infecção, incluindo a colonização dos sacos aéreos (Dozois *et al.*, 2000) e, assim como outras adesinas, está ligada à aglutinação de hemácias (Johnson, 1991).

1.4 COLIBACILOSE E AVICULTURA BRASILEIRA

A produção de carne de frango no Brasil foi de 13,05 milhões de toneladas em 2017, número que confere ao Brasil o segundo lugar no mundo em produção de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos da América (18,59 milhões de toneladas). Cerca de 67% dessa produção foi destinada ao consumo pelo mercado interno, atingindo uma média de 42,7 kg de carne de frango por pessoa. Os estados da região Sul do Brasil são os principais responsáveis por essa produção, contribuindo com 64,35% da produção nacional (ABPA 2018).

Infecções extraintestinais causadas por cepas de APEC, chamadas coletivamente de colibacilose aviária, podem manifestar-se de diversas formas, como infecções respiratórias, peritonite do ovo, celulite (dermatite necrótica), síndrome da cabeça inchada, onfalite (infecção do embrião), salpingite (infecção do oviduto), coligranuloma e colissepticemia, sendo esta última a mais grave (La Ragione, 2002). A colissepticemia geralmente é iniciada pelo trato respiratório superior e culmina com a morte da ave. Na colissepticemia, o primeiro passo para o estabelecimento da infecção é a colonização do epitélio do trato respiratório da ave. Depois de aderida ao epitélio, a APEC sobrevive ao influxo de heterófilos e macrófagos e espalha-se para os órgãos internos. Porém, ainda não está elucidado como a bactéria ultrapassa a barreira epitelial (Pourbakhsh *et al.* 1997). A criação de aves em confinamento para produção alimentícia cria ambientes propícios para a disseminação e para o desenvolvimento da colissepticemia (La Ragione, 2002), que pode levar à condenação total ou parcial da carcaça no abatedouro.

A colibacilose aviária é uma das principais causas de mortalidade e morbidade associada a perdas econômicas na produção avícola em todo o mundo. As perdas podem ser devidas à redução das taxas de eclosão, diminuição na produção de ovos, mortalidade, condenação de carcaça no abate e custos associados ao tratamento e profilaxia (Guabiraba e Schouler, 2015).

1.5 A CEPA MT78

A cepa APEC MT78 foi isolada da traqueia de uma galinha com colibacilose, na França, em 1982 (Dho e Lafont, 1982). A MT78 apresenta alta patogenicidade em modelos *in vivo* de infecção: causa septicemia após infecção experimental do trato respiratório (Pourbkhsh *et al.* 1997; Horn *et al.* 2012), e causou a morte de 7 entre 18 galinhas Cobb de três semanas infectadas intra-traqueia (Horn *et al.*, resultados não-publicados). *In vitro*, interage fortemente com macrófagos aviários, resistindo à sua capacidade fagocítica (Mellata *et al.* 2003) e causando apoptose nessas células (Horn *et al.* 2012); e invade células do microendotélio vascular cerebral humano (BMEC)(Germon *et al.* 2005), pneumócitos humanos do tipo II (Chanteloup *et al.* 2011), hepatócitos (LHM)(Chanteloup *et al.* 2011) e fibroblastos aviários (Matter *et al.* 2011).

Como citado anteriormente, estudos mostram grande similaridade filogenética e de perfis de virulência entre cepas patogênicas humanas e aviárias, apesar de isoladas de hospedeiros distintos. A MT78 não é uma exceção, pois embora seja considerada APEC por sua origem, possui genes ligados a NMECs, como *ibeA*, *gimB*, cápsula K1, *neuC*, *kpsMTII*, e *ompA*, e foi capaz de colonizar a bexiga em modelo murino de infecção urinária (Pavanelo *et al.* 2018).

Dentre outras cepas APEC testadas, a MT78 foi a única capaz de invadir fibroblastos aviários, superando inclusive o controle positivo *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium SL1344 (Matter *et al.* 2011). O fato da cepa MT78 possuir uma capacidade tão grande de adesão e invasão, embora seu genótipo de virulência seja muito similar a outras APEC não-invasivas, indica que ela pode possuir genes ou mecanismos que influenciam em sua virulência que ainda não foram elucidados.

À procura de genes que podem influenciar na virulência desta cepa, Pavanelo D.B. criou, por meio da técnica de STM (*signature-tagged mutagenesis*)(Hensel *et al.* 1995), uma biblioteca de 1710 mutantes aleatórios da MT78, que foram triados à procura de atenuação da capacidade de invasão a células não-fagocitárias. Entre os mutantes atenuados encontrados, está o mutante MT78*bglB*::Tn5 (20E12), que teve o gene para a enzima fosfo-β-glicosidase B interrompido pela inserção de um transposon (Fig. 1). Para caracterizar a função do operon *bgl*, foram criados os mutantes limpos, em que tanto o gene *bglB* (MT78Δ*bglB*) como todo o operon *bgl* (MT78Δ*bgl*) foram removidos pela técnica lambda red de mutação apolar

(Datsenko e Wanner, 2000). Ambos mutantes apresentaram atenuação da adesão e da invasão a fibroblastos, e o mutante MT78 Δ *bgl* apresentou atenuação da colonização da bexiga murina *in vivo* (Pavanelo, 2017).

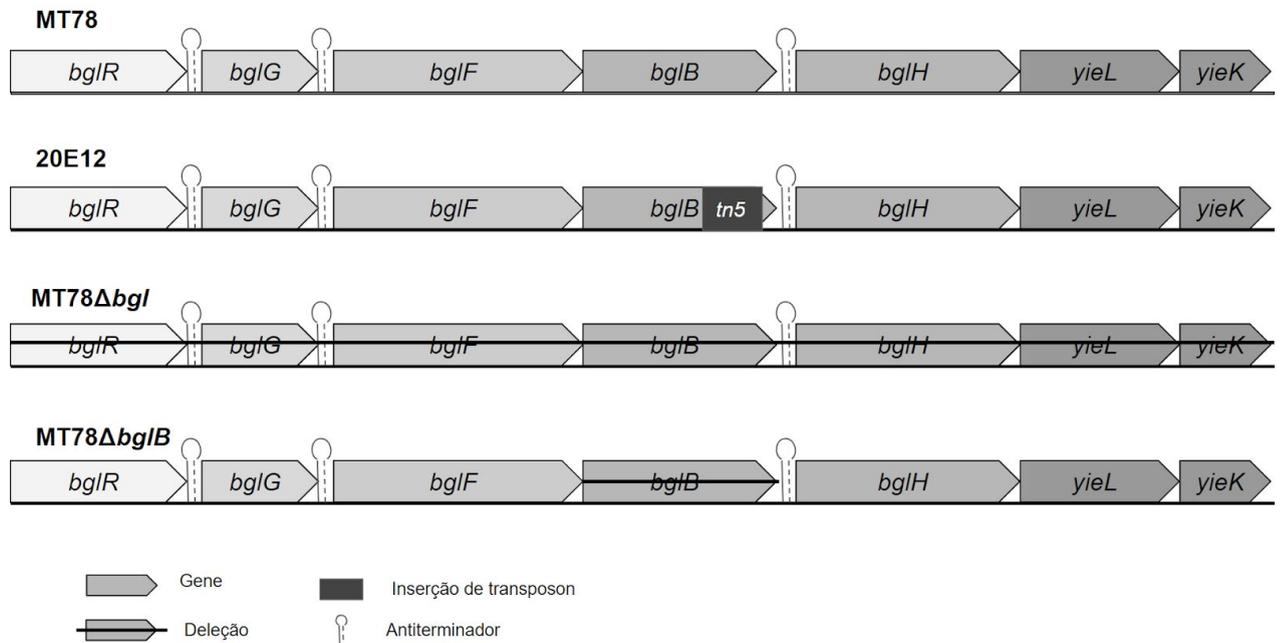


Figura 1. Ilustração do operon *bgl* da cepa MT78 e seus mutantes. Operon íntegro na cepa selvagem MT78, composto pelos genes *bglG*, *bglF*, *bglB*, *bglH*, *yieL* e *yieK*; no mutante 20E12, em que o gene *bglB* sofreu inserção do transposon Tn5; no mutante MT78 Δ *bgl*, em que todo operon foi deletado; e no mutante MT78 Δ *bglB*, em que apenas o gene *bglB* foi deletado.

1.6 O OPERON *BGL* E O METABOLISMO DE β -GLICOSÍDEOS

Os β -glicosídeos são açúcares, em sua maioria de origem vegetal, que consistem em uma molécula de glicose ligada por uma ligação β -1,4 a um grupamento alifático ou

aromático. Os principais β -glicosídeos são arbutina e salicina, cujos grupamentos laterais são 2-hidroximetilfenil e 4-hidroxifenil, respectivamente (Harwani, 2014).

O operon *bgl* codifica todas as funções necessárias para o captação e utilização dos açúcares β -glicosídeos salicina e arbutina (Schnetz, 1995), sendo composto pelos genes *bglG*, *bglF*, *bglB*, *bglH*, *yeL* (*bglI*) e *yeK* (*bglK*) (Fig. 1). O gene *bglG* codifica um antiterminador que age em dois terminadores rho-independentes que flanqueiam *bglG* (Mahadevan *et al.* 1987, Schnetz and Rak, 1988). O gene *bglF* codifica uma permease PTS (sistema de transferência de fosfato) que fosforila e transporta arbutina e salicina. Na ausência de um indutor, BglF fosforila BglG, impedindo sua função como antiterminador (Amster-Choder *et al.* 1989, Schnetz e Rak 1990, Görke e Rak 1999). O gene *bglB* codifica uma fosfo- β -glicosidase, que cliva salicina e arbutina fosforiladas (Harwani, 2014). A função de BglH não é essencial para a utilização de β -glicosídeos; BglH é uma porina de membrana externa específica para a absorção de carboidratos (Andersen *et al.* 1999). Não há função descrita para os genes *yeL* e *yeK*.

O operon *bgl* é um operon críptico, silenciado pela proteína similar a histona HN-S; (Schnetz 1995), um regulador de transcrição global em bactérias gram-negativas (Dorman 2007). Na cepa comensal K-12, nenhuma condição laboratorial foi capaz de desreprimir o silenciamento, mas se sabe que a expressão constitutiva dos genes *leuO* e *bglJ*, também reprimidos por HN-S, é capaz de desreprimir o operon *bgl*. O gene *leuO* é um determinante de virulência para *Salmonella enterica*; o gene *bglJ*, por sua vez, é codificado juntamente com o gene *yjyQ*, que foi associado à patogenicidade de cepas ExPEC por afetar a captação de ferro (Li *et al.* 2008; Sankar *et al.* 2009). Esses dados indicam uma possível ligação da regulação do operon *bgl* à virulência. Outro estudo que corrobora a ligação do operon *bgl* à virulência identificou a expressão do operon por uma ExPEC em um modelo *in vivo* de infecção de fígado (Khan e Isaacson, 1998).

Além da associação da expressão do operon *bgl* com genes ligados à virulência e da identificação de sua expressão *in vivo*, uma análise do operon *bgl* em uma coleção de 171 isolados de *E. coli* mostrou que a evolução e estado funcional do operon estão relacionados à filogenia de *E. coli*. Em isolados do grupo filogenético B2, embora críptico, o operon *bgl* se mantém funcional e por vezes até apresenta um menor silenciamento pela H-NS. Já nos grupos filogenéticos A e B1, o operon acumula mutações com perda de função, enquanto no grupo filogenético D o operon apresenta perda de genes (Sankar *et al.* 2009), o que indica

uma pressão seletiva neutra ou mesmo desvantajosa. O grupo B2 concentra isolados ExPEC (Bingen *et al.* 1998; Johnson *et al.* 2001; Picard *et al.* 1999), sugerindo que a funcionalidade do operon *bgl* confere uma vantagem seletiva a esses patógenos.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é analisar a influência do operon *bgl* na virulência da cepa MT78 e elucidar os mecanismos pelos quais essa influência ocorre.

Como objetivos específicos, este trabalho propõe (1) verificar a funcionalidade e a regulação do operon *bgl* na cepa selvagem MT78, (2) analisar fatores de virulência que podem ser alterados nos mutantes para o operon *bgl*, (3) complementar cromossomicamente o mutante MT78 Δ *bgl* (MT78 Δ *bgl*::*bgl*), e (4) produzir os mutantes complementados MT78 Δ *bgl*::*bglG* e MT78 Δ *bgl*::*bglGFB*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CEPAS BACTERIANAS, PLASMÍDEOS E PRIMERS.

A principal cepa utilizada neste estudo foi a ExPEC MT78 (O2:K1:H5), ST95, isolada de uma galinha com colibacilose associada à infecção com *Mycoplasma sp.* (Dho e Lafont, 1982), e seus mutantes derivados. A lista completa com a cepa, seus mutantes e os plasmídeos utilizados está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas e plasmídeos utilizados neste estudo.

Cepa	Característica	Resistência	Referência/fonte
MT78	Cepa selvagem ExPEC	Ácido nalidíxico (intrínseca)	(Dho e Lafont, 1982)

MT78Δ<i>bglB</i>	Mutante <i>bglB</i> ::Km	Ácido nalidíxico e canamicina	(Pavanelo 2017)
MT78Δ<i>bgl</i>	Mutante <i>bgl</i> ::Km (Δ <i>bglGFBHΔyeLK</i>)	Ácido nalidíxico e canamicina	(Pavanelo 2017)
Mutante MT78 20E12	Mutante STM <i>bglB</i> ::Tn5	Ácido nalidíxico e canamicina	(Pavanelo 2017)
MT78 20E12*	Recriação da mutação <i>bglB</i> ::Tn5	Ácido nalidíxico e canamicina	Este estudo
DH5α	Cepa-vetor; derivada da K-12	Nenhuma	Bethesda Laboratories
pKD46	Plasmídeo que codifica a recombinase, usado para complementação	Ampicilina	(Datsenko e Wanner, 2000)
pGPTn7-Cm	Plasmídeo usado na complementação	Ampicilina e cloranfenicol	(Crepin <i>et al.</i> 2012a)

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nesse estudo.

Nome	Sequência 5'-3'	Função	Referência
<i>bgl_compl_F</i>	TAAACTCGAGGCAGA AAAAGATAGCGATAA A	Complementações do mutante Δ <i>bgl</i> (Sítio para XhoI)	Este estudo
<i>bgl_compl_R</i>	CTTTGAGCTCAGCGG AATGCTTTATCTATT	Complementações do mutante Δ <i>bgl</i> (Sítio para SacI)	Este estudo
1R	TAATGGCGGGCATT ACAGC	Complementações do mutante Δ <i>bgl</i>	Este estudo

2F	CTTTGTGATGTTCCGGT CTGC	Complementações do mutante Δbgl	Este estudo
2R	TATCCACACCATCGG CAATC	Complementações do mutante Δbgl	Este estudo
3F	GATGGTTCGATACAG GACGA	Complementações do mutante Δbgl	Este estudo
3R	TTCGTCTTTGGTCATC GGGT	Complementações do mutante Δbgl	Este estudo
4F	TGCCGATAACAGCGT GACCT	Complementações do mutante Δbgl	Este estudo
bglGFB_compl_R	GGCAGAGCTCATAAT ATTTCGTCTAAACAT	Complementações do mutante Δbgl (Sítio para SacI)	Este estudo
bglG_compl_R	TGCGGAGCTCGTTCT GGCTAACTCCGTCAT	Complementações do mutante Δbgl (Sítio para SacI)	Este estudo
Dat_bglGFB_compl_R	AGCAAGGACCTTTTTTATAA ACAAAAAACCCGACTTCAC CAGTATTCTCTCAGAACGCTC GGTTGCCGC	Complementações do mutante Δbgl	Este estudo

3.2 RECRIAÇÃO DO MUTANTE MT78 20E12

A cepa selvagem MT78 contendo o plasmídeo pKD46, que possui um sistema de λ Red recombinases induzido por arabinose, foi crescida em caldo LB *overnight* a 30° C com ampicilina (100 mg/L). Trezentos microlitros foram então diluídos em 30 mL de caldo LB contendo ampicilina e arabinose 0,1 M (para indução das recombinases), e incubados sob

agitação a 30° C; ao atingir OD₅₅₀ 0,6, arabinose foi novamente adicionada ao meio; as células foram coletadas na OD₅₅₀ 0,75 a e tornadas eletrocompetentes.

Utilizando os iniciadores (*primers*) 3F e 3R (Tabela 2), a região do operon *bgl* do mutante MT78 20E12 que continha a inserção do transposon Tn5 foi amplificada (aproximadamente 2,5 kb), e o amplicon então transformado na cepa selvagem MT78+pKD46 eletrocompetente. As recombinases, ao reconhecerem as regiões de homologia ao redor do transposon Tn5, inseriram-no na mesma região do operon em que está presente no mutante MT78 20E12, criando assim o mutante MT78 20E12*.

3.3 COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE MT78 Δ BGL

Devido à extensão de 8,3 kb do operon *bgl*, tive problemas em amplificá-lo em uma única reação; então, desenhei *primers* (*bgl_compl_F*, 1R, 2F, 2R, 3F, 3R, 4F e *bgl_compl_R*) para amplificá-lo em 4 fragmentos de aproximadamente 2 kb cada, com complementaridade de bases entre si em suas extremidades. Em uma primeira PCR, esses trechos foram amplificados individualmente, misturados e o operon completo foi amplificado em uma segunda reação. Posteriormente, com a utilização de outras DNA polimerases, o operon pode ser amplificado por completo em uma reação única.

Após a amplificação, o fragmento do operon *bgl*, bem como o plasmídeo pGpTn7-cm, foram digeridos pelas enzimas de restrição *SacI* e *XhoI*. Digeridos pelas enzimas, o plasmídeo e o fragmento possuem extremidades coesivas e complementares que possibilitam sua ligação.

3.4 CRIAÇÃO DOS MUTANTES MT78 Δ BGL::*BGLG* E MT78 Δ BGL::*BGLGFB*

Foram utilizados os *primers* *bgl_compl_F* e *bglG_compl_R* para amplificar o gene *bglG* e sua região promotora, e os *primers* *bgl_compl_F* e *bglGFB_compl_R* para amplificar um fragmento contendo os genes *bglG*, *bglB* e *bglF* e sua região promotora.

Após a amplificação, os fragmentos e o plasmídeo PgpTn7-cm foram digeridos pelas enzimas de restrição SacI e XhoI, e então ligados.

3.5 ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO EM LEVEDURA

As cepas selvagem e mutantes foram crescidas em 5 mL de caldo LB a 37° C *overnight* e então diluídas 1:100 em 20 mL de LB e crescidas sob agitação a 37° C até fase a fase logarítmica (OD600 = 0,6) . As células foram coletadas por centrifugação (10 min a 3200 g) e suspensas em PBS até uma OD600 de 30, e então serialmente diluídas 1:2 em uma microplaca. Em cada poço, um volume igual de uma solução 1,5% de levedura foi adicionada. Após 30 minutos no gelo, a aglutinação foi monitorada visualmente e titulada pelo poço com maior diluição apresentando aglutinação.

3.6 Ensaio de hemaglutinação resistente à manose

Sangue humano do tipo O foi coletado em uma seringa contendo heparina, e então centrifugado a 1800 g por 5 minutos; o plasma foi retirado e os eritrócitos foram ressuspendidos em aproximadamente o dobro do seu volume em solução salina (0,85% NaCl). Os eritrócitos foram centrifugados novamente a 1800 g por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e o processo foi repetido 3 vezes. Ao final, suspensões de 0,5% ou 1% de eritrócitos foram aliqotados em solução salina na presença ou ausência de 3% de manose.

As cepas foram crescidas em 5 ml de caldo LB a 37° C *overnight* e então diluídas 1:100 em 20 mL de LB e crescidas sob agitação a 37° C até fase a fase logarítmica. As células foram coletadas por centrifugação (10 min a 3200 g) e suspensas em PBS até uma OD600 de 30 ou 60, e então serialmente diluídas 1:2 em uma microplaca. Em cada poço, foi adicionado um volume igual de uma solução 0,5% ou 1% de eritrócitos humanos com ou sem manose 3%. Após 30 minutos no gelo, a aglutinação foi monitorada visualmente e titulada pelo poço com maior diluição apresentando aglutinação.

3.7 FERMENTAÇÃO DE β -GLICOSÍDEOS

As cepas foram plaqueadas em LB-ágar na presença de salicina e azul de bromotimol (indicador de pH) (Schnetz *et al.* 1987). Após quatro dias de incubação a 37° ou 28° C, o crescimento bacteriano foi analisado e as cepas que apresentaram fermentação do açúcar foram replaqueadas e incubadas por mais quatro dias.

3.8 ENSAIO DE MOTILIDADE

Para verificar a capacidade de motilidade ligada ao flagelo, as cepas foram incubadas *overnight* em LB a 37° C sob agitação. Um fio de platina foi mergulhado na cultura e utilizado para perfurar o centro de uma placa de ágar LB semi-sólido (ágar 0,25%); após 7 h de incubação a 37° C, o halo formado pelo movimento das bactérias foi registrado e medido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 O OPERON *BGL* DA CEPA MT78 É FUNCIONAL, PORÉM CRÍPTICO.

Como mencionado na Introdução (seção 1.5), o grupo filogenético B2, que apresenta o operon *bgl* funcional e por vezes com uma menor repressão pela H-NS a 37° C, concentra cepas de ExPEC (Bingen *et al.* 1998; Picard *et al.* 1999), o que sugere que o operon *bgl* pode conferir alguma vantagem justamente para cepas patogênicas.

Para testar se, como outras cepas do grupo B2, a cepa MT78 possui o operon funcional, ela foi plaqueada em LB-ágar com salicina e azul de bromotimol . Após três dias de incubação a 37° C, a MT78 apresentou papilas positivas (laranjas) para a fermentação (Fig. 2), indicando que possui o operon *bgl* funcional. Quando replaqueadas, as papilas apresentaram fermentação já no primeiro dia de incubação, indicando que o operon havia sido desreprimido por mutações na região reguladora.

E. coli apresenta, além do *bgl*, outros operons envolvidos com a fermentação de β -glicosídeos que podem ser ativados quando o *bgl* se encontra disfuncional (Desai *et al.* 2010). Para testar se o fenótipo de fermentação apresentado pela cepa MT78 era causado apenas pela desrepressão do operon *bgl*, o mutante MT78 Δ *bgl* também foi testado e não apresentou fermentação após três dias de incubação em nenhuma das temperaturas.

Embora o operon *bgl* seja considerado críptico em condições laboratoriais, e que necessite de mutações para ser desreprimido nas cepas onde se encontra funcional, o operon *bgl* foi expresso em uma ExPEC em modelo *in vivo* de infecção de fígado (Khan e Isaacson 1998). Essa observação levanta a possibilidade que o operon *bgl* possa ser desreprimido na cepa MT78 em uma infecção *in vivo*.

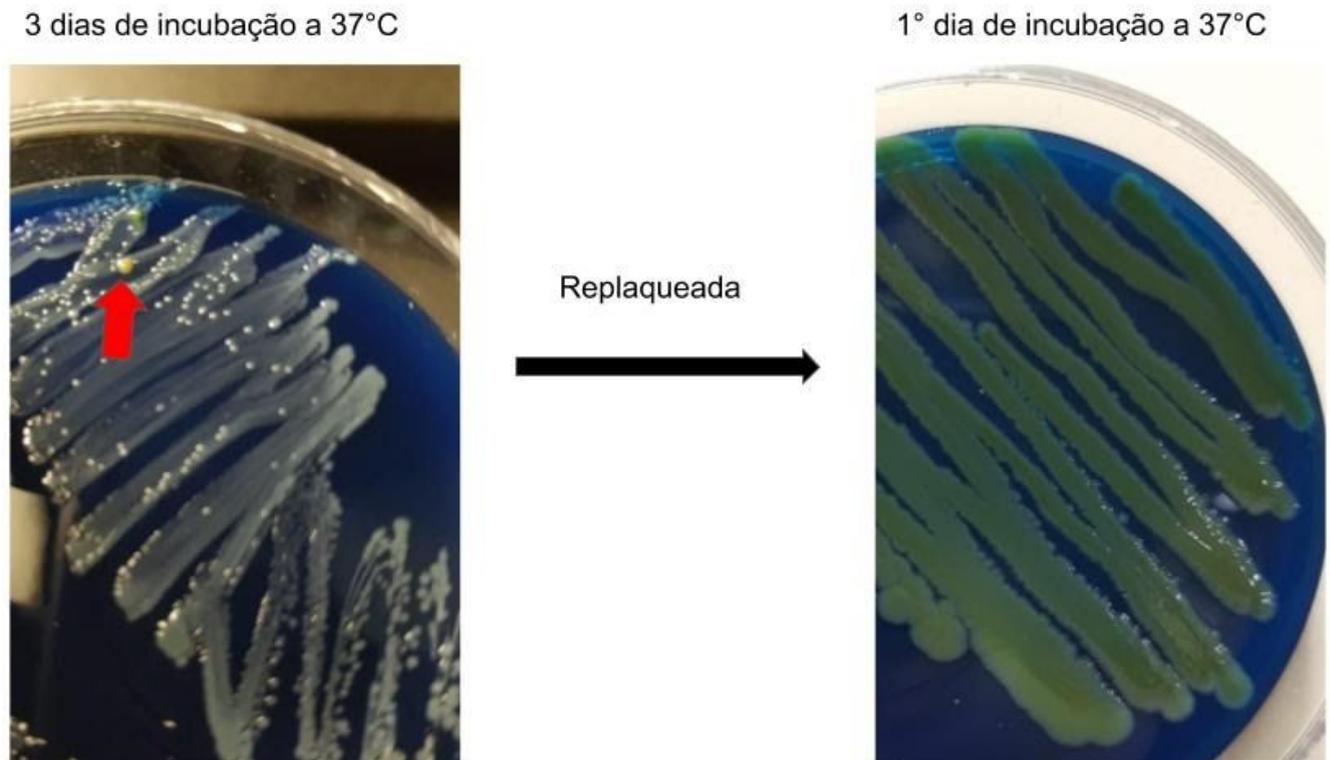


Figura 2. Teste de fermentação de β -glicosídeos. A cepa MT78, após 3 dias de incubação, apresenta papilas positivas (laranjas, seta vermelha); quando replaqueada apresenta fenótipo positivo (cor laranja) desde o primeiro dia de incubação.

4.2 O MUTANTE $MT78\Delta BGL$ NÃO APRESENTOU ALTERAÇÃO NO TÍTULO DE AGLUTINAÇÃO DE LEVEDURA

O mutante $MT78\Delta bgl$, gerado pela técnica lambda red de mutação apolar (Datsenko e Wanner 2000) apresentou uma redução na capacidade de colonização da bexiga, 48 h após a inoculação da bactéria via uretra em modelo murino de infecção urinária (Pavanelo, 2017). Para testar se essa redução foi causada por alguma alteração na expressão de fímbria do tipo 1, adesina com receptores específicos à manose que é de grande importância para a colonização da bexiga (Kaper, 2004), a cepa selvagem e os mutantes $MT78\Delta bgl$ e 20E12 - que possui a inserção do transposon Tn5 no gene *bglB*, criado originalmente pela técnica de STM - foram submetidos ao teste de aglutinação em levedura.

O mutante $MT78\Delta bgl$ não apresentou variação no título de aglutinação em relação à cepa selvagem; portanto, não é possível atribuir a redução da virulência a alguma alteração na

fimbria do tipo 1. Entretanto, o mutante 20E12 não apresentou aglutinação de levedura (Fig. 3) e será discutido posteriormente (seção 4.5).

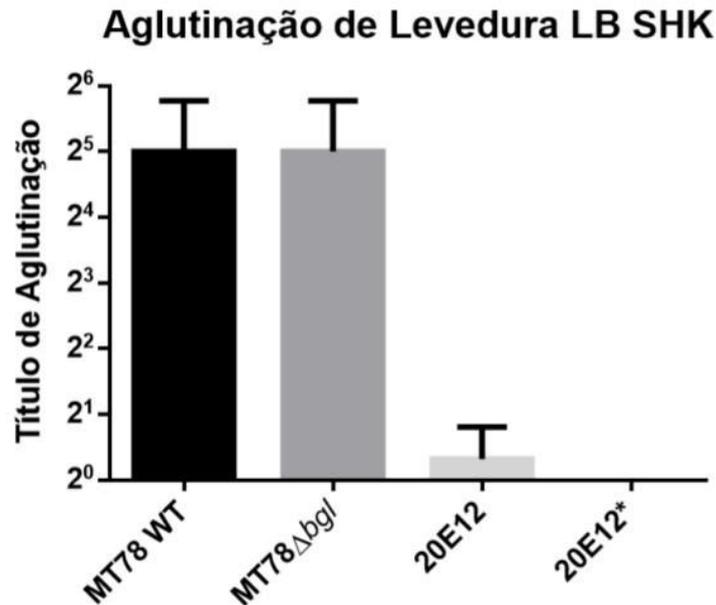


Figura 3. Título de aglutinação. Aglutinação de levedura após crescimento bacteriano sob agitação em caldo LB até fase mid-log. Foi considerado o título da última diluição na qual houve aglutinação.

4.3 O MUTANTE 20E12 NÃO É CAPAZ DE AGLUTINAR ERITRÓCITOS HUMANOS

Para testar se outras adesinas que não a fimbria do tipo 1 estariam sendo afetadas nos mutantes MT78 Δ bgl e 20E12, foi realizado o teste de hemaglutinação resistente à manose. A hemaglutinação depende de várias adesinas (Johnson, 1991), inclusive da fimbria do tipo 1; esta porém está inibida pela adição de manose no meio. Quando as cepas são postas em contato com eritrócitos humanos na presença de manose, observa-se a aglutinação causada por outras adesinas.

Tanto a cepa selvagem MT78 quanto o mutante MT78 Δ bgl apresentaram hemaglutinação resistente à manose apenas na diluição 1:1 (quantidades iguais de bactérias e eritrócitos), de modo que não foi possível verificar se há diferença entre mutante e selvagem (Fig. 4). Testes com diferentes concentrações ou com eritrócitos de outros animais aos quais a cepa pode ter mais afinidade ainda devem ser feitos para obter um resultado mais preciso.

Como a cepa selvagem apresentou hemaglutinação resistente à manose, verificamos se o mutante 20E12, cujo resultado de aglutinação em leveduras revelou que não expressa a fimbria do tipo 1, seria capaz de aglutinar eritrócitos na presença de manose. Assim como com leveduras, o mutante 20E12 não apresentou nenhum tipo de hemaglutinação (Fig. 4), indicando que além da fimbria do tipo 1, a expressão de outras adesinas foram afetadas nesse mutante.

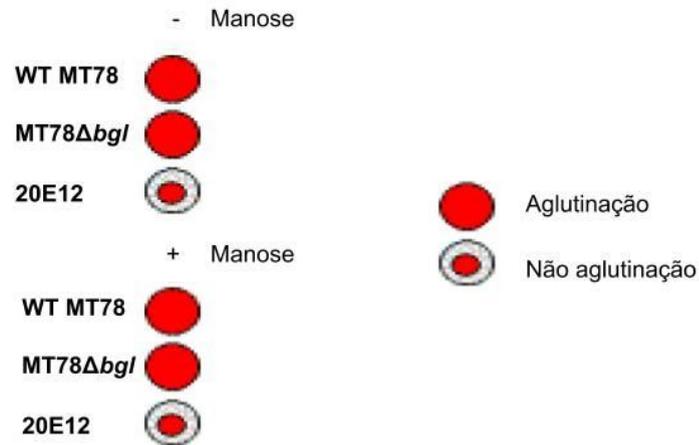


Figura 4. Representação do fenótipo de hemaglutinação observado. Solução de eritrócitos humanos 0,5%, na presença (coluna acima) ou ausência (coluna abaixo) de manose 3%, incubados por 30 minutos no gelo com quantidades iguais de cada cepa ressuspensa em PBS.

4.4 Os mutantes MT78Δbgl e 20E12 apresentam redução na motilidade

Os flagelos são cruciais para a motilidade bacteriana e desempenham um papel importante na colonização, penetração da camada mucosa, adesão ou invasão de células epiteliais, e na exploração de inflamações para competir com a microbiota intestinal *in vivo* (Duan *et al.* 2012).

Para verificar se o operon *bgl* poderia ter alguma influência no flagelo e na motilidade, a cepa selvagem MT78 e os mutantes MT78ΔbglB, MT78Δbgl e 20E12 foram inoculados em ágar semi-sólido (ágar 0,25%) e após 7 horas foram observados os halos formados pela movimentação das bactérias no meio.

O mutante limpo para o operon apresentou motilidade reduzida em relação a a cepa selvagem (Fig. 5), indicando que o operon *bgl* pode influenciar na motilidade da cepa.

Embora a redução na motilidade não explique a atenuação da invasão e adesão a fibroblastos aviários observada no mutante *MT78Δbgl*, este é mais um indício de que o operon *bgl* pode influenciar outras funções relacionadas à virulência e não apenas ao metabolismo de β-glicosídeos. O mutante 20E12 novamente demonstrou um fenótipo diferente dos outros mutantes e não apresentou motilidade (Fig. 5).

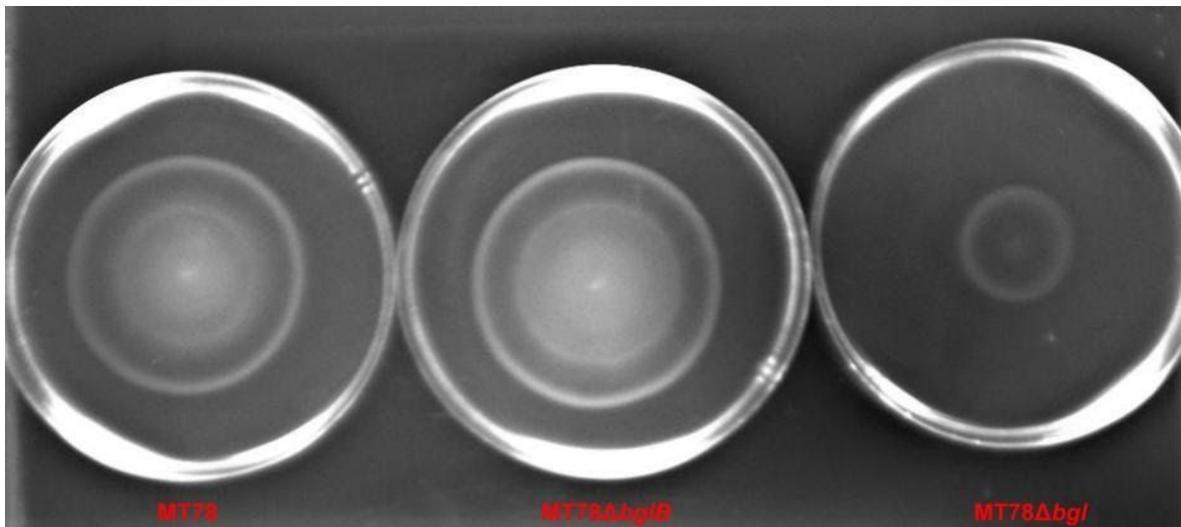


Figura 5. Motilidade em ágar semi-sólido. Halo formado em LB-ágar 0.25% após 7 horas de incubação a 37°C. Da esquerda para direita: cepa selvagem *MT78* e os mutantes *MT78ΔbglB* e *MT78Δbgl*. O mutante *MT78ΔbglB* não apresentou diferença na motilidade em relação ao selvagem; já o mutante *MT78Δbgl*, limpo para o operon, apresentou motilidade reduzida.

4.5 A RECRIAÇÃO DO MUTANTE 20E12 CONFIRMA O FENÓTIPO CAUSADO PELA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TN5 NO GENE *BGLB*

O mutante 20E12 possui a inserção do transposon Tn5 no gene *bglB*, que codifica para a enzima fosfo-β-glicosidase B. Criado originalmente pela técnica de STM, esse mutante apresentou atenuação na adesão e na invasão a fibroblasto aviários, o que deu início ao estudo da influência do operon *bgl* na virulência da cepa *MT78*. Verificou-se que a deleção do gene *bglB* causa atenuação da adesão e da invasão *in vitro*, e que a deleção do operon inteiro causa uma atenuação mais acentuada. Entretanto, o mutante 20E12 apresentou uma atenuação ainda maior que a dos outros (Pavanelo *et al.* 2017), e esse fenótipo pode ser explicado pela baixa produção ou ausência de fimbria do tipo 1, constatada pelos ensaios de aglutinação em

levedura (Fig. 2) e alteração na produção de outras adesinas resistentes à manose indicada pelos ensaios de hemaglutinação (Fig. 3).

O fato da desativação do gene *bglB* pela inserção do transposon Tn5 ter causado uma alteração no fenótipo mais acentuada que a deleção do gene ou do operon pela técnica de mutação apolar levantou a hipótese que o mutante 20E12 teria uma segunda inserção causada pela técnica STM que explicaria o seu fenótipo.

Para responder essa pergunta, a região da inserção no mutante foi amplificada e inserida na mesma região da cepa selvagem MT78, através de recombinação homóloga. O novo mutante, criado com a mesma inserção do mutante 20E12 no gene *bglB*, amplificada e inserida exatamente na mesma região com *background* da cepa selvagem, foi chamado de 20E12* e testado para aglutinação de levedura, o fenótipo mais característico do mutante 20E12.

O mutante 20E12* apresentou o mesmo fenótipo de aglutinação do mutante 20E12, sugerindo que há uma única inserção do Tn5 no gene *bglB*, responsável pela alteração no fenótipo mais acentuada do que a deleção do operon inteiro, embora por mecanismos ainda desconhecidos. Não se sabe qual a extensão do efeito dessa inserção, se causa um silenciamento apenas no gene *bglB*, se afeta todo o operon ou, até mesmo, genes próximos. Portanto, antes de se responder a essas dúvidas, ainda não se pode associar o fenótipo do 20E12 exclusivamente ao interrompimento do gene *bglB* pelo Tn5.

4.6 COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE MT78 Δ BGL

A complementação do mutante para o operon *bgl* está em andamento. Complementação de mutantes utilizando o transposon Tn7 já foram descritas antes (Crepin, Harel e Dozois 2012), porém pelo fato do operon *bgl* ser um fragmento extenso (8,3 kb), houve dificuldades em amplificá-lo e purificá-lo, e alguns passos da complementação tiveram que ser repetidos e aperfeiçoados. Por exemplo, a adição de DMSO na reação de amplificação que aumentou sua eficiência.

O plasmídeo pGPTn7*bgl*-cm será inserido por choque térmico em uma DH5 α λ pir quimiocompetente, porém como há a possibilidade de que alguns plasmídios PgpTn7-cm

ainda tenham sido ligados sem a inserção do fragmento *bgl*, as colônias das bactérias transformadas serão isoladas e triadas por PCR, com a amplificação de um fragmento que comece no plasmídeo e termine no fragmento *bgl*.

Selecionadas colônias recombinantes, o plasmídeo PgpTn7*bgl*-cm será extraído e a cepa MGN-617 será transformada com ele. Após, será conjugada com a cepa mutante MT78Δ*bgl* contendo o plasmídeo pSTNSK, que codifica uma transposase. A MGN-617 doará o plasmídeo PgpTn7*bgl*-cm e a transposase codificada no plasmídeo pSTNSK irá inserir o operon *bgl* no cromossomo do mutante. O mutante complementado será então selecionado em um meio na ausência de DAP (ácido diaminopimérico), que inibirá o crescimento da cepa MGN-617, e com os antibióticos canamicina, ao qual o mutante é resistente, e cloranfenicol, cujo gene de resistência está presente no fragmento inserido com o operon *bgl*. A incubação será feita a 42° C, o que impedirá a replicação do plasmídeo pSTNSK.

Uma vez criado o complementado, será possível avaliar por testes *in vitro* e *in vivo* se houve a restauração do fenótipo selvagem, confirmando a influência do operon na virulência da cepa MT78.

4.7 CRIAÇÃO DOS MUTANTES MT78Δ*BGL*::*BGLG* E MT78Δ*BGL*::*BGLGFB*

O gene *bglG* afeta a regulação de outros genes (Harwani 2014), podendo ser a chave para explicar a redução da virulência do mutante MT78Δ*bgl*. Para testar essa hipótese, desenhei *primers* com diferentes sítios para enzimas de restrição, e amplifiquei o fragmento com o gene *bglG* e seu promotor. A digestão com as enzimas de restrição *SacI* e *XhoI* gerou duas extremidades coesivas no amplicon, que permitirão ligá-lo no plasmídeo PgpTn7-cm. Uma vez criada a construção do plasmídeo com o gene *bglG*, ele será amplificado juntamente com o cassete de resistência a cloranfenicol utilizando *primers* com homologia ao promotor do operon *bgl* *bgl_compl_F* e *Dat_bglGFB_compl_R* e usado na transformação por eletroporação no mutante MT78Δ*bgl* contendo o plasmídeo pKD46. Esse plasmídeo possui um sistema de λ Red recombinases, que irão reconhecer as homologias entre as sequências do fragmento e do cromossomo da cepa selvagem e então inserir o fragmento com o cassete de resistência à canamicina no genoma da cepa selvagem.

Usando essa mesma metodologia, também será criado um complementado do mutante MT78 Δ *bgl* contendo os genes *bglG*, *bglF* e *bglB*, pois a enzima codificada pelo gene *bglF* interage com a proteína BglG (Görke e Rak 1999), ativando-a ou desativando-a através de desfosforilação e fosforilação mediada pela presença de β -glicosídeos. Nesse complementado, o gene *bglB* será inserido junto com os genes *bglG* e *bglF*, pois *bglF* e *bglB* compartilham o mesmo terminador.

Uma vez criados os complementados com apenas o gene *bglG* e com os genes *bglG*, *bglF* e *bglB* será possível, por meio de ensaios celulares, avaliar a influência do gene na virulência da cepa. Ademais, uma análise de transcriptoma poderá ajudar a elucidar o mecanismo pelo qual o operon *bgl* influencia na virulência da cepa MT78.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Esse estudo explorou a influência do operon *bgl* na virulência da cepa ExPEC MT78. Testes fenotípicos concluíram que a atenuação observada no mutante MT78 Δ *bgl* não se deu por alteração na produção de fimbria do tipo 1, tampouco pela alteração de outras adesinas envolvidas na hemaglutinação. Por outro lado, foi observada redução na motilidade do mutante MT78 Δ *bgl*, que embora não explique a redução na adesão e na invasão a fibroblastos aviários observada no mutante, é um indício de que o operon *bgl* pode influenciar outras funções além do metabolismo de β -glicosídeos e que são relacionadas à virulência.

Procurou-se também explicar o fenótipo super atenuado do mutante 20E12. A ausência de aglutinação de levedura no mutante 20E12*, criado nesse estudo, sugere que há uma única inserção do Tn5 no gene *bglB* e que essa inserção causa a alteração no fenótipo ainda mais acentuada que a deleção do operon. Porém, mais testes são necessários para concluir que o seu fenótipo decorre exclusivamente de um efeito no operon *bgl*.

Por fim, deu-se início à criação de três complementações do mutante MT78 Δ *bgl*: os complementados MT78 Δ *bgl*::*bgl*, MT78 Δ *bgl*::*bglG* e MT78 Δ *bgl*::*bglGFB*. Ensaios celulares com esses complementados servirão para avaliar a influência do operon na capacidade adesiva e invasiva da MT78. Ademais, uma análise de transcriptoma da cepa selvagem, do mutante e complementados poderá elucidar o mecanismo pelo qual o operon *bgl* atua não

apenas no metabolismo de β -glicosídeos, mas também na expressão de outros genes que podem estar envolvidos na aptidão e virulência da cepa MT78.

6. REFERÊNCIAS

- ABPA (2017) Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal. São Paulo, Brasil
- Amster-Choder, Orna, *et al.* “Protein Phosphorylation Regulates Transcription of the β -Glucoside Utilization Operon in E. Coli.” *Cell*, vol. 58, no. 5, 1989, pp. 847–855., doi:10.1016/0092-8674(89)90937-9.
- Bingen, Edouard, *et al.* “Phylogenetic Analysis Of Escherichia Coli Strains Causing Neonatal Meningitis Suggests Horizontal Gene Transfer from a Predominant Pool of Highly Virulent B2 Group Strains.” *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 177, no. 3, 1998, pp. 642–650., doi:10.1086/514217.
- Chanteloup, Nathalie Katy, *et al.* “The Extra-Intestinal Avian Pathogenic Escherichia Coli Strain BEN2908 Invades Avian and Human Epithelial Cells and Survives Intracellularly.” *Veterinary Microbiology*, vol. 147, no. 3-4, 2011, pp. 435–439., doi:10.1016/j.vetmic.2010.07.013.
- Crépin, Sébastien, *et al.* “Chromosomal Complementation Using Tn7 Transposon Vectors in Enterobacteriaceae.” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, no. 17, 2012, pp. 6001–6008., doi:10.1128/aem.00986-12.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. “One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in Escherichia Coli K-12 Using PCR Products.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 12, 2000, pp. 6640–6645., doi:10.1073/pnas.120163297.
- Desai, Stuti K, *et al.* “Diverse Pathways for Salicin Utilization in Shigella Sonnei and Escherichia Coli Carrying an Impaired Bgl Operon.” *Archives of Microbiology*, vol. 192, no. 10, 2010, pp. 821–33, 10.1007/s00203-010-0610-8..
- Dho, Maryvonne, and J. P. Lafont. “Escherichia Coli Colonization of the Trachea in Poultry:

- Comparison of Virulent and Avirulent Strains in Gnotoxenic Chickens.” *Avian Diseases*, vol. 26, no. 4, 1982, p. 787., doi:10.2307/1589865.
- Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C. and III, R. C. (2000); Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region; *Infection and Immunity*, 68, pp. 4145-4154.
- Duan, Qiangde, *et al.* “Flagella and Bacterial Pathogenicity.” *Journal of Basic Microbiology*, vol. 53, no. 1, 2012, pp. 1–8., doi:10.1002/jobm.201100335.
- Dziva, F. and Stevens, M. P. (2008) ; Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts; *Avian Pathology*, 37(4), pp. 355- 366.
- Germon, P. “IbeA, a Virulence Factor of Avian Pathogenic *Escherichia Coli*.” *Microbiology*, vol. 151, no. 4, 2005, pp. 1179–1186., doi:10.1099/mic.0.27809-0.
- Gorke, B. “Catabolite Control of *Escherichia Coli* Regulatory Protein BglG Activity by Antagonistically Acting Phosphorylations.” *The EMBO Journal*, vol. 18, no. 12, 1999, pp. 3370–3379., doi:10.1093/emboj/18.12.3370.
- Guabiraba, Rodrigo, and Catherine Schouler. “Avian Colibacillosis: Still Many Black Holes.” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 362, no. 15, 2015, doi:10.1093/femsle/fnv118.
- Hensel, M, *et al.* “Simultaneous Identification of Bacterial Virulence Genes by Negative Selection.” *Science*, vol. 269, no. 5222, 1995, pp. 400–403., doi:10.1126/science.7618105.
- Horn, F. *et al.* “Infections with Avian Pathogenic and Fecal *Escherichia Coli* Strains Display Similar Lung Histopathology and Macrophage Apoptosis.” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 7, 2012, doi:10.1371/journal.pone.0041031.

- Johnson, J R. "Virulence Factors in Escherichia Coli Urinary Tract Infection." *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 4, no. 1, 1991, pp. 80–128., doi:10.1128/cmr.4.1.80.
- Kaper, James B., *et al.* "Pathogenic Escherichia Coli." *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, no. 2, 2004, pp. 123–140., doi:10.1038/nrmicro818.
- Khan MA, Isaacson RE. 1998. In vivo expression of the beta-glucoside (bgl) operon of Escherichia coli occurs in mouse liver. *J. Bacteriol.* 180:4746 – 4749.
- Klemm P, Hancock V, Schembri MA (2010) Fimbrial adhesins from extraintestinal Escherichia coli. *Environ Microbiol Rep* 2: 628-640.
- Köhler, Christian-Daniel, and Ulrich Dobrindt. "What Defines Extraintestinal Pathogenic Escherichia Coli?" *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 301, no. 8, 2011, pp. 642–647., doi:10.1016/j.ijmm.2011.09.006.
- Li, G., *et al.* "Characterization of a YjjQ Mutant of Avian Pathogenic Escherichia Coli (APEC)." *Microbiology*, vol. 154, no. 4, 2008, pp. 1082–1093., doi:10.1099/mic.0.2007/015784-0.
- Matter, Leticia Beatriz, *et al.* "Avian Pathogenic Escherichia Coli MT78 Invades Chicken Fibroblasts." *Veterinary Microbiology*, vol. 148, no. 1, 2011, pp. 51–59., doi:10.1016/j.vetmic.2010.08.006.
- Mellata, M., *et al.* "Role of Avian Pathogenic Escherichia Coli Virulence Factors in Bacterial Interaction with Chicken Heterophils and Macrophages." *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 1, 2003, pp. 494–503., doi:10.1128/iai.71.1.494-503.2003.
- Moulin-Schouleur, M., *et al.* "Extraintestinal Pathogenic Escherichia Coli Strains of Avian and Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 10, 2007, pp. 3366–3376., doi:10.1128/jcm.00037-07.

- Pavanelo, Daniel Brisotto, *et al.* “The Periplasmic Trehalase Affects Type 1 Fimbria Production and Virulence of Extraintestinal Pathogenic Escherichia Coli Strain MT78.” *Infection and Immunity*, vol. 86, no. 8, 2018, doi:10.1128/iai.00241-18.
- Pavanelo, Daniel Brisotto *et al.* A TREALASE PERIPLASMÁTICA E O OPERON DE METABOLISMO DE β -GLICOSÍDEOS AFETAM A VIRULÊNCIA IN VIVO NA CEPA Escherichia coli PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL MT78. Orientador: Fabiana Horn. 2017. 159 p. Dissertação (Doutorado Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Porto Alegre, 2017.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. and Denamur, E. (1999) “The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection”, *Infect. Immun.*, 67(2), pp. 546-553.
- Pourbakhsh, Seyed Ali, *et al.* “Dynamics of Escherichia Coli Infection in Experimentally Inoculated Chickens.” *Avian Diseases*, vol. 41, no. 1, 1997, p. 221., doi:10.2307/1592463.
- Ragione, R.m La, and M.j Woodward. “Virulence Factors of Escherichia Coli Serotypes Associated with Avian Colisepticaemia.” *Research in Veterinary Science*, vol. 73, no. 1, 2002, pp. 27–35., doi:10.1016/s0034-5288(02)00075-9.
- Sankar, T. Sabari, *et al.* “Fate of the H-NS–Repressed Bgl Operon in Evolution of Escherichia Coli.” *PLoS Genetics*, vol. 5, no. 3, 2009, doi:10.1371/journal.pgen.1000405.
- Sauer, F. G., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J. and Hultgren, S. J. (2000); Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis; *Current Opinion in Microbiology*, 3, pp. 65-72.

- Schnetz, K., and B. Rak. "Beta-Glucoside Permease Represses the Bgl Operon of Escherichia Coli by Phosphorylation of the Antiterminator Protein and Also Interacts with Glucose-Specific Enzyme III, the Key Element in Catabolite Control." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87, no. 13, 1990, pp. 5074–5078., doi:10.1073/pnas.87.13.5074.
- Schnetz, K. "Silencing of Escherichia Coli Bgl Promoter by Flanking Sequence Elements." *The EMBO Journal*, vol. 14, no. 11, 1995, pp. 2545–2550., doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb07252.x.
- Sperandio, V. "Virulence or Competition?" *Science*, vol. 336, no. 6086, 2012, pp. 1238–1239., doi:10.1126/science.1223303.
- Tivendale, K. A., *et al.* "Avian-Pathogenic Escherichia Coli Strains Are Similar to Neonatal Meningitis E. Coli Strains and Are Able To Cause Meningitis in the Rat Model of Human Disease." *Infection and Immunity*, vol. 78, no. 8, 2010, pp. 3412–3419., doi:10.1128/iai.00347-10.