

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RENATO ELIAS RODRIGUES DE SOUZA SANTOS

**Fatores de transcrição da família Fur e a resposta a ferro e zinco em
*Chromobacterium violaceum***

Ribeirão Preto

2021

RENATO ELIAS RODRIGUES DE SOUZA SANTOS

**Fatores de transcrição da família Fur e a resposta a ferro e zinco em
*Chromobacterium violaceum***

Versão original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Santos, Renato Elias Rodrigues de Souza

Fatores de transcrição da família Fur e a resposta a ferro e zinco em *Chromobacterium violaceum*. Ribeirão Preto, 2021.

p.: 168 ; il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: da Silva Neto, José Freire.

1. *Chromobacterium violaceum*. 2. Homeostase de ferro. 3. Homeostase de zinco. 4. Família Fur de fatores de transcrição. 5. Transportador de zinco. 6. Genética de bactérias. 7. Virulência bacteriana.

Nome: SANTOS, Renato Elias Rodrigues de Souza

Título: Fatores de transcrição da família Fur e a resposta a ferro e zinco em *Chromobacterium violaceum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Avaliado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Fatores de transcrição da família Fur e a resposta a ferro e zinco em Chromobacterium violaceum*”, registrado com o número **181/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Freire da Silva Neto**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de setembro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 100 camundongos Balb c fêmeas pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 25/09/2017 a 25/10/2021.

We certify that the Protocol nº 181/2017, entitled “*The Fur family of transcription factors and the response to iron and zinc in Chromobacterium violaceum*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/25/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 100 female Balb/c mice weighing 20g from Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 10/25/2021.

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA-FMRP – USP

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução e a conclusão desse trabalho e aqui pretendo brevemente expressar minha gratidão:

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. José Freire da Silva Neto, inicialmente por ter dado a oportunidade de integrar o seu grupo de pesquisa, e também gostaria de agradecer pela excelente condução de minha orientação, pela disponibilidade e confiança no meu trabalho, que me inspirou, pessoal e profissionalmente, servindo como um modelo de profissional a ser seguido.

Aos membros do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana que tive a oportunidade de conviver. Foram quatro anos excelentes, com muitos momentos alegres e trocas de aprendizado, que com certeza me ajudaram a levar de forma mais leve os anos intensos do doutorado. Em especial, gostaria de agradecer à Kelly, à Juliana e à Júlia, amigas que eu adorei ter conhecido e formado uma amizade sincera. Também gostaria de agradecer à Bianca e ao Waldir, pela oportunidade de ter colaborado e aprendido junto com vocês. Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à Cláudia, pela amizade e também pelo apoio técnico prestado, que certamente ajudou não só a mim, mas a toda a equipe do laboratório.

Aos professores Eric Skaar e Walter Chazin, Vanderbilt University, Tennessee, USA, pela colaboração com os ensaios com calprotectina.

Aos professores Paulo S. R. Coelho, Dario S. Zamboni e Maria Cristina R. A. Barreira, por sempre terem disponibilizado acesso a equipamentos de seus laboratórios, que foram imprescindíveis para a conclusão desse projeto. Em especial, gostaria de agradecer à Sandra M. O. Thomaz, pela sua atenciosidade e pela disposição a ajudar sempre com muita paciência.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, que mantiveram o funcionamento e andamento das nossas atividades, mesmo em épocas complicadas como a pandemia que estamos enfrentando. Um agradecimento especial à secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Gabriela B. Zamoner, por sua prestatividade.

Aos membros da banca examinadora do exame de qualificação, pelo tempo dedicado a análise minuciosa desse trabalho, assim como as dicas e sugestões

que foram feitas e que decerto contribuíram de maneira relevante para a conclusão dessa jornada. E também aos membros da banca examinadora da Tese, por terem aceitado o convite, me ajudando a concluir mais essa etapa da minha vida acadêmica.

À minha família, Adriana, Alexandre, Lauro, Berenice, Rodrigo, Girleide e Vitória, pelo apoio incondicional, companheirismo e incentivo. Em especial, à minha mãe, Adriana, e aos meus avós, Lauro e Berenice, a quem devo tudo o que sou hoje e são meu porto seguro. Eu amo vocês.

Ao João, que esteve ao meu lado me ajudando e fazendo companhia por todos esses anos, mesmo nas etapas difíceis e angustiantes, me acalmando, divertindo e incentivando. Assim como à sua família, em especial à sua mãe, Rosângela, pela amizade e companheirismo.

À Livia, Raquel, Ana Cláudia e Daniela que mesmo com a distância, sei que sempre pude contar com a amizade de vocês.

Ao apoio financeiro fornecido pela FAPESP e pelo CNPq, sem o qual seria muito difícil concluir essa jornada. Aos contribuintes que financiam essas agências de fomento a pesquisa e possibilitam a realização desse e de tantos outros projetos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio institucional ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP.

AGRADECIMENTOS PELO APOIO FINANCEIRO E DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado, processo nº 2017/03342-0.

À FAPESP, pela concessão dos auxílios financeiros ao Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana (LREGPB), que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), pelo apoio financeiro anual concedido ao LREGPB.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de doutorado durante o período de maio a novembro de 2017, processo 141941/2017-0. Também agradeço pelo apoio institucional ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio institucional ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP.

Declaração de responsabilidade: “As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

RESUMO

Santos, Renato Elias Rodrigues de Souza. **Fatores de transcrição da família Fur e a resposta a ferro e zinco em *Chromobacterium violaceum***. 2021. 168 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os metais de transição ferro e zinco são micronutrientes essenciais a todas as formas de vida. Estes metais desempenham funções catalíticas, estruturais e regulatórias, atuando como cofator de inúmeras proteínas em bactérias e em eucariotos. No contexto da infecção, tanto o hospedeiro vertebrado quanto os patógenos competem por esses metais. As bactérias utilizam inúmeras estratégias para superar os mecanismos de imunidade nutricional do hospedeiro e ter acesso ao ferro e ao zinco. Nesse trabalho, caracterizamos os fatores de transcrição Fur e Zur quanto às suas funções na manutenção da homeostase de ferro e zinco e na virulência da bactéria ambiental *Chromobacterium violaceum*, um patógeno oportunista de humanos. A obtenção do mutante nulo Δfur foi possível somente em limitação de ferro, indicando que Fur é condicionalmente essencial em *C. violaceum*. O mutante espontâneo Fur^{R40S}, que tem Fur parcialmente funcional, mostrou maior produção de sideróforos e susceptibilidade ao estresse oxidativo. O mutante Δfur teve fenótipos pleiotrópicos, como aumento na produção de sideróforos, redução de crescimento e sobrevivência na presença de ferro e peróxido de hidrogênio e diminuição na produção de biofilme e na motilidade do tipo *swimming*. Muitos dos problemas gerais de *fitness* do mutante Δfur foram revertidos na linhagem Δfur T8 que possui inserção do transposon T8 em um locus CRISPR/Cas. Tanto a linhagem Δfur quanto a Δfur T8 apresentaram forte atenuação de virulência em camundongos, indicando a importância de Fur na patogênese de *C. violaceum*. Por fim, demonstramos que em suficiência de ferro, Fur atua como repressor dos genes *cbaF* e *cbuA*, relacionados com uso de ferro via sideróforos. Em relação ao fator de transcrição Zur, ensaios de β -galactosidase revelaram que esse regulador atua como repressor de um operon que codifica Zur, duas proteínas hipotéticas e o transportador de alta afinidade ZnuABC. O promotor deste operon possui um Zur-box e foi desreprimido em limitação de zinco. O único fenótipo encontrado para o mutante Δzur foi um aumento em moléculas indutoras de *quorum sensing* em sobrenadantes de suas culturas. No entanto, na ausência do

transportador ZnuABC, *C. violaceum* ficou mais susceptível à carência de zinco induzida por tratamento com EDTA ou com a proteína ligadora de metais calprotectina. Demonstramos a importância de zinco e do transportador ZnuABC na produção de violaceína, na formação de biofilme, na competição bacteriana e na susceptibilidade a antibióticos. Ensaio de infecção *in vitro* revelaram que o mutante $\Delta znuCBA$ é mais susceptível a morte por neutrófilos, corroborando dados obtidos em colaboração, de que este mutante é atenuado para virulência em camundongos. Em conjunto, essas caracterizações demonstram a relevância dos reguladores Fur e Zur e do transportador ZnuABC na manutenção da homeostase de ferro e zinco e sua importância na virulência de *C. violaceum*.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*, fatores de transcrição, família Fur, virulência bacteriana, homeostase de ferro e zinco, transportador de zinco, imunidade nutricional.

ABSTRACT

Santos, Renato Elias Rodrigues de Souza. **The Fur family of transcription factors and the response to iron and zinc in *Chromobacterium violaceum***. 2021. 168 p. Thesis (Ph.D. in Cellular and Molecular Biology) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The transition metals iron and zinc are micronutrients essential to all forms of life. These metals perform catalytic, structural, and regulatory functions, acting as a cofactor of numerous proteins in bacteria and eukaryotes. In the context of infection, both the vertebrate host and the pathogens compete for these metals. Bacteria use numerous strategies to overcome the mechanisms of host nutritional immunity and to gain access to iron and zinc. In this work, we characterized the transcription factors Fur and Zur regarding their roles in maintaining iron and zinc homeostasis and in the virulence of the environmental bacterium *Chromobacterium violaceum*, an opportunistic human pathogen. Obtaining null mutant Δfur was only possible under iron limitation, indicating that Fur is conditionally essential in *C. violaceum*. The spontaneous mutant Fur^{R40S}, which has Fur partially functional, showed increased production of siderophores and susceptibility to oxidative stress. The Δfur mutant had pleiotropic phenotypes, such as increased siderophore production, reduced growth and survival in the presence of iron and hydrogen peroxide, and decreased biofilm production and swimming motility. Many of the general fitness problems of the Δfur mutant were reversed in the Δfur T8 strain that has an insertion of the T8 transposon at a CRISPR/Cas locus. Both the Δfur and Δfur T8 strains showed strong attenuation of virulence in mice, indicating the importance of Fur in the pathogenesis of *C. violaceum*. Finally, we demonstrate that in iron sufficiency Fur acts as a repressor of *cbaF* and *cbaA* genes related to iron use via siderophores. Regarding the Zur transcription factor, β -galactosidase assays revealed that this regulator acts as a repressor of an operon that encodes Zur, two hypothetical proteins, and the high-affinity transporter ZnuABC. The promoter of this operon has a Zur-box and was derepressed in zinc limitation. The only phenotype found for the Δzur mutant was an increase in quorum sensing molecules in its culture supernatants. However, in the absence of the ZnuABC transporter, *C. violaceum* was more susceptible to zinc deficiency induced by treatment with EDTA or the metal-binding protein calprotectin.

We demonstrate the importance of zinc and the ZnuABC transporter in violacein production, biofilm formation, bacterial competition, and antibiotic susceptibility. *In vitro* infection assays revealed that the $\Delta znuCBA$ mutant was more susceptible to killing by neutrophils, corroborating collaborative data that this mutant is attenuated for virulence in mice. Together, these characterizations demonstrate the relevance of the Fur and Zur regulators and the ZnuABC transporter in maintaining iron and zinc homeostasis and their importance in the virulence of *C. violaceum*.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*, transcription factors, Fur family, bacterial virulence, homeostasis of iron and zinc, zinc transporter, nutritional immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estratégias do hospedeiro para limitar o acesso ao ferro, zinco e manganês nas infecções bacterianas	28
Figura 2 – Mecanismos gerais de homeostase de ferro em bactérias Gram-negativa.	30
Figura 3 – Mecanismo secundário para aquisição de ferro mediado pelo T6SS.....	31
Figura 4 – Mecanismos gerais de homeostase de zinco em bactérias Gram-negativas	33
Figura 5 – Mecanismo secundário para aquisição de zinco mediado pelo T6SS.....	34
Figura 6 – Regulação transcricional mediada por Fur	35
Figura 7 – Regulação transcricional mediada por Zur	37
Figura 8 – Aspectos gerais da bactéria <i>C. violaceum</i>	38
Figura 9 – Número de casos de infecções por <i>C. violaceum</i> relatados entre os anos 2000 e 2020	40
Figura 10 – Panorama atual sobre a patogenicidade de <i>C. violaceum</i>	41
Figura 11 – Representação esquemática da obtenção de linhagens mutantes por troca alélica em <i>C. violaceum</i>	51
Figura 12 – Obtenção da linhagem mutante Δfur em <i>C. violaceum</i>	73
Figura 13 – Obtenção da linhagem com mutação espontânea em <i>fur</i> através da seleção em excesso de manganês	75
Figura 14 – Análise dos níveis de expressão da proteína Fur em <i>C. violaceum</i>	76
Figura 15 – Análises da mutação R40S em Fur	77
Figura 16 – Os mutantes <i>fur</i> possuem maior atividade de sideróforos.....	79
Figura 17 – Avaliação da sobrevivência e do crescimento dos mutantes Δfur e Fur ^{R40S} em diferentes meios de cultura	80
Figura 18 – A viabilidade dos mutantes <i>fur</i> não é afetada em meio líquido.....	82
Figura 19 – Perfil de crescimento do mutante Δfur em excesso de ferro.....	84
Figura 20 – Efeitos da toxicidade mediada por ferro em mutantes <i>fur</i>	85
Figura 21 – Perfil de formação de biofilme rugoso ou liso em meio sólido	88
Figura 22 – Os mutantes <i>fur</i> são mais susceptíveis ao estresse oxidativo.....	89
Figura 23 – Fur reprime a expressão de <i>cbaF</i> e <i>cbuA</i> em condições de suficiência de ferro	91
Figura 24 – Efeitos pleiotrópicos da ausência de <i>fur</i> em <i>C. violaceum</i>	93
Figura 25 – Perfil de virulência em modelo de infecção em camundongos e produção de NET	94

Figura 26 – A inserção do transposon T8 em locus CRISPR-Cas melhora o <i>fitness</i> do mutante Δfur	96
Figura 27 – Perfil de atividade e análise quantitativa de sideróforos.....	99
Figura 28 – Identificação de um possível Fur box em <i>C. violaceum</i>	100
Figura 29 – Organização genômica dos loci contendo genes relacionados a homeostase de zinco em diferentes bactérias.....	101
Figura 30 – Confirmação genotípica dos mutantes Δzur e ΔCV_3067	102
Figura 31 – Determinação de Zur box em <i>C. violaceum</i> e regulação transcricional mediada por Zur.....	104
Figura 32 – Concentração inibitória mínima de TPEN e EDTA em <i>C. violaceum</i>	104
Figura 33 – Perfil de síntese de violaceína em carência de zinco.....	105
Figura 34 – Perfil de sensibilidade a carência de zinco mediada por EDTA.....	107
Figura 35 – Padronização do uso de calprotectina em <i>C. violaceum</i>	109
Figura 36 – Perfil de crescimento e expressão de <i>pzur</i> em carência de zinco mediada por calprotectina.....	111
Figura 37 – Sensibilidade a H_2O_2 do mutante Δzur	112
Figura 38 – Avaliação da produção de biofilme, celulose e motilidade do tipo <i>swimming</i>	113
Figura 39 – A ausência do transportador ZnuABC diminui a competitividade de <i>C. violaceum</i> com outras bactérias.....	114
Figura 40 – A ausência do transportador ZnuABC de <i>C. violaceum</i> diminui a competitividade intra-específica.....	115
Figura 41 – Perfil de sensibilidade a antibióticos e produção de moléculas autoindutoras do <i>quorum sensing</i> e de violaceína.....	117
Figura 42 – Perfil de virulência e de infecção <i>in vitro</i> de neutrófilos.....	119
Figura 43 – Curvas de crescimento para investigação de vias secundárias para aquisição de zinco em <i>C. violaceum</i>	121
Figura 44 – Ensaio de estimulação e perfil de expressão dos receptores dependentes de TonB <i>cbuA</i> e <i>vbuA</i> aos tratamentos com zinco e EDTA.....	122
Figura 45 – Expressão de <i>cbuA</i> e <i>vbuA</i> em resposta ao tratamento conjunto com zinco e EDTA.....	123
Figura 46 – Identidade de proteínas pertencentes ao COG0523.....	124
Figura 47 – Análise de sequência e distribuição da proteína CV_RS15040 em bactérias do gênero <i>Chromobacterium</i>	125
Figura 48 – Predição da topologia da proteína CV_RS15040.....	126

Figura 49 – Comparação da distribuição de ortólogos de CV_RS15040.....	127
Figura 50 – Filogenia de β -proteobactérias baseado na sequência do rRNA 16S	128
Figura 51 – Papel de Fur, Zur e ZnuABC na fisiologia e virulência de <i>C. violaceum</i>	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho	45
Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo	52
Tabela 3 – Genes utilizados para determinação do Fur-box de <i>C. violaceum</i>	100
Tabela 4 – IC ₅₀ de calprotectina.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	sulfato de amônio
°C	Grau Celsius, escala centígrada
× g	Aceleração da gravidade no sistema MKS (9,81 m/s ²)
~	aproximadamente
2,2'-DP	2,2'-dipiridil
2,3-DHB	do inglês, <i>2,3-dihydroxybenzoic acid</i> (ácido 2,3-di-hidroxibenzóico)
AHL	do inglês, <i>N-acyl-homoserine lactone</i>
Amp	Ampicilina
ATCC	do inglês, <i>American type culture collection</i>
BrEt	Brometo de etídeo
BSA	do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
Ca	Cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CAS	do inglês, <i>chrome azurol S</i>
CDF	do inglês, <i>cation diffusion facilitator</i>
CIM	concentração inibitória mínima
Co	Cobalto
CO ₂	dióxido de carbono
COG	do inglês, <i>clusters of orthologous groups</i>
CP	calprotectina
Cu	Cobre
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DEPC	Dietilpirocarbonato ou dicarbonato de dietila
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxiribonucleico)
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO ₄₂₀	densidade ótica no comprimento de onda de 420 nm
DO ₄₉₀	densidade ótica no comprimento de onda de 490 nm
DO ₅₇₅	densidade ótica no comprimento de onda de 575 nm
DO ₆₀₀	densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm
DO ₆₃₀	densidade ótica no comprimento de onda de 630 nm
DTT	do inglês, <i>dithiothreitol</i> (ditiotreitól)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético

Fe	Ferro
Fe ⁺²	Ferro ferroso
Fe ⁺³	Ferro férrico
FeCl ₃	cloreto férrico
FeSO ₄	sulfato ferroso
Fur	do inglês, <i>Ferric Uptake Regulator</i> (Regulador da Captação de Ferro)
h	hora(s)
H ₂ DCDFA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HC	do inglês, <i>casein hydrolysate</i> (hidrolisado de caseína)
HDTMA	do inglês, <i>hexadecyltrimethylammonium bromide</i> (brometo de cetrimônio)
IC ₅₀	concentração inibitória média
i.p.	intraperitoneal
IL-18	interleucina 18
IL-1β	interleucina 1β
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
HP	haptoglobina
HPX	hemopexina
K ₂ HPO ₄	fosfato dipotássico
Kan	do inglês <i>kanamycin</i> (canamicina)
kb	kilobase
KCl	cloreto de potássio
kDa	kilodalton
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotássico
l	litro
LB	meio de cultura Luria-Bertani
LTF	lactoferrina
M	molar
M9HC	meio mínimo M9 suplementado com hidrolisado de caseína 0,1%
M9HC-1%	meio mínimo M9 suplementado com hidrolisado de caseína 1%
mA	miliampère
Mg	Magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
min	minuto(s)

MKS	Sistema de unidades metro/kilograma/segundo
ml	mililitro
mM	milimolar
Mn	Manganês
MnCl ₂	Cloreto de manganês
MOPS	do inglês, <i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
Na ₂ CO ₃	carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico
NaCl	cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato monossódico
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaNO ₃	nitrato de sódio
NET	do inglês, <i>neutrophil extracellular traps</i>
ng	nanograma
NGAL	lipocalina
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
Ni	Níquel
NLRC4	do inglês, <i>NLR family CARD domain-containing protein 4</i>
nm	nanômetros
nM	nanomolar
NRAMP	do inglês, <i>natural resistance-associated macrophage protein</i>
NRPS	do inglês, <i>nonribosomal peptide-synthetase</i> (sintetase de peptídeos não-ribossomal)
OMR	do inglês, <i>outer membrane receptor</i> (receptor de membrana externa)
ON	do inglês, <i>overnight</i>
ONPG	Orto-nitrofenil β-galactopiranosídeo
p	peso
pb	pares de base
PBS	do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	potencial hidrogeniônico
PMA	do inglês, <i>phorbol myristate acetate</i> , (13-acetato de forbol 12-miristato)
pmol	picomol
PMSF	do inglês, <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (fluoreto de fenilmetilsulfonil)

PQS	do inglês, <i>Pseudomonas quinolone signal</i>
PSA	do inglês, <i>peptone sucrose agar</i>
PSA-CAS	do inglês, <i>peptone sucrose agar-chrome azurol S</i>
PTM	do inglês, <i>post-translational modifications</i> (modificações pós-traducionais)
QRDR	do inglês, <i>quinolone resistance-determining regions</i>
rcf	do inglês, <i>relative centrifuge force</i> (força centrífuga relativa)
RNA	do inglês, <i>ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico)
ROS	do inglês, <i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	do inglês, <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
s	segundo(s)
SDS	do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
sRNA	do inglês, <i>small RNA</i> (pequeno RNA)
T3SS	Sistema de Secreção do tipo 3
T6SS	Sistema de Secreção do tipo 6
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris-Borato-EDTA
Tet	Tetraciclina
TF	transferrina
TPEN	N,N,N',N'-tetraquis-(2-piridilmetil)etilenodiamina
U	unidade
UFC	Unidade(s) Formadora(s) de Colônia(s)
V (ou v)	volume
WT	do inglês, <i>Wild-type</i>
Zn	Zinco
Zn ⁺²	Íon zinco
ZnCl ₂	cloreto de zinco
Zur	do inglês, <i>Zinc Uptake Regulator</i> (Regulador da Captação de Zinco)
α	alfa
β	beta
μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Importância dos metais de transição na fisiologia de bactérias e hospedeiros vertebrados.....	24
1.2. Principais mecanismos para homeostase de ferro e de zinco em hospedeiros vertebrados e a imunidade nutricional na infecção.....	26
1.3. Principais mecanismos para manutenção da homeostase de ferro e de zinco em bactérias.....	29
1.4. Fatores de transcrição da família Fur.....	34
1.4.1. O fator de transcrição Fur e a resposta a ferro.....	34
1.4.2. O fator de transcrição Zur e a resposta a zinco.....	36
1.5. Aspectos gerais de <i>Chromobacterium violaceum</i>	37
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. Objetivo geral	43
2.2. Objetivos específicos	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo e manutenção	44
3.2. Manipulação de ácidos nucleicos	48
3.2.1. Extração e purificação de DNA genômico	48
3.2.2. Extração e purificação de DNA plasmidial em pequena escala	48
3.2.3. Reações de PCR.....	48
3.2.4. Purificação de produtos de PCR e digestão enzimática com endonucleases de restrição	49
3.2.5. Reações de sequenciamento de Sanger.....	49
3.3. Obtenção de mutantes nulos e espontâneos em <i>C. violaceum</i>	50
3.4. Complementação gênica das linhagens mutantes.....	56
3.5. Avaliação da atividade de sideróforos em placas PSA-CAS e ensaio quantitativo	56
3.6. Purificação de proteínas, geração de anticorpos policlonais em camundongos e análise da expressão proteica por Western blotting.....	57
3.7. Análises <i>in silico</i> da mutação C118A em <i>fur</i>.....	59
3.8. Ensaio de estimulação de crescimento por sideróforos	59
3.9. Determinação e quantificação de UFC	60
3.10. Curvas de crescimento	60
3.11. Viabilidade celular por ensaio LIVE/DEAD	60
3.12. Perfil de captação de brometo de etídeo em culturas de fase planctônica	61
3.13. Ensaio de rugosidade em meio sólido	61

3.14.	Perfil de sensibilidade ao estresse oxidativo e dosagem de ROS.....	61
3.15.	Análise da expressão gênica por atividade de β -galactosidase	62
3.16.	Motilidade do tipo <i>swimming</i>	63
3.17.	Mensuração de biofilme estático e produção de celulose	63
3.18.	Ensaio com camundongos	64
3.19.	Mutagênese via transposon T8	65
3.19.1.	Mutagênese por inserção do transposon T8	65
3.19.2.	Caracterização genotípica de mutantes <i>fur</i> com inserção do transposon T8	66
3.19.3.	Caracterização fenotípica de mutantes <i>fur</i> com inserção do transposon T8	66
3.20.	Análise <i>in silico</i> para identificação de Fur box em <i>C. violaceum</i>	67
3.21.	Análise <i>in silico</i> para comparação genômica de <i>loci</i> contendo <i>zur</i> , <i>znuA</i> , <i>znuB</i> e <i>znuC</i> em diferentes bactérias	67
3.22.	Análise <i>in silico</i> para identificação de Zur box em <i>C. violaceum</i>	67
3.23.	Efeitos de carência de zinco mediados por EDTA em meio líquido	67
3.24.	Avaliação da atividade bacteriostática, bactericida e indutora de carência de zinco por calprotectina.....	68
3.25.	Ensaio de competição interespécies	69
3.26.	Teste de sensibilidade a antimicrobianos por disco difusão.....	69
3.27.	Deteção de moléculas extracelulares de <i>quorum sensing</i> e quantificação de violaceína	69
3.28.	Participação de sideróforos na aquisição de zinco por <i>C. violaceum</i>	70
3.29.	Análise <i>in silico</i> para comparação de membros do COG0523	70
3.30.	Análises estatísticas.....	70
4.	RESULTADOS	72
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO Fur.....	72
4.1.1.	Fur é condicionalmente essencial em <i>C. violaceum</i>	72
4.1.2.	Os mutantes <i>fur</i> nulo e espontâneo apresentam aumentada produção de sideróforos	78
4.1.3.	O mutante Δfur tem crescimento prejudicado em condições regulares de cultivo	80
4.1.4.	A ausência ou o comprometimento da função de Fur torna <i>C. violaceum</i> mais susceptível à intoxicação por ferro e ao estresse oxidativo	82
4.1.5.	Fur reprime a expressão de <i>cbaF</i> e <i>cbuA</i> em suficiência de ferro	89
4.1.6.	Efeitos pleiotrópicos da ausência de <i>fur</i>	92
4.1.7.	O mutante Δfur é atenuado para virulência e induz menos formação de NET	93

4.1.8.	A inserção do transposon T8 em um locus CRISPR-Cas melhora o <i>fitness</i> do mutante Δfur	95
4.1.9.	Análises preliminares do regulon Fur em <i>C. violaceum</i>	99
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO Zur	101
4.2.1.	Análise genômica e obtenção de mutantes nulos em genes do operon que codifica Zur em <i>C. violaceum</i>	101
4.2.2.	O operon <i>zur-CV_3067-CV_RS15040-znuCBA</i> é reprimido por Zur em resposta a zinco	102
4.2.3.	A ausência de <i>znuCBA</i> e de <i>CV_3067</i> , mas não de <i>zur</i> , torna <i>C. violaceum</i> mais susceptível à carência de zinco	104
4.2.4.	Efeitos pleiotrópicos da ausência de <i>zur</i> e <i>znuCBA</i> em <i>C. violaceum</i>	112
4.2.5.	A ausência de <i>zur</i> e de <i>CV_3067</i> não comprometem a virulência de <i>C. violaceum</i>	118
4.2.6.	Análise preliminar de sistemas secundários para aquisição de zinco	120
4.2.7.	Análise de membros da família COG0523 e da proteína <i>CV_RS15040</i>	123
5.	DISCUSSÃO	129
5.1.	Caracterização de Fur na homeostase de ferro em <i>C. violaceum</i>	132
5.2.	Caracterização de Zur na homeostase de zinco em <i>C. violaceum</i>	140
6.	CONCLUSÃO	147
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
8.	APÊNDICE	168

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos ocupam os mais variados ambientes do planeta Terra. Quando consideramos as bactérias, observamos sua capacidade de existência em vida livre e/ou em associação direta com outros organismos. As bactérias podem estabelecer relações ecológicas cooperativas com seus hospedeiros, como no caso das bactérias da microbiota humana, ou relações em que causam prejuízo ao hospedeiro, como acontece com vários patógenos bacterianos obrigatórios ou oportunistas (GHOSH, 2013; PÉREZ-BROCAL; LATORRE; MOYA, 2013). As bactérias que são capazes de causar doenças possuem fatores de virulência que podem ser de diferentes tipos e existirem em variadas combinações (JOHNSON, 2018). Diversos mecanismos regulatórios de controle da expressão gênica permitem que as bactérias patogênicas expressem combinações destes fatores de virulência em locais e momentos adequados, garantindo o sucesso na colonização do hospedeiro, em invasão celular, e ainda, no escape da resposta imunológica (BEIER; GROSS, 2006; GREEN; ROLFE; SMITH, 2014).

Os fatores de virulência podem ser espécie-específicos ou uma característica geral do gênero ou da família bacteriana (GAL-MOR; FINLAY, 2006; HUBER et al., 2016). Como importantes exemplos de fatores de virulência, temos: i) adesinas fimbriais ou afimbriais, proteínas presentes na superfície bacteriana que facilitam a aderência a superfícies ou a outras células (KLINE et al., 2009; PATEL; MATHIVANAN; GOYAL, 2017); ii) sistemas de secreção de proteínas, que atuam no transporte de proteínas efetoras, toxinas ou enzimas para o meio externo ou diretamente para o interior de células-alvo, com o objetivo de subverter a resposta imune, de eliminar células ou de facilitar a colonização bacteriana (GREEN; MECSAS, 2016); iii) toxinas, que promovem a infecção por danificar as células ou alterar a resposta imunológica do hospedeiro (LOBATO-MÁRQUEZ; DÍAZ-OREJAS; GARCÍA-DEL PORTILLO, 2016); iv) sistemas de *quorum sensing*, utilizados para reconhecimento da densidade populacional bacteriana e coordenação da expressão gênica (AZIMI et al., 2020; RUTHERFORD; BASSLER, 2012); e v) biofilmes, comunidades bacterianas envoltas em uma matriz extracelular que confere proteção contra agentes bióticos a abióticos (FLEMMING et al., 2016; JOO; OTTO, 2012).

Os diversos mecanismos de patogenicidade bacteriana são enfrentados pelas defesas do hospedeiro, sobretudo os mecanismos de imunidade inata e

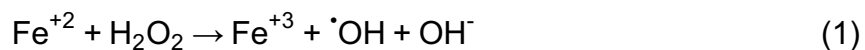
adaptativa. Importantes ações do sistema imune inato incluem: a fagocitose de bactérias por macrófagos e neutrófilos, a expressão de peptídeos para inibição da formação de biofilmes e a ativação de caspases e proteínas ligadoras de carboidratos em resposta a presença de sistemas de secreção bacterianos que desencadeia mecanismos de morte celular programada (CASSON et al., 2013; FEELEY et al., 2017; OVERHAGE et al., 2008). Outro mecanismo muito importante no combate a colonização por microrganismos patogênicos é a restrição imposta pelo hospedeiro ao acesso pelo patógeno a micronutrientes essenciais, como os metais de transição ferro, zinco e manganês, um processo denominado imunidade nutricional (BECKER; SKAAR, 2014; HOOD; SKAAR, 2012; LONERGAN; SKAAR, 2019; PALMER; SKAAR, 2016). Assim, tanto os hospedeiros quanto os patógenos desenvolveram mecanismos para aquisição desses metais e estratégias para evitar a intoxicação por eles. Em bactérias, a coordenação dos processos para aquisição e efluxo de metais de transição ocorre por meio de sistemas de regulação gênica específicos que são determinantes no sucesso evolutivo de patógenos bacterianos (CHANDRANGSU; RENSING; HELMANN, 2017).

1.1.Importância dos metais de transição na fisiologia de bactérias e hospedeiros vertebrados

Vários processos fisiológicos de células eucarióticas e procarióticas requerem metais de transição, uma vez que estes atuam como cofatores necessários para o funcionamento de inúmeras proteínas, seja de hospedeiros ou patógenos (BECKER; SKAAR, 2014; PALMER; SKAAR, 2016). O ferro é o metal de transição mais abundante em sistemas vivos e participa como cofator de enzimas que atuam em processos fisiológicos fundamentais, como na síntese de DNA, na respiração ou na fixação de nitrogênio (HALBLEIB; LUDDEN, 2000; PUIG et al., 2017).

O ferro possui dois estados de oxidação mais comuns, ferro férrico (Fe^{+3}) e ferro ferroso (Fe^{+2}), podendo assim participar de importantes reações de oxido-redução (reações redox). Em condições aquosas, aeróbicas e com pH neutro, predomina o Fe^{+3} que é quase insolúvel. Por isso, o transporte e armazenamento de ferro é feito através da sua coordenação com diferentes proteínas (CONRAD; UMBREIT, 2000). O ferro livre catalisa a formação de ROS (do inglês, *Reactive Oxygen Species*, espécies reativas do oxigênio). Na reação de Fenton (1) o ferro ferroso reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzindo o radical hidroxila

(WINTERBOURN, 1995). O radical hidroxila é altamente reativo e tóxico para as células, provocando desnaturação proteica, quebras na dupla fita de DNA e peroxidação lipídica (GUTTERIDGE, 1986).



Nos hospedeiros vertebrados, o ferro exerce funções importantes, como o transporte de oxigênio. A principal proteína desse processo é a hemoglobina, uma proteína alostérica composta por quatro globinas, cada qual ligada a um grupo heme. O heme é uma porfirina que coordena Fe^{+2} , no qual o oxigênio se liga de modo reversível (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; DUNN; MYTHEN; GROCOTT, 2016). As proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro no hospedeiro vertebrado podem ser classificadas como: i) proteínas que contém o grupo heme, como a hemoglobina, a mioglobina, as peroxidases e os citocromos; ii) proteínas que não contém o grupo heme, como aquelas que atuam no transporte e armazenamento de ferro (transferrina, lactoferrina e ferritina) ou como enzimas que ligam ferro diretamente (ribonucleotídeo redutase) ou na forma de *cluster* ferro-enxofre (WINTER; BAZYDLO; HARRIS, 2014).

O metal de transição zinco ocorre na natureza como um cátion divalente (Zn^{+2}) e, ao contrário do ferro, não possui atividade redox em condições fisiológicas (MARET, 2013). Suas funções em células eucarióticas agrupam-se em três categorias: i) como um componente estrutural de proteínas, ii) como um fator catalítico ou iii) como um mediador de sinalização celular (KAMBE et al., 2015). Como exemplo, o domínio dedo de zinco é um motivo estrutural proteico caracterizado pela coordenação de um ou mais átomos de zinco para a estabilização da estrutura proteica. Quanto à sua função catalítica, o zinco já foi descrito como cofator enzimático nas seis principais classes enzimáticas (oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases). Em relação à mediação da sinalização celular, o zinco desempenha funções extracelulares, como funções neuromodulatórias no sistema nervoso central ou funções intracelulares, como segundo mensageiro (MARET, 2013). Em bactérias, o papel fisiológico do zinco é semelhante àquelas funções destacadas em eucariotos, principalmente como componente estrutural e catalítico de diversas classes de proteínas, como proteases e chaperonas (BLENCOWE; MORBY, 2003).

1.2.Principais mecanismos para homeostase de ferro e de zinco em hospedeiros vertebrados e a imunidade nutricional na infecção

Em humanos, o ferro é absorvido através da dieta nos enterócitos por um transportador de metais divalentes (DMT1, do inglês *divalent metal transporter 1*). Do intestino, o ferro é então distribuído para os diferentes tipos celulares ligado a proteína transferrina, onde irá atuar de modo direto ou ligado a grupos prostéticos como heme e *clusters* ferro-enxofre. No fígado, o excesso de ferro é estocado no citosol em ferritinas. O ferro de hemácias senescentes é reciclado em macrófagos (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004). A regulação da homeostase de ferro se dá através do hormônio hepático hepcidina, que atua ligando-se ao transportador ferroportina, causando sua internalização e degradação e, conseqüentemente, diminuindo o transporte de ferro do meio intracelular para o plasma (GANZ; NEMETH, 2012; NEMETH et al., 2004).

Assim como o ferro, o aporte fisiológico de zinco é garantido principalmente através da absorção intestinal. Estima-se que o corpo humano possua entre 2 e 3 g de zinco, que encontra-se armazenado em sua maior parte no tecido muscular esquelético e nos ossos (KAMBE et al., 2015). Apenas 0,1% da quantidade total deste metal encontra-se no plasma, coordenado as proteínas plasmáticas albumina e α 2-macroglobulina. A mobilização de zinco, seja para absorção ou transporte entre compartimentos celulares, ocorre principalmente através da expressão dos transportadores da família ZIP e ZnT, que estão distribuídos em diversos tipos celulares (COUSINS; LIUZZI; LICHTEN, 2006). Uma outra família de transportadores importante para a mobilização de metais de transição é a família NRAMP, que é conservada desde bactérias a humanos. Estes transportadores são responsáveis pelo transporte de diferentes metais como zinco, cobre, ferro, cádmio, níquel e cobalto (NEVO; NELSON, 2006).

Uma vez que os metais de transição desempenham funções importantes tanto na fisiologia do hospedeiro vertebrado quanto na fisiologia bacteriana, uma estratégia de defesa mediada pelo hospedeiro vertebrado para combater a proliferação de patógenos é a diminuição do acesso aos metais essenciais para as bactérias, em um processo definido como imunidade nutricional (HOOD; SKAAR, 2012; LONERGAN; SKAAR, 2019; PALMER; SKAAR, 2016; WEINBERG, 1975). O ferro e o zinco foram os primeiros metais estudados com essa função, há quase 50 anos, seguido de estudos com manganês (HOOD; SKAAR, 2012; WEINBERG, 1975).

Em estudos pioneiros, foi observado que o excesso de ferro na dieta ou doenças genéticas que aumentam a carga de ferro no organismo exacerbavam a infecção por vários microrganismos (WEINBERG, 1975). A restrição severa de ferro ou zinco gerava um efeito similar (BAGGS; MILLER, 1973; FRAKER; CARUSO; KIERSZENBAUM, 1982), indicando que níveis homeostáticos desses metais são importantes para o hospedeiro combater a infecção.

A imunidade nutricional envolve uma série de mecanismos, reforçados durante a infecção, para manter os metais ligados com alta afinidade a proteínas ou dentro de compartimentos celulares, dificultando o acesso e a quantidade destes micronutrientes livres no plasma e no citosol (BEGG, 2019; HOOD; SKAAR, 2012; PALMER; SKAAR, 2016) (Figura 1). O ferro circulante é transportado na corrente sanguínea associado à transferrina (TF) ou ligado à lactoferrina (LTF) nas secreções mucosas. Dentro das células, o ferro é estocado no citosol em complexos com ferritinas. No sangue, Fe^{+2} é complexado ao grupo heme, que encontra-se ligado a hemoglobina nas hemácias. Quando ocorre a lise das hemácias, a proteína haptoglobina (HP) liga-se à hemoglobina e a proteína hemopexina (HPX) liga-se ao grupo heme livre (Figura 1).

Adicionalmente, nos grânulos dos neutrófilos estão presentes as proteínas lactoferrina (LTF), para ligação ao ferro, calprotectina (CP), para complexação a Mn^{+2} , Zn^{+2} e Fe^{+2} , e lipocalina (NGAL), que se liga a alguns tipos de sideróforos sintetizados por bactérias (Figura 1). A calprotectina, um heterodímero S100A8/S100A9 da família S100 de proteínas ligadoras de cálcio, promove um efeito antimicrobiano contra uma grande variedade de bactérias ao quelar os metais de transição Mn^{+2} , Zn^{+2} e Fe^{+2} (GADDY et al., 2014; HOOD et al., 2012; KEHL-FIE et al., 2011; LIU et al., 2012; LOPEZ et al., 2019). Nos macrófagos, a proteína 1 associada à resistência natural do macrófago (NRAMP1), localizada na membrana do fagossomo, funciona como uma bomba de efluxo de Mn^{+2} e Fe^{+2} , diminuindo o acesso de bactérias vacuolares a esses metais (BEGG, 2019; HOOD; SKAAR, 2012; PALMER; SKAAR, 2016) (Figura 1).

Além da limitação do acesso do patógeno a micronutrientes essenciais, uma outra estratégia empregada pelo hospedeiro durante a imunidade nutricional é a intoxicação dos patógenos por metais. Para isso são utilizados diferentes mecanismos, como a fusão de vesículas contendo zinco e cobre aos fagossomos, ocasionando um processo conhecido como *mismetallation*. Esse processo já foi descrito em infecções por *Salmonella Typhimurium* (KAPETANOVIC et al., 2016) e

Streptococcus pneumoniae (MCDEVITT et al., 2011), por exemplo. Na *mismetallation* ocorre o comprometimento da função proteica através da substituição dos metais que são utilizados como cofatores enzimáticos. Essa substituição se dá seguindo a série Irving-Williams, que mensura a estabilidade relativa de complexos formados entre metais e proteínas e segue a seguinte ordem: $Mg < Ca < Mn < Fe < Co < Ni < Cu > Zn$, com magnésio (Mg) representando o metal com menor estabilidade e cobre (Cu) e zinco (Zn) representando os metais com maior estabilidade às proteínas (CAPDEVILA; WANG; GIEDROC, 2016; CHANDRANGSU; RENSING; HELMANN, 2017). No caso do cobre, além da *mismetallation*, a intoxicação pode ocorrer por oxidação de *clusters* Fe-S de enzimas do metabolismo, como demonstrado em *Escherichia coli* (MACOMBER; IMLAY, 2009).

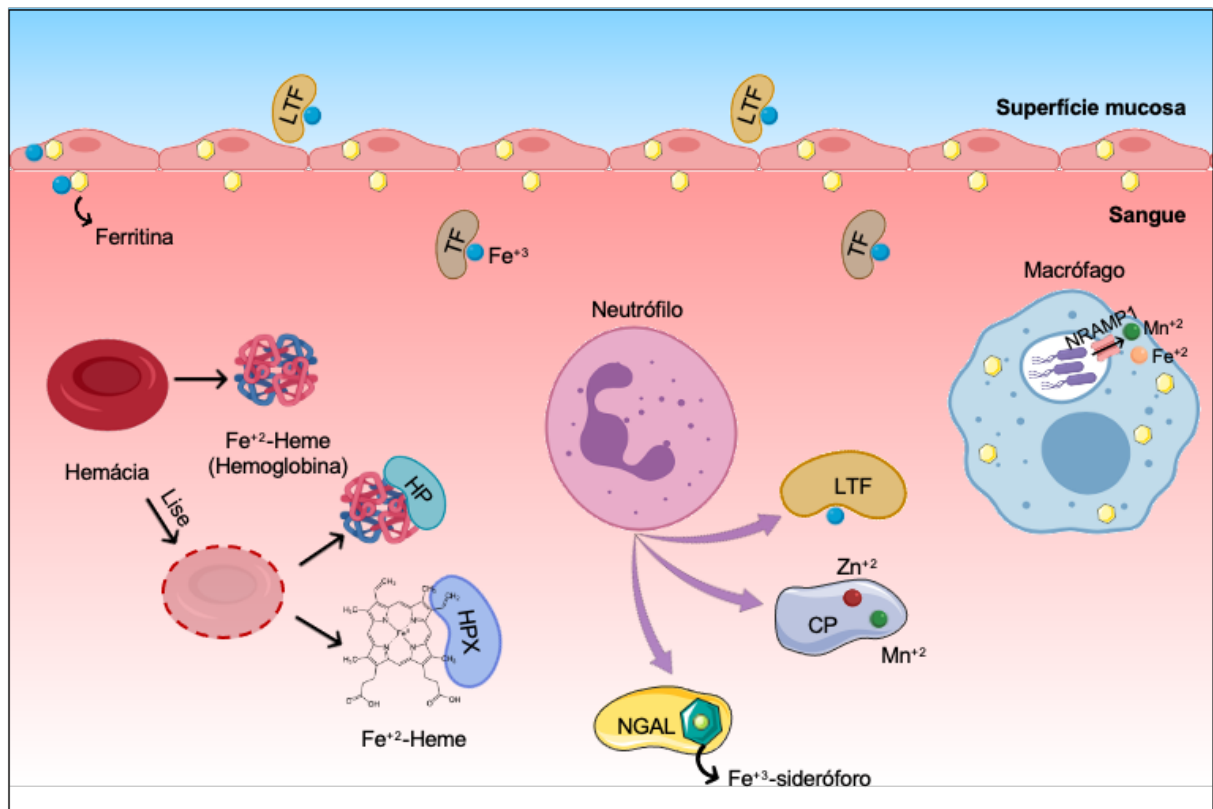


Figura 1 – Estratégias do hospedeiro para limitar o acesso ao ferro, zinco e manganês nas infecções bacterianas. Restrição ao ferro por sua ligação às proteínas transferrina (TF), lactoferrina (LTF) e ferritina. Restrição ao heme por manter a hemoglobina dentro das hemácias, ou pela formação de complexos hemoglobina/haptoglobina (HP) ou heme/hemopexina (HPX). Neutrófilos liberam lactoferrina (LTF), calprotectina (CP) e lipocalina (NGAL). Macrófagos usam proteínas NRAMP1 para limitar metais no vacúolo. Fonte: O autor, 2021; baseado em BEGG, 2019 e PALMER; SKAAR, 2016 e com representações gráficas obtidas do site BioRender (<https://biorender.com/>) e SMART Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

Embora os mecanismos de imunidade nutricional sejam efetivos, as bactérias possuem vários meios para subvertê-los e causar a infecção. De fato, sistemas de captação ou efluxo dos metais ferro, zinco e manganês são importantes determinantes de virulência em várias bactérias (LONERGAN; SKAAR, 2019; PALMER; SKAAR, 2016; PAPP-WALLACE; MAGUIRE, 2006). Por exemplo, em *Enterococcus faecalis* foi demonstrado que o transportador do tipo ABC EfaCBA e os transportadores da família NRAMP MntH1 e MntH2 atuam em conjunto para promover o crescimento em condições de restrição de manganês; a inativação conjunta desses transportadores levou a severa perda de virulência da bactéria (COLOMER-WINTER et al., 2018). Sistemas de captação de manganês tem sido descritos como importantes para virulência de várias outras bactérias Gram-positivas (EIJKELKAMP; MCDEVITT; KITTEN, 2015). Para evadir a intoxicação por metais mediada pelo hospedeiro, as bactérias utilizam-se de sistemas de efluxo, como o exportador de manganês MntE em *Staphylococcus aureus* (GRUNENWALD et al., 2019) e o exportador de zinco CtpC de *Mycobacterium tuberculosis* (BOTELLA et al., 2011).

1.3. Principais mecanismos para manutenção da homeostase de ferro e de zinco em bactérias

Para adquirir metais no ambiente e para contrapor a escassez de metais imposta durante a imunidade nutricional, as bactérias expressam sistemas de captação especializados para a aquisição destes micronutrientes. A regulação transcricional de tais sistemas permite uma modulação fina da expressão desses transportadores, garantindo o aporte necessário de metais sem causar toxicidade às células bacterianas (Figura 2) (CHANDRANGSU; RENSING; HELMANN, 2017).

Em bactérias Gram-negativas, um dos principais reguladores para modulação da aquisição de ferro é o fator de transcrição Fur, que atua através de mudanças conformacionais, se desligando da região promotora de genes responsáveis pela aquisição de ferro quando os níveis intracelulares desse metal encontram-se baixos (Figura 2, etapa 1) (FILLAT, 2014). O desligamento do regulador das regiões promotoras acarreta na expressão de transportadores e de enzimas responsáveis pela síntese de sideróforos, quelantes de baixo peso molecular que são exportados para o exterior para ligar Fe^{+3} com alta afinidade (Figura 2, etapas 2 a 5). Os complexos ferro/sideróforo ou o ferro ligado ao heme, lactoferrina e ferritina são transportados para o interior da célula utilizando receptores na membrana externa

(OMR, do inglês *outer membrane receptors*) dependentes do complexo TonB-ExbB-ExbD e, em seguida, sistemas de transporte do tipo ABC (do inglês, *ATP-binding cassette transporters*) na membrana plasmática (Figura 2, etapas 6 e 9). Para aquisição de Fe^{+2} são utilizados sistemas FeoAB na membrana plasmática (Figura 2, etapa 8) (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; HANTKE, 2001b; PALMER; SKAAR, 2016).

Uma vez no citosol, o ferro é desligado dos sideróforos e distribuído para suas diferentes funções, como síntese de *cluster* Fe-S e heme, incorporação direta em proteínas dependentes de ferro ou armazenamento em ferritinas (Figura 2, etapa 7). Para evitar os efeitos tóxicos dos produtos da reação de Fenton ao DNA bacteriano, a mini-ferritina Dps oxida Fe^{+2} usando H_2O_2 e estoca o metal em uma forma mineral inerte (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; FRAWLEY; FANG, 2014). Quando em suficiência, o ferro se liga ao fator de transcrição Fur, que em sua conformação ativa, atua reprimindo a expressão de genes para captação de ferro (Figura 2, etapa 10) (FILLAT, 2014). Para evitar os efeitos tóxicos em situações em que os níveis intracelulares do metal encontram-se elevados, são expressos os sistemas de efluxo de ferro (Figura 2, etapa 11) (FRAWLEY; FANG, 2014; PI; HELMANN, 2017).

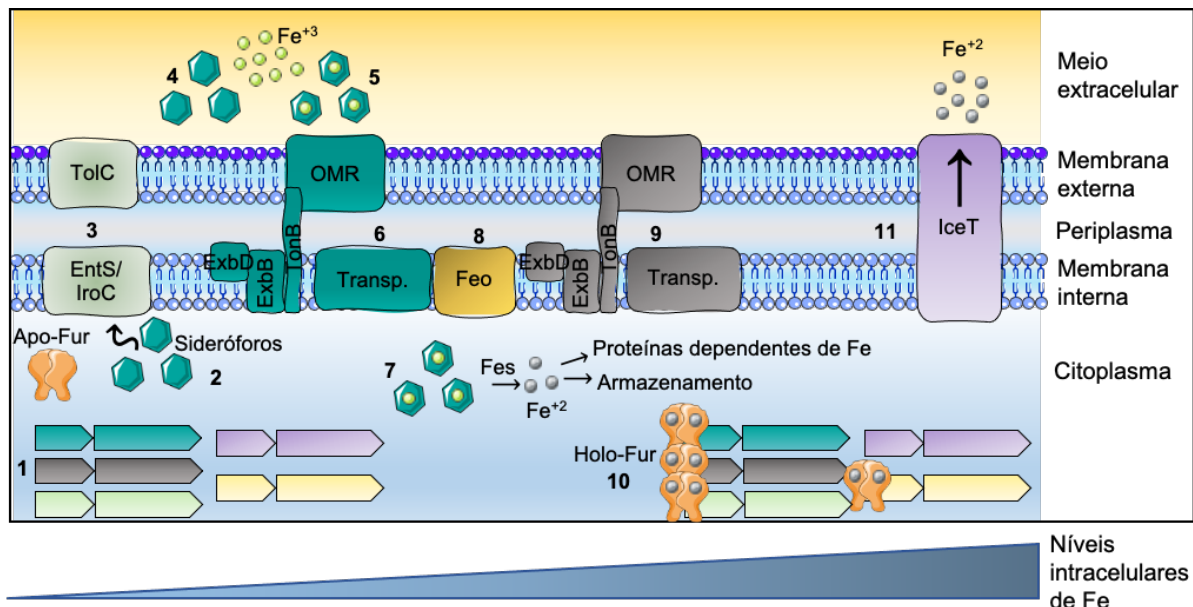


Figura 2 – Mecanismos gerais de homeostase de ferro em bactérias Gram-negativas. Quando ocorre escassez de ferro (Fe) no citosol, o regulador Fur se desliga das regiões promotoras de genes que codificam sistemas de aquisição de Fe (1). São produzidas moléculas como os sideróforos (2) e seus respectivos sistemas para efluxo (3). Uma vez no meio extracelular (4), os sideróforos ligam-se a Fe^{+3} (5) e são transportados para o interior da célula utilizando receptores na membrana externa (OMR) dependentes de TonB-ExbB-ExbD

e transportadores ABC na membrana plasmática (6). O complexo Fe^{+3} -sideróforo é desfeito e reduzido no citosol, disponibilizando o metal solúvel para diversas funções (7). O Fe^{+2} é captado por transportadores Feo (8). Sistemas especializados captam heme, lactoferrina e transferrina (9). Em suficiência de Fe, o regulador Fur ligado ao Fe^{+2} reprime a expressão de genes para a captação de Fe (10). Em excesso de Fe, sistemas de efluxo, como o IceT (11), são expressos para evitar o acúmulo intracelular de ferro. Fonte: O autor, 2021; com representações gráficas obtidas do site BioRender (<https://biorender.com/>) e SMART Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

Além dos mecanismos clássicos para aquisição de ferro, utilizando sideróforos, heme, lactoferrina, transferrina ou até mesmo o ferro solúvel, mais recentemente foram descritas estratégias alternativas para a aquisição deste metal (Figura 3). Em *Pseudomonas aeruginosa*, foi descrito que uma linhagem mutante com deleção de todos os sistemas conhecidos de aquisição ferro ainda era capaz de crescer em meio contendo quelantes de ferro (LIN et al., 2017). Foi identificado que um efector do sistema de secreção do tipo 6 (T6SS, do inglês *type VI secretion system*), denominado TseF, seria incorporado a vesículas de membrana externa contendo a molécula de *quorum sensing* PQS (do inglês, *Pseudomonas quinolone signal*) ligada a ferro. Os autores demonstraram que o TseF facilitou a captação de ferro através da porina OprF e de FtpA, o OMR para o sideróforo pioquelina (Figura 3).

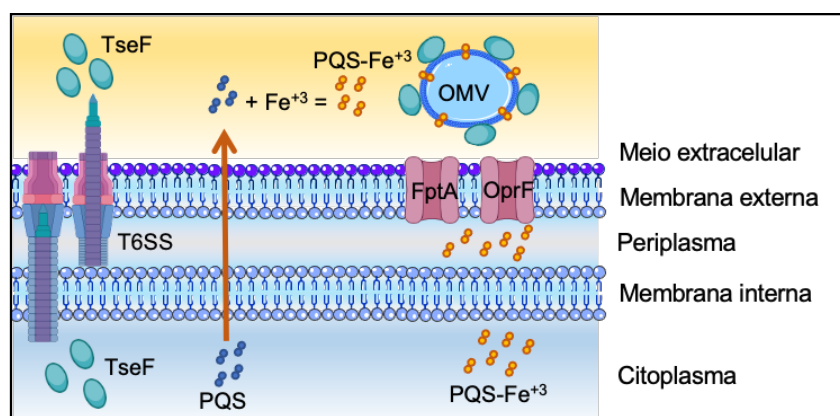


Figura 3 – Mecanismo secundário para aquisição de ferro mediado pelo T6SS. O efector TseF é transportado pelo T6SS de *P. aeruginosa* e então incorporado a vesículas de membrana externa (OMV) contendo PQS- Fe^{+3} . Esse complexo OMV-PQS-TseF é reconhecido pelos receptores de superfície FptA e OprF que facilitam o transporte de ferro para a célula por um mecanismo ainda não identificado. Fonte: O autor, 2021; baseado em Lin et al., 2017, com representações gráficas obtidas do site BioRender (<https://biorender.com/>) e SMART Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

A homeostase de zinco em bactérias Gram-negativas (Figura 4) é regulada por um fator de transcrição membro da família Fur, denominado Zur (do inglês, *Zinc*

Uptake Regulator). Em condições de carência de zinco, Zur sofre mudanças conformacionais e se desliga de regiões promotoras, permitindo a expressão de genes que codificam para sistemas de aquisição de zinco (Figura 4, etapa 1) (CAPDEVILA; WANG; GIEDROC, 2016; MIKHAYLINA et al., 2018). Dentre estes sistemas está o transportador do tipo ABC de alta afinidade ZnuABC, constituído por uma proteína ligadora de zinco periplasmática, ZnuA; uma proteína transmembrana, ZnuB e uma ATPase, ZnuC, que em conjunto transportam zinco do espaço periplasmático para o citoplasma. Nesta etapa de transporte também estão envolvidos ZinT, uma proteína periplasmática acessória ligadora de zinco, e transportadores de baixa afinidade, como ZIP (BHUBHANIL et al., 2014; PETRARCA et al., 2010). A aquisição de zinco do meio extracelular através da membrana externa é feita por OMR dependentes do sistema TonB-ExbB-ExbD, como ZnuD e CbpA (Figura 4, etapas 2 a 5 e 9) (MAZZON et al., 2014; MIKHAYLINA et al., 2018). A proteína CbpA de *Neisseria meningitidis* é especializada em captar zinco ligado a proteína calprotectina do hospedeiro (STORK et al., 2010, 2013).

Mecanismos alternativos para a manutenção dos níveis fisiológicos de zinco incluem a expressão de proteínas ribossomais parálogas, que não necessitam desse metal como cofator enzimático, permitindo que o zinco seja mobilizado para uso em outros processos celulares (Figura 4, etapa 8) (MIKHAYLINA et al., 2018). Além disso, em algumas bactérias foi demonstrada a síntese de uma molécula com função similar aos sideróforos, mas especializada na captação de zinco, denominada como metalóforo (Figura 4, etapas 6 e 7). É o caso em *S. aureus*, que expressa o metalóforo *staphylopine* (GHSSEIN et al., 2016; GRIM et al., 2017). Já em *Yersinia pestis*, trabalhos demonstraram que o transportador YbtX, que é utilizado na aquisição de sideróforos, também é utilizado na aquisição de zinco (BOBROV et al., 2017), assim como o próprio sideróforo de *Y. pestis*, *yersiniabactin* (BOBROV et al., 2014).

Quando os níveis de zinco aumentam no citosol, esse metal liga-se ao regulador Zur. A proteína holo-Zur passa a reprimir a expressão de genes que codificam os sistemas de aquisição de zinco, de maneira a evitar o acúmulo de zinco a níveis tóxicos dentro da célula (Figura 4, etapa 10) (HANTKE, 2001a; MIKHAYLINA et al., 2018). Caso ocorra a intoxicação, três classes de proteínas podem ser expressas para mediar o efluxo do excesso de zinco: as proteínas da família CDF (do inglês, *cation-diffusion facilitator*), bombas do tipo RND (do inglês, *root-nodulation-cell division*) e ATPases do tipo P (Figura 4, etapa 11) (MIKHAYLINA et al., 2018).

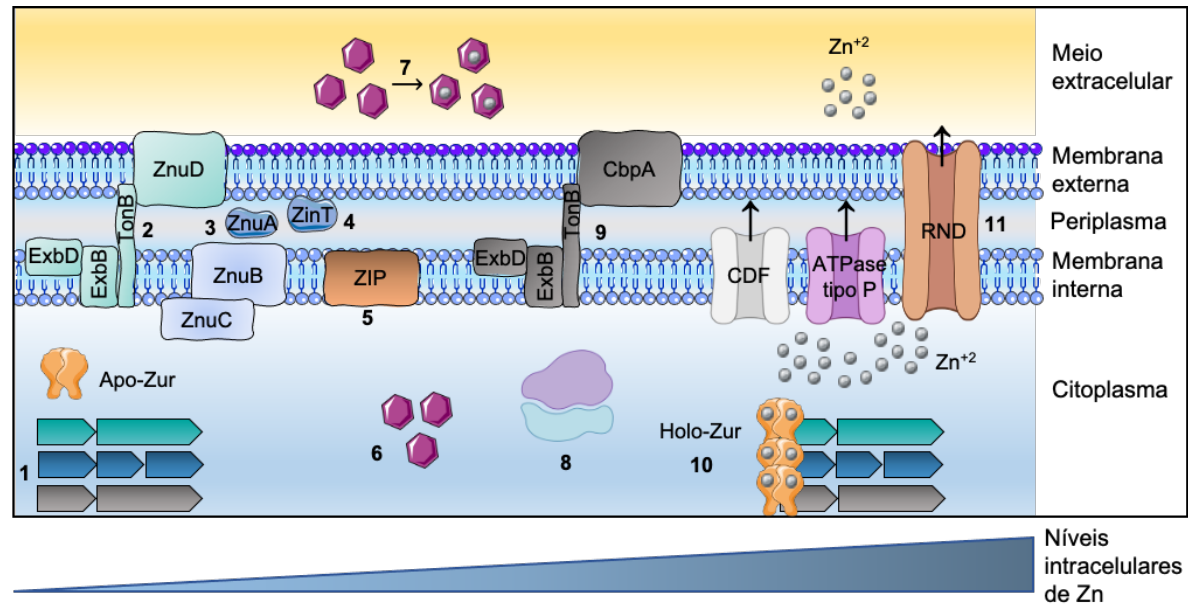


Figura 4 – Mecanismos gerais de homeostase de zinco em bactérias Gram-negativas.

Quando há escassez de zinco (Zn) no citosol, o regulador Zur se desliga de regiões promotoras dos genes que codificam sistemas de aquisição de Zn (1). O Zn é captado do meio extracelular via receptores dependentes de TonB, como ZnuD (2). O transporte ao citosol ocorre via transportadores de alta afinidade, como ZnuABC (3), proteínas acessórias periplasmáticas, como ZinT (4) ou transportadores de baixa afinidade, como ZIP (5). Em alguns casos, a captação de Zn envolve o uso de metalóforos ou ainda de sideróforos (6 e 7). Em situações de escassez aumentada, o Zn pode ser mobilizado de proteínas ribossomais parálogas pela expressão de proteínas ribossomais parálogas (8). Sistemas especializados podem ser expressos, como o receptor dependente de TonB, CbpA, para captação de zinco da proteína calprotectina (9). Quando em suficiência de Zn, o regulador Zur reprime a expressão de genes para captação deste metal (10). Em condições de toxicidade, três principais classes de transportadores podem ser expressos para garantir o efluxo de Zn: CDF, bombas do tipo RND e ATPases do tipo P. Fonte: O autor, 2021; com representações gráficas obtidas do site BioRender (<https://biorender.com/>) e SMART Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

Mais recentemente, também foi demonstrada a participação do T6SS para aquisição de zinco (Figura 5). Em *Yersinia pseudotuberculosis*, o regulador OxyR e estímulos ambientais, incluindo estresse oxidativo, ativam a expressão do T6SS, cujo efetor YezP é responsável pela captação de zinco do meio extracelular (WANG et al., 2015). Já em *Burkholderia thailandensis*, foi descrito que o regulador Zur reprime a expressão do T6SS. Quando a célula está sujeita a limitação de zinco e altos níveis de estresse oxidativo, o efetor TseZ, translocado para o meio extracelular através do T6SS, é o responsável pela aquisição de zinco, que é transportado novamente para a célula via o receptor dependente de TonB, HmuR (SI et al., 2017).

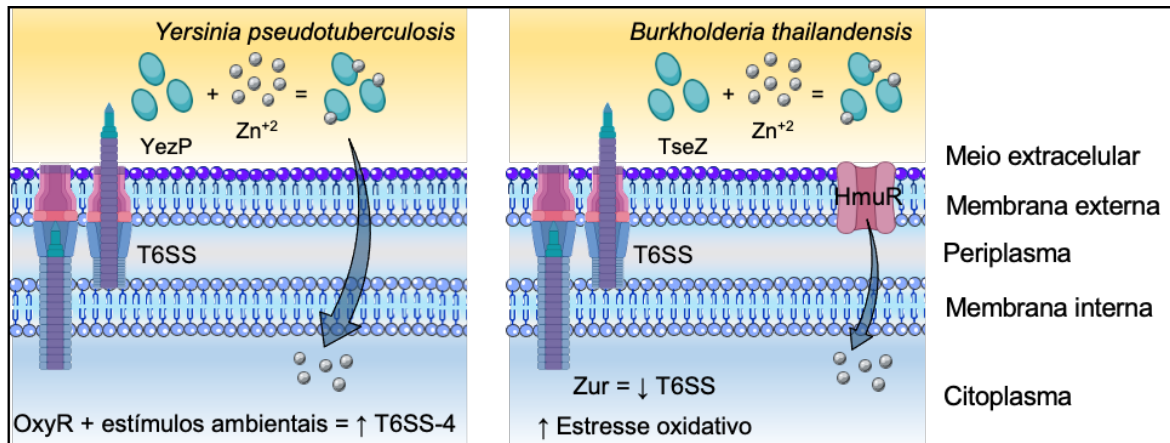


Figura 5 – Mecanismo secundário para aquisição de zinco mediado pelo T6SS. Estímulos ambientais (para *Y. pseudotuberculosis*) ou estresse oxidativo (para *B. thailandensis*) são responsáveis por induzir a expressão do T6SS via OxyR ou Zur. Os efetores YezP e TseZ, translocados para o meio extracelular via o T6SS, são responsáveis pela aquisição de zinco. Em *B. thailandensis*, o receptor dependente de TonB HmuR é o responsável pela aquisição de zinco ligado a TseZ. Em *Y. pseudotuberculosis*, ainda não foi descrito como zinco ligado a YezP é captado. Fonte: O autor, 2021; baseado em Wang et al., 2015 e Si et al., 2017, com representações gráficas obtidas do site BioRender (<https://biorender.com/>) e SMART Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

1.4. Fatores de transcrição da família Fur

1.4.1. O fator de transcrição Fur e a resposta a ferro

O regulador Fur é utilizado para a modulação fina da aquisição de ferro em diversas bactérias ao atuar como um sensor direto dos níveis de ferro no citosol (FILLAT, 2014; TROXELL; HASSAN, 2013). O modelo clássico de atuação deste regulador é via a repressão da expressão gênica em condições de suficiência de ferro (Figura 6). Quando em carência de ferro, o regulador encontra-se em sua forma inativada sem estar ligado a ferro (Apo-Fur) e ao DNA, o que permite o acesso da RNA polimerase a região operadora dos genes e, conseqüentemente, a síntese do RNA mensageiro (FILLAT, 2014; TROXELL; HASSAN, 2013). Esse mecanismo clássico já foi descrito em várias bactérias, como em *E. coli* (BAGG; NEILANDS, 1987), *P. aeruginosa* (POHL et al., 2003), *Bradyrhizobium japonicum* (FRIEDMAN; O'BRIAN, 2004) e muitas outras (PORCHERON; DOZOIS, 2015; TROXELL; HASSAN, 2013). Uma vez que os genes expressos garantam o influxo de ferro e a manutenção das condições fisiológicas necessárias a célula, o regulador Fur associa-se ao ferro (Holo-Fur) e o homodímero é ativado (DENG et al., 2015). Isso possibilita que o regulador se associe a sequências específicas da região promotora, conhecidas

como Fur-box, para impedir o acesso da RNA polimerase e, conseqüentemente, reprimir a expressão de genes para aquisição de ferro (Figura 6).

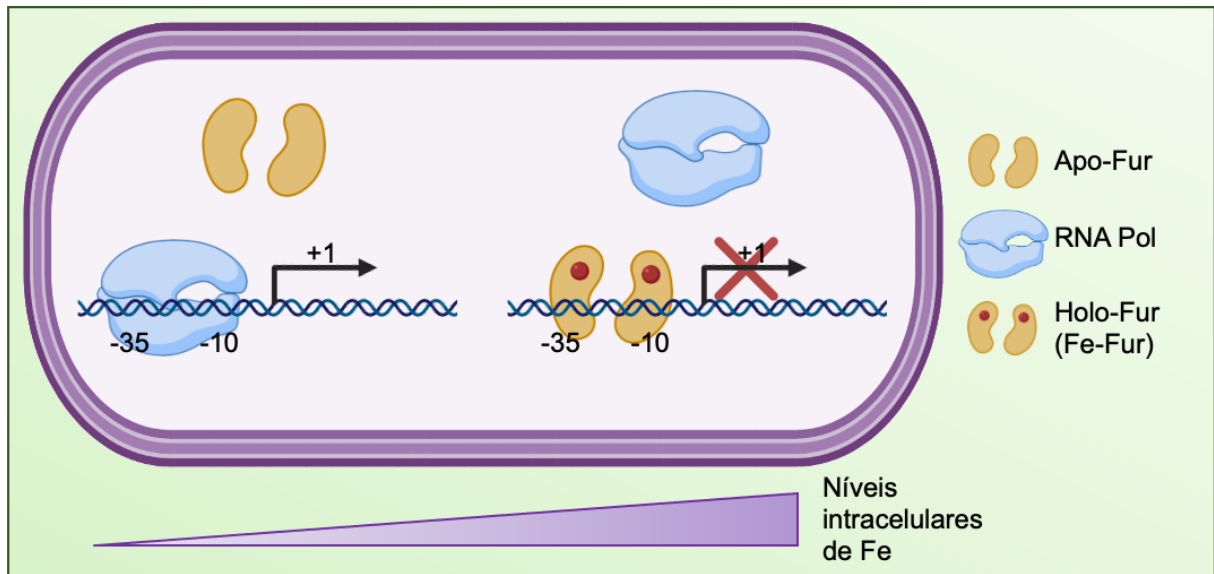


Figura 6 – Regulação transcricional mediada por Fur. Em carência de ferro, Apo-Fur encontra-se inativo e possibilita o acesso da RNA polimerase para a transcrição de genes necessários para a captação de ferro. Uma vez que os níveis intracelulares aumentam, o ferro liga-se ao regulador Fur, que em sua conformação ativada liga-se as regiões Fur-box, impedindo o acesso da RNA polimerase e reprimindo a expressão gênica. Fonte: O autor, 2021; com representações gráficas obtidas do site BioRender (<https://biorender.com/>).

Além do mecanismo clássico de repressão gênica previamente descrito, o regulador Fur pode atuar de maneira direta ou indireta para ativar a expressão gênica (FILLAT, 2014; PORCHERON; DOZOIS, 2015). Em *Salmonella enterica*, por exemplo, foi demonstrado que Fur se liga em uma região rica em AT (BoxA), ativando a expressão gênica de Hild, um regulador da ilha de patogenicidade 1 de *Salmonella* (SPI1) (TEIXIDÓ et al., 2011). Em *Caulobacter crescentus* e *N. meningitidis* o mesmo mecanismo de ativação direta por Fur foi demonstrado para regiões promotoras de genes como *norB*, *pan1*, *nuoA* e *sdhC* (DA SILVA NETO et al., 2009; DELANY; RAPPUOLI; SCARLATO, 2004).

Quanto aos mecanismos indiretos, temos como exemplo a participação do pequeno RNA RyhB, inicialmente descrito em *E. coli* (MASSÉ; GOTTESMAN, 2002; PORCHERON; DOZOIS, 2015; TROXELL; HASSAN, 2013). Este pequeno RNA é transcrito em condições de carência de ferro e associa-se a chaperona de RNA Hfq e ao RNA mensageiro dos genes alvo para diminuir sua expressão via um mecanismo dependente da clivagem por RNase (MASSÉ; GOTTESMAN, 2002). Em condições de suficiência de ferro, Fur reprime a expressão de *ryhB* e, conseqüentemente, os

genes alvo de sua regulação passam a ser expressos. Homólogos de RyhB são encontrados em diversas bactérias filogeneticamente relacionadas a *E. coli*. Este mecanismo de um sRNA desreprimido por Fur em limitação de ferro causar a degradação de mRNAs de genes que codificam enzimas dependentes de ferro não essenciais é chamado de resposta de economia de ferro. Diversos análogos funcionais do sRNA RyhB operam por um mecanismo semelhante, como descrito em *P. aeruginosa* (sRNAs PrrF1 e PrrF2), *Bacillus subtilis* (sRNA FsrA) e *N. meningitidis* (sRNA NrrF) (FILLAT, 2014; OGLESBY-SHERROUSE; MURPHY, 2013).

1.4.2. O fator de transcrição Zur e a resposta a zinco

Um outro membro importante da família Fur de fatores de transcrição é o regulador Zur, especializado na modulação da expressão de genes para a homeostase de zinco (HANTKE, 2001a, 2005; KANDARI; JOSHI; BHATNAGAR, 2021; MIKHAYLINA et al., 2018). Seu mecanismo de atuação assemelha-se ao regulador Fur, através do reconhecimento de uma sequência palindrômica na região promotora dos genes sob sua regulação (Zur-box), reprimindo a expressão gênica em suficiência de zinco (Figura 7). Embora o mecanismo de atuação seja semelhante, o regulon Zur é, geralmente, menor do que o regulon Fur. De maneira geral, o regulon Zur compreende genes que codificam para sistemas de importação de zinco, como o transportador ZnuABC, ZinT e receptores dependentes de TonB, proteínas ribossomais, proteínas pertencentes ao COG0523 e algumas enzimas dependentes de zinco (HANTKE, 2005; MIKHAYLINA et al., 2018).

A via clássica de atuação do regulador Zur é por repressão da expressão gênica (Figura 7), conforme demonstrado em diversas bactérias como *Mycobacterium tuberculosis* (MACIAG et al., 2007), *B. subtilis* (SHIN; HELMANN, 2016), *S. aureus* (LINDSAY; FOSTER, 2001), *E. coli* (GILSTON et al., 2014), *P. aeruginosa* (LHOSPICE et al., 2017), *C. crescentus* (MAZZON et al., 2014) e *N. meningitidis* (PAWLIK et al., 2012). Em algumas bactérias, no entanto, o regulador Zur também atua como ativador da expressão gênica, como em *Xanthomonas campestris* (HUANG et al., 2008), *C. crescentus* (MAZZON et al., 2014) e *N. meningitidis* (PAWLIK et al., 2012).

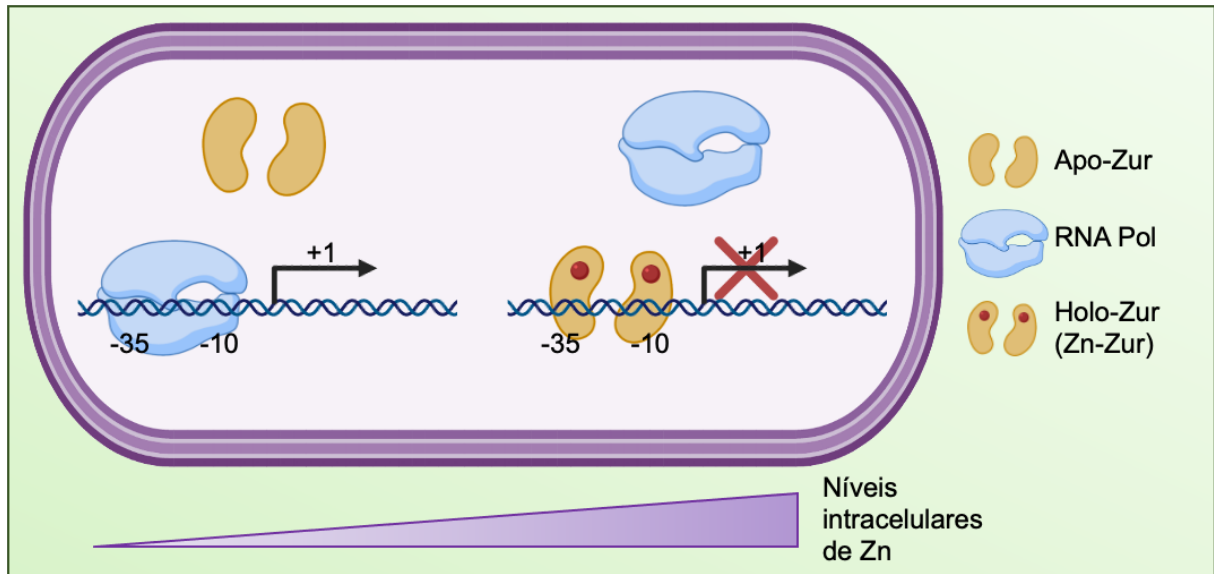


Figura 7 – Regulação transcricional mediada por Zur. Em carência de zinco, Apo-Zur encontra-se inativo e possibilita o acesso da RNA polimerase para a transcrição de genes necessários para a captação de zinco. Uma vez que os níveis intracelulares aumentam, o zinco liga-se ao regulador Zur, que em sua conformação ativada liga-se às regiões Zur-box, impedindo o acesso da RNA polimerase e reprimindo a expressão gênica. Fonte: O autor, 2021; com representações gráficas obtidas do site BioRender (<https://biorender.com/>).

1.5. Aspectos gerais de *Chromobacterium violaceum*

A bactéria *Chromobacterium violaceum* foi acidentalmente descoberta por Bergonzini em 1880 na Itália, com base em uma de suas principais características, a coloração violeta devido à síntese do pigmento violaceína (BERGONZINI, 1881). Na década de 70, na cidade de Manaus (Amazonas) foi identificado o primeiro isolado ambiental de *C. violaceum* no Brasil em uma estação de tratamento de água (CALDAS, 1977). O local onde a bactéria foi isolada reflete o habitat típico de *C. violaceum*, amostras de água e solo de regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. Considerada um patógeno oportunista de humanos e de animais, a via de contágio frequentemente ocorre após o contato de feridas com água contaminada (DURÁN; MENCK, 2001; SNEATH et al., 1953; YANG; LI, 2011).

Do ponto de vista taxonômico, a bactéria *C. violaceum* pertence ao filo Proteobactéria, classe β -proteobactéria, ordem Neisseriales, família Chromobacteriaceae e gênero *Chromobacterium*. É um bacilo Gram-negativo (Figura 8A), flagelado, anaeróbio facultativo que produz colônias violetas em meio de cultura devido a síntese do pigmento violaceína (Figura 8B-C). A violaceína é um derivado indol produzido através da oxidação enzimática de duas moléculas de triptofano (Figura 8D). Apesar da produção do pigmento ser uma característica importante e

diferencial para a espécie, existem relatos de isolados clínicos (TIWARI; PATTANAİK; BERIHA, 2017; YANG; LI, 2011) e ambientais (SIVENDRA; LO; LIM, 1975) não-pigmentados. A via de síntese e esse metabólito ocorrem em outras bactérias, como em *Duganella sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Iodobacter sp.*, e *Massilia sp.* (PARK et al., 2021). Além disso, sabe-se que o sistema de *quorum sensing* Cvil/CviR ativa a síntese de violaceína em alta densidade celular (MCCLEAN et al., 1997).

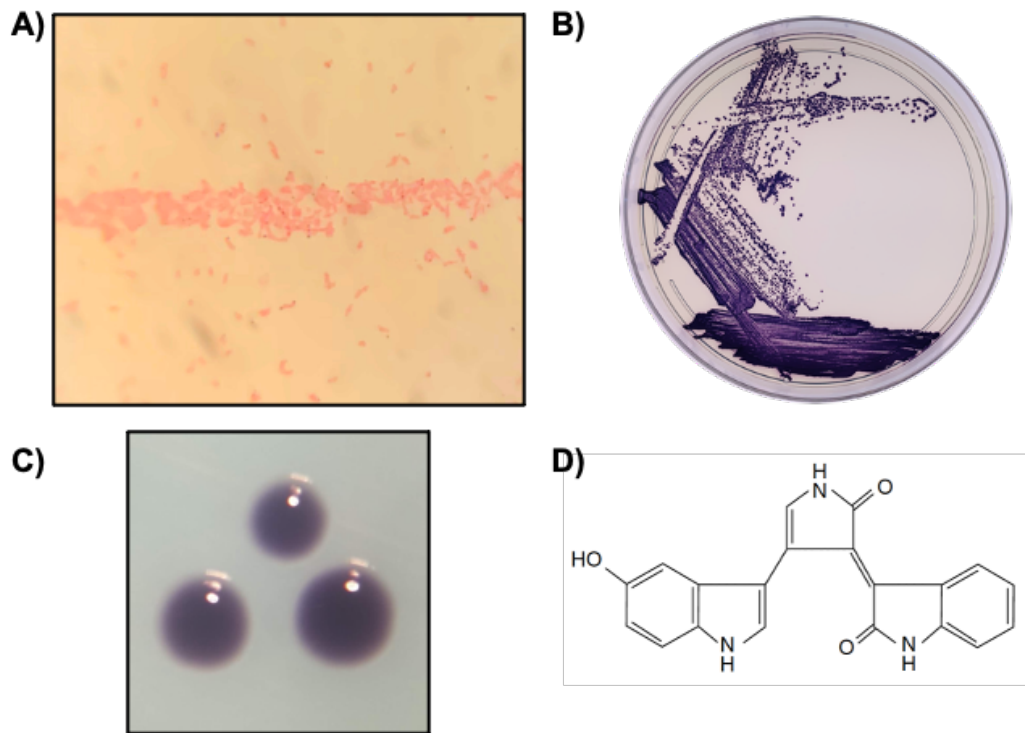


Figura 8 – Aspectos gerais da bactéria *C. violaceum*. **A)** Coloração de Gram após cultivo em meio LB, com visualização de *C. violaceum* por microscopia óptica em aumento de 1000 vezes. **B)** Aspecto macroscópico de *C. violaceum*, linhagem selvagem (WT), cultivada em meio LB a 37°C por 24 h. **C)** Colônia de *C. violaceum* WT cultivada em meio LB a 37°C por 24 h visualizada em lupa. **D)** Estrutura química do pigmento violaceína. Fonte: O autor, 2021.

A violaceína e outros metabólitos sintetizados por *C. violaceum* possuem potencial para uso farmacológico e industrial (DURÁN; MENCK, 2001; PARK et al., 2021). Durán e Menck revisaram trabalhos da literatura que demonstraram que a violaceína possui atividade microbicida e evita a ingestão das bactérias por amebas terrestres. Ainda, o pigmento também mostrou atividade microbicida contra o fungo fitopatogênico *Rosellinia necatrix*, contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, contra o Vírus do Herpes Simples e Poliovírus após infecções de células HeLa ou contra outras bactérias, como por exemplo *Mycobacterium tuberculosis*. Mais recentemente, foi demonstrado que o pigmento violaceína é entregue através de vesículas de

membrana externa para exercer sua atividade bactericida contra diferentes espécies de bactérias Gram-positivas (BATISTA et al., 2020; CHOI et al., 2020) e tem como seu alvo de ação a membrana plasmática destas bactérias (CAUZ et al., 2019).

Além disso, *C. violaceum* sintetiza o metabólito cianeto, que mostrou atividade microbida contra protozoários ciliados e potencial alternativo ao uso de mercúrio para solubilização de ouro (DURÁN; MENCK, 2001). Ainda, *C. violaceum* sintetiza o antibiótico aerocavina (SINGH et al., 1988) com atividade *in vitro* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o antibiótico aerocianidina (PARKER et al., 1988) que possui atividade *in vitro* majoritariamente contra bactérias Gram-positivas e o antibiótico anisomicina, que é secretado ao meio extracelular e tem sua síntese regulada por *quorum sensing* (MION et al., 2021).

Relatos de casos clínicos demonstram que as infecções por *C. violaceum* associam-se a manifestação de febre, dor abdominal, lesões na pele, formação de abscessos e a rápida disseminação da bactéria para órgãos como o fígado, pulmões e baço (DURÁN; MENCK, 2001; SNEATH et al., 1953). Apesar do quadro clínico severo, do ponto de vista epidemiológico *C. violaceum* não possui alta taxa de infecção. Entretanto, dados da literatura demonstram a taxa de mortalidade variando entre 53% (1952-2009) e 35% (2010-2017) dos casos de infecção (BATISTA; DA SILVA NETO, 2017; YANG; LI, 2011). Estas revisões analisaram 129 casos reportados entre 1952 e 2017, distribuídos principalmente em países tropicais e subtropicais. Dados revisitados e atualizados para este trabalho mostram que nos últimos vinte anos (2000-2020) foram reportados 74 casos, com a mesma tendência de redução na taxa de mortalidade (38%; 28 mortes em 74 casos) e de distribuição em países tropicais e subtropicais (Figura 9). Esta queda na taxa de mortalidade nas duas últimas décadas talvez seja devido a maior rapidez do diagnóstico da infecção ou ao uso adequado da antibioticoterapia.

Em relação aos mecanismos moleculares empregados pelo hospedeiro para a defesa contra a infecção por *C. violaceum*, foi demonstrado que a ativação do inflamassoma NLRC4 pelo T3SS com consequente piroptose dos macrófagos desempenha uma importante função nesse processo (MALTEZ et al., 2015). Os autores demonstraram que a citocina IL-18 ativada através da clivagem por caspase-1 possui um importante papel para primar células *natural killer*, cujos efetores, as perforinas, são importantes para defesa contra nichos replicativos intracelulares no fígado. Assim, a piroptose de macrófagos no baço e a lise de hepatócitos infectados

por células *natural killer* são mecanismos fundamentais para o *clearance* da infecção por *C. violaceum*, pois liberam esta bactéria intracelular para a ação fagocítica de neutrófilos (MALTEZ et al., 2015).

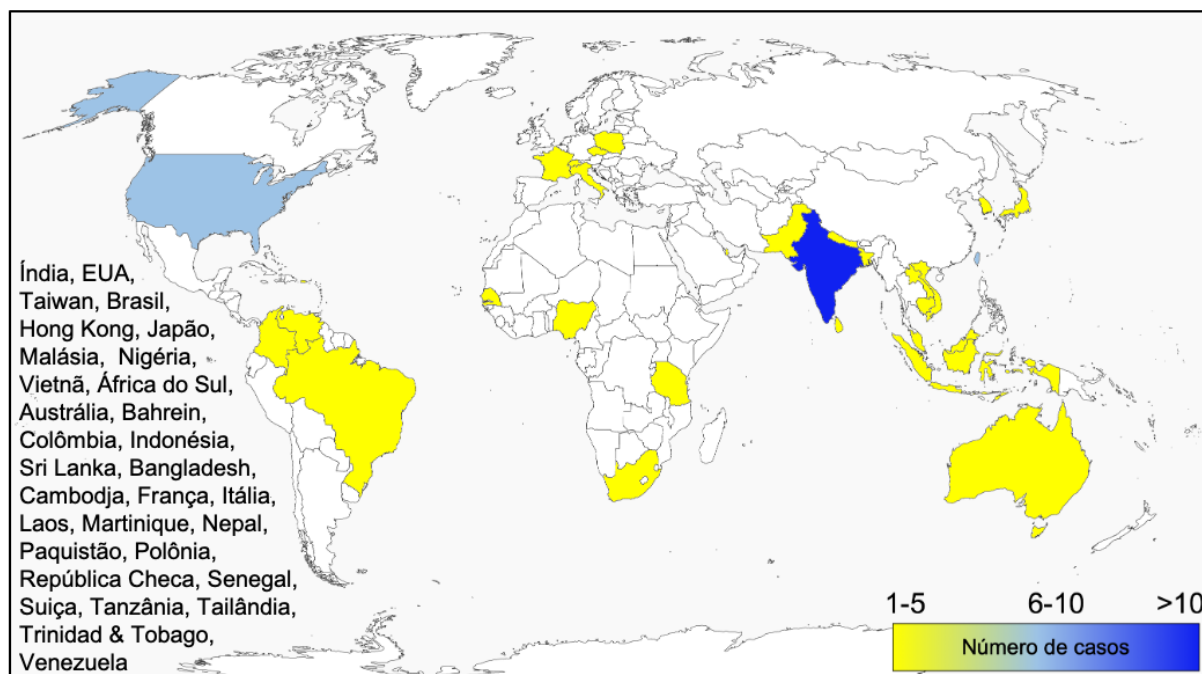


Figura 9 – Número de casos de infecções por *C. violaceum* relatados entre os anos 2000 e 2020. Representação esquemática da distribuição do número de casos descritos nos últimos vinte anos. A análise compilou relatos publicados na base de dados PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) entre o período de janeiro de 2000 e junho de 2020. Fonte: O autor, 2021. O mapa mundi foi obtido através do website Free Vector Maps (<http://freevectormaps.com/>), licenciado pela empresa Striped Candy LLC.

Trabalhos recentes têm elucidado alguns aspectos moleculares da patogenicidade de *C. violaceum* (Figura 10). Inicialmente, foi demonstrado que *C. violaceum* possui dois sistemas de secreção do tipo 3 (T3SS, do inglês *Type III secretion system*) codificados a partir de duas ilhas de patogenicidade (Cpi-1/1a e Cpi-2). Os autores demonstraram que em um modelo de infecção em camundongos, *C. violaceum* provoca hepatite fulminante e que uma das estratégias de citotoxicidade envolve a formação de poros na membrana plasmática de células do hospedeiro via o efector CpiB, translocado pelo T3SS. Mutação em Cpi-1/1a, mas não em Cpi-2, causou atenuação da virulência em modelo de infecção em camundongos (MIKI et al., 2010). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que Cila é o principal regulador da expressão de Cpi-1/1a. Nesse mesmo trabalho, foi realizada a caracterização de um outro efector do T3SS, chamado CopE, cuja principal função foi ativar as Rho GTPases Rac1 e Cdc42, cuja função é induzir ao rearranjo do

citoesqueleto de actina, permitindo a invasão de células epiteliais (Figura 10). O mutante $\Delta copE$ foi atenuado para virulência em modelo murino de infecção, indicando sua contribuição para a virulência de *C. violaceum* (MIKI et al., 2011). Mais recentemente, foi caracterizado um outro efetor do T3SS, chamado CteC, responsável por interromper o processo de ubiquitinação em células do hospedeiro, através da modificação de um resíduo específico de treonina (Figura 10) (YAN et al., 2020).

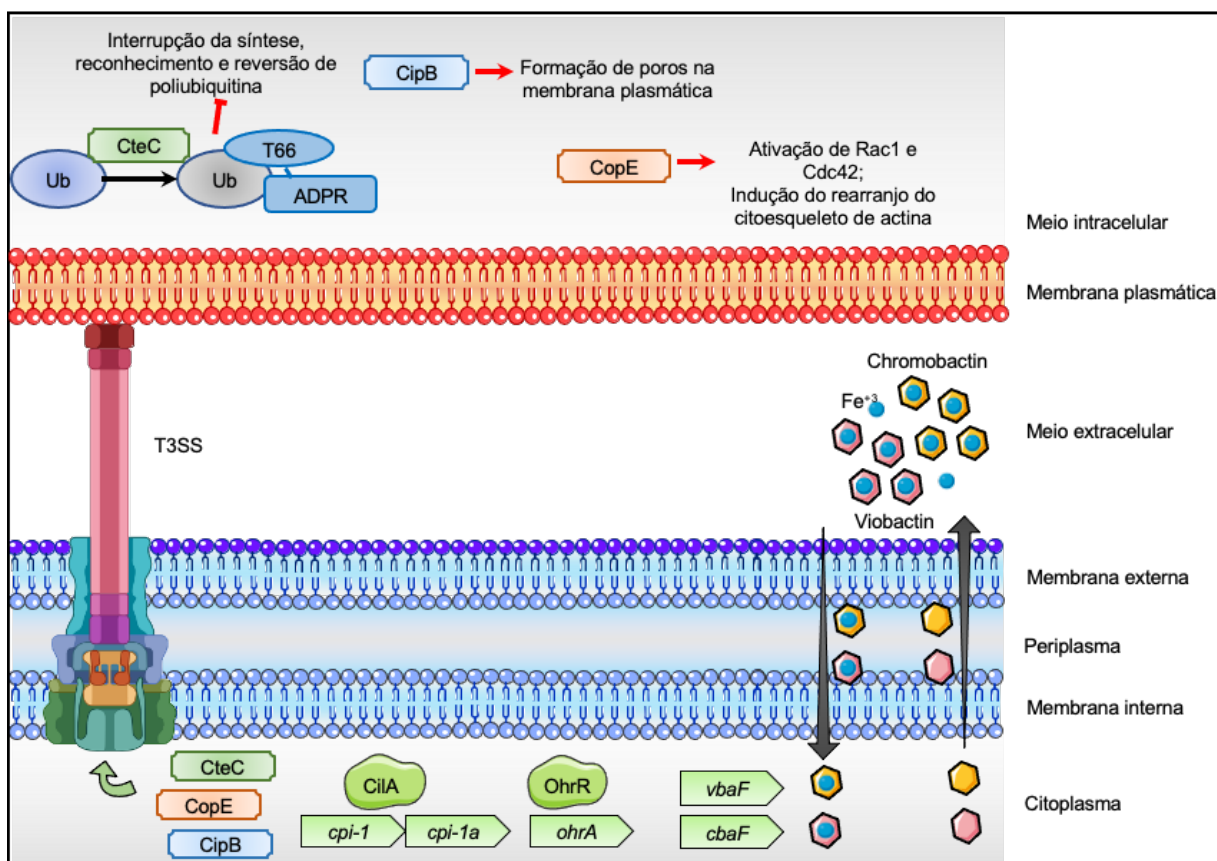


Figura 10 – Panorama atual sobre a patogenicidade de *C. violaceum*. O fator de transcrição Cila é responsável por ativar a expressão da ilha de patogenicidade 1 de *C. violaceum* (Cpi-1/1a). Efeitores translocados pelo sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) dessa ilha, como CteC, CipB e CopE possuem diferentes ações em células do hospedeiro. Mutação nos fatores de transcrição Cila ou OhrR resulta em atenuação da virulência. OhrR é um regulador importante para detoxificação de hidróperóxidos orgânicos. Sideróforos são importantes para a patogênese de *C. violaceum*, pois mutantes da via de síntese e captação dos sideróforos *viobactin* e *chromobactin* são atenuados para virulência. Para fins didáticos é representada apenas uma célula alvo dos efetores do T3SS, mas diferentes tipos celulares foram utilizados nos estudos, como células da linhagem HeLa e hepatócitos. Fonte: O autor, 2021; baseado nos trabalhos de Miki et al., 2010, 2011; Yan et al., 2020; Previato-Mello et al., 2017; Batista et al., 2019. Com representações gráficas obtidas do site BioRender (<https://biorender.com/>) e SMART Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

Além da caracterização do T3SS e seus efetores, trabalhos do nosso grupo de pesquisa investigaram outras vias que pudessem estar envolvidas com a

patogenicidade de *C. violaceum* (Figura 10). Foi demonstrado que um mutante *ohrR* é atenuado para a virulência em modelo murino de infecção. O regulador *OhrR*, pertencente a família *MarR*, é responsável pelo controle transcricional de genes para detoxificação de hidroperóxidos orgânicos (PREVIATO-MELLO et al., 2017). Também demonstramos que *C. violaceum* possui duas vias para biossíntese de sideróforos, denominados *chromobactin* e *viobactin*, e que mutantes para a via de síntese ($\Delta cbaCEBA$ e $\Delta cbaF/vbaF::pNPT$) e para a captação de ambos os sideróforos ($\Delta vbuA\Delta cbuA$) são atenuados para virulência (Figura 10) (BATISTA et al., 2019).

O sequenciamento do genoma de *C. violaceum* revelou um cromossomo circular único com 4.571.080 pb e 64,83% de conteúdo G+C. Foram anotados 4.431 fases abertas de leituras e estudos recentes vêm caracterizando vias e proteínas que nos auxiliam na compreensão da biologia e da patogenicidade dessa bactéria (Figura 10). Análises *in silico* mostram a presença de dois fatores de transcrição da família *Fur* (*Fur* e *Zur*) e diversos genes que codificam proteínas envolvidas com a homeostase de ferro e de zinco em *C. violaceum*.

Visto que muitos patógenos bacterianos utilizam a baixa concentração de ferro e de zinco presente no hospedeiro como um importante sinal para aumentar a expressão de uma ampla variedade de toxinas e determinantes de virulência (LAMONT; KONINGS; REID, 2009; MARTIN et al., 2011; SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004), o presente trabalho buscou elucidar os mecanismos de homeostase destes metais de transição no patógeno oportunista *C. violaceum*, ajudando a descobrir novos fatores de virulência que possam contribuir para a patogenicidade desta bactéria.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral estudar os mecanismos de homeostase de ferro e zinco na bactéria oportunista *Chromobacterium violaceum*, buscando caracterizar o impacto da limitação destes metais e dos fatores de transcrição Fur e Zur na fisiologia de *C. violaceum* e no controle da virulência desta bactéria.

2.2. Objetivos específicos

- i. Determinar a importância dos metais de transição ferro e zinco na fisiologia de *C. violaceum*;
- ii. Obter linhagens mutantes dos fatores de transcrição Fur e Zur de *C. violaceum*;
- iii. Fazer a análise fenotípica dos mutantes Δfur e Δzur ;
- iv. Investigar a função de Fur e Zur na virulência bacteriana, usando um modelo de infecção em camundongos;
- v. Caracterizar possíveis genes regulados em suficiência e limitação de ferro e de zinco;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo e manutenção

Neste trabalho foi utilizada a linhagem selvagem (WT) de *C. violaceum* ATCC 12472 que possui genoma sequenciado (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003) e disponível em bancos de dados como KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, código de acesso T00147), NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, código de acesso ASM770v1) e PATRIC (*Pathosystems Resource Integration Center*, código de acesso 243365.4). Os mutantes nulos foram construídos a partir da linhagem WT de *C. violaceum* e encontram-se descritos na Tabela 1. Esta tabela também possui a lista das linhagens complementadas, seus respectivos controles com os vetores vazios, assim como as outras linhagens e bactérias utilizadas neste trabalho. A Tabela 1 também contém a descrição dos plasmídeos utilizados em diferentes etapas.

Como condições-padrão de cultivo das linhagens bacterianas foi utilizado o meio rico Luria-Bertani (LB) ou o meio mínimo M9 (AUSUBEL et al., 1993), modificado com a adição de hidrolisado de caseína (HC) na concentração final de 0,1% (M9HC). Para a manutenção do mutante Δfur ou em ensaios específicos (indicado na legenda das figuras) foi utilizado o M9 suplementado com 1% HC (M9HC-1%). O cultivo em meio líquido se deu sob agitação constante de 250 rpm a 37°C. Para o cultivo em meio sólido (agar 1,5%) ou em meio líquido em condições estáticas foi utilizada estufa bacteriológica na temperatura de 37°C.

Quando necessário, foram utilizados os seguintes antibióticos: ampicilina com concentração final de 100 µg/ml, canamicina com concentração final de 50 µg/ml e tetraciclina com concentração final de 10 µg/ml para cultivo em meio sólido ou 5 µg/ml para cultivo em meio líquido. Para cultivo de linhagens de *E. coli* o antibiótico tetraciclina foi utilizado na concentração final de 12 µg/ml tanto em meio líquido quanto em meio sólido. Todas as linhagens foram armazenadas em ultrafreezer a -70°C em meio de cultura LB suplementado com glicerol em concentração final de 20% (v/v) para as linhagens de *C. violaceum* ou 10% (v/v) para as linhagens de *E. coli*.

Tabela 1 – Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho

Linhagem ou plasmídeo	Descrição	Referência
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Linhagem utilizada para clonagens em geral	(HANAHAN, 1983)
S17-1	Linhagem utilizada para mobilização de plasmídeos	(SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983)
BL21(DE3)	Linhagem utilizada para expressão heteróloga de proteínas	Novagen
SM10 λ pir	Linhagem utilizada para mobilização de transposons	(JACOBS et al., 2003)
<i>Chromobacterium violaceum</i>		
WT	Linhagem selvagem (WT) de <i>C. violaceum</i> com genoma referência sequenciado	(BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003)
WT[pMR20]	Linhagem controle contendo o vetor pMR20 vazio	Este trabalho.
WT[pMR20 <i>fur</i>]	Linhagem WT com <i>fur</i> (CV_1797) clonado no vetor pMR20	Este trabalho.
Δfur	Mutante nulo para o gene <i>fur</i>	Este trabalho.
Δfur [pMR20]	Linhagem controle contendo o vetor pMR20 vazio	Este trabalho.
Δfur [pMR20 <i>fur</i>]	Mutante <i>fur</i> complementado com a cópia selvagem de <i>fur</i>	Este trabalho.
Δfur [pMR20 <i>fur</i> ^{C118A}]	Mutante <i>fur</i> complementado com a cópia mutada (C118A) de <i>fur</i>	Este trabalho.
Fur ^{R40S}	Linhagem com mutação espontânea em <i>fur</i> (C118A) selecionada em excesso de MnCl ₂	Este trabalho.
Fur ^{R40S} [pMR20]	Linhagem controle contendo o vetor pMR20 vazio	Este trabalho.
Fur ^{R40S} [pMR20 <i>fur</i>]	Mutante espontâneo complementado com a cópia selvagem de <i>fur</i>	Este trabalho.
Fur ^{R40S} [pMR20 <i>fur</i> ^{C118A}]	Mutante espontâneo complementado com a cópia mutada (C118A) de <i>fur</i>	Este trabalho.
WT[<i>pcbA</i> F- <i>lacZ</i>]	Linhagem WT com fusão da região promotora de <i>cbA</i> F (CV_1486) ao gene <i>lacZ</i> sem promotor do vetor pRK <i>lacZ</i> 290	Este trabalho.
Δfur [<i>pcbA</i> F- <i>lacZ</i>]	Mutante Δfur com fusão da região promotora de <i>cbA</i> F (CV_1486) ao gene <i>lacZ</i> sem promotor do vetor pRK <i>lacZ</i> 290	Este trabalho.

Δfur [<i>pcbaF-lacZ</i> /pSEVA221 <i>fur</i>]	Mutante Δfur com fusão da região promotora de <i>cbaF</i> (CV_1486) ao gene <i>lacZ</i> sem promotor do vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290 e complementada com a cópia selvagem de <i>fur</i> clonada no vetor pSEVA221	Este trabalho.
Fur^{R40S} [<i>pcbaF-lacZ</i>]	Mutante espontâneo Fur^{R40S} com fusão da região promotora de <i>cbaF</i> (CV_1486) ao gene <i>lacZ</i> sem promotor do vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290	Este trabalho.
WT[<i>pcbuA-lacZ</i>]	Linhagem WT com fusão da região promotora de <i>cbuA</i> (CV_1491) ao gene <i>lacZ</i> sem promotor do vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290	Este trabalho.
WT[<i>pvbuA-lacZ</i>]	Linhagem WT com fusão da região promotora de <i>vbuA</i> (CV_2230) ao gene <i>lacZ</i> sem promotor do vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290	Este trabalho.
Δfur [<i>pcbuA-lacZ</i>]	Mutante Δfur com fusão da região promotora de <i>cbaA</i> (CV_1491) ao gene <i>lacZ</i> sem promotor do vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290	Este trabalho.
Δfur^{NALR}	Mutante nulo resistente a ácido nalidíxico (NAL^R) com mutação espontânea em <i>gyrA</i> , para seleção de mutantes com inserções do transposon T8	Este trabalho.
Δfur CRISPR/Cas::T8	Mutante Δfur^{NALR} com inserção aleatória do transposon T8 em locus CRISPR/Cas, também denominado Δfur T8	Este trabalho.
$\Delta cbaCEBA$	Mutante nulo para os genes CV_1485, CV_1484, CV_1483, CV1482 ($\Delta cbaCEBA$)	(BATISTA et al., 2019)
$\Delta cbaCEBA\Delta fur$	Mutante nulo com deleção do operon <i>cbaCEBA</i> e de <i>fur</i>	Este trabalho.
$\Delta cbaCEBA\Delta znuCBA$	Mutante nulo com deleção do operon <i>cbaCEBA</i> e do operon <i>znuCBA</i>	Este trabalho.
Δzur	Mutante nulo para o gene <i>zur</i> (CV_3068)	Este trabalho.
Δzur [pMR20 <i>zur</i>]	Mutante <i>zur</i> complementado com a cópia selvagem de <i>zur</i>	Este trabalho.
ΔCV_3067	Mutante nulo para o gene CV_3067	Este trabalho.
$\Delta znuCBA$	Mutante nulo para os genes CV_3066 (<i>znuC</i>), CV_3065 (<i>znuB</i>) e CV_3064 (<i>znuA</i>)	W.P. da Silva Junior

$\Delta znuCBA$ [pMR20]	Linhagem controle contendo o vetor pMR20 vazio	W.P. da Silva Junior
$\Delta znuCBA$ [pMR20 $znuCBA$]	Mutante <i>znuCBA</i> complementado com as cópias selvagens de <i>znuCBA</i>	W.P. da Silva Junior
WT[p $zur-lacZ$]	Linhagem WT com fusão da região promotora de <i>zur</i> ao gene <i>lacZ</i> sem promotor do vetor pRK <i>lacZ</i> 290	Este trabalho.
Δzur [p $zur-lacZ$]	Mutante Δzur com fusão da região promotora de <i>zur</i> ao gene <i>lacZ</i> sem promotor do vetor pRK <i>lacZ</i> 290	Este trabalho.
$\Delta cvil$	Mutante nulo para o gene <i>cvil</i> (CV_4091)	(BARROSO et al., 2018)
Outras bactérias		
<i>Burkholderia cepacia</i>	Linhagem selvagem de <i>B. cepacia</i> ATCC 17759 com genoma referência sequenciado	(CROOKS; PALMERB; LINDNER, 2018)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Linhagem selvagem de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 com genoma referência sequenciado	(JOHNSON et al., 2017)
<i>Streptococcus mutans</i>	Linhagem selvagem de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 com genoma referência sequenciado	(COYKENDALL, 1977)
Plasmídeos		
pNPTS138	Vetor suicida contendo <i>oriT</i> , <i>sacB</i> , Kan ^R	M.R.K. Alley
pMR20	Vetor com pequeno número de cópias e amplo espectro de hospedeiros contendo <i>oriT</i> , Tet ^R	(ROBERTS et al., 1996)
pSEVA221	Vetor utilizado em amplo espectro de hospedeiros contendo <i>oriT</i> , <i>oriRK2</i> , Kan ^R	(SILVA-ROCHA et al., 2013)
pET15b	Vetor para expressão de proteínas com epítipo His amino-terminal, Amp ^R	Novagen
pIT2	Plasmídeo contendo o transposon T8 (<i>ISlacZ/hah</i>), Amp ^R , Tet ^R	(JACOBS et al., 2003)
pGEM-T easy	Vetor para clonagens, Amp ^R	Promega
pRK <i>lacZ</i> 290	Vetor derivado de pRK2 com gene <i>lacZ</i> sem região promotora, Tet ^R	(GOBER; SHAPIRO, 1992)

Legenda: Kan, canamicina; R, resistência; Tet, tetraciclina; NAL, ácido nalidíxico; His, histidina; Amp, ampicilina;

3.2. Manipulação de ácidos nucleicos

3.2.1. Extração e purificação de DNA genômico

Para a extração do DNA genômico bacteriano, a linhagem WT de *C. violaceum* foi cultivada em meio LB até a fase exponencial ($DO_{600} \sim 2$) e 2 ml da cultura foram centrifugados (12.000 rcf, 3 min, TA). O *pellet* foi ressuscitado em 200 μ l de tampão de lise (Tris-Acetato 40 mM pH 7,8; Acetato de Sódio 20 mM; EDTA 1 mM, SDS 1%) e 100 μ g/ml RNase A. Após adição de NaCl na concentração final de 1,65 M, o material foi centrifugado (12.000 rcf, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e um volume igual de clorofórmio foi adicionado. O microtubo foi homogeneizado por inversão (~ 50 vezes) e centrifugado (12.000 rcf, 5 min, 4°C). O sobrenadante foi cuidadosamente removido para um novo microtubo e o DNA foi precipitado com 600 μ l de etanol 100% gelado, seguido por uma centrifugação (12.000 rcf, 10 min, 4°C). O *pellet* foi lavado duas vezes com 1 ml de etanol 70% gelado, centrifugando nas mesmas condições anteriores. O *pellet* final foi ressuscitado em 50 μ l de tampão TE (40 mM Tris e 1 mM EDTA).

3.2.2. Extração e purificação de DNA plasmidial em pequena escala

Para a extração e purificação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep), as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em 10 ml de meio LB com o antibiótico de seleção adequado para cada plasmídeo e a miniprep foi realizada com os kits Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) ou NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel), seguindo as orientações do fabricante.

3.2.3. Reações de PCR

As reações em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) foram feitas utilizando as enzimas *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), *Taq* Pol DNA Polymerase (Cellco Biotec) ou Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific). As duas primeiras enzimas foram utilizadas para confirmação de clonagens e a enzima de alta fidelidade Phusion foi utilizada nos processos iniciais de clonagens para obtenção dos mutantes nulos e das linhagens complementadas.

Nas reações com a *Taq* DNA polimerase foi utilizado o tampão *Taq* Buffer ($(NH_4)_2SO_4$ 1 \times (Thermo Fisher Scientific) ou *Taq* Reaction buffer (Cellco Biotec); 1,25 mM $MgCl_2$, 5% (v/v) DMSO; 0,2 mM mix dNTPs; 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo, \sim 500 ng de DNA genômico ou 1 μ l da colônia bacteriana lisada e 1 U da *Taq* DNA

Polymerase. Nas reações com a *Taq* de alta fidelidade foi utilizado o tampão *High Fidelity* (HF) 1× (Thermo Fisher Scientific); 0,2 mM mix dNTPs, 3% (v/v) DMSO; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo; ~ 50 ng de DNA genômico e 0,6 U da *Phusion* Polymerase. O tempo de extensão variou de acordo com o fragmento amplificado, sempre seguindo as orientações do fabricante e a temperatura de anelamento variou de acordo com o par dos oligonucleotídeos utilizados. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1%, resolvidos por eletroforese em tampão TBE (Tris Borato EDTA) 0,5× a 100 Volts por aproximadamente 40 min, corados com brometo de etídeo (BrEt) e fotodocumentados.

3.2.4. Purificação de produtos de PCR e digestão enzimática com endonucleases de restrição

Quando necessário, os produtos resolvidos em gel de agarose ou a própria PCR foram purificados utilizando os kits Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) ou NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), seguindo as orientações do fabricante.

Para a digestão enzimática dos produtos de PCR purificados foram utilizadas endonucleases de restrição da empresa Thermo Fisher Scientific. As reações foram realizadas por 1 ou 2 h a 30 ou 37°C de acordo com a enzima, utilizando o tampão que permitisse a maior atividade enzimática de acordo com o indicado pelo fabricante.

3.2.5. Reações de sequenciamento de Sanger

Para as reações de sequenciamento de DNA foi utilizado o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Em cada reação foram utilizados 2 µl de DNA; 3,2 pmol do oligonucleotídeo apropriado; 0,5× BigDye Sequencing Buffer; 0,25× Ready Reaction Premix e água ultrapura para o volume final de 10 µl. O programa do sequenciamento consistiu em desnaturação inicial de 96°C por 1 min, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 s, anelamento dos oligonucleotídeos a 50°C por 5 s e extensão a 60°C por 4 min. Em seguida, as reações foram precipitadas com a adição de 50 µl de isopropanol 75%, seguidos por homogeneização em agitador vórtex e incubação a TA por 15 min. Após, as amostras foram centrifugadas por 20 min, 12.000 rpm, 20°C, e o *pellet* foi lavado duas vezes com 100 µl de etanol 70% com centrifugação por 5 min, 12.000 rpm, 20°C em cada

etapa de lavagem. Por fim, as amostras foram secas a 37°C por 30 min ao abrigo da luz e enviadas para sequenciamento no equipamento ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.3. Obtenção de mutantes nulos e espontâneos em *C. violaceum*

Os mutantes nulos (Tabela 1) foram construídos por troca alélica utilizando protocolo já estabelecido no laboratório para *C. violaceum* (Figura 11) (BARROSO et al., 2018; BATISTA et al., 2019; DA SILVA NETO; NEGRETTO; NETTO, 2012). As regiões flanqueadoras do gene de interesse foram amplificadas por PCR (oligonucleotídeos na Tabela 2), digeridas internamente com a endonuclease de restrição adequada e ligadas utilizando a enzima T4 DNA ligase (New England BioLabs), seguindo as orientações do fabricante. O produto da ligação foi utilizado em uma PCR com os oligonucleotídeos nomeados com final del1 e del4 (Tabela 2). O produto desta PCR foi digerido com as endonucleases de restrição adequadas, clonado no vetor pNPTS138 em *E. coli* DH5 α e sequenciado (Figura 11A-B).

Em seguida, as construções resultantes (pNPTS138 com inserto das regiões flanqueadoras) foram transformadas por eletroporação em *E. coli* S17-1 e mobilizadas por conjugação para *C. violaceum* (Figura 11C). Esse evento foi selecionado em placas LB contendo canamicina (transconjugantes) e ampicilina (eliminação de *E. coli*) (Figura 11D). As colônias de *C. violaceum* Kan^R foram então verificadas por PCR (Tabela 2, Figura 11D) para confirmar a integração da construção.

O segundo evento de recombinação foi selecionado após cultivo por 48 horas em condições padrão em meio LB, sem antibiótico (Figura 11E-F). Em seguida, 1 μ l da cultura foi plaqueado em LB com sacarose nas concentrações de 12 ou 16%, e as placas foram mantidas a 30 e 37°C. Colônias resistentes a sacarose foram testadas para sensibilidade a canamicina (Kan^S). O genótipo resultante desta recombinação pode ser o mutante de interesse ou linhagens com a reversão para o genótipo WT (Figura 11E-F). Assim, uma PCR foi realizada para confirmar a existência da linhagem mutante dentre as colônias testadas (Figura 11E-F).

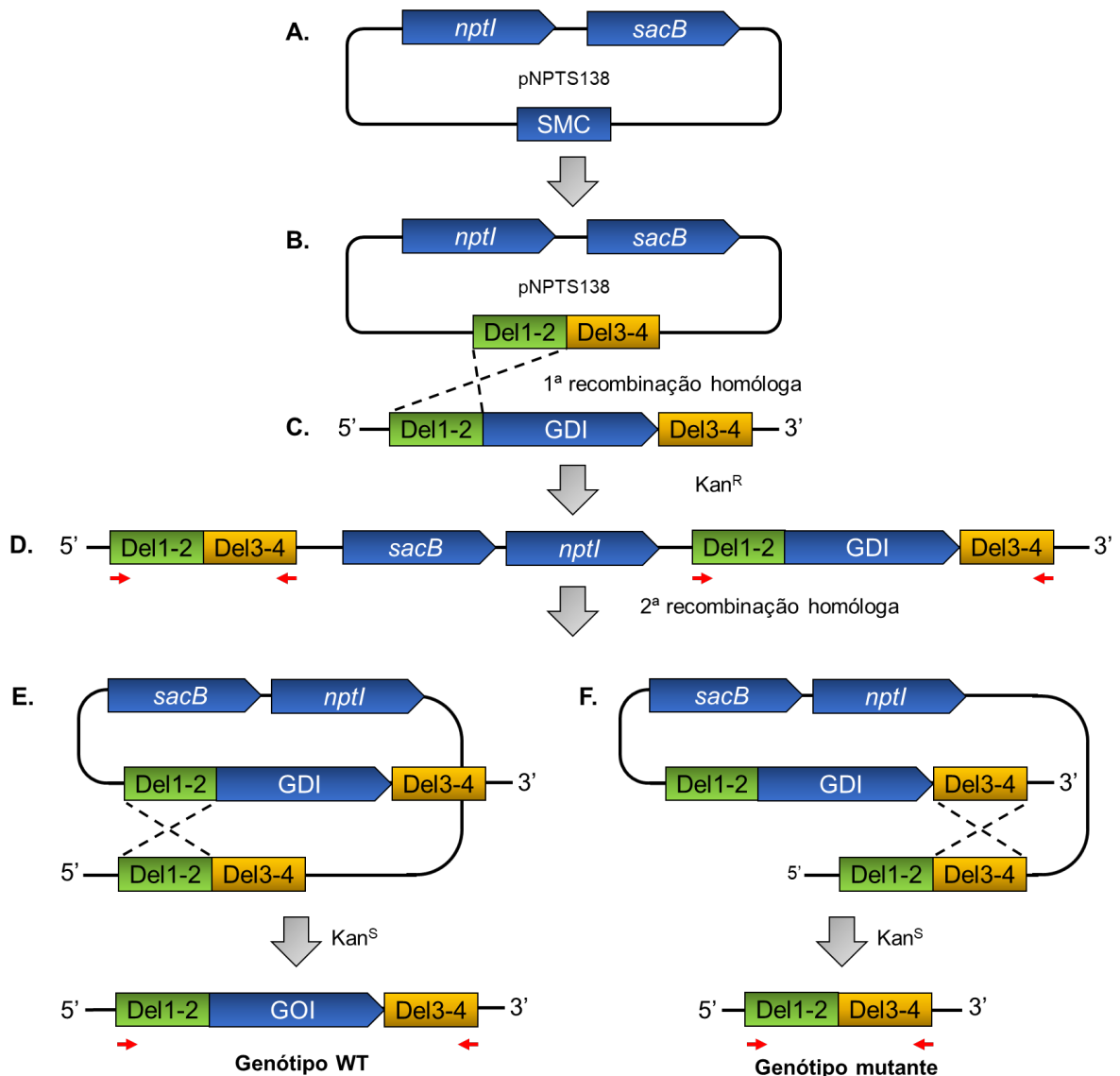


Figura 11 – Representação esquemática da obtenção de linhagens mutantes por troca alélica em *C. violaceum*. **A)** O vetor pNPTS138 possui o gene *nptI* (neomicina fosfo-transferase) que confere resistência à canamicina (Kan^R), o gene *sacB* (levanasacarase) que converte a sacarose a levana, um metabólito tóxico para *C. violaceum* (contra-seleção para perda do vetor) e um Sítio Múltiplo de Clonagem (SMC). **B)** Os fragmentos que flanqueiam o Gene de Interesse (GDI) a ser mutado são amplificados por PCR utilizando oligonucleotídeos que possuem os sítios de enzimas de restrição tanto para ligação das regiões flanqueadoras entre si quanto para a clonagem no SMC do vetor. A construção resultante é sequenciada para se certificar da ausência de mutações. **C)** O plasmídeo com as regiões flanqueadoras clonadas no SMC é então transformado em *E. coli* S17-1 e conjugado com a linhagem WT de *C. violaceum*. Esse processo possibilita a integração dessa construção no genoma na etapa conhecida como primeira recombinação homóloga (1ª rec). A recombinação pode ocorrer aleatoriamente entre os fragmentos Del1-2 (indicado na figura) ou Del3-4 (não indicado) do plasmídeo com sua região homóloga no genoma bacteriano. **D)** As colônias resultantes deste processo de recombinação possuem o vetor integrado no cromossomo. Assim, as colônias Kan^R são verificadas por PCR com os oligonucleotídeos nomeados com final del1 e del4 (Tabela 2), onde são esperados dois produtos de amplificação: um produto contendo o

fragmento de deleção (as regiões flanqueadoras Del1 a Del4) e outro contendo as regiões flanqueadoras mais o GDI, conforme indicado pelas setas vermelhas (posição dos oligonucleotídeos del1 e del4). Em seguida, as colônias que tiveram a integração correta do vetor são inoculadas em meio LB por 48 h para permitir a ocorrência aleatória do segundo evento de recombinação homóloga (2^a rec). **E)** Se houver recombinação entre os fragmentos Del1-Del2, o resultado é a reversão ao genótipo WT. **F)** Se houver recombinação entre os fragmentos Del3-Del4, o resultado é a linhagem mutante. Os cultivos de 48 h são submetidos a etapas adicionais de seleção, a primeira por sacarose, onde espera-se obter apenas colônias que não tenham o vetor integrado no genoma; e a seleção por canamicina, onde espera-se obter colônias sensíveis ao antibiótico. Ao final, as colônias Sac^R e Kan^S são testadas por PCR para determinação do genótipo (WT ou mutante), com os oligonucleotídeos Del1 e Del4.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo

Propósito e nome	Sequência (5'→3') ^a	Descrição
Construção de mutantes nulos		
Fur_del1	ATTATTGGGCCCCCGAATCCGCGCGGTCTATC	Região flanqueadora a montante do gene <i>fur</i> , com 613 pb, sítios de <i>Apal</i> e <i>HindIII</i> , para clonagem no pNPTS138.
Fur_del2	ATTATTAAGCTTGTGACTGGCTTTGCTCATCGTG	
Fur_del3	ATTATTAAGCTTTACGGCGAGTGCCCGGATTG	Região flanqueadora a jusante do gene <i>fur</i> , com 630 pb, sítios de <i>HindIII</i> e <i>EcoRI</i> , para clonagem no pNPTS138
Fur_del4	ATTATTGAATTCTGGCCAGATGCTCGGTATGC	
Zur_del1	ATTATTGGGCCCCGGCCCGGGCGGATCAATCC	Região flanqueadora a montante do gene <i>zur</i> , com 626 pb, sítios de <i>Apal</i> e <i>HindIII</i> , para clonagem no pNPTS138
Zur_del2	ATTATTAAGCTTCTCGGCGGCGGAGATAGG	
Zur_del3	ATTATTAAGCTTCTGGCCGACGCTGCCAGT	Região flanqueadora a jusante do gene <i>zur</i> , com 629 pb, sítios de <i>HindIII</i> e <i>BamHI</i> , para clonagem no pNPTS138
Zur_del4	ATTATTGGATCCGCCAGGCGACATCCAGCTGG	

CV_3067_del1	ATTATT <u>GGGCCCT</u> GTTTGGCATGAAAAGCGGC	Região flanqueadora a montante do gene CV_3067, com 644 pb, sítios de <i>Apal</i> e <i>HindIII</i> , para clonagem no pNPTS138
CV_3067_del2	ATTATTA <u>AAGCTT</u> TGGTCTTGCCGACGCCAG	
CV_3067_del3	ATTATTA <u>AAGCTT</u> GAATTCGACGCCGCCGCG	
CV_3067_del4	ATTATT <u>GGATCCC</u> ATGCCGTCGCGGCCCA	
ZnuCBA_del1	ATTATT <u>GGGCCCG</u> CTGTTCCCGCCCAAGTC	Região flanqueadora a montante do gene <i>znuC</i> , com 647 pb, sítios de <i>Apal</i> e <i>HindIII</i> , para clonagem no pNPTS138
ZnuCBA_del2	ATTATTA <u>AAGCTT</u> GATGTGGTGCACCGCCGG	
ZnuCBA_del3	ATTATTA <u>AAGCTT</u> GAGTCCGAGGCCTCGGCC	Região flanqueadora a jusante do gene <i>znuA</i> , com 634 pb, sítios de <i>HindIII</i> e <i>BamHI</i> , para clonagem no pNPTS138
ZnuCBA_del4	ATTATT <u>GGATCCC</u> TGATCGCGATGGGCCTCT	
M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenciamento dos insertos clonados no vetor pNPTS138
M13 Rv	AGCGGATAACAATTCAC	

Construção de linhagens complementadas

Fur_comp_Fw	ATTATT <u>GAGCTC</u> GGTACTCCGATTGACTCAAACGT	Produto de 556 pb correspondendo ao gene <i>fur</i> e sua região promotora, com sítios <i>SacI</i> e <i>BamHI</i> , para clonagem nos vetores pMR20 e pSEVA221 e para checagem de mutações selecionadas em excesso de MnCl ₂
Fur_comp_Rv	ATTATT <u>GGATCC</u> CAGACAGGCTCGGGACCGAGC	

Zur_comp_Fw	ATTATT <u>GAGCTCCG</u> AAACTCTCCTTGTTTGGCAT	Produto de 671 pb correspondendo ao gene <i>zur</i> e sua região promotora, com sítios <i>SacI</i> e <i>Bam</i> HI, para clonagem no vetor pMR20
Zur_comp_Rv	ATTATT <u>GGATCCG</u> TGGCGCAGCGCGGTGGT	

Expressão heteróloga de proteínas

Fur_exp_Fw	ATTATT <u>CTCGAGATGAG</u> CAAAGCCAGTCACCT	Produto de 432 pb correspondendo ao gene <i>fur</i> , com sítios <i>Xho</i> I e <i>Bam</i> HI, para clonagem no vetor pET15b
Fur_exp_Rv	ATTATT <u>GGATCC</u> TCATCCGCGGCGGCCGCT	
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenciamento dos insertos clonados no vetor pET15b
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

Ensaio de β -galactosidase

Promot_1486_Fw	CCTAGC <u>GGATCCG</u> CTGAAGGCCGGCAAGCTG	Produto de 415 pb da região promotora de <i>cbaF</i> com sítios de <i>Bam</i> HI e <i>Pst</i> I para clonagem no vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290
Promot_1486_Rv	GGCCTA <u>CTGCAGG</u> ATGGCTTCCGCGGTCCAG	
Promot_1491_Fw	CGCGATGCGAACGGAATTGG	Produto de 436 pb da região promotora de <i>cbuA</i> para clonagem no vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290
Promot_1491_Rv	GCGGGGAGCGCTTGTTTTTC	
Promot_2230_Fw	CTCTCCAACGATCCAGGCTG	Produto de 218 pb da região promotora de <i>vbuA</i> para clonagem no vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290
Promot_2230_Rv	CTGCTTCCGGTCACTCTGAC	
Promot_3068_Fw	ATTATT <u>GAATTCG</u> CTTGACTGCTTGAACAC	Produto de 347 pb da região promotora de <i>zur</i> com sítios de <i>Eco</i> RI e <i>Hind</i> III para clonagem no vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290
Promot_3068_Rv	ATTATTA <u>AGCTTC</u> AGCTTCAGCACCTGGC	
<i>lacZ</i> up	GTGACGGCTATCACCATCA	Verificação da orientação de insertos clonados no vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290

Geração de mutantes de transposon e identificação do sítio de inserção

GyrA_QRDR_Fw	ATGACCGATAACCTGTTTCGCC	Fragmento de 419 pb utilizado para sequenciar a região determinante de resistência a quinolonas (QRDR) do gene <i>gyrA</i> de <i>C. violaceum</i>
GyrA_QRDR_Rv	ATGTCGGCCAACAGCTCGTG	
ISTet_Fw	TGGACAGCATGGCCTGCAAC	Fragmento de 560 pb do gene de resistência a tetraciclina utilizado para detectar a presença do transposon T8
ISTet_Rv	TTTCGGCGTGGGTATGGTGG	
CEKG2A	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNAGAG	Oligonucleotídeos randômicos utilizados para identificar o sítio de inserção do transposon T8
CEKG2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNACGCC	
CEKG2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNGATAT	
CEKG4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	Oligonucleotídeos específicos utilizados para identificar o sítio de inserção do transposon T8
<i>lacZ</i> -211	TGCGGGCCTCTTCGCTATTA	
<i>lacZ</i> -148	GGGTAACGCCAGGGTTTTTCC	
CRISPR_ID_Fw	TACCGGGGTACCCCAGGCTTCCAGATACTGCG	Fragmento de 635 pb utilizado para confirmar a inserção do transposon
CRISPR_ID_Rv	TACCGGGGATCCACTGGCTAGCAATGCGTTCAG	

^aSequências sublinhadas indicam os sítios de reconhecimento das endonucleases de restrição utilizadas para propósito de clonagem

Além da estratégia previamente descrita para obtenção de mutantes nulos, também buscamos selecionar mutações espontâneas em *fur* através de seleção em excesso de manganês (HANTKE, 1981; SILVER et al., 1972). Primeiro padronizamos a concentração de excesso de manganês através do cultivo da linhagem WT em diferentes concentrações de MnCl₂, e avaliando o crescimento por até 72 horas. As colônias selecionadas em MnCl₂ foram então testadas no meio indicativo PSA-CAS (descrito em detalhes no item 3.5) para selecionar possíveis mutantes em que a produção de sideróforos estivesse desreprimida. Os prováveis candidatos foram sequenciados com oligonucleotídeos que flanqueiam a fase aberta de leitura do gene *fur* para investigar a presença de possíveis mutações (Tabela 2).

3.4. Complementação gênica das linhagens mutantes

A complementação gênica foi realizada através da clonagem do gene de interesse com sua respectiva região promotora nos vetores replicativos pMR20 ou pSEVA221 (Tabela 1). As regiões de interesse foram amplificadas por PCR utilizando DNA genômico da linhagem WT ou do mutante espontâneo Fur^{R40S} com oligonucleotídeos específicos (Tabela 2) e clonadas nos vetores, conforme descrito no item 3.2. As construções resultantes e os vetores vazios como controle foram mobilizadas por conjugação para as linhagens de *C. violaceum* (Tabela 1).

3.5. Avaliação da atividade de sideróforos em placas PSA-CAS e ensaio quantitativo

A verificação da atividade de sideróforos foi feita utilizando o reagente indicativo Cromo Azurol S (CAS) (LOUDEN; HAARMANN; LYNNE, 2011; SCHWYN; NEILANDS, 1987). A solução *Blue Dye* possui coloração azul, pois são formados complexos entre os reagentes CAS e cloreto de hexadeciltrimetilamônio (HDTMA, *hexadecyltrimethylammonium chloride*) com FeCl₃. Na presença de moléculas que possuem maior afinidade por ferro – como os sideróforos – o ferro férrico é sequestrado por tais moléculas, desfazendo o complexo de ferro com CAS e HDTMA, ocasionando na mudança de coloração de azul para alaranjado.

Associado ao *Blue Dye* é necessário um meio de crescimento para as bactérias. Para *C. violaceum* utilizamos um método modificado com o meio PSA (Peptona Sacarose Ágar) (BATISTA et al., 2019; CHATTERJEE; SONTI, 2002), uma vez que o crescimento bacteriano não foi satisfatório no meio descrito no protocolo original (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Assim, a cada 30 ml do meio PSA (1% peptona; 1% sacarose; 1,4% ágar) foram adicionados 3,6 ml de *Blue Dye*. A solução estoque de *Blue Dye* foi preparada dissolvendo 60 mg de CAS (Sigma-Aldrich) em 50 ml de água ultrapura e adicionado a 2,7 mg de FeCl₃ previamente dissolvido em 10 ml de HCl 10 mM. A finalização do complexo foi feita com a adição de 73 mg de HDTMA dissolvidos em 40 ml de água ultrapura. As concentrações na solução pronta são de CAS 1 mM, FeCl₃ 100 µM e HDTMA 2 mM.

Para avaliar a atividade de sideróforos em meio indicativo PSA-CAS, foram plaqueados 5 µl de culturas mantidas em condições padrão (meio LB, 37°C, ON, 250 rpm). As placas foram incubadas a 37°C e em determinados pontos (18, 24 ou 48 h), as placas foram fotografadas para posterior comparação e quantificação dos halos

alaranjados referentes a atividade dos sideróforos. A mensuração dos halos foi feita através do programa Fiji (<https://imagej.net/Fiji>) utilizando as fotos previamente adquiridas. Cada foto foi obtida com um padrão de escala para garantir a correta comparação entre fotos de diferentes linhagens. A área de cada halo foi medida e plotada no programa GraphPad Prism (versão 8, <https://www.graphpad.com/>).

Também foi avaliada a presença de sideróforos nos sobrenadantes das culturas. Para isso, foram obtidos sobrenadantes filtrados em poro de 0,22 µm de culturas mantidas em meio mínimo M9HC por 48 h. Foram inoculados cerca de 80 µl dos sobrenadantes em orifícios feitos com auxílio de ponteiras para micropipeta 100-1000 µl (P1000) em placas PSA-CAS. A atividade dos sideróforos foi avaliada após 18-24 horas de incubação a 37°C, com fotos adquiridas e quantificadas no programa Fiji, conforme previamente descrito.

Para o ensaio quantitativo foram obtidos sobrenadantes das diferentes linhagens cultivadas por 48 h em meio MM9-Tris (MM9 sais 1× (KH₂PO₄ 150 mM; NaCl 100 mM; NH₄Cl 185 mM); Tris 100 mM; glicose 0,4%; MgSO₄ 2 mM; CaCl₂ 100 µM; hidrolisado de caseína 0,1%). Após leitura da DO₆₀₀ das culturas, os sobrenadantes foram obtidos e misturados a solução de CAS líquido (HDTMA 600 µM; FeCl₃ 25 µM; CAS 150 µM; piperazina 5 µM; HCl 0,75 N) na proporção de 1:10 (1 parte de sobrenadante para 9 partes de CAS líquido). As amostras foram incubadas a TA por 10 min seguido pela mensuração da DO₆₃₀. Como controle foi utilizado o meio MM9-Tris em substituição ao sobrenadante. O cálculo da RSU (do inglês, *Relative Siderophore Unit*, Unidade Relativa de Sideróforo) foi feito através da seguinte fórmula (2):

$$RSU = 100 \times \left[\frac{(DO_{630} \text{ meio MM9-Tris} \times \text{diluição}) - (DO_{630} \text{ sobrenadante} \times \text{diluição})}{DO_{600} \text{ cultura}} \right] \quad (2)$$

3.6. Purificação de proteínas, geração de anticorpos policlonais em camundongos e análise da expressão proteica por Western blotting

Para expressão heteróloga e purificação da proteína Fur, o gene *fur* foi clonado no vetor pET15b (Tabela 1), utilizando o par de oligonucleotídeos descritos na Tabela 2. A construção foi sequenciada e transformada por eletroporação em *E. coli* BL21(DE3) (Tabela 1). A linhagem obtida foi cultivada em 500 ml de meio LB com ampicilina até DO₆₀₀ 0,6-0,8, quando então foi adicionado IPTG (do inglês, *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) na concentração final de 1 mM, por 2 h a 37°C. O *pellet*

bacteriano foi ressuscitado em tampão de lise (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; imidazol 50 mM e PMSF 1 mM) e sonicado (10 pulsos com amplitude de 75% por 20 s com intervalos de 59 s). Em seguida, foram adicionados 2 ml de estreptomicina 10% à solução, que foi agitada lentamente por 20 min e filtrada em filtro com poro de 0,45 µm. A proteína heteróloga foi então purificada do extrato solúvel por cromatografia em coluna de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. As frações contendo a proteína de interesse foram concentradas utilizando Vivaspin 6 Concentrator (Sartorius Stedim Biotech), e o tampão de eluição foi trocado em Disposable PD 10 Desalting Columns (GE Healthcare) para o tampão de estocagem (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 100 mM e glicerol 5%). A avaliação final do processo foi feita resolvendo os extratos totais e as frações obtidas ao longo do processo de purificação em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). A determinação da quantidade de proteína foi feita através do ensaio de Bradford, onde 1 µl da amostra foi incubado com 500 µl do reagente de Bradford em TA por 5 min, seguido pela mensuração da DO₆₀₀. A concentração final foi feita através da equação da reta da regressão linear de curva padrão de BSA (do inglês, *bovine serum albumin*).

Para geração de anticorpos policlonais, cerca de 40 µg da proteína recombinante purificada foram injetados em quatro camundongos BALB/c fêmeas (Protocolo CEUA 181/2017). Na primeira imunização, a proteína foi emulsificada no adjuvante completo de Freund (Sigma Aldrich), e nas três imunizações seguintes foi utilizado o adjuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich). O intervalo entre cada imunização foi de 15 dias. Após a última imunização, os animais foram anestesiados (cetamina 90 mg/kg de peso e xilazina 10 mg/kg de peso) e cerca de 1,5-2 ml de sangue total foram coletados do seio retro-orbital. O sangue total foi centrifugado (4.000 rpm, 10 min, 4°C) e o soro contendo os anticorpos foi coletado e armazenado em alíquotas a -80°C.

Para análise da expressão proteica por Western blotting foram obtidos extratos totais a partir de culturas de *C. violaceum* em fase logarítmica (DO₆₀₀ ~ 1) que foram centrifugadas (16.000 rcf, 25°C, 90 s) e ressuscitadas em tampão de carregamento (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,1% azul de bromofenol e 100 mM DTT), de acordo com a DO₆₀₀, na seguinte proporção: para DO₆₀₀ 0,5 o extrato total foi ressuscitado em 50 µl de tampão de carregamento. Previamente à aplicação no gel de poliacrilamida, as amostras foram aquecidas a

100°C por 10 min. O gel de poliacrilamida 15% foi montado de acordo com as instruções do manual Molecular Cloning (SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. AND MANIATIS, 1989) no sistema Mini-PROTEAN Tetra Handcast (Bio-Rad) e resolvido no sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad), a 100 Volts por aproximadamente 1 h. A transferência para a membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) foi feita em tampão de transferência (Metanol 20% (v/v); Tris 25 mM; glicina 192 mM) a 250 mA por 1 h no sistema Mini-PROTEAN Tetra Handcast (Bio-Rad). Em seguida, o carregamento das amostras foi analisado por coloração de Ponceau S 0,1% (p/v). O Western blotting foi realizado de acordo com as instruções do kit Protein Detector LumiGLO Western Blotting (KPL) com o soro na diluição de 1:1000. A revelação foi feita usando filme Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare), seguindo as orientações do fabricante.

3.7. Análises *in silico* da mutação C118A em *fur*

Para predição da estrutura secundária e terciária de Fur, foi utilizado o programa Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (Phyre 2, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) com a sequência de aminoácidos da versão WT da proteína. O produto da análise foi visualizado no programa PyMOL (<https://pymol.org/2/>), destacando as α -hélices e as folhas β -pregueadas. O domínio de ligação ao DNA foi destacado de acordo com as predições contidas no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/34103108>).

3.8. Ensaios de estimulação de crescimento por sideróforos

A utilização de sideróforos endógenos foi avaliada por ensaio de zona de estimulação de crescimento em disco (BURNSIDE et al., 2015; JIN et al., 2006), utilizando a linhagem $\Delta cbaCEBA$, que não sintetiza sideróforos, embebida em meio LB suplementado com 125 μ M 2,2'-DP. A presença do quelante de ferro 2,2'-DP impede o crescimento dessa linhagem em placas devido a inacessibilidade ao metal. Sobre a placa solidificada, foram adicionados entre 5 e 10 μ l de diferentes linhagens cultivadas em meio LB. A estimulação do crescimento da linhagem $\Delta cbaCEBA$ foi avaliada após incubação por 24 h a 37°C e é diretamente dependente da quantidade de sideróforos produzidas por cada linhagem avaliada no ensaio.

3.9. Determinação e quantificação de UFC

Para avaliação das unidades formadoras de colônia (UFC), os pré-inóculos em meio LB ou M9HC de todas as linhagens foram diluídos para DO_{600} 0,01 em 5 ml de meio LB ou M9HC, respectivamente, e cultivados a 37°C, 250 rpm por 20 h. Após, ~1,7 ml da cultura foram centrifugados e ressuspensão em 1 ml de PBS 1×. Foram feitas sete diluições sucessivas e o plaqueamento de 100 µl da última diluição, que conforme protocolo padronizado em nosso laboratório, possui 1000 UFC/ml. O plaqueamento foi realizado no meio em que as linhagens foram cultivadas originalmente (LB ou M9HC) e incubados a 37°C por 24 h. Após esse período as UFC foram contabilizadas e convertidas para UFC/ml.

Para quantificação do crescimento em ágar, as mesmas placas obtidas no ensaio anterior foram fotografadas em visualização sob lupa e o tamanho das colônias foi quantificado no programa Fiji (<https://imagej.net/Fiji>).

3.10. Curvas de crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas em meio LB ou M9HC a partir de pré-inóculos cultivados no mesmo meio em que as curvas foram feitas. Os pré-inóculos foram diluídos para DO_{600} 0,01 e as curvas foram acompanhadas por até 48 h de cultivo em agitação de 250 rpm e 37°C, retirando-se alíquotas em intervalos de 1 ou 2 h, conforme indicado em cada gráfico. O equipamento BioPhotometer plus (Eppendorf) foi utilizado para mensuração da densidade ótica a 600 nm.

3.11. Viabilidade celular por ensaio LIVE/DEAD

Culturas de fase exponencial ($DO_{600} \sim 1$) ou estacionária foram analisadas quanto a viabilidade celular em meio líquido utilizado o LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability kit (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, as células cultivadas em meio LB ou M9HC foram lavadas em NaCl 0,85% (p/v) e coradas por 15 min com 6 µM de SYTO 9 e 30 µM de iodeto de propídeo. Cerca de 2 µl das suspensões de células foram observadas no microscópio de fluorescência invertido Leica DMI6000 B em lâminas preparadas com um suporte de agarose 1% e lamínula, com excitação dos fluoróforos em 470/490 nm e emissão a 530 nm para o corante SYTO 9 e 630 nm para o corante iodeto de propídeo. Posteriormente, foi realizada a quantificação de células de campos adquiridos de maneira aleatória.

3.12. Perfil de captação de brometo de etídeo em culturas de fase planctônica

Esse ensaio foi baseado em protocolo previamente descrito (LONERGAN et al., 2019), com pequenas alterações. As culturas foram mantidas em meio M9HC ou M9HC suplementado com FeSO_4 50 μM até a fase exponencial (DO_{600} 0,8-1) e então lavadas com PBS 1× estéril e normalizadas para DO_{600} 0,3. Cerca de 100 μl foram transferidos para placa de 96 poços de fundo chato e com isolamento ótico entre cada poço (Corning). Imediatamente antes da leitura da fluorescência no equipamento SpectraMax i3x Fluorescence Reader (Molecular Devices) foi adicionado brometo de etídeo (BrEt) na concentração final de 1 $\mu\text{g/ml}$. Os comprimentos de onda utilizados para excitação e emissão de fluorescência foram 530 nm e 600 nm, respectivamente, por cerca de 300 s, com intervalo de 30 s a cada captura. Esse ensaio também foi realizado utilizando os sobrenadantes de culturas mantidas por 24 h nas mesmas condições descritas anteriormente. Como controle endógeno do experimento, foram adquiridos os níveis de fluorescência tanto de células quanto dos sobrenadantes sem a adição de BrEt.

3.13. Ensaio de rugosidade em meio sólido

Para avaliar o perfil de rugosidade em biofilme, 5 μl de inóculos cultivados em meio LB foram plaqueados em meio PSA suplementado ou não com FeSO_4 600 μM e/ou NaNO_3 60 mM. As placas foram mantidas a 37°C por 72 h e fotodocumentadas com lente macro.

3.14. Perfil de sensibilidade ao estresse oxidativo e dosagem de ROS

A sensibilidade ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi avaliada por ensaio de disco-difusão. 500 μl das culturas de fase estacionária foram diluídas para DO_{600} 0,1 e plaqueadas em meio M9HC-1%. Após a secagem completa das placas, discos de papel filtro estéril foram posicionados na placa e sobre estes foram adicionados diferentes concentrações de H_2O_2 em um volume final de 10 μl . Após 24 h de cultivo a 37°C, fotos foram adquiridas e as zonas de inibição de crescimento foram mensuradas no programa Fiji (<https://imagej.net/Fiji>).

Para determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) foi utilizada a sonda permeável H_2DCFDA (do inglês, *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*, Invitrogen). As culturas foram mantidas em meio

M9HC até a fase exponencial e foram tratadas ou não por 40 min com FeSO₄ 0,5 mM ou H₂O₂ 20 mM. Após o tratamento, a sonda H₂DCFDA recém preparada em DMSO foi adicionada, na concentração final de 10 µM por 45 min. Por fim, as células foram lavadas em PBS e dispostas em placa com 96 poços de fundo chato e com isolamento ótico entre cada poço (Corning). A fluorescência de cada poço foi medida no equipamento SpectraMax i3x Fluorescence Reader (Molecular Devices) utilizando o comprimento de onda de 490 nm para excitação da sonda e detecção da emissão de fluorescência no comprimento de onda de 525 nm.

3.15. Análise da expressão gênica por atividade de β-galactosidase

As regiões promotoras dos genes *cbaF*, *cbuA* e *vbuA* foram amplificadas por PCR (Tabela 2) e clonadas no vetor pGEM (Tabela 1) em *E. coli* DH5α, seguindo as orientações do fabricante. Após verificação da clonagem por PCR, foi feita a miniprep dos plasmídeos que continham o inserto de interesse clonado e a digestão com as endonucleases de restrição adequadas para clonagem no vetor pRK/*lacZ*290 (Tabela 1). No caso da região promotora de *cbuA*, que não continha sítios de endonucleases de restrição nos oligonucleotídeos, foi feita a ligação no sítio de *EcoRI* do vetor pRK/*lacZ*290, seguido da checagem por PCR da orientação de ligação do inserto utilizando um oligonucleotídeo da região promotora e um oligonucleotídeo anelado próximo ao sítio múltiplo de clonagem do vetor (M13 Fw ou *lacZ* up, Tabela 2). Uma vez obtidos os plasmídeos com as regiões promotoras em fusão ao *lacZ*, estes foram transformados por eletroporação em *E. coli* S17-1 para conjugação com as diferentes linhagens de *C. violaceum* (Tabela 1).

A análise da expressão gênica utilizando esse sistema repórter foi feita utilizando protocolo previamente estabelecido (MILLER, 1972). As linhagens foram cultivadas em meio LB ou M9HC até a fase exponencial de crescimento, seguido pela adição dos tratamentos (2,2'-DP ou FeSO₄) por 1 h. Após, 100 µl da cultura foram adicionados a 800 µl do tampão Z (NaH₂PO₄ 40 mM; Na₂HPO₄ 60 mM; KCl 10 mM; MgSO₄ 1 mM e β-mercaptoetanol 5 mM), 100 µl de clorofórmio e 25 µl de SDS 0,1%. A solução foi homogeneizada em agitador vórtex e incubada a 30°C por 5 min. Após a incubação foram adicionados 200 µl de ONPG (4 mg/ml dissolvidos em 0,1 M K₂HPO₄ e 0,1 M KH₂PO₄, pH 7) e as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 30°C por 5 min. A reação foi parada com a adição de 400 µl de Na₂CO₃ 1 M e homogeneizada em agitador vórtex. A quantificação das unidades de Miller foi feita

segundo a fórmula descrita em (3), utilizando a mensuração da DO₆₀₀ das culturas e a mensuração da DO₄₂₀ das reações.

$$1 \text{ Unidade de Miller} = 1000 \times \left(\frac{A_{420}}{T \times V \times A_{600}} \right), \text{ onde:} \quad (3)$$

A₄₂₀ = densidade ótica no comprimento de 420 nm, T = tempo (em min), V = volume de células utilizado no ensaio (em ml) e A₆₀₀ = densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm.

3.16. Motilidade do tipo *swimming*

Para determinação da motilidade dependente de flagelo do tipo *swimming* foi utilizado o protocolo previamente descrito para *P. aeruginosa* (HA; KUCHMA; O'TOOLE, 2014). Um volume de 5 µl de culturas de fase estacionária ajustados para DO₆₀₀ 0,1 foi inoculado no interior de placas M9HC com 0,3% de ágar, recém-preparadas. As placas foram incubadas a 37°C por até 48 h e o diâmetro correspondente ao *swimming* foi medido a cada 24 h.

3.17. Mensuração de biofilme estático e produção de celulose

A quantificação do biofilme foi realizada utilizando protocolo de coloração por cristal violeta. As culturas bacterianas com DO₆₀₀ inicial de 0,01 foram mantidas em meio LB a 37°C por 24 h em tubos de vidro sem agitação. Após o cultivo, as células em fase planctônica foram removidas e a DO₆₀₀ foi quantificada. O tubo contendo o biofilme aderido foi lavado com água destilada por duas vezes. Em seguida, foi adicionado cristal violeta 0,1% (p/v) em quantidade suficiente para cobrir o halo do biofilme presente no tubo, seguido por incubação por 10 min a TA. O material corado foi lavado com água destilada por duas vezes e ressuscitado em 1 ml de etanol 100%, seguido pela mensuração da DO₆₀₀. O resultado final apresenta-se padronizado com a razão do biofilme corado com cristal violeta sobre a densidade celular da cultura planctônica. Esse ensaio foi realizado, no mínimo, em seis réplicas biológicas para cada condição apresentada.

Também foi utilizado o corante vermelho congo para quantificar a produção de celulose, um importante componente do biofilme rugoso, de acordo com protocolo previamente descrito (DEPAS et al., 2013). As linhagens foram cultivadas em meio LB de modo estático por 48 h em tubos de vidro, a partir de DO₆₀₀ 0,01. O biofilme foi ressuscitado em 1 ml de PBS 1× e centrifugado a 16.000 rcf por 2 min, TA. O

sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspendido em 1 ml de PBS com 40 µg/ml vermelho congo (Fisher Scientific). Adicionalmente, foi utilizado como controle apenas o PBS com o vermelho congo. As amostras foram incubadas por 1 h, 37°C, 250 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16.000 rcf, 2 min, TA e a DO₄₉₀ do sobrenadante foi mensurada, utilizando o PBS como controle positivo. O cálculo da quantidade de vermelho congo ligado às células foi feito conforme a fórmula descrita em (4):

$$\text{Vermelho congo ligado (µg/ml)} = 40 \times \left(1 - \frac{A_{490 \text{ amostra}}}{A_{490 \text{ controle}}}\right) \quad (4)$$

3.18. Ensaios com camundongos

Para determinação do perfil de virulência utilizando camundongos da linhagem BALB/c fêmea como modelo de hospedeiro, as linhagens bacterianas foram cultivadas da mesma maneira descrita no ensaio de determinação de UFC. Para a infecção intraperitoneal (i.p.) dos camundongos foi utilizada uma dose de 10⁶ UFC e os animais foram acompanhados diariamente por até 10 dias.

A carga bacteriana no fígado dos camundongos também foi quantificada. Para isso, os camundongos foram infectados com 10⁶ UFC, e após 16 h de infecção os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os fígados foram coletados assepticamente em tubos contendo PBS. Após a pesagem, os órgãos foram homogeneizados e 100 µl do homogenato foram transferidos para uma placa de 96 poços, onde foram feitas diluições seriadas (até 10⁻⁴). 10 µl das diluições foram plaqueadas em meio LB para posterior determinação das UFC/g.

Para verificar a produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) durante a infecção por *C. violaceum* foram feitos ensaios de infecção *in vitro* em neutrófilos. Utilizamos um modelo de peritonite em camundongos com o uso do tioglicolato para indução da migração de neutrófilos (BARON; PROCTOR, 1982; LEIJH et al., 1984). Inicialmente, os camundongos (n = 2) foram injetados duas vezes com 1-2 ml de tioglicolato 4% (p/v), via i.p., com intervalo de aproximadamente 14 h entre cada aplicação. Após um intervalo de 3 h após a segunda injeção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e 5 ml de meio HBSS 1× (do inglês, *Hank's Balanced-Salt Solution*) (NaCl 135 mM; KCl 13,4 mM; K₂HPO₄ 0,4 µM; glicose 5,5 mM; Na₂HPO₄ 335 µM mM; MgSO₄ 800 µM; CaCl₂ 125 µM; NaHCO₃ 0,1% (v/v); HEPES 14,3 mM)

foram adicionados a cavidade peritoneal, para lavagem e remoção das células migradas para a região. Após, o lavado peritoneal enriquecido com neutrófilos foi centrifugado 10 min, 350 rcf, 30°C e as células sedimentadas foram ressuspensas em 3 ml de HBSS 1× suplementado com soro fetal bovino 2% (v/v). As células foram coradas por azul de tripano 0,4% e contadas em câmara de Neubauer. Além disso, a morfologia celular e a contagem diferencial foram realizadas através de coloração por panótico. A infecção dos neutrófilos com as diferentes linhagens de *C. violaceum* cultivadas em meio LB por 20 h foi feita com um MOI (do inglês, *multiplicity of infection*) de 10:1 (10^6 bactérias para 10^5 neutrófilos por poço), mantendo as placas de 96 poços a 37°C em estufa com CO₂ por 3 h. Para a quantificação da produção de NET, foi adicionado as placas 1 µM de Sytox (Invitrogen), um corante impermeável a células vivas. A quantificação de fluorescência decorrente da presença de DNA extracelular intercalado ao Sytox foi feita em equipamento SpectraMax i3x (Molecular Devices). Os resultados foram analisados no software SoftMax Pro 6.4 (Molecular Devices).

Para quantificação da atividade microbicida de neutrófilos foi utilizado o mesmo modelo de peritonite induzido por tioglicolato previamente descrito. As linhagens de *C. violaceum* foram adicionadas aos neutrófilos em meio HBSS em MOI 10 e incubados por 2 h a 37°C com agitação leve. Após a incubação, os neutrófilos foram lisados adicionando um volume igual de água destilada a solução e vortexados por 30 s. A suspensão de células foi diluída serialmente e plaqueada em meio LB para quantificação das UFC. Todos os ensaios com camundongos foram realizados de acordo com protocolo autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP-USP (Protocolo CEUA 181/2017).

3.19. Mutagênese via transposon T8

3.19.1. Mutagênese por inserção do transposon T8

Para obter mutantes de transposon em *C. violaceum*, foi utilizado o plasmídeo pIT2 (Tabela 1) contendo o transposon IS/*lacZ*/hah (T8) desenvolvido para *P. aeruginosa* (JACOBS et al., 2003). Este plasmídeo conjugativo e mobilizável através da linhagem de *E. coli* SM10λpir contém o gene da transposase, um gene que confere resistência a ampicilina e o transposon T8, que também possui uma marca de resistência a tetraciclina. Uma vez que a linhagem *E. coli* SM10λpir[pIT2] é resistente a ampicilina, o antibiótico usualmente utilizado para selecionar transconjugantes de *C. violaceum*, foi necessário selecionar uma linhagem mutante *fur* espontaneamente

resistente a ácido nalidíxico (Δfur^{NALR} , Tabela 2), possibilitando assim uma alternativa a seleção de mutantes contendo o plasmídeo pIT2. Para isso, o mutante *fur* foi cultivado em meio LB e plaqueado em meio M9HC contendo várias concentrações de ácido nalidíxico (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 e 0 $\mu\text{g/ml}$). As colônias resistentes foram sequenciadas para mutações no gene *gyrA*, utilizando oligonucleotídeos para a região QRDR do gene (Tabela 2). Uma linhagem mutante Δfur^{NALR} confirmada foi conjugada com a linhagem *E. coli* SM10 λ pir[pIT2] e selecionado em placas LB suplementadas com ácido nalidíxico (20 $\mu\text{g/ml}$) e tetraciclina (10 $\mu\text{g/ml}$).

3.19.2. Caracterização genotípica de mutantes *fur* com inserção do transposon T8

Os mutantes foram caracterizados quanto a inserção do transposon T8 de diferentes maneiras. Inicialmente foi feita uma PCR utilizando oligonucleotídeos para o gene da tetraciclina, que está contido no transposon T8, mas não no mutante Δfur . Em seguida foi realizada a identificação do sítio de inserção do transposon, conforme protocolo descrito para *P. aeruginosa* (JACOBS et al., 2003), utilizando uma PCR semi-degenerativa de dois estágios (Tabela 2), seguido por reação de sequenciamento de Sanger.

3.19.3. Caracterização fenotípica de mutantes *fur* com inserção do transposon T8

O principal objetivo desta abordagem foi selecionar clones com inserção do transposon T8 no mutante *fur* que tivessem o atraso de crescimento em meio sólido resgatado, para assim determinar vias ou genes que pudessem estar relacionados com esse defeito no crescimento do mutante *fur*. Assim, foram selecionadas, por inspeção visual, colônias *fur*/T8 com tamanho aumentado em relação as colônias do mutante *fur*. Em seguida foi feita a caracterização genotípica descrita no item anterior. A linhagem *fur*/T8 selecionada foi caracterizada em relação as linhagens WT e Δfur para vários parâmetros, como o padrão de atividade de sideróforos no meio indicativo PSA-CAS e em ensaio quantitativo de CAS, o crescimento em meio líquido, o padrão de crescimento em meio sólido, a quantidade de UFC, a motilidade do tipo *swimming* e o perfil de virulência em camundongos da linhagem BALB/c.

3.20. Análise *in silico* para identificação de Fur box em *C. violaceum*

As regiões promotoras (-200 até + 50 pb relativo ao códon de início da tradução) de possíveis genes relacionados com a captação de ferro e que, portanto, têm o potencial para ser regulado por Fur, foram utilizadas para pesquisar os sítios de ligação ao DNA de Fur (Fur box) através da ferramenta MEME (*Multiple Em for Motif Elicitation*, <http://meme-suite.org>).

3.21. Análise *in silico* para comparação genômica de *loci* contendo *zur*, *znuA*, *znuB* e *znuC* em diferentes bactérias

As regiões codificadoras dos genes foram obtidas dos bancos de dados *Microbial Genome Database for Comparative Analysis* (MGD, <http://mbgd.genome.ad.jp>) e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, <https://www.kegg.jp>) e plotadas em escala. A referência completa das espécies utilizadas assim como a denominação de cada fase aberta de leitura encontra-se descrita na legenda da figura.

3.22. Análise *in silico* para identificação de Zur box em *C. violaceum*

Para encontrar um possível sítio de ligação de Zur em *C. violaceum*, foram utilizadas sequências de DNA de 25 espécies pertencentes ao gênero *Chromobacterium* do banco de dados *Integrated Microbial Genomes and Microbiomes* (IMG/M) (<https://img.jgi.doe.gov>). Todos os genomas foram examinados em busca do regulador Zur anotado. Foram encontrados 23 genomas contendo um possível gene *zur*. A região com 300 pb a montante do códon predito para início da tradução de *zur* foi exportada para uso na ferramenta MEME (*Multiple Em for Motif Elicitation*, <https://meme-suite.org/>), em busca de regiões palindrômicas com sequência entre 14 e 19 pb de comprimento. As matrizes obtidas foram utilizadas na ferramenta de comparação de sítios de fatores de transcrição Tomtom (<https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom>), a fim de comparar os sítios encontrados na análise da ferramenta MEME com Zur-boxes já descritos na literatura.

3.23. Efeitos de carência de zinco mediados por EDTA em meio líquido

Para determinar os efeitos que a presença de EDTA poderia exercer em diferentes linhagens de *C. violaceum* em relação a carência de zinco, diferentes linhagens (WT, $\Delta znuCBA$ e $\Delta znuCBA[pMR20znuCBA]$) foram diluídas para DO_{600} 0,01

em meio LB e cultivadas por 24 h, a 37°C e 250 rpm com diferentes tratamentos. A carência de zinco foi induzida com a suplementação do meio com 1 mM EDTA e a suficiência de zinco foi induzida com a suplementação do meio com 250 µM ZnCl₂. Como controle, as mesmas linhagens foram tratadas com o quelante de ferro 2,2'-DP na concentração de 200 µM ou com 1 mM FeSO₄ para condições de carência e suficiência desse metal, respectivamente. Ao final das 24 h de tratamento, a DO₆₀₀ de todas as linhagens foi medida.

3.24. Avaliação da atividade bacteriostática, bactericida e indutora de carência de zinco por calprotectina

As versões WT e com a mutação Δ SI/SII de calprotectina (CP) foram obtidas em colaboração com os laboratórios dos Prof. Walter Chazin e Eric Skaar (Vanderbilt University). As proteínas liofilizadas foram ressuspendidas em tampão para CP (NaCl 100 mM, CaCl₂ 3 mM, β -mercaptoetanol 5 mM e Tris pH 7,5 20 mM). A determinação da quantidade de proteína em cada alíquota foi feita através do ensaio de Bradford, onde 1 µl da amostra foi incubado com 500 µl do reagente de Bradford em TA por 5 min, seguido pela mensuração da DO₆₀₀. A concentração final foi feita através da equação da reta da regressão linear de curva padrão de BSA. Uma vez determinada a concentração, as amostras foram resolvidas em SDS-PAGE 15%, com o gel corado com azul de Coomassie. Em seguida, foram realizadas diferentes curvas de crescimento testando concentrações do meio LB e composição do tampão para CP, para determinação do perfil de crescimento da linhagem WT. Após a padronização, outras curvas de crescimento foram realizadas com diferentes concentrações da proteína WT e de sua versão Δ SI/SII. Por fim, foram realizadas curvas de crescimento com pré-inóculos tratados ou não com CP e o ensaio de β -galactosidase para avaliar a expressão da região promotora de *zur* (*pzur*) na presença de calprotectina. O ensaio utilizando o sistema repórter foi feito exatamente como o descrito anteriormente, exceto que o tratamento com a CP não foi realizado por um pulso de tempo, como para os outros agentes quelantes de metais. Nesse caso, a CP foi adicionada no início do experimento quando as culturas foram diluídas e mantidas por 4 h até a mensuração da atividade de β -galactosidase. Para garantir a comparação adequada, foram incluídos dois controles, um com a linhagem WT[*pzur-lacZ*] não tratada e outro com a mesma linhagem tratada com EDTA, também por 4 h.

Todos os ensaios foram realizados com LB na concentração de 38% (v/v) e tampão para CP na concentração de 62% (v/v).

3.25. Ensaio de competição interespecies

Como *C. violaceum* é resistente a ampicilina, inicialmente foi feita uma análise das espécies disponíveis em nosso laboratório em busca de linhagens sensíveis a esse antibiótico, permitindo assim a seleção de *C. violaceum* após o co-cultivo. Uma vez determinadas as linhagens sensíveis a ampicilina, as bactérias foram cultivadas em 10 ml de meio LB, 250 rpm a 37°C, ON, e então foi realizado o co-cultivo utilizando 100 µl de cada linhagem, em um volume total de 2 ml de meio LB, com ou sem a adição de 250 µM de ZnCl₂. Os co-cultivos foram incubados a 250 rpm, 37°C por 2 h e foram diluídos em PBS 1× estéril e plaqueados em meio LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e as UFC foram contabilizadas e convertidas a UFC/ml. Para o ensaio intraespecífico foram utilizadas as linhagens WT e $\Delta znuCBA$ [pMR20]. Este ensaio foi feito exatamente como o previamente descrito, exceto a seleção de *C. violaceum* que foi feita em 10 µg/ml tetraciclina ao invés de ampicilina.

3.26. Teste de sensibilidade a antimicrobianos por disco difusão

Para determinação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos por disco difusão, foram vertidas placas de meio Mueller-Hinton com 15 cm de diâmetro contendo 60 ml de meio em cada placa. Sobre o meio solidificado foi espalhada a cultura a ser testada diluída em PBS com DO₆₀₀ 0,1. No caso das culturas em que foi induzida a carência de zinco, foi realizada a adição de 1 mM EDTA para cultivo ON. Após, foram distribuídos os discos de antibióticos com auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e os halos de inibição de crescimento foram medidos conforme a oitava edição da norma técnica divulgada pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), M2-A8, volume 23, número 1.

3.27. Detecção de moléculas extracelulares de quorum sensing e quantificação de violaceína

A presença de AHLs (do inglês, *N-acyl-L-homoserine lactones*) em sobrenadantes de diferentes linhagens de *C. violaceum* foi avaliada através da síntese de violaceína pela linhagem biosensora $\Delta cvil$. Foram utilizados 80 µl de

sobrenadantes filtrados de *C. violaceum* dispostos em orifícios feitos em placas de meio LB embebidas com o mutante $\Delta cvil$ na proporção de 0,1% (v/v). Após 48 h de incubação a 25°C, as placas foram fotodocumentadas e os halos roxos foram medidos utilizando o programa Fiji (<https://imagej.net/Fiji>).

Para a quantificação da produção de violaceína por *C. violaceum*, 500 μ l de culturas de fase estacionária, crescidas em meio LB foram solubilizadas em 500 μ l de acetona, um solvente orgânico para violaceína. As amostras foram vortexadas por 30 s e centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min para separação das fases. A fase orgânica, contendo a violaceína solubilizada, foi quantificada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 575 nm (DO_{575}).

3.28. Participação de sideróforos na aquisição de zinco por *C. violaceum*

O envolvimento de sideróforos endógenos de *C. violaceum* na aquisição de zinco foi avaliado através dos ensaios de zona de estimulação de crescimento em disco, onde a linhagem $\Delta cbaCEBA\Delta znuCBA$, que não sintetiza sideróforos e possui o principal transportador de zinco ausente, foi embebida em meio LB na proporção de 0,1% (v/v) e suplementado com EDTA 500 μ M. O estímulo de crescimento foi feito com a adição de gotas de 5 μ l de culturas sobre o ágar solidificado e fotodocumentando a placa após 24 h de cultivo a 37°C. Como controles endógenos foram adicionadas gotas com 50 mM EDTA, 3 mM $FeSO_4$, 100 μ M $MnCl_2$ e 100 μ M $ZnCl_2$. Além disso, foram realizados ensaios utilizando o sistema repórter de atividade de β -galactosidase com as linhagens WT[*pcbua-lacZ*] e WT[*pvbuA-lacZ*], conforme previamente descrito.

3.29. Análise *in silico* para comparação de membros do COG0523

A comparação de diferentes membros da família COG0523 foi feita a partir de sequências de proteínas desta família de diferentes espécies em formato FASTA obtidas do banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org>). As sequências obtidas foram alinhadas em pares utilizando o programa EMBOSS MATCHER (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/).

3.30. Análises estatísticas

Todos os ensaios foram realizados, no mínimo, em três réplicas biológicas independentes, excetuando-se os casos descritos nas legendas das figuras ou nos

materiais e métodos. A análise estatística dos resultados contou com a verificação do padrão de distribuição dos dados utilizando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk no programa GraphPad Prism (versão 8, <https://www.graphpad.com/>). Dados com distribuição normal foram comparados utilizando o teste One-Way ANOVA, seguido por análise *post hoc* com o teste de comparação múltipla de Dunnett. O valor de *P* encontra-se descrito na legenda de cada figura, assim como os parâmetros utilizados na comparação. Em caso de dados não paramétricos, o teste utilizado encontra-se descrito na legenda de cada figura. Para as curvas de sobrevivência de infecção em modelo animal foi utilizado o teste log-rank (Mantel-Cox).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO Fur

4.1.1. Fur é condicionalmente essencial em *C. violaceum*

O primeiro passo para iniciar a caracterização da homeostase de ferro em *C. violaceum* foi a obtenção do mutante nulo para o regulador Fur, uma vez que em diversas bactérias este é o principal regulador responsável pela homeostase de ferro, como previamente descrito para *Vibrio cholerae* (DAVIES; BOGARD; MEKALANOS, 2011), *Enterococcus faecalis* (LATORRE et al., 2018), *Campylobacter jejuni* (BUTCHER et al., 2012) e muitas outras bactérias (FILLAT, 2014). Para a obtenção deste mutante nulo utilizamos a estratégia de deleção em fase mediada por recombinação homóloga, utilizando as regiões flanqueadoras do gene de interesse clonadas no vetor suicida pNPTS138 (Tabela 1, Figura 11). Essa estratégia já é bem estabelecida e amplamente utilizada em *C. violaceum* (BARROSO et al., 2018; BATISTA et al., 2019; BATISTA et al., 2020; DA SILVA NETO; RETTO; NETTO, 2012).

Durante o processo de obtenção do mutante ocorrem duas etapas de recombinação homóloga. Na primeira, o vetor suicida integra-se ao genoma de *C. violaceum* através da recombinação entre os fragmentos que flanqueiam o gene de interesse (Figura 11). Na caracterização genotípica por PCR são observadas duas bandas em gel de agarose: i) um produto de amplificação maior contendo as regiões flanqueadoras e o gene de interesse, que corresponde ao que é encontrado no cromossomo da linhagem WT; ii) um produto com tamanho menor, que corresponde às regiões flanqueadoras sem o gene de interesse, que estão clonadas no vetor suicida. Conforme demonstrado na Figura 12A, essa etapa foi prontamente obtida com a construção para mutação de *fur* em *C. violaceum* (canaleta 1^a r.).

O segundo evento de recombinação homóloga ocorre entre os fragmentos idênticos já inseridos no genoma da bactéria. A recombinação ocorre de maneira aleatória entre o fragmento à montante (del1-del2) ou o fragmento à jusante (del3-del4) e pode gerar linhagens revertidas ao genótipo selvagem ou então as linhagens mutantes, com a deleção do gene de interesse (Figura 11). Para a obtenção do mutante Δfur , duzentas colônias foram analisadas e todas apresentaram reversão ao genótipo selvagem, conforme exemplo indicado na Figura 12A (canaleta 2^a r.).

A frequente reversão ao genótipo selvagem levantou a possibilidade de que *fur* de *C. violaceum* fosse um gene essencial, o que impediria a seleção de um mutante nulo com a estratégia utilizada até então. Para testar essa possibilidade, foi gerada uma linhagem selvagem com o gene *fur* completo clonado no vetor replicativo pMR20, denominada WT[pMR20*fur*] (Tabela 1). Essa linhagem foi utilizada como meio para testar a essencialidade de *fur*, uma vez que se o gene for essencial, a cópia cromossomal conseguiria ser removida do genoma utilizando a estratégia de deleção por recombinação homóloga, pois haveria a expressão de Fur a partir do gene na cópia plasmidial. Ao repetir as etapas de recombinação homóloga utilizando a linhagem WT[pMR20*fur*] ao invés da linhagem WT, a deleção do gene *fur* do cromossomo foi prontamente obtida (Figura 12B, canaleta 2^a r.), com cinco eventos de deleção obtidos em treze colônias testadas. É importante destacar que neste caso a deleção de *fur* do cromossomo não gerou uma linhagem mutante nula, pois o gene *fur* está presente em cópia plasmidial.

Uma segunda possibilidade para explicar a dificuldade na obtenção do mutante nulo *fur* a partir da linhagem WT seria de que como esse regulador atua reprimindo genes envolvidos com a captação de ferro, o acúmulo intracelular deste metal na ausência de Fur seria tóxico e poderia causar a morte celular. Para testar essa possibilidade, voltamos a utilizar a linhagem WT para fazer as recombinações homólogas, mas desta vez foi utilizado para seleção do segundo evento de recombinação o meio LB suplementado com o agente quelante específico para ferro 2,2'-DP (2,2'-dipiridil). Nesse caso, conseguimos obter com sucesso o mutante nulo *fur* em seis de vinte e quatro colônias testadas (Figura 12C, canaleta 2^a r.).

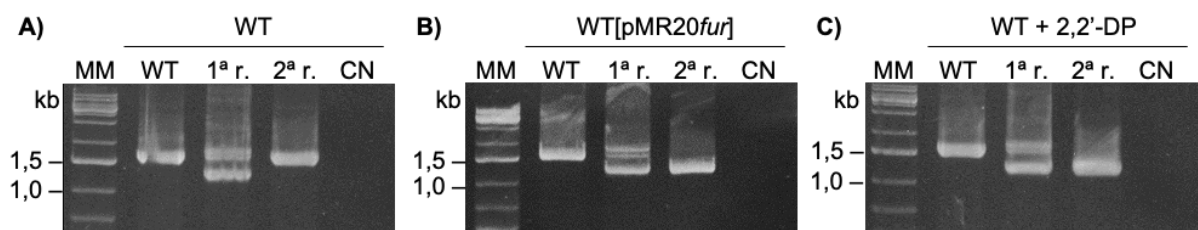


Figura 12 – Obtenção da linhagem mutante Δfur em *C. violaceum*. **A)** As tentativas de obtenção do mutante *fur* selecionando as colônias em meio LB falharam. A PCR é representativa dos resultados obtidos para cerca de 200 colônias testadas. Na linhagem WT é observado um produto de 1633 pb referente as regiões flaqueadoras mais o gene *fur* (CV_1797), amplificado com os oligonucleotídeos Fur_del1 e Fur_del4 (Tabela 2). O produto da primeira recombinação (1^a r.) possui a banda de 1633 bp e uma banda menor, de 1291 bp, que contém apenas as regiões flaqueadoras. O produto da segunda recombinação (2^a r.) possui a banda de 1633 bp, indicando reversão ao genótipo WT. CN = controle negativo. **B)**

O mesmo processo realizado no item anterior com a linhagem WT, foi realizado com a linhagem WT[pMR20*fur*]. Assim, na segunda recombinação é observado apenas a presença da banda de 1291 bp, correspondendo a deleção da cópia cromossomal do gene *fur*. **C)** Mutante Δfur obtido através de seleção em meio LB suplementado com 100 μM 2,2'-DP.

Os dados apresentados até aqui sugerem que *fur* é condicionalmente essencial em *C. violaceum*, uma vez que apenas em condições carenciadas de ferro foi possível selecionar linhagens com a deleção do gene *fur*. Em paralelo a obtenção do mutante nulo, também buscamos selecionar uma linhagem com uma mutação espontânea em *fur*, estratégia alternativa amplamente empregada em bactérias em que Fur é essencial. Esse método, descrito inicialmente para *E. coli* (HANTKE, 1987) e depois empregado em *P. aeruginosa* (BARTON et al., 1996), consiste no cultivo da bactéria em concentrações altas de manganês para que esse metal em excesso ligue-se a proteína Fur, ativando-a (Figura 13A). Mn^{2+} -Fur mimetiza a ligação Fe^{2+} -Fur e atua reprimindo os genes para captação de ferro em condições que não haja mutações na proteína Fur, levando a carência intracelular de ferro e consequentemente a diminuição do *fitness* celular e morte. Entretanto, as células têm maior *fitness* e sobrevivem quando ocorre a seleção eventual de um mutante *fur* que mantenha os sistemas de captação de ferro desreprimidos (Figura 13A).

Para empregar essa estratégia em *C. violaceum*, inicialmente foi padronizada a concentração para cultivo em excesso de manganês (Figura 13B). Para isso, a linhagem WT foi cultivada em placas LB suplementadas com MnCl_2 variando de 5 a 20 mM por 24 h (Figura 13B). Nas concentrações de 5, 10 e 15 mM MnCl_2 , *C. violaceum* foi capaz de crescer de maneira semelhante ao controle, sem a adição de manganês, com crescimento confluyente. Assim, foram definidas as concentrações entre 25 e 30 mM MnCl_2 para realizar a seleção de um possível mutante Fur. Ao todo, 192 colônias foram isoladas entre 48 e 72 h de cultivo em excesso de MnCl_2 e avaliadas quanto a atividade de sideróforos em placas PSA-CAS (Figura 13C), onde espera-se que a produção desses metabólitos esteja desreprimida em mutantes *fur*. Foram escolhidos dez possíveis mutantes para sequenciamento do gene *fur* completo (Tabela 2), dos quais apenas um apresentou uma mutação de uma citosina (C) para uma adenina (A) na posição 118 (*fur*^{C118A}), acarretando na troca de uma arginina (R) para uma serina (S) no aminoácido 40 de Fur, gerando assim a linhagem Fur^{R40S} (Figura 13D).

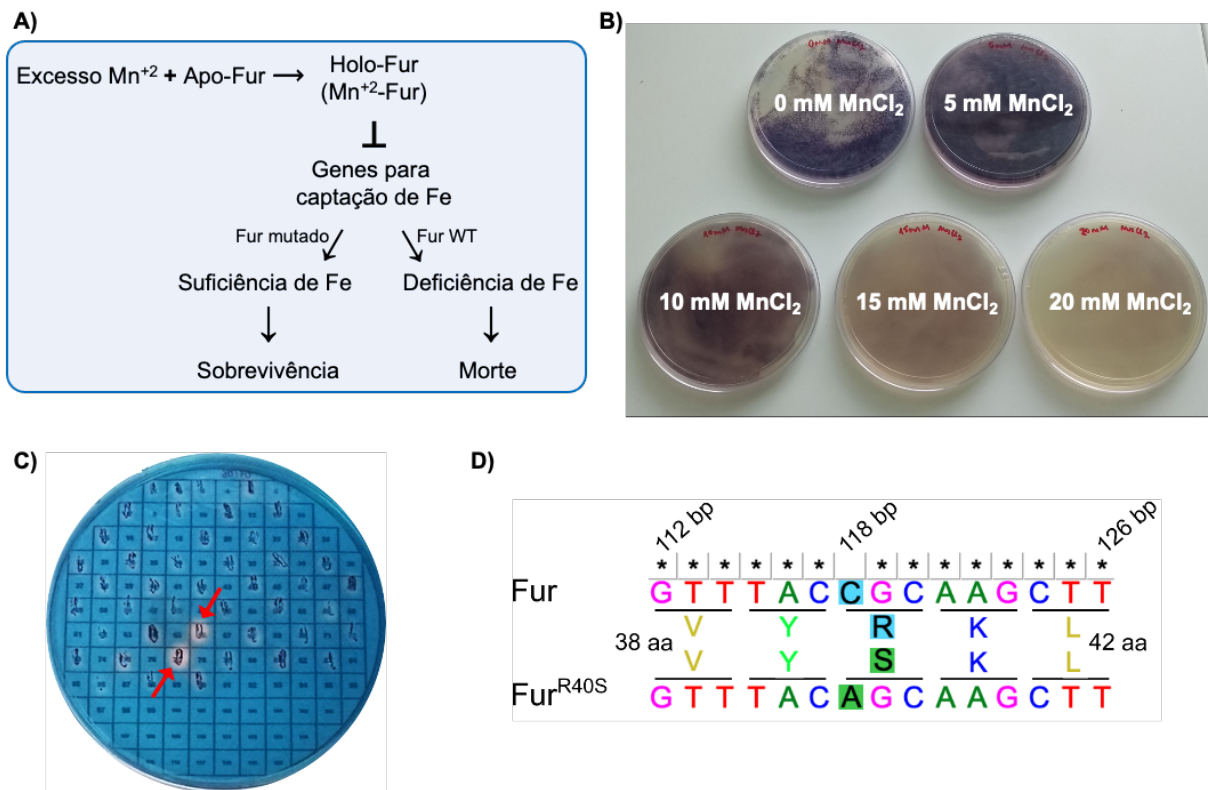


Figura 13 – Obtenção da linhagem com mutação espontânea em *fur* através da seleção em excesso de manganês. **A)** Racional para a seleção de mutantes *fur* via cultivo em excesso de manganês. Em excesso deste metal, Mn^{+2} -Fur atua reprimindo a expressão de genes responsáveis pela captação de ferro, o que em condições fisiológicas normais (Fur WT, sem mutação) leva a deficiência de ferro e inibição de crescimento. Em mutantes *fur* espontâneos em que se preserve os genes para captação de ferro desreprimidos, a célula sobrevive e é selecionada em excesso de manganês, uma vez que há suficiência de ferro. **B)** Perfil de crescimento da linhagem WT após 24 h de cultivo nas concentrações indicadas de $MnCl_2$. **C)** Placa representativa mostrando diferentes inóculos dos possíveis mutantes *fur* selecionados em excesso de $MnCl_2$. As setas vermelhas indicam o perfil das colônias que possuem maior produção de sideróforos em comparação a linhagem WT e que foram selecionadas para investigação da mutação em *fur*. **D)** Confirmação do mutante espontâneo *fur*. O sequenciamento de DNA indica a mutação C118A, resultando na substituição R40S na proteína Fur, gerando a linhagem denominada Fur^{R40S}. Os alinhamentos mostram os segmentos numerados a partir do ATG e do códon de início de tradução de Fur. Asteriscos denotam conservação dos nucleotídeos. A mutação está destacada em azul (na linhagem WT) e em verde (na linhagem Fur^{R40S}).

Uma vez que o mutante nulo (Δfur) e o mutante espontâneo (Fur^{R40S}) foram obtidos, as linhagens foram complementadas com a cópia selvagem (*fur*) ou a cópia mutada (*fur*^{C118A}) do gene *fur* clonadas no vetor replicativo pMR20 (Tabela 1). Foram utilizados anticorpos policlonais obtidos a partir do soro de camundongos BALB/c imunizados com a proteína Fur selvagem purificada (Figura 14A) para fazer a análise da expressão de Fur em *C. violaceum* (Figura 14B e C). Conforme esperado, no mutante nulo Δfur não foi observada a banda correspondente a Fur (Figura 14B e C)

e no mutante espontâneo Fur^{R40S} houve uma forte redução na expressão desta proteína (Figura 14B), o que posteriormente foi confirmado ao refazer o experimento com uma concentração maior do extrato total (Figura 14C). Surpreendentemente, foi observada uma superexpressão da proteína Fur nas complementações em *trans*, com o gene *fur* nas versões selvagem ou com mutação pontual.

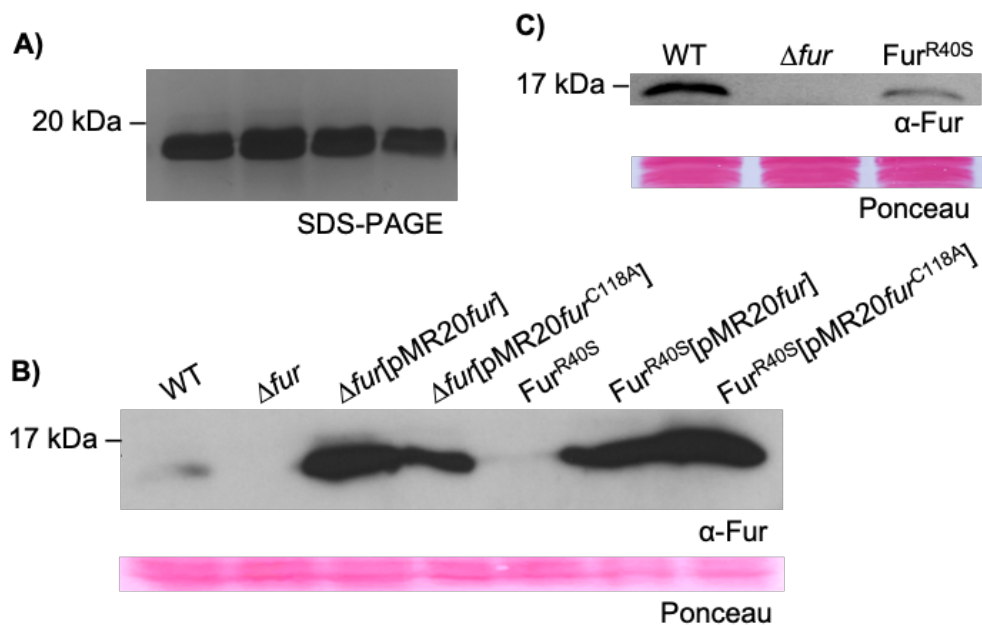


Figura 14 – Análise dos níveis de expressão da proteína Fur em *C. violaceum*. **A)** A proteína Fur expressa em *E. coli* e purificada foi resolvida em gel de poliacrilamida 15% e corada com Coomassie Brilliant Blue (BioRad). Estão mostradas as frações da purificação quantificadas por Bradford que indicavam maior presença da proteína. Unstained Precision Plus Protein Standard (BioRad) foi utilizado como marcador de peso molecular. **B)** Detecção de Fur nas linhagens mutantes e complementadas por Western blotting com o anticorpo policlonal α -Fur na diluição 1:1000. O carregamento das amostras foi avaliado por coloração de Ponceau da membrana de nitrocelulose. **C)** Para maior detalhe sobre a expressão de Fur^{R40S} , o procedimento descrito no item anterior foi feito utilizando uma maior concentração dos extratos totais das linhagens WT, Δfur e Fur^{R40S} .

Um dado intrigante foi como a troca de um único aminoácido acarretou em uma grande diminuição da expressão de Fur^{R40S} . Isso nos levou a investigar os possíveis efeitos dessa mutação na estrutura e no funcionamento de Fur. Para isso, foi realizada uma análise *in silico* com a sequência da proteína Fur WT para determinação da estrutura secundária da proteína utilizando o programa Phyre2 (Figura 15A). Essa análise permitiu identificar qual região topográfica da proteína poderia ser afetada devido a troca do aminoácido arginina (Figura 15B) para o aminoácido serina (Figura 15C). Ao visualizar a estrutura terciária da proteína Fur (Figura 15D), verificamos que a mutação ocorreu no domínio de ligação ao DNA, mais

especificamente na terceira α -hélice, predita como hélice de estabilização. Juntamente com a quarta α -hélice, predita como a hélice de reconhecimento, esta região compõe o motivo HTH (do inglês, *helix-turn-helix*) de ligação ao DNA. Essas análises nos levaram a hipotetizar que a mutação selecionada pode ter afetado a estabilidade e a meia vida da proteína e/ou comprometer a sua capacidade de ligação ao DNA, o que levaria a diminuição da expressão da proteína conforme visto por Western blotting e também a desrepressão da síntese de sideróforos, conforme inicialmente observado em placas PSA-CAS no isolamento do mutante espontâneo.

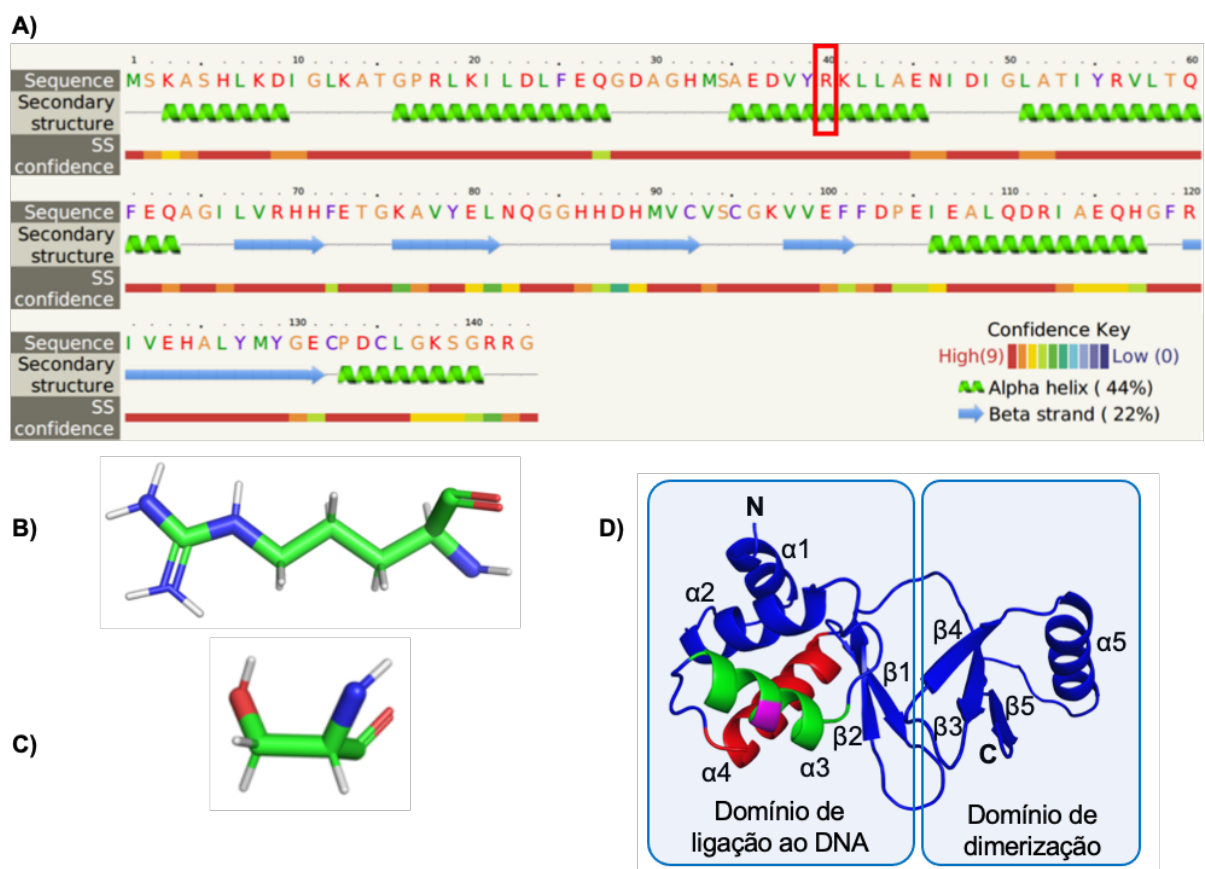


Figura 15 – Análises da mutação R40S em Fur. **A)** Representação esquemática da estrutura secundária de Fur obtida através do programa Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). O aminoácido arginina da posição 40, onde foi identificada a mutação selecionada em excesso de manganês, encontra-se destacado no retângulo vermelho. **B)** Estrutura terciária do aminoácido arginina (R). **C)** Estrutura terciária do aminoácido serina (S). **D)** Estrutura terciária da proteína Fur visualizada no programa PyMOL (<https://pymol.org/2/>). As α -hélices e folhas β -pregueadas estão numeradas a partir da extremidade amino-terminal (N) no sentido da extremidade carboxi-terminal (C) da proteína. $\alpha 1$ a $\alpha 4$, $\beta 1$ e $\beta 2$ denotam o domínio de ligação ao DNA e $\alpha 5$, $\beta 3$ a $\beta 5$ denotam o domínio de dimerização do monômero de Fur. A $\alpha 3$ (hélice de estabilização), destacada em verde, e a $\alpha 4$ (hélice de reconhecimento), destacada em vermelho, compõem o motivo HTH de ligação ao DNA. Na $\alpha 3$ destaca-se o resíduo de arginina (em rosa) que encontra-se mutado em Fur^{R40S}.

4.1.2. Os mutantes *fur* nulo e espontâneo apresentam aumentada produção de sideróforos

Uma das principais características de mutantes *fur* é a desrepressão da via de síntese e captação de sideróforos, conforme demonstrado em várias bactérias como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (BECERRA et al., 2014), *P. aeruginosa* (PASQUA et al., 2017), *Pectobacterium carotovorum* (TANUI et al., 2017), *Xanthomonas campestris* (JITTAWUTTIPOKA et al., 2010) e *Xanthomonas vesicatoria* (LIU et al., 2016). Assim, utilizamos o ensaio CAS para avaliar a atividade de sideróforos em *C. violaceum*. Cerca de 5 µl de culturas *overnight* (ON) em meio LB foram gotejados em placas PSA-CAS e os halos alaranjados, indicativos da síntese e liberação de sideróforos, foram avaliados as 18, 24 e 48 h após o inóculo (Figura 16A e B). Foi demonstrado que tanto o mutante Δfur quanto a linhagem Fur^{R40S} tiveram maior atividade de sideróforos quando comparados à linhagem selvagem (WT). Essa característica já foi detectada às 18 h após o inóculo e foi mais evidenciada às 24 e 48 h. Também foi verificado que o vetor pMR20 vazio não interferiu nas linhagens controle e que nas complementações com a versão WT de *fur* o fenótipo foi revertido aos níveis da linhagem WT e da linhagem WT[pMR20] (Figura 16A e B). Por fim, verificamos que a complementação com o a cópia mutada de *fur* (*fur*^{C118A}) não foi capaz de reprimir a produção dos sideróforos a níveis semelhantes ao da linhagem WT (Figura 16A e B), indicando que a mutação ocasiona na redução da atividade da proteína Fur.

Além da avaliação feita com as bactérias, também foi verificada a presença dos sideróforos nos sobrenadantes de *C. violaceum*. Para isso, as linhagens foram cultivadas em meio mínimo M9HC por 48 h, uma condição pré-determinada em que a síntese de sideróforos é máxima. Foram aplicados cerca de 80 µl dos sobrenadantes obtidos em orifícios feitos na placa PSA-CAS (Figura 16C). Esse ensaio confirmou que os mutantes têm maior atividade de sideróforos do que a linhagem selvagem e que a complementação funcionou corretamente (Figura 16C). Para reforçar a caracterização dos mutantes *fur* de *C. violaceum* quanto à produção de sideróforos, foram realizados ensaios de nutrição cruzada (Figura 16D). Nesse experimento, o mutante $\Delta cbaCEBA$, que não produz sideróforos (BATISTA et al., 2019), foi embebido em meio LB suplementado com 2,2'-DP 125 µM, condição previamente estabelecida para impedir seu crescimento. Sobre o ágar solidificado foram colocados 5 µl das linhagens WT, Δfur , Fur^{R40S} e suas respectivas complementações, para avaliar se os

sideróforos produzidos por essas linhagens seriam capazes de induzir o crescimento do mutante $\Delta cbaCEBA$. Conforme mostrado na Figura 16D, todas as linhagens foram capazes de promover o crescimento do mutante $\Delta cbaCEBA$, sendo que nas linhagens Δfur e Fur^{R40S} , que possuem maior produção de sideróforos do que a linhagem WT, o halo de crescimento foi maior.

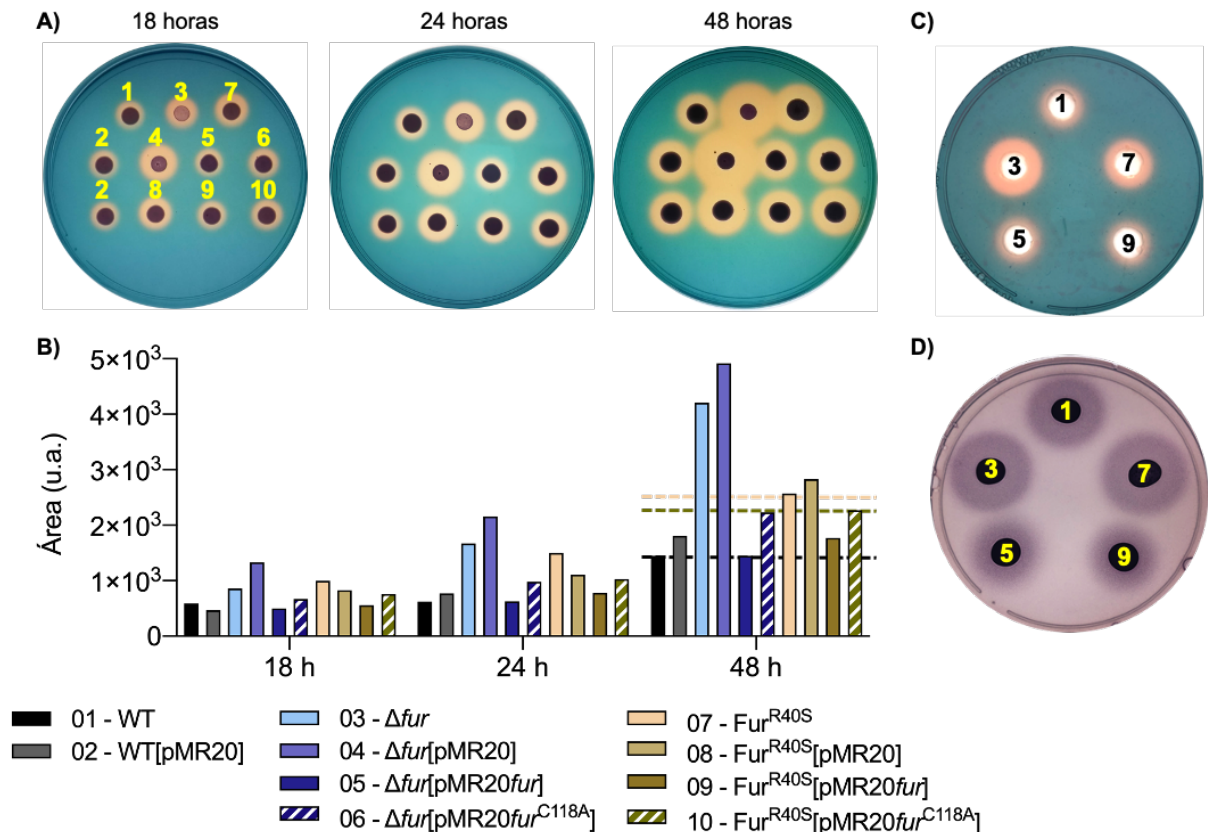


Figura 16 – Os mutantes *fur* possuem maior atividade de sideróforos. **A)** Avaliação ao longo do tempo da atividade de sideróforos (halos alaranjados) em placa PSA-CAS das linhagens indicadas. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas independentes, e são apresentadas imagens representativas de um dos ensaios. **B)** Quantificação da atividade de sideróforos em placas PSA-CAS. A área dos halos (representados como unidades arbitrárias, u.a.) foi quantificada no programa Fiji (<https://imagej.net/Fiji/>), descontando a área de crescimento das bactérias para eliminar a interferência do espalhamento das linhagens no ágar ao longo do tempo. As linhas tracejadas auxiliam na comparação da quantificação da atividade de sideróforos em relação as linhagens WT, Fur^{R40S} e Fur^{R40S} [pMR20*fur*^{C118A}] às 48 h de cultivo. **C)** Detecção de sideróforos nos sobrenadantes de culturas crescidas em meio M9HC por 48 h em placa PSA-CAS. **D)** Ensaio de nutrição. O mutante $\Delta cbaCEBA$ foi embebido em placas de meio LB suplementado com 2,2'-DP 125 μ M. Os halos roxos indicam crescimento do mutante $\Delta cbaCEBA$ estimulado pelas linhagens gotejadas sobre o ágar. Em todas as figuras as linhagens estão identificadas pelos mesmos números que estão descritos na legenda do gráfico do item "B".

4.1.3. O mutante Δfur tem crescimento prejudicado em condições regulares de cultivo

A dificuldade para obter o mutante Δfur (Figura 12) e a observação de que este mutante teve um prejuízo no crescimento em meio sólido PSA-CAS (Figura 16A), nos levaram a fazer uma caracterização do crescimento e da sobrevivência das linhagens mutantes nos meios de cultura LB e M9HC, sólido e líquido (Figura 17).

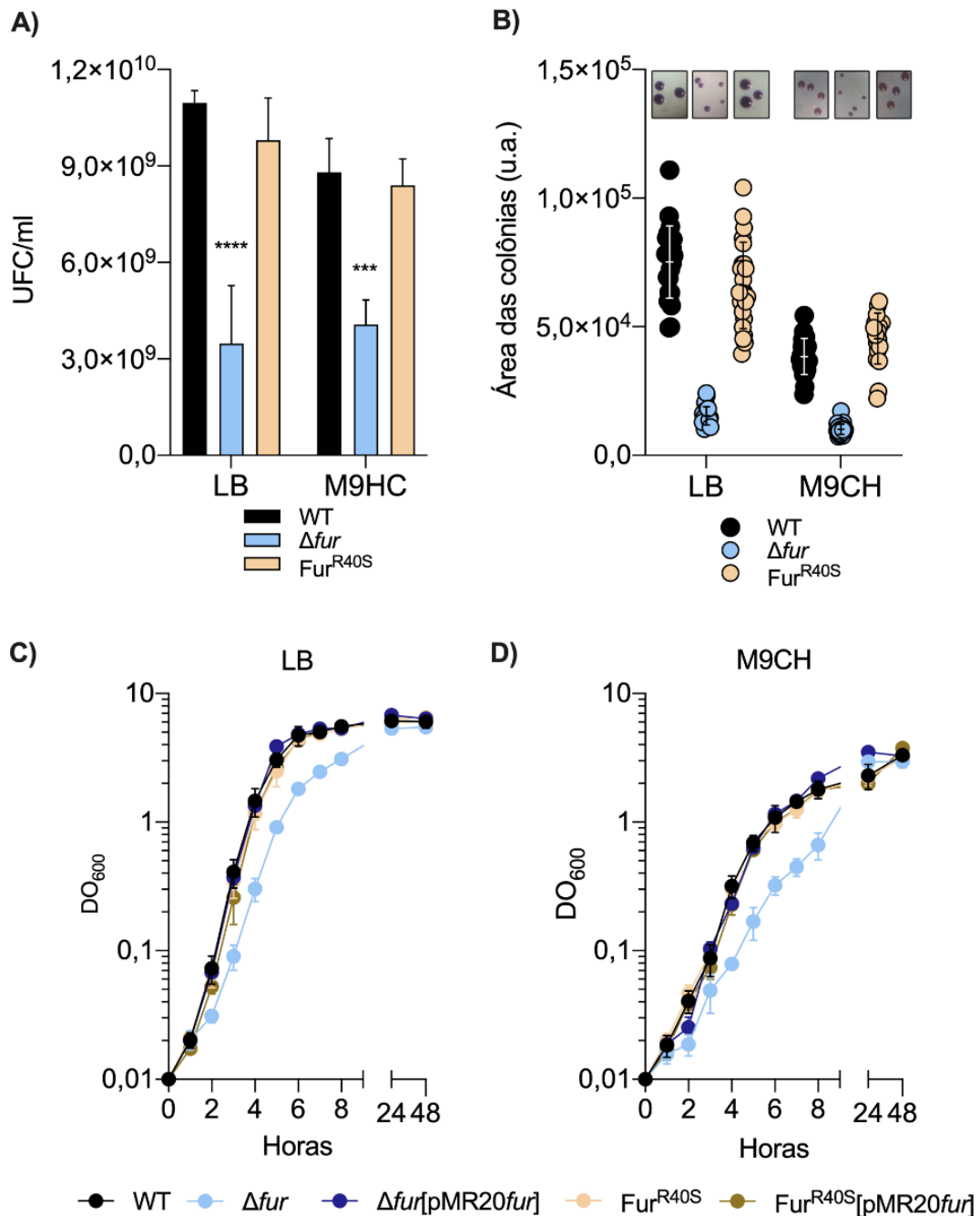


Figura 17 – Avaliação da sobrevivência e do crescimento dos mutantes Δfur e Fur^{R40S} em diferentes meios de cultura. A) Quantificação de UFC das linhagens cultivadas por 20 h em meio LB ou M9HC através do plaqueamento da diluição seriada no meio original (LB ou

M9HC) de cultivo. **** $P < 0,0001$; *** $P = 0,0007$. **B)** Perfil de crescimento em meio sólido. A área das mesmas colônias obtidas no ensaio anterior foi quantificada após 24 h de incubação a 37°C nos meios indicados. As fotos foram adquiridas com lupa e as quantificações foram realizadas no programa Fiji (<https://imagej.net/Fiji/>), e representadas como unidades arbitrárias (u.a.) No topo do gráfico estão fotos representativas do ensaio. **C e D)** Curvas de crescimento em meio LB (C) ou M9CH (D) com alíquotas retiradas para mensuração da DO_{600} nos tempos indicados. Todas as curvas foram realizadas em três réplicas biológicas. Todos os dados estão representados com média e desvio padrão.

Inicialmente, foram mensuradas as UFC após 20 h de cultivo em meio LB e meio M9HC. Os dados indicaram menos UFC para o mutante Δfur em ambos os meios. Já o mutante Fur^{R40S} não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação a linhagem WT (Figura 17A). Além da quantidade, foi também avaliado o tamanho das colônias em placas LB e M9HC. As colônias do mutante nulo Δfur foram menores do que as colônias das linhagens WT e Fur^{R40S} (Figura 17B). Nas curvas de crescimento, em ambos os meios de cultivo, o mutante Δfur apresentou menor DO_{600} em quase todos os pontos da curva, quando comparado às linhagens WT e Fur^{R40S} . Essa característica foi revertida na linhagem complementada (Figura 17C e D).

Ao analisar o perfil de sobrevivência e crescimento do mutante Δfur é importante determinar se a menor DO_{600} medida na curva de crescimento é um indicativo de morte celular ou se é devido a uma característica intrínseca da linhagem, que não atinge uma densidade celular semelhante a linhagem WT decorrente de problemas metabólicos ou fisiológicos da ausência do regulador Fur. Para responder a esse questionamento, foi realizada a análise de viabilidade celular com o ensaio LIVE/DEAD, onde são utilizados dois corantes para avaliar a presença de células vivas, coradas com o fluoróforo SYTO 9, e células mortas, coradas com o fluoróforo iodeto de propídeo. Esse ensaio foi realizado com as linhagens WT, Δfur e Fur^{R40S} cultivadas em meio LB e meio M9HC, em fase exponencial e estacionária de crescimento (Figura 18). Os dados do ensaio mostraram que ambos os mutantes têm praticamente o mesmo número de células vivas em relação à linhagem selvagem em todas as condições testadas. Como esperado, há mais células mortas em fase estacionária do que em fase exponencial em todas as linhagens (Figura 18B). Assim, uma vez que o mutante nulo fur não possui comprometimento da viabilidade em meio líquido (Figura 18), mas é menos viável em ensaios de UFC (Figura 17A), existe a possibilidade de que os efeitos tóxicos que diminuem as UFC sejam decorrentes do cultivo em placas.

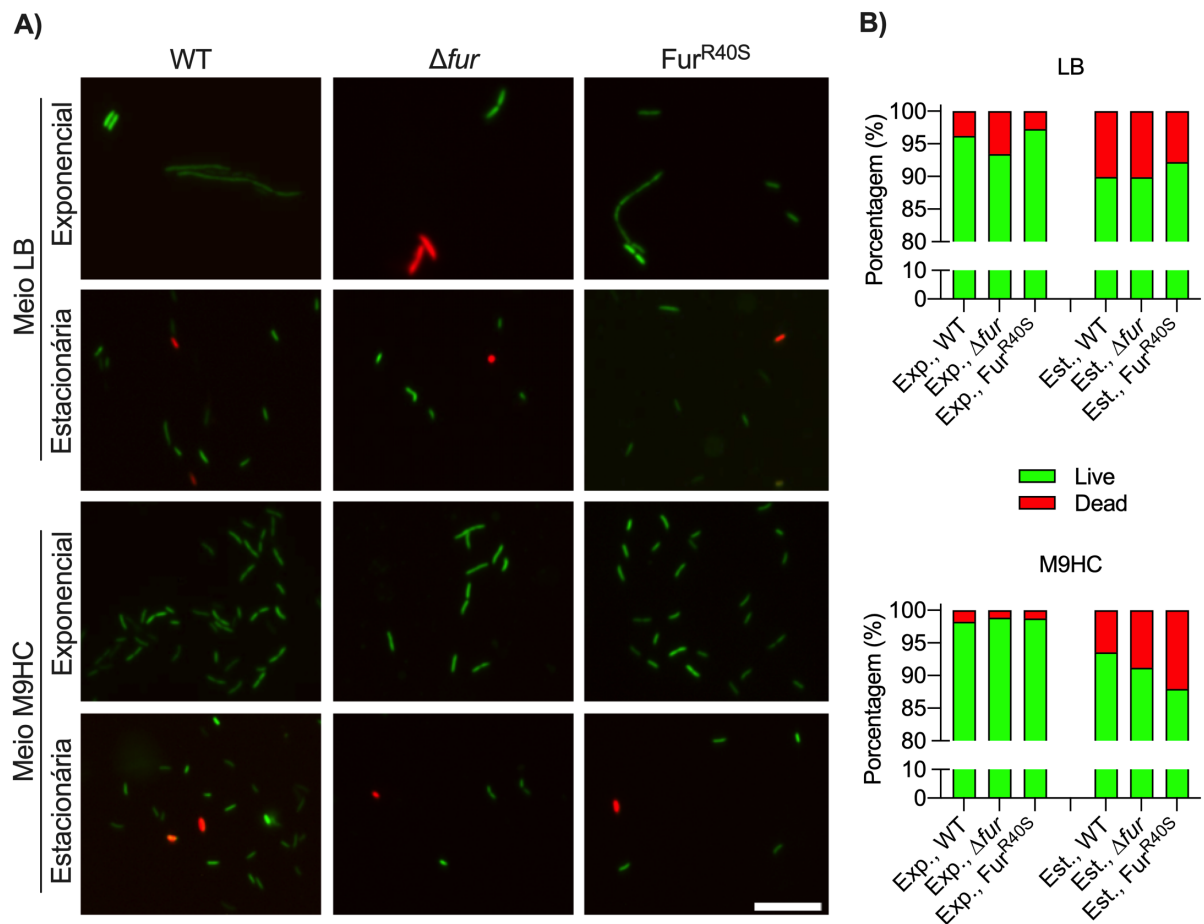


Figura 18 – A viabilidade dos mutantes *fur* não é afetada em meio líquido. A) Ensaio de viabilidade celular LIVE/DEAD das linhagens indicadas cultivadas em meio LB e M9HC e com alíquotas de culturas em fases exponencial e estacionária de crescimento. Imagens representativas da microscopia de fluorescência, mostrando células vivas (em verde, com o corante SYTO 9) e mortas (em vermelho, com o corante iodeto de propídeo). A barra branca presente na figura da linhagem Fur^{R40S} em meio M9HC de fase estacionária corresponde ao padrão de 10 μm . **B)** Quantificação de células vivas (verde = Live) e mortas (vermelho = Dead) utilizando o programa Fiji (<https://imagej.net/Fiji/>). Foram quantificadas pelo menos 60 células de cada linhagem e condição.

4.1.4. A ausência ou o comprometimento da função de Fur torna *C. violaceum* mais susceptível à intoxicação por ferro e ao estresse oxidativo

Para verificar se os fenótipos de atraso no crescimento e redução de UFC do mutante Δfur estariam relacionados ao ferro, foram realizadas curvas de crescimento em condições de escassez ou excesso de ferro (Figura 19). Inicialmente, foram realizadas curvas de crescimento em meio LB suplementado com o quelante de ferro 2,2'-DP para verificar se a menor disponibilidade de acesso ao metal poderia melhorar o perfil de crescimento do mutante Δfur (Figura 19A). No entanto, nestas condições o mutante Δfur manteve o atraso de crescimento em relação às linhagens

WT e complementada (Figura 19A), de modo similar ao observado em meio LB (Figura 17C). A linhagem Fur^{R40S} apresentou uma pequena diminuição na DO da cultura a partir da sexta hora de crescimento quando comparada a linhagem WT (Figura 19A).

O mutante Δfur cultivado em excesso de ferro tanto em meio LB (Figura 19B) quanto em meio M9HC (Figura 19C) apresentou uma piora no fenótipo de crescimento quando comparado às linhagens WT e complementada (Figura 19B e C). Esse dado demonstra que o excesso de ferro é altamente prejudicial para o mutante Δfur , em especial no meio mínimo M9HC, onde ocorreu inclusive uma queda na DO_{600} da curva de crescimento do mutante (Figura 19C). O excesso de ferro para a linhagem Fur^{R40S} , no entanto, parece ser menos prejudicial, sugerindo que a atividade remanescente do regulador protege *C. violaceum* dos efeitos tóxicos decorrentes do cultivo em excesso de ferro.

A queda acentuada e abrupta na DO_{600} das culturas do mutante Δfur observada entre a sétima e oitava hora de cultivo em meio M9HC suplementado com ferro (Figura 19C) foi acompanhada por uma mudança de coloração das culturas deste mutante, que tornaram-se mais roxas e com coloração acastanhada conforme aumentava a quantidade de ferro no meio (Figura 19D). Para investigar se esse evento foi decorrente da lise celular, foi feita a precipitação de DNA do sobrenadante das linhagens WT, Δfur e Fur^{R40S} cultivadas em meio M9HC suplementado com $FeSO_4$ (Figura 19E). Nesse ensaio, foi detectada uma maior quantidade de DNA nos sobrenadantes das culturas dos mutantes Δfur e Fur^{R40S} em relação aos sobrenadantes das culturas da linhagem selvagem. O ferro exacerbou um pouco este efeito. Estes resultados sugerem um maior extravasamento do DNA bacteriano devido a lise celular nos mutantes *fur*.

Para investigar com mais detalhes os efeitos de toxicidade do cultivo em meio líquido com excesso de ferro, foi feito um ensaio para detecção de fluorescência de brometo de etídeo (BrEt) das células e dos sobrenadantes das culturas bacterianas tratadas ou não com ferro (Figura 20A e B). Podemos observar que em meio M9HC sem a adição de ferro (Figura 20A) as células de todas as linhagens bacterianas (linhas contínuas) possuem um sinal semelhante de fluorescência do BrEt, exceto as células do mutante Δfur , que possuem o sinal aumentado. Quanto aos sobrenadantes (linhas tracejadas), foi detectado um sinal semelhante para todas as linhagens, com exceção do mutante Δfur , em cujo sobrenadante o sinal de fluorescência também estava bastante aumentado (Figura 20A).

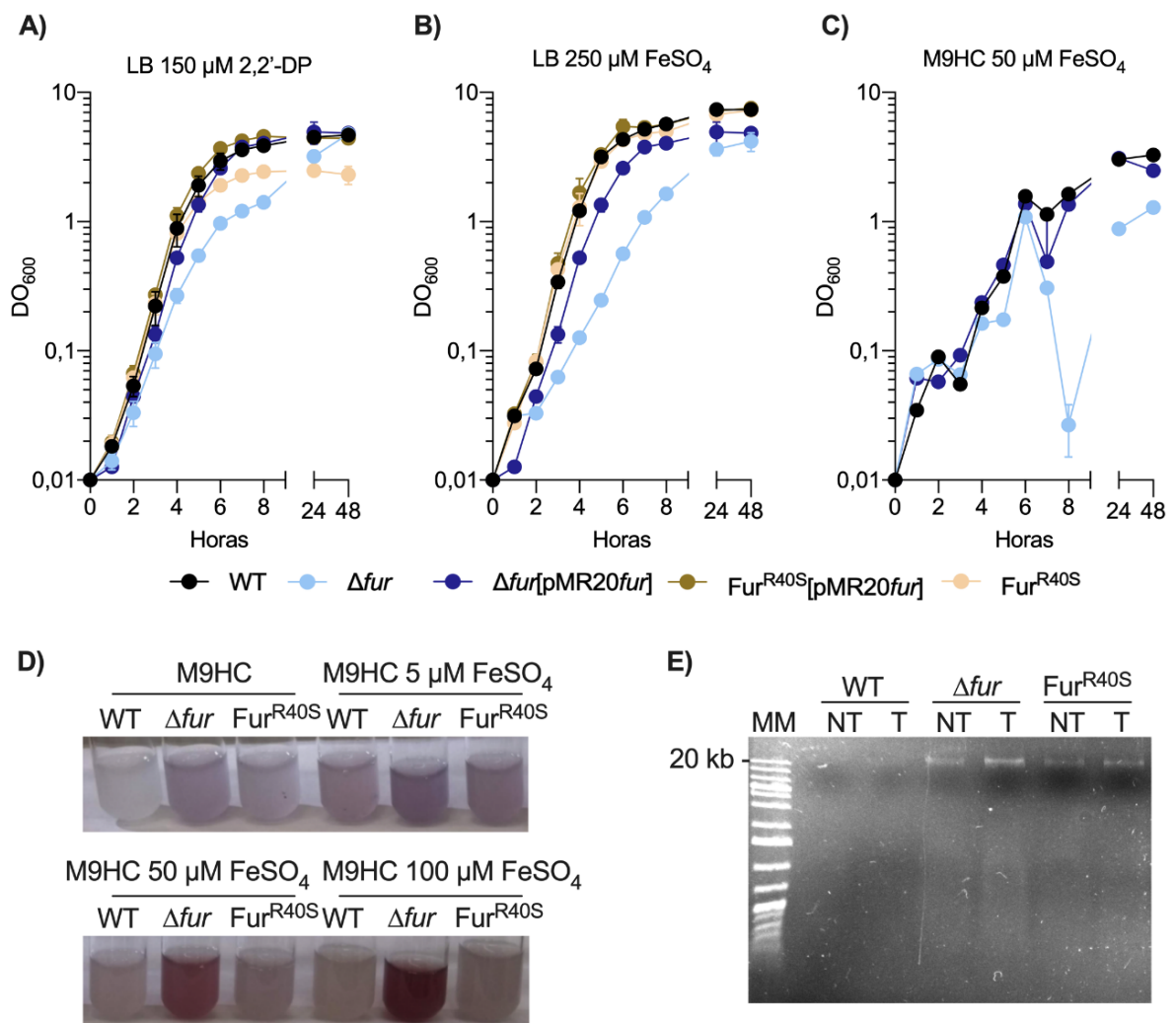


Figura 19 – Perfil de crescimento do mutante Δfur em excesso de ferro. A-C) Curvas de crescimento em meio LB suplementado com 2,2'-DP 150 μM (A), meio LB suplementado com FeSO_4 250 μM (B) ou meio M9HC suplementado com FeSO_4 50 μM (C). Todas as curvas foram realizadas com três réplicas biológicas e estão indicadas as médias com desvio padrão. **D)** Fotos obtidas após 24 h de cultivo em meio M9HC das linhagens indicadas na presença de diferentes concentrações de FeSO_4 . **E)** Detecção da lise celular via precipitação de DNA do sobrenadante após cultivo das linhagens em meio M9HC suplementado com 50 μM FeSO_4 . As culturas foram tratadas (T) ou não (NT) por 3h30 com ferro. O DNA dos sobrenadantes foi extraído com fenol-clorofórmio, precipitado com etanol e resolvido em gel de agarose 0,8%.

Quando o mesmo ensaio foi realizado, mas agora em meio M9HC com excesso de ferro (Figura 20B), podemos observar que a linhagem WT permaneceu com o sinal de BrEt inalterado tanto nas células quanto no sobrenadante. Notadamente, houve um aumento significativo no sinal de BrEt do mutante Δfur tanto nas células quanto no sobrenadante. Além disso, no sobrenadante do mutante espontâneo Fur^{R40S} também houve um aumento na detecção de BrEt (Figura 20B), evidenciando que o excesso de ferro também possa a ser tóxico para essa linhagem, embora em níveis menores do que o observado no mutante nulo. Como controle

endógeno para eliminar a possibilidade de que as bactérias estivessem emitindo algum tipo de fluorescência no comprimento de onda utilizado no ensaio, foi medida a fluorescência das células bacterianas e dos sobrenadantes sem a adição de BrEt. Esse sinal permaneceu em níveis mínimos (menores que 10^5 u.a.) em ambos os ensaios (Figura 20A e B).

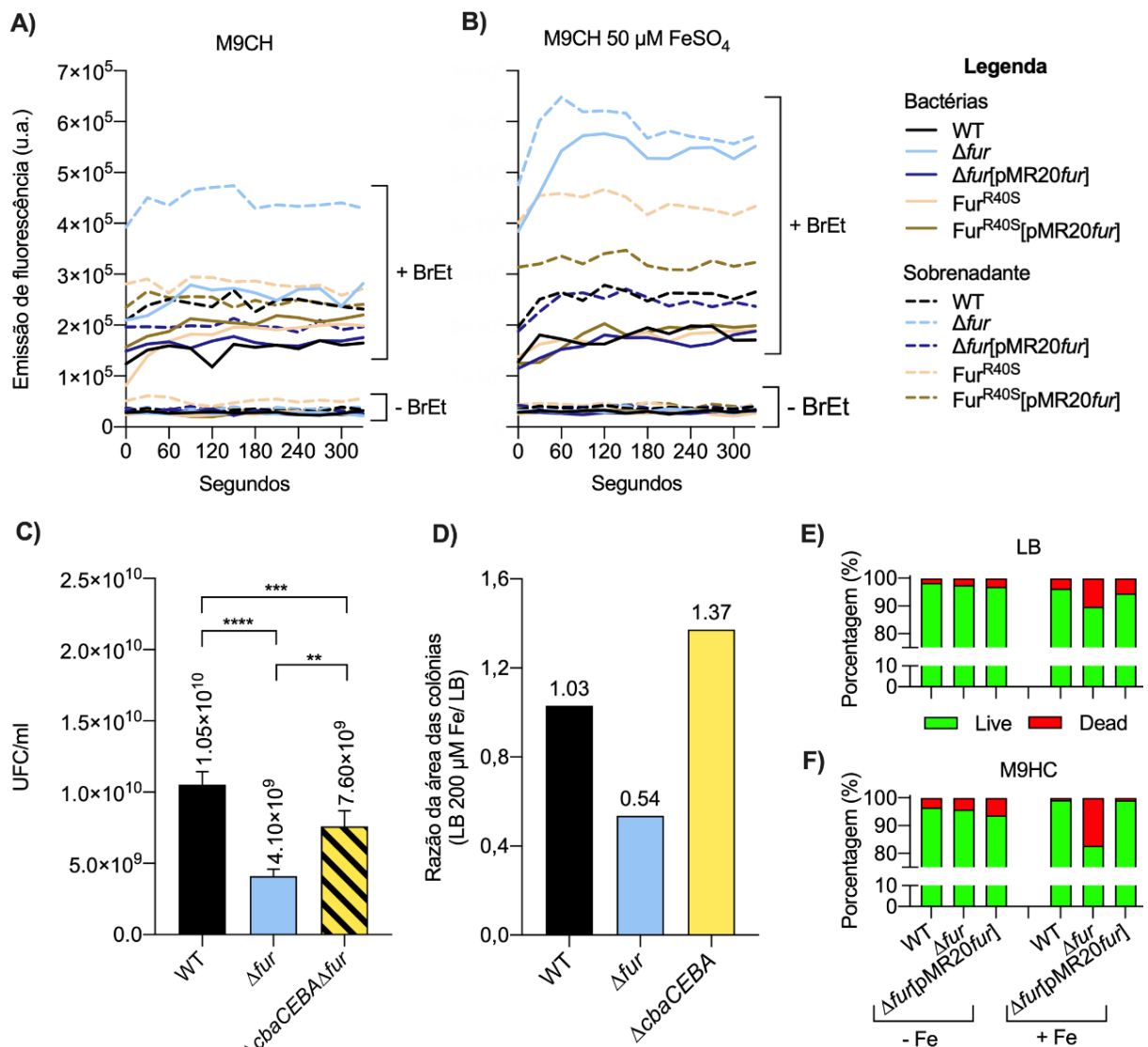


Figura 20 – Efeitos da toxicidade mediada por ferro em mutantes *fur*. **A e B)** Ensaio de detecção de fluorescência após tratamento com brometo de etídeo. A emissão de fluorescência das bactérias (linhas contínuas) e dos sobrenadantes (linhas tracejadas) foi realizada nas linhagens cultivadas em meio M9HC (**A**) e meio M9HC suplementado com FeSO_4 50 μM (**B**) na presença ou ausência de brometo de etídeo, conforme indicado nos gráficos. O ensaio foi realizado em três réplicas biológicas e encontra-se representada a média dos dados para cada linhagem. **C)** A ausência da síntese de sideróforos na linhagem $\Delta cbaCEBA \Delta fur$ melhora seu *fitness*. UFC de culturas de 20 h em meio LB das linhagens indicadas plaqueadas em meio LB. **** $P < 0,0001$; *** $P = 0,0008$; ** $P < 0,001$. **D)** Efeitos da suplementação de ferro em meio LB no mutante Δfur . Foi realizada uma quantificação da área das colônias das linhagens indicadas plaqueadas em meio LB e meio LB suplementado com

FeSO₄ 200 µM e plotado como razão da área das colônias suplementadas com ferro sobre a área das colônias controle plaqueadas em meio LB. **E e F)** Ensaio para avaliação da viabilidade celular por LIVE/DEAD. Culturas em fase mid-log de crescimento mantidas em meio LB (**E**) ou M9HC (**F**) foram tratadas ou não com 500 µM FeSO₄ por 2 h. As imagens foram adquiridas aleatoriamente e aproximadamente 200 células foram quantificadas em cada linhagem/condição.

Além da caracterização da toxicidade de ferro em meio líquido, também buscamos investigar os efeitos causados no cultivo em meio sólido. Para isso, foi mensurada as UFC das linhagens WT, Δfur e do mutante $\Delta cbaCEBA\Delta fur$, que não possui parte da via que sintetiza sideróforos (BATISTA et al., 2019). Assim, no mutante $\Delta cbaCEBA\Delta fur$ espera-se que os efeitos tóxicos decorrentes da maior captação de ferro estejam ausentes ou diminuídos. Ao medir as UFC foi demonstrado que no mutante $\Delta cbaCEBA\Delta fur$ houve uma melhora quando comparado ao mutante Δfur (Figura 20C). Esse dado fornece evidências de que a maior captação de ferro por sideróforos em meio sólido pode ser prejudicial para *C. violaceum*, diminuindo o número de células viáveis assim como a velocidade de crescimento.

Além disso, as linhagens WT, Δfur e $\Delta cbaCEBA$, que não sintetiza sideróforos, foram cultivadas em meio LB e plaqueadas em meio LB ou meio LB suplementado com FeSO₄ 200 µM. Após 24 h de incubação a 37°C, as colônias presentes nas placas foram fotografadas. Em seguida, foi determinada a razão da área das colônias plaqueadas em excesso de ferro sobre a área das colônias plaqueadas apenas em meio LB (Figura 20D). Para a linhagem WT a razão ficou em 1,03, demonstrando que a adição de ferro não compromete a velocidade de crescimento celular de maneira a aumentar ou diminuir significativamente o tamanho das colônias. Para o mutante Δfur a razão encontrada foi de 0,54, indicando que o excesso de ferro diminuiu a velocidade de crescimento do mutante. Já o mutante $\Delta cbaCEBA$, que não utiliza ferro via sideróforos, a razão encontrada foi de 1,37, demonstrando que nesse caso a suplementação do ferro aumenta a velocidade de crescimento bacteriano (Figura 20D).

Por fim, foi realizado um novo ensaio de determinação de viabilidade celular por LIVE/DEAD em culturas da linhagem WT, Δfur e $\Delta fur[pMR20fur]$ mantidas em meio LB ou meio M9HC sem ou com a adição de FeSO₄ 500 µM (Figura 20E e F). Sem a suplementação com ferro, todas as linhagens apresentaram viabilidade superior a 93% tanto em meio LB (Figura 20E) quanto em meio M9HC (Figura 20F). Após o tratamento com ferro, no entanto, observamos que o mutante Δfur apresentou

uma queda na viabilidade (de 97% para 90% em meio LB e de 96% para 83% em meio M9HC, comparando os meios sem e com adição de ferro (Figura 20E e F).

Em conjunto, os dados demonstram que o mutante Δfur apresenta crescimento atrasado em meio líquido (Figura 17C e D) e em meio sólido (Figura 17B), sendo esse fenótipo exacerbado em excesso de ferro (Figura 19B e C e Figura 20). Ademais, o problema de viabilidade do mutante Δfur é mais evidente em meio sólido (Figura 17A) do que em meio líquido (Figura 18) e parece envolver, dentre outras coisas, intoxicação por captação excessiva de ferro (Figura 20C e D).

Uma característica observada durante o cultivo prolongado em meio sólido foi a formação de biofilme rugoso quando em presença de ferro (Figura 21). Esse efeito foi observado no mutante Δfur independente do tipo de tratamento adicionado à placa e para a linhagem Fur^{R40S} esse efeito foi observado em placas PSA ou placas PSA suplementadas com FeSO₄ 600 μ M (Figura 21). Essa alteração da superfície do biofilme em placa também foi observada em *P. aeruginosa* e esse fenótipo parece estar relacionado com o acúmulo de ROS (DIETRICH et al., 2013; KAHL; PRICE-WHELAN; DIETRICH, 2020). Um dos mecanismos para reversão desse estado é o uso de fontes de nitrato para reverter o estado redox intracelular (DIETRICH et al., 2013). Assim, os ensaios para avaliação da formação de biofilme rugoso em *C. violaceum* foram repetidos adicionando NaNO₃ às placas PSA (Figura 21). Nesse cenário, as colônias da linhagem WT e do mutante Fur^{R40S} apresentaram-se lisas, mesmo com a adição de ferro. Já o mutante Δfur manteve o fenótipo rugoso previamente observado. Curiosamente, em ambas linhagens complementadas o fenótipo de rugosidade não foi observado em nenhuma das condições testadas (Figura 21). Hipotetizamos que essa característica possa ser devida a superexpressão de Fur nestas linhagens (Figura 14B), que levaria a uma maior proteção contra o estresse oxidativo.

Por fim, o estado redox dos mutantes Δfur e Fur^{R40S} foi avaliado na presença de H₂O₂ e com a utilização da sonda H₂DCFDA (Figura 22). Em relação ao tratamento com H₂O₂, os mutantes Δfur e Fur^{R40S} foram mais sensíveis que a linhagem WT (Figura 22A), sendo que a maior sensibilidade do mutante Δfur já foi observada na presença de H₂O₂ 5 mM, enquanto que para a linhagem Fur^{R40S} a maior sensibilidade que a linhagem WT foi observada a partir de H₂O₂ 10 mM. As complementações reverteram o fenótipo em ambas as linhagens (Figura 22A).

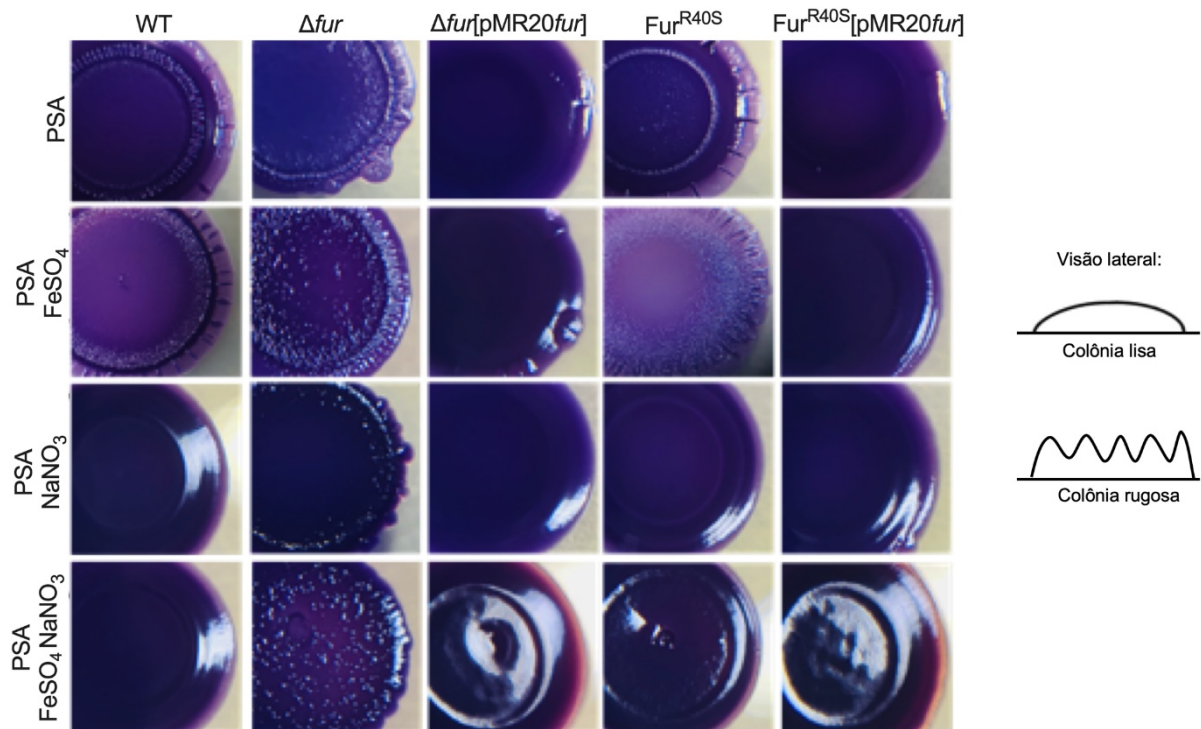


Figura 21 – Perfil de formação de biofilme rugoso ou liso em meio sólido. As linhagens foram cultivadas por 72 h em placas PSA com diferentes tratamentos: FeSO₄ 600 μM, NaNO₃ 60 mM ou FeSO₄ 600 μM + NaNO₃ 60 mM, conforme indicado na figura. Após o cultivo, cada linhagem foi fotografada com o auxílio de uma lente macro para captação de detalhes da morfologia do biofilme em placa.

A sonda H₂DCFDA é um composto químico permeável a célula cujos grupos acetato são clivados por oxidação e por esterases intracelulares, sendo convertida ao composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010). Esta sonda é amplamente utilizada como indicador da presença de ROS. Nesse ensaio, o mutante *Δfur* apresentou altos níveis de ROS mesmo sem a adição de nenhum tratamento às células, sugerindo que *Δfur* está sob estresse oxidativo intrínseco (Figura 22B). Quando FeSO₄ foi adicionado às culturas, os mutantes *Δfur* e Fur^{R40S} apresentaram mais ROS do que a linhagem WT (Figura 22B). Em todas as condições, as complementações se comportaram de maneira semelhante a linhagem WT. Como controle positivo foi utilizado o tratamento com H₂O₂, onde todas as linhagens apresentaram aumento estatisticamente significativo nos níveis de ROS quando comparado a linhagem WT não tratada (Figura 22B).

Em conjunto, os dados apresentados nessa sessão mostram que a ausência de *fur*, como no mutante nulo ou o comprometimento da função da proteína, como no mutante espontâneo, tornam *C. violaceum* mais susceptível ao estresse oxidativo e mais sensível ao aumento do nível intracelular de ferro.

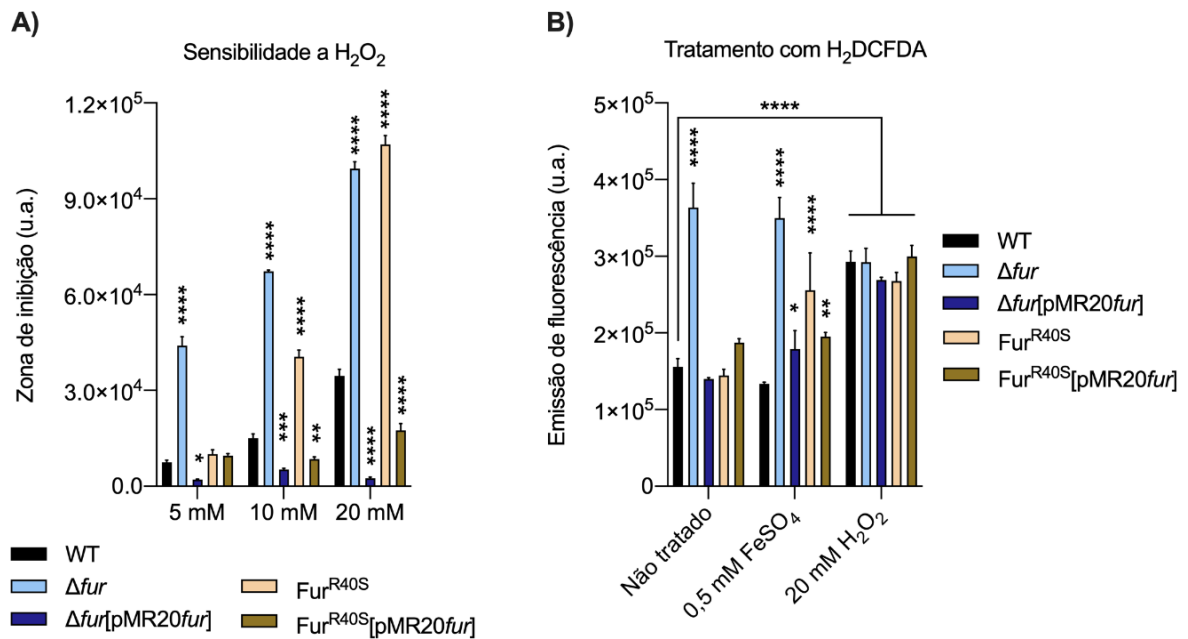


Figura 22 – Os mutantes *fur* são mais susceptíveis ao estresse oxidativo. A) Perfil de sensibilidade a H₂O₂ avaliado por ensaios de disco difusão. Mensuração do halo de inibição de crescimento das linhagens indicadas na presença de concentrações crescentes de H₂O₂. u.a., unidades arbitrárias. *****P*<0,0001; ****P*=0,0001; ***P*=0,042; **P*=0,0161. **B)** Detecção de ROS por fluorescência utilizando a sonda H₂DCFDA. As células foram não tratadas ou tratadas com FeSO₄ 0,5 mM e H₂O₂ 20 mM por 40 min antes da adição da sonda H₂DCFDA para mensuração da fluorescência. *****P*<0,0001; ***P*=0,0023; **P*=0,0288. Ambos experimentos foram realizados em três réplicas biológicas independentes.

4.1.5. Fur reprime a expressão de *cbaF* e *cbuA* em suficiência de ferro

Para avaliar a regulação mediada por Fur foram escolhidas as regiões promotoras dos genes *cbaF* e *cbuA* de *C. violaceum*. CbaF codifica a enzima sintetase de peptídeo não-ribossomal (NRPS, do inglês *nonribosomal peptide synthetase*) envolvida na montagem do sideróforo *chromobactin* e CbuA codifica o receptor dependente de TonB responsável pela captação do mesmo sideróforo (BATISTA et al., 2019). Análises *in silico* e dados anteriores do nosso grupo de pesquisa sugerem que esses genes estão sob regulação de Fur (PREVIATO-MELLO et al., 2017). Assim, foram geradas fusões das regiões promotoras destes genes (*pcbaF* e *pcbuA*) ao sistema repórter *lacZ* (Tabelas 1 e 2) que foram então conjugadas às linhagens WT, *Δfur*, *Δfur*[pSEVA221*fur*] ou Fur^{R40S}. O sistema repórter presente no vetor pRK*lacZ*290 e o vetor pMR20 utilizam tetraciclina como antibiótico para seleção (Tabela 1). Assim, nesse ensaio foi utilizada a linhagem complementada *Δfur*[pSEVA221*fur*] porque esse vetor utiliza canamicina como marca de seleção. A análise da expressão de *pcbaF* e *pcbuA* foi avaliada tanto em meio LB quanto em meio M9HC (Figura 23).

Na linhagem WT cultivada em meio LB, a expressão de *cbaF* foi maior quando foi induzida carência de ferro pelo tratamento com 2,2'-DP (Figura 23A, coluna laranja). Em suficiência de ferro (Figura 23A, colunas roxa e azul) os níveis de expressão de *cbaF* foram semelhantes ao da linhagem não tratada (Figura 23A, coluna amarela). Esses dados demonstram que a expressão de *cbaF* é dependente dos níveis intracelulares de ferro. No mutante Δfur , a expressão se manteve desreprimida independente do tratamento, indicando a repressão da expressão gênica mediada por Fur (Figura 23A). Já o mutante complementado $\Delta fur[pSEVA221fur]$ apresentou o mesmo padrão da linhagem WT, demonstrando o papel de Fur na repressão de *cbaF* quando em suficiência de ferro. Na linhagem Fur^{R40S} a expressão de *cbaF* foi parcialmente desreprimida na presença de ferro, indicando que a substituição R40S compromete, mas não abole a atividade do regulador Fur (Figura 23A).

Em meio mínimo, o perfil de repressão da expressão de *cbaF* por Fur em suficiência de ferro foi mantido (Figura 23B), assim como a desrepressão em carência mediada por 2,2'-DP. No entanto, quando a fusão *pcbaF* na linhagem WT foi cultivada em meio sem nenhum tratamento, a expressão se manteve alta, demonstrando que o meio M9HC, ao contrário do meio LB, tem menor quantidade de ferro disponível (Figura 23B).

Quando avaliada a expressão de *pcbuA* na linhagem WT e no mutante Δfur , foi observada a mesma tendência da expressão de *pcbaF* (Figura 23C e D). Em conjunto, esses dados definem Fur como sendo um repressor da expressão de *pcbaF* e *pcbuA* em suficiência de ferro. Além disso, demonstramos como a diferença no conteúdo do metal em relação ao meio LB e o meio M9HC implica em uma mudança na expressão desses genes, definindo sua importância na homeostase de ferro para *C. violaceum*.

Curiosamente, quando um gel de poliacrilamida 8% foi corrido com extratos totais das linhagens WT, WT tratada com 2,2'-DP 300 μ M por 30 min, Δfur e $\Delta fur[pMR20fur]$ obtidos a partir de meio LB, foi detectada uma banda (ou mais que uma juntas) mais expressa próximo aos 75 kDa no mutante Δfur (Figura 23E). Análises *in silico* (https://web.expasy.org/compute_pi/) sugerem que as proteínas CbuA e VbuA têm aproximadamente 77 e 75 kDa. Assim, hipotetizamos que a(s) banda(s) mais expressa(s) seja(m) correspondente(s) a um ou aos dois receptores dependentes de TonB (CbuA e VbuA).

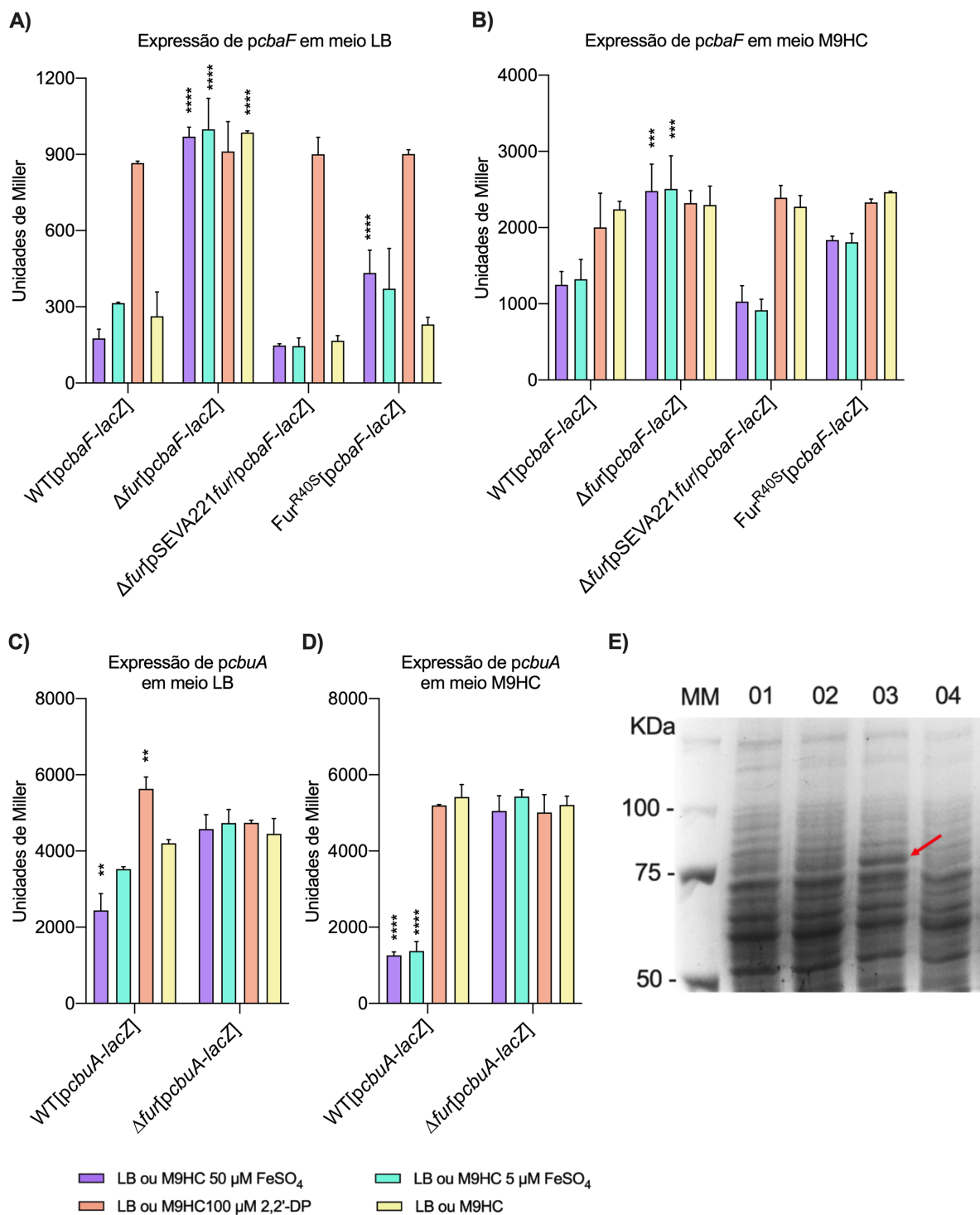


Figura 23 – Fur reprime a expressão de *cbaF* e *cbuA* em condições de suficiência de ferro. A expressão de *cbaF* e *cbuA* em resposta a ferro e Fur foi determinada em ensaios de atividade de β-galactosidase. As linhagens indicadas com as fusões das regiões promotoras *pcbaF* (A e B) e *pcbuA* (C e D) ao gene *lacZ* sem promotor do vetor pRK*lacZ*290 foram cultivadas em meio LB (A e C) ou meio M9HC (B e D). As culturas foram não tratadas ou tratadas com FeSO₄ 5 e 50 μM e 2,2'-DP 100 μM por 1 h. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas independentes. *****P*<0,0001; ****P*<0,0002; ***P*=0,065. As comparações realizadas na análise estatística referem-se sempre a cada condição (FeSO₄ ou 2,2'-DP) em relação a expressão da linhagem WT, sob o mesmo tratamento. E) SDS-PAGE 8% corrido a 100 Volts por 30 min mais 200 Volts por 50 min e corado com azul de

Coomassie, contendo extratos totais das linhagens 01) WT; 02) WT tratada com 2,2'-DP 300 μM por 30 min; 03) Δfur e 04) $\Delta fur[pMR20fur]$, cultivadas em meio LB. A seta vermelha indica a(s) banda(s) mais expressa(s) no mutante Δfur .

4.1.6. Efeitos pleiotrópicos da ausência de *fur*

Além dos efeitos diretos decorrentes da ausência ou do comprometimento do funcionamento de Fur, também buscamos avaliar possíveis fenótipos secundários, os quais podem estar relacionados com vias reguladas direta ou indiretamente por esse regulador. Avaliação da motilidade do tipo *swimming* indicou que, após 48 h de cultivo em meio M9HC semi-sólido (0,3% ágar), apenas o mutante Δfur apresentou redução no diâmetro da motilidade quando comparado às linhagens WT e complementada. O mutante Fur^{R40S} não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à linhagem WT (Figura 24A).

A produção de biofilme em meio estático foi avaliada com a coloração com cristal violeta em linhagens cultivadas por 24 h em meio LB (Figura 24B). Uma vez que o mutante Δfur atinge uma menor densidade final em cultivo em meio líquido (Figura 17C e D), para evitar o viés de que uma menor produção de biofilme seja devida a menor densidade celular atingida, os dados estão apresentados como a razão entre a densidade ótica determinada para o biofilme sobre a densidade de células planctônicas medidas no momento da realização do ensaio. Assim, determinamos que o mutante Δfur também produz menos biofilme que a linhagem WT e que esse fenótipo foi revertido na linhagem complementada. O mutante Fur^{R40S} não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à linhagem WT (Figura 24B).

Por fim, a última característica avaliada foi a produção de celulose em biofilmes com a coloração por vermelho congo (Figura 24C). Novamente, apenas o mutante Δfur mostrou diminuição significativa quando comparado a linhagem WT, com reversão do fenótipo na linhagem complementada.

Esses dados sugerem que em *C. violaceum* Fur pode estar envolvido com a regulação direta ou indireta de outros processos fisiológicos além daqueles relacionados com a homeostase de ferro. Não podemos descartar a possibilidade de que os defeitos de crescimento no mutante nulo *fur* possam ter alguma influência nos fenótipos de menor produção de biofilme e celulose e pela diminuição da motilidade do tipo *swimming*.

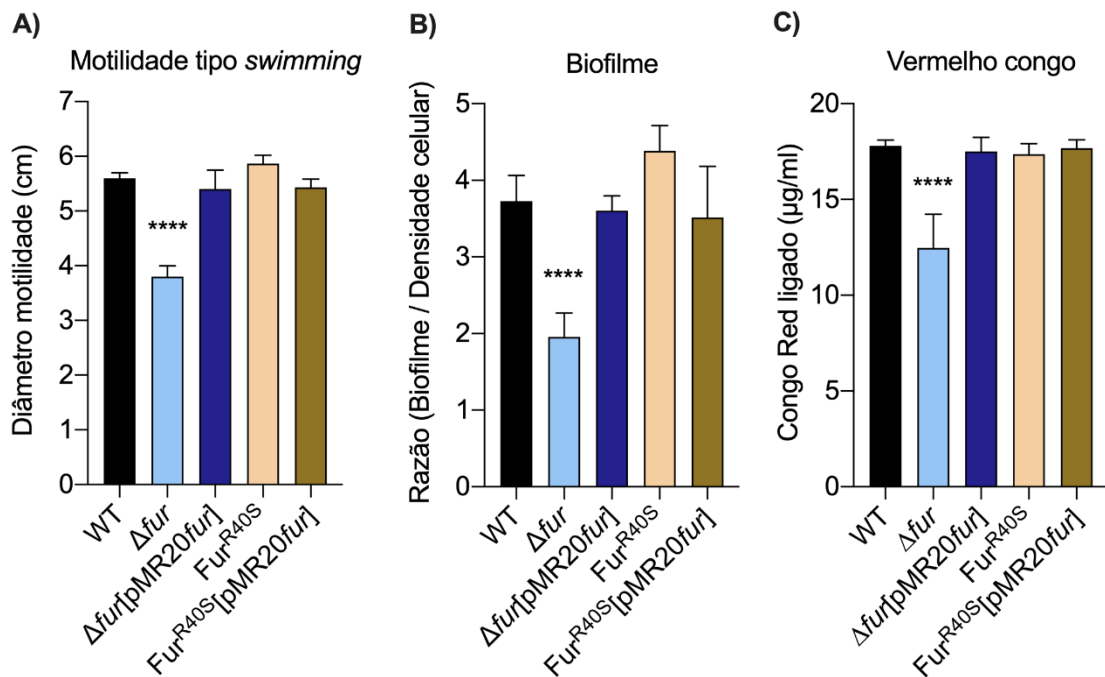


Figura 24 – Efeitos pleiotrópicos da ausência de *fur* em *C. violaceum*. **A)** Ensaio de motilidade do tipo *swimming*. As linhagens indicadas foram cultivadas em meio M9HC com 0,3% ágar e o diâmetro da motilidade foi medido 48 h após o inóculo. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas. **** $P < 0,0001$. **B)** Ensaio para mensuração do biofilme em condições estáticas. Após 24 h de cultivo em meio LB, a formação do biofilme das linhagens indicadas foi determinada por coloração com cristal violeta. Os dados estão indicados como razão do biofilme pela densidade celular. **** $P < 0,0001$. Ensaio realizado em seis réplicas biológicas. **C)** Ensaio para produção de celulose em biofilmes via coloração com vermelho congo. Após 48 h de cultivo em meio LB, a síntese de celulose em biofilmes foi determinada por coloração com vermelho congo. **** $P < 0,0001$. Ensaio realizado em seis réplicas biológicas.

4.1.7. O mutante Δfur é atenuado para virulência e induz menos formação de NET

Em trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, demonstramos que a virulência de *C. violaceum* é atenuada em mutantes que não sintetizam sideróforos ($\Delta cbaCEBA$ e $\Delta cbaF/vbaF::pNTP$), assim como naqueles que não são capazes de captá-los ($\Delta vbuA\Delta cbuA$) (BATISTA et al., 2019).

Em relação aos níveis de sideróforos, o mutante $\Delta vbuA\Delta cbuA$ e o mutante Δfur possuem acúmulo desses metabólitos no meio extracelular. O mutante $\Delta vbuA\Delta cbuA$ devido a não captação, e o mutante Δfur devido a desrepressão da via de síntese. Assim, resolvemos avaliar o perfil de virulência dos mutantes Δfur e Fur^{R40S} em camundongos da linhagem BALB/c. Os animais foram injetados com 10^6 UFC de cada uma das linhagens e a curva de sobrevivência foi avaliada por até dez dias

(Figura 25A). Apenas o mutante Δfur apresentou atenuação da virulência em relação à linhagem WT, com reversão do fenótipo na linhagem complementada. Já o mutante Fur^{R40S} , em que o acúmulo extracelular de sideróforos é menor, não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação a linhagem WT (Figura 25A).

Também foi quantificada a carga bacteriana no fígado dos animais infectados. O mutante Δfur teve acentuada redução na colonização do órgão, com reversão do fenótipo na linhagem complementada (Figura 25B). Além disso, utilizamos neutrófilos isolados para quantificação *in vitro* da liberação de NET (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*), que são redes de fibras extracelulares majoritariamente compostas por DNA, utilizadas para aprisionar patógenos (BRINKMANN et al., 2004). Demonstramos que a linhagem WT produz grandes quantidades de NET quando comparada ao controle positivo PMA (do inglês, *phorbol myristate acetate*, 13-acetato de forbol 12-miristato), e que no mutante Δfur os níveis de NET apresentaram-se reduzidos e com reversão do fenótipo na linhagem complementada (Figura 25C). Como controle negativo foi quantificado a produção de NET espontânea, sem a adição de estímulo (PMA ou cultura bacteriana). Coletivamente, esses resultados demonstram a importância de Fur na virulência e colonização do hospedeiro vertebrado por *C. violaceum*.

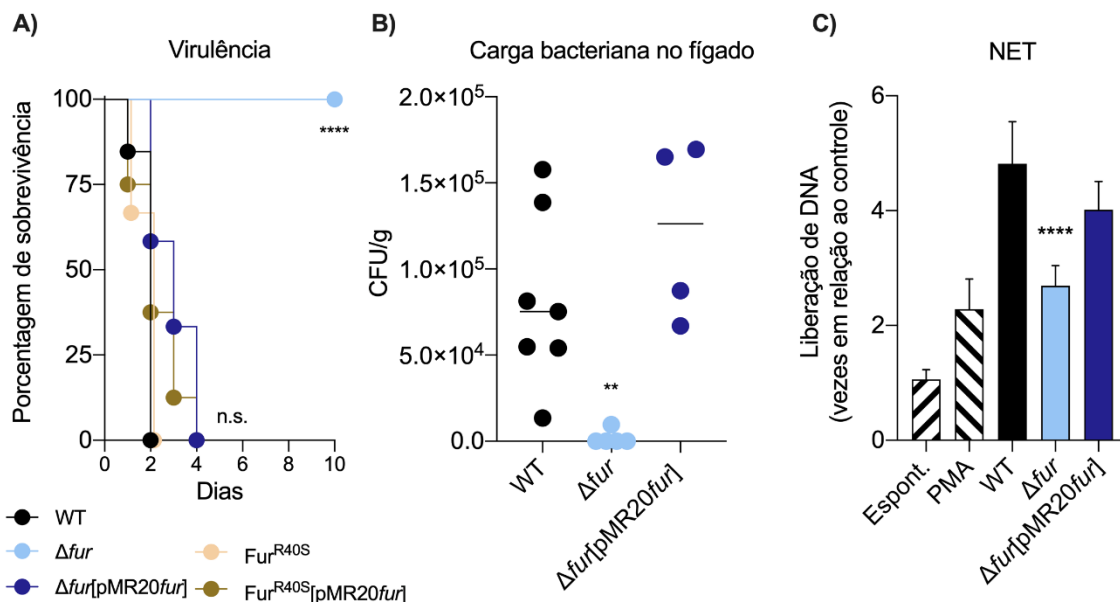


Figura 25 – Perfil de virulência em modelo de infecção em camundongos e produção de NET. A) Curvas de sobrevivência. Os animais ($n = 16$ para linhagem WT e mutantes e $n = 8$ para linhagens complementadas) foram injetados com 10^6 UFC e a sobrevivência foi monitorada por até 10 dias. Análise estatística realizada com o teste log rank (Mantel-Cox). **** $P=0,0001$; n.s. = não significativo. **B)** Carga bacteriana no fígado. Os animais foram

infectados com 10^6 UFC e após 16 h de infecção, os fígados foram coletados de maneira estéril, homogeneizados, diluídos e plaqueados para determinação das UFC. **** $P < 0,0128$.** **C)** Quantificação da liberação de NET após 3 h de incubação entre *C. violaceum* e neutrófilos isolados do peritônio de camundongos em MOI 10:1. Como controle positivo foi determinada a liberação de NET em meio com PMA e como controle negativo foi determinada a liberação de NET em meio sem a presença de bactérias ou PMA (Espontâneo = Espont.); ****** $P < 0,001$.**

4.1.8. A inserção do transposon T8 em um locus CRISPR-Cas melhora o *fitness* do mutante Δfur

Uma característica marcante do mutante Δfur de *C. violaceum* é o seu atraso de crescimento em meio de cultura (Figura 17). Essa peculiaridade pode levantar questões importantes acerca de vários fenótipos observados até então, como por exemplo a virulência. Mesmo havendo o ajuste da dose do mutante para um valor de UFC equiparável a dose utilizada na linhagem WT, a atenuação da virulência poderia ser atribuída ao atraso de crescimento do mutante ou invés de um efeito regulatório de Fur. Para investigar e responder essas dúvidas, utilizamos o transposon IS $lacZ$ /hah (T8) (JACOBS et al., 2003) para obter mutantes Δfur em que o *fitness* bacteriano fosse melhorado em meio sólido. Com isso, poderíamos verificar qual(is) via(s) estariam envolvidas com o fenótipo de atraso de crescimento observado, e utilizar o mutante para corroborar os dados dos outros experimentos obtidos até aqui.

Inicialmente, foi gerada a linhagem Δfur resistente a ácido nalidíxico (Δfur^{NALR}) para a seleção de transconjugantes com *E. coli* SM10 λ pir[pIT2], uma vez que o plasmídeo pIT2 (Tabela 1) é resistente a ampicilina, o antibiótico usualmente utilizado para eliminação de *E. coli* nas etapas de conjugação.

O mutante Δfur^{NALR} foi obtido a partir de seleção em placas de meio M9HC-1% suplementadas com concentrações crescentes do antibiótico ácido nalidíxico, seguido pelo sequenciamento da região determinante de resistência a quinolonas (QRDR) do gene *gyrA* de *C. violaceum* (Tabela 2). A escolha de colônias com maior tamanho, indicando melhor crescimento em meio sólido, foi utilizada como critério para seleção após conjugação do mutante Δfur^{NALR} com *E. coli* SM10 λ pir[pIT2].

Foram selecionados dez mutantes com a melhora de crescimento em meio sólido para identificação do sítio de inserção do transposon T8, seguindo protocolo de PCR com oligonucleotídeos semi-degenerados (Tabela 2) (JACOBS et al., 2003). Destes dez, apenas em um mutante foi possível identificar adequadamente o sítio de inserção do T8 no genoma de *C. violaceum* Δfur^{NALR} , em um locus CRISPR/Cas (Figura 26A). Esse mutante, nomeado Δfur CRISPR/Cas::T8 foi então caracterizado.

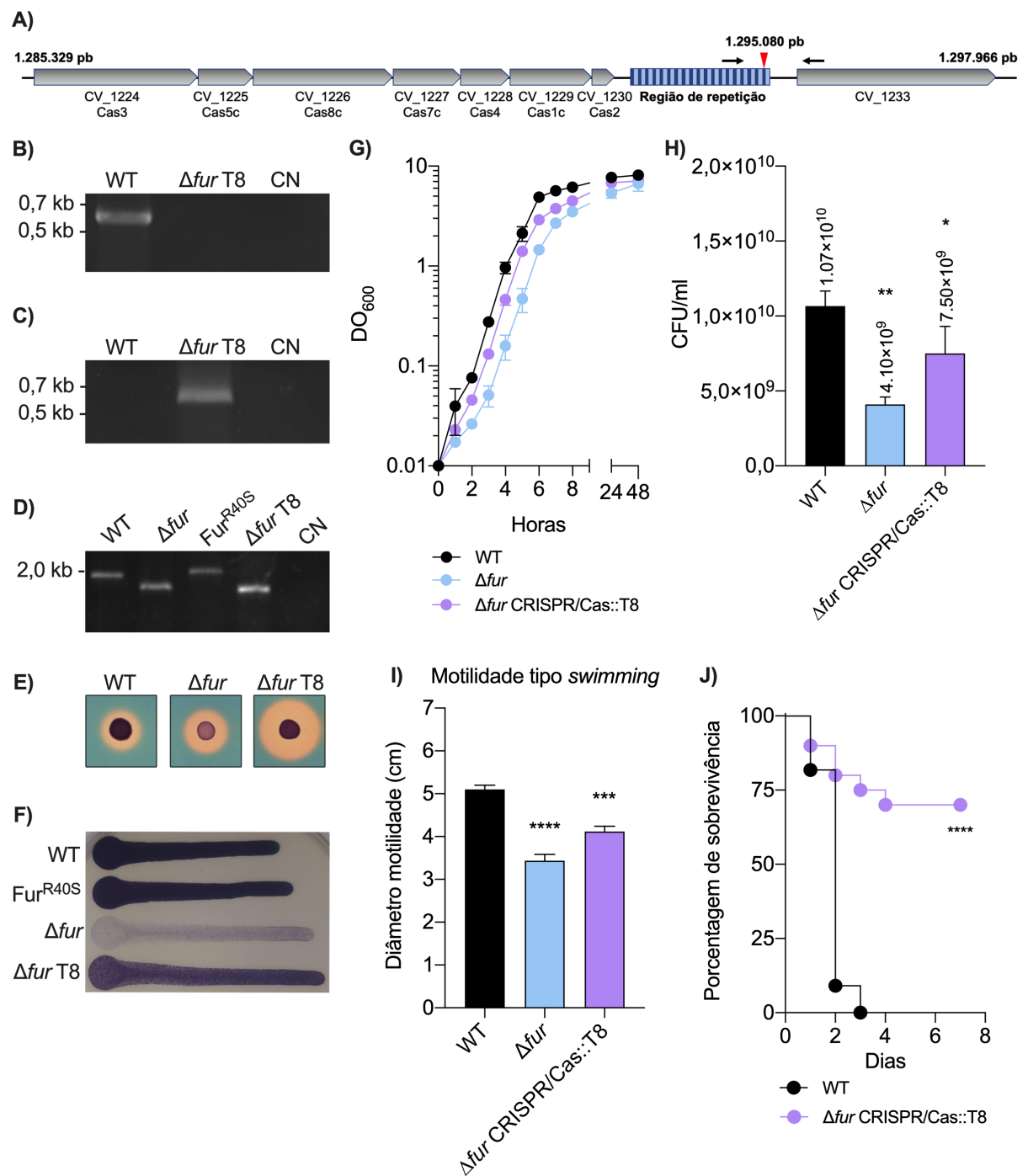


Figura 26 – A inserção do transposon T8 em locus CRISPR-Cas melhora o *fitness* do mutante Δfur . **A)** Representação esquemática da inserção do transposon T8 no locus CRISPR-Cas no cromossomo do mutante Δfur (seta vermelha), gerando a linhagem Δfur CRISPR/Cas::T8 (também identificada como Δfur T8). Na região de repetição, as barras em azul escuro indicam as regiões espaçadoras e as barras em azul claro indicam as regiões repetitivas do locus CRISPR. **B)** Confirmação genotípica da inserção do transposon T8 por PCR utilizando os oligonucleotídeos CRISPR_ID_Fw e CRISPR_ID_Rv (Tabela 2, as setas pretas no item "A" indicam os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos). O produto esperado na linhagem WT é de 635 pb. **C)** Confirmação adicional da inserção do transposon T8 por PCR. Nessa PCR foram utilizados os oligonucleotídeos *lacZ*-148 (Tabela 2) anelando no transposon e o CRISPR_ID_Rv, anelando no genoma de *C. violaceum*. O produto de PCR

esperado na linhagem Δfur T8 é de 678 pb. **D)** PCR confirmando que Δfur T8 tem o genótipo de mutação em *fur*, utilizando os oligonucleotídeos Fur_del1 e Fur_del4 (Tabela 2), com produto estimado em 1633 pb na linhagem WT e 1249 pb na linhagem mutante. As linhagens WT, Δfur e Fur^{R40S} foram incluídas como controles. CN = controle negativo. A estimativa do tamanho dos fragmentos de DNA foi feita com o marcador molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). **E)** O mutante Δfur T8 libera mais sideróforos que o mutante Δfur . A produção foi avaliada em placa PSA-CAS após 24 h de cultivo. **F)** Crescimento em placas LB das linhagens indicadas com DO₆₀₀ 0,01 após 24 h a 37°C. **G)** Curvas de crescimento em meio LB. Experimento realizado em três réplicas biológicas e plotado como média e desvio padrão. **H)** Determinação de UFC das linhagens indicadas após 20 h de cultivo em meio LB, diluídas e plaqueadas em LB. ***P*=0,0011; **P*=0,0344. **I)** Ensaio de motilidade do tipo *swimming* feitos em placas M9HC 0,3% ágar realizados em duas réplicas biológicas. *****P*<0,0001; ****P*<0,0002. **J)** O mutante Δfur CRISPR/Cas::T8 é atenuado para virulência. Ensaio realizado com camundongos da linhagem Balb/c (n = 11 para linhagem WT, n = 20 para Δfur CRISPR/Cas::T8). Análise estatística realizada com o teste log rank (Mantel-Cox). *****P*=0,0001.

Uma análise detalhada mostrou que a inserção do transposon T8 no locus CRISPR/Cas ocorreu em uma região composta de sequências espaçadoras e sequências repetitivas (Figura 26A). A inserção na posição 1.295.080 pb compreende a última região espaçadora (entre 1.295.052 e 1.295.084). Adicionalmente, foram realizadas PCRs para confirmar o sítio de inserção: os oligonucleotídeos CRISPR_ID_Fw e CRISPR_ID_Rv (Tabela 2, Figura 26A) se anelam em regiões próximas ao sítio de inserção do transposon T8, e na linhagem WT o produto de amplificação é de 635 pb (Figura 26B). Uma vez que o transposon tenha se inserido nessa região, o produto passa a ser a soma dos 635 pb do locus WT com os 6.192 pb do transposon T8. Assim, para o mutante Δfur CRISPR/Cas::T8 (também denominado Δfur T8) não foi observado um produto de amplificação na mesma faixa de tamanho que o observado na linhagem WT (Figura 26B).

A segunda PCR foi realizada utilizando a combinação dos oligonucleotídeos *lacZ*-148 ou *lacZ*-211, que se anelam no transposon (Tabela 2) com CRISPR_ID_Rv, que se anela no genoma bacteriano, possibilitando assim checar a orientação de inserção do transposon (Figura 26C). Como esperado, na linhagem WT não foi obtido produto de amplificação, e no mutante Δfur CRISPR/Cas::T8, foi obtido um produto apenas com a combinação *lacZ*-148 e CRISPR_ID_Rv (Figura 26C). Por fim, os oligonucleotídeos Fur_del1 e Fur_del4 (Tabela 2) foram utilizados em uma PCR para confirmar que além da inserção do transposon, a linhagem obtida tem como origem o mutante nulo (Figura 26D). As linhagens WT, Δfur e Fur^{R40S} foram utilizadas como controles da reação.

Confirmado o genótipo do mutante Δfur CRISPR/Cas::T8, foram então realizadas caracterizações fenotípicas, começando pela atividade de sideróforos (Figura 26E). Na placa PSA-CAS, o halo indicativo da atividade dos sideróforos foi consideravelmente maior no mutante com inserção do transposon quando comparado à linhagem mutante Δfur (Figura 26E). A explicação para esse fenômeno está no melhor crescimento da linhagem Δfur CRISPR/Cas::T8 em placas PSA-CAS, sugerindo que o halo no mutante nulo possa estar subestimado, uma vez que o crescimento do mutante é retardado.

Para confirmar o fenótipo utilizado na seleção do mutante com inserção do transposon, cerca de 20 μ l de culturas das linhagens WT, Δfur , Δfur CRISPR/Cas::T8 e Fur^{R40S} com DO₆₀₀ 0,01 foram plaqueados em meio LB e estas foram cultivadas por 24 h a 37°C, mostrando a reversão do crescimento no mutante com inserção do transposon T8 quando comparado ao mutante Δfur (Figura 26F).

Além disso, foi observada uma melhora significativa no crescimento da linhagem Δfur CRISPR Cas::T8 em meio líquido quando comparado ao mutante Δfur (Figura 26G), além de uma melhora nas UFC (Figura 26H) e na motilidade do tipo *swimming* (Figura 26I). Embora estes experimentos mostrem que não houve reversão a níveis exatamente iguais aos da linhagem WT, houve significativa melhora, demonstrando que os resultados dos ensaios realizados com o mutante Δfur não são decorrentes apenas do atraso no crescimento, mas também podem ter influência de genes regulados direta ou indiretamente por Fur.

Para corroborar os últimos achados, o ensaio de virulência foi feito com o mutante Δfur CRISPR/Cas::T8 (Figura 26J). Nesse ensaio houve a mesma tendência de atenuação de virulência observada no mutante Δfur (Figura 25A), confirmando a relevância de Fur para determinação da virulência de *C. violaceum*.

Por fim, o perfil de atividade de sideróforos em meio PSA-CAS foi feito em placa suplementada com FeSO₄ 50 μ M (Figura 27A). Após 48 h de cultivo, mostramos que tanto o mutante nulo Δfur quanto o mutante Δfur CRISPR/Cas::T8 mantiveram o perfil de desrepressão na atividade de sideróforos (Figura 27A). O menor halo formado no mutante nulo Δfur pode ser devido a atenuação do crescimento dessa linhagem em meio sólido quando comparado a linhagem WT, conforme indicado às 24 h de cultivo.

A confirmação da desrepressão da síntese de sideróforos em mutantes *fur* também foi feita através de ensaio quantitativo (Figura 27B). Nesse ensaio, foi

demonstrado que os mutantes Δfur , Fur^{R40S} e Δfur CRISPR/Cas::T8 têm maior síntese de sideróforos quando em comparação a linhagem WT. A complementação do mutante Δfur e Fur^{R40S} com a cópia selvagem de *fur* reverteu a produção de sideróforos para níveis próximos ao da linhagem WT, enquanto que na complementação dos mesmos mutantes com a cópia mutada de *fur* (*fur*^{C118A}), a reversão foi parcial (Figura 27B).

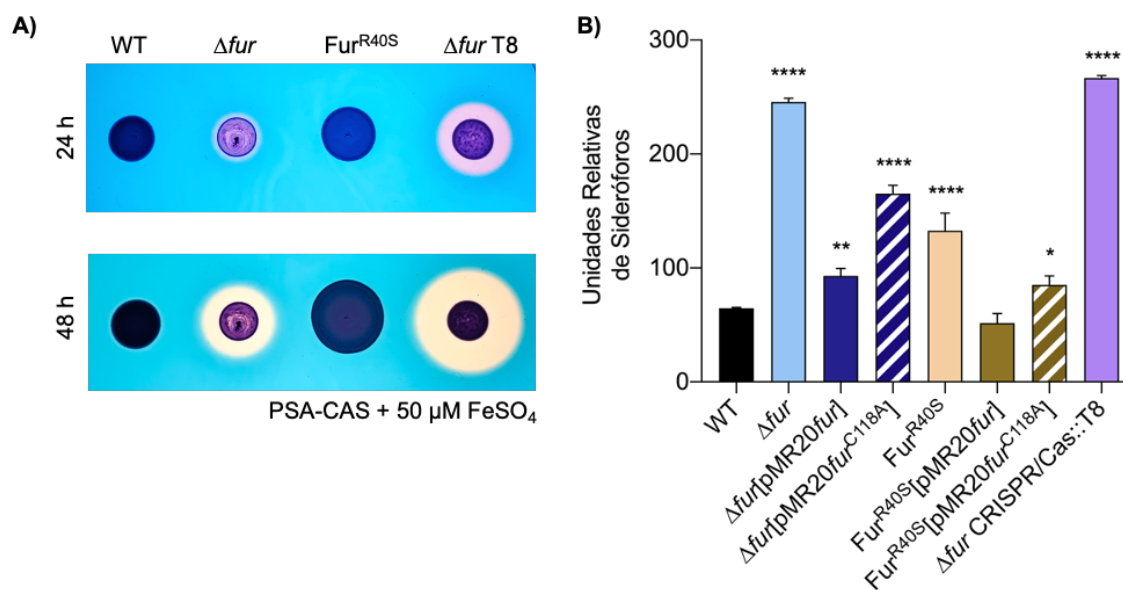


Figura 27 – Perfil de atividade e análise quantitativa de sideróforos. A) Perfil de atividade de sideróforos das linhagens indicadas cultivadas em meio PSA-CAS suplementado com FeSO₄ 50 μ M. As placas foram documentadas 24 e 48 h após o inóculo de 5 μ l de cada uma das linhagens crescidas em meio LB. **B)** Ensaio quantitativo com mensuração da produção de sideróforos em sobrenadantes obtidos após 48 h de cultivo em meio MM9-Tris. O ensaio foi realizado em triplicata biológica. **** $P < 0,0001$; ** $P = 0,0023$; * $P = 0,0275$.

4.1.9. Análises preliminares do regulon Fur em *C. violaceum*

Para determinação do possível Fur-box de *C. violaceum* foram utilizadas sequências das regiões promotoras de genes de dois *clusters* envolvidos com a produção e utilização de sideróforos (BATISTA et al., 2019), além de alguns genes potencialmente envolvidos com homeostase de ferro que foram superexpressos em resposta ao tratamento com hidróperóxido de cumeno (PREVIATO-MELLO et al., 2017). Das catorze regiões promotoras utilizadas (Tabela 4) foi possível determinar uma sequência consenso para o Fur-box de *C. violaceum* que lembra Fur box de outras bactérias (Figura 28). Essas análises sugerem que o regulador Fur de *C. violaceum* deve regular de modo direto importantes genes para utilização de ferro via sideróforos (BATISTA et al., 2019).

Tabela 3 – Genes utilizados para determinação do Fur-box de *C. violaceum*

Nome	Valor P	Sítios
CV_0077	2.30e-7	GTTAATAGAA AAACACAATTGTCATCAAT GGATTAACAA
CV_1485 (<i>cbaC</i>)	3.36e-11	ATATACATTG AACGATAATTATTATCATT ATCATCGGAG
CV_1486 (<i>cbaF</i>)	7.21e-8	CAAGAATGCG ATTGAAATTGATATTCAAT CGCATTATG
CV_1491	6.17e-8	ATTCGCCTGA AATAAAAACGATTCCTATT TGTGTTCTCA
CV_1970	7.12e-7	TTTATCAGCA ATGGAAAGTATTTCCTAAT TTGTGTTTGT
CV_1982	1.79e-6	TCTGTACTTA ATGACAAATTGTTACTGAT ATTGACGGTT
Cv_2230 (<i>fepA</i>)	1.41e-10	GCATATTGAT AATGATAAATATTATCATT CGCATCGATT
CV_2231 (<i>fes</i>)	5.69e-11	AATCGATGCG AATGATAAATATTATCATT ATCAATATGC
CV_2236 (<i>fepD</i>)	5.29e-7	GGCAGTTGTT ATTAGGAATCATTTCATT TGATTATGCA
CV_2237	1.33e-9	TGCATAATCA AATGAAAATGATTCCTAAT AACAACCTGCC
CV_2239 (<i>fepB</i>)	2.61e-9	CGACAATGTT AATGATAAATCATTATCACT TGCAATAAAA
CV_2251 (<i>fhuA</i>)	4.74e-11	GCTTAATACT AATGATAAATATCATCATT ATCAAATGCG
CV_2387 (<i>ribE</i>)	2.78e-6	ATGTTGTCCA AACGACAATTCAAACCAAG GAGGCTTGCC
CV_3895	3.36e-11	TGCCGACTTA AATGATAAATGGTTATCATT TTTAAATGAG

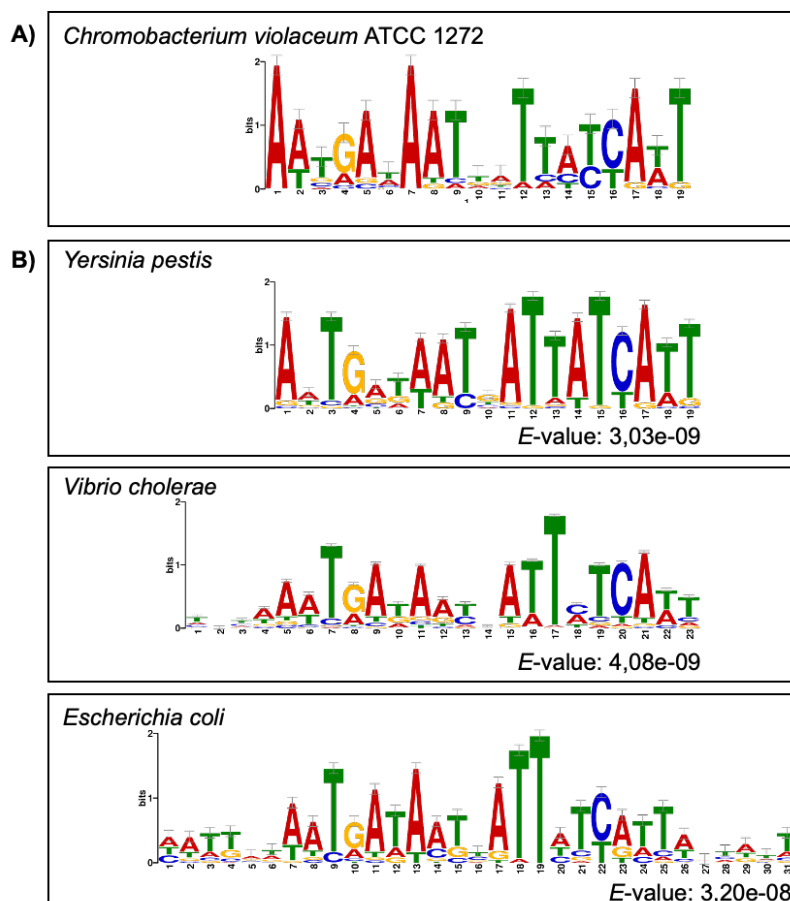


Figura 28 – Identificação de um possível Fur box em *C. violaceum*. **A)** A sequência palindrômica consenso do Fur box de *C. violaceum* ATCC 12472 foi gerada com o programa MEME (<https://meme-suite.org/meme/>), utilizando as sequências de DNA da Tabela 3. **B)** Comparação do possível Fur-box de *C. violaceum* com o Fur-box já caracterizado em outras espécies. Essa análise foi realizada com o programa Tomtom (<https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom/>).

4.2. CARACTERIZAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO Zur

4.2.1. Análise genômica e obtenção de mutantes nulos em genes do operon que codifica Zur em *C. violaceum*

Em muitas bactérias, os principais genes que codificam proteínas relacionadas com a homeostase de zinco, como o regulador Zur e o transportador de alta afinidade do tipo ABC, ZnuABC, organizam-se em um mesmo *cluster* no genoma. Em *C. violaceum*, observamos que *zur* encontra-se em um possível operon com os genes CV_3067 (Número de acesso NCBI: CV_RS14045), que codifica uma possível metalochaperona pertencente ao COG0523; CV_RS15040, que codifica uma proteína hipotética; e os três genes que compõem o transportador de alta afinidade, *znuC*, que codifica uma ATPase, *znuB*, que codifica uma proteína transmembrana e *znuA*, que codifica uma proteína periplasmática de ligação a zinco (Figura 29). Esta co-localização genômica entre os genes acima mencionados se mantém em várias bactérias, com variações na ordem e orientação dos genes (Figura 29). O transportador ZnuABC de *C. violaceum* e seu papel no transporte de zinco foi estudado em detalhes em trabalho colaborativo de co-orientação da iniciação científica do aluno Waldir Paulo da Silva Júnior. Alguns resultados desse trabalho importantes para a discussão dos dados desta tese estarão citados ao longo do texto.

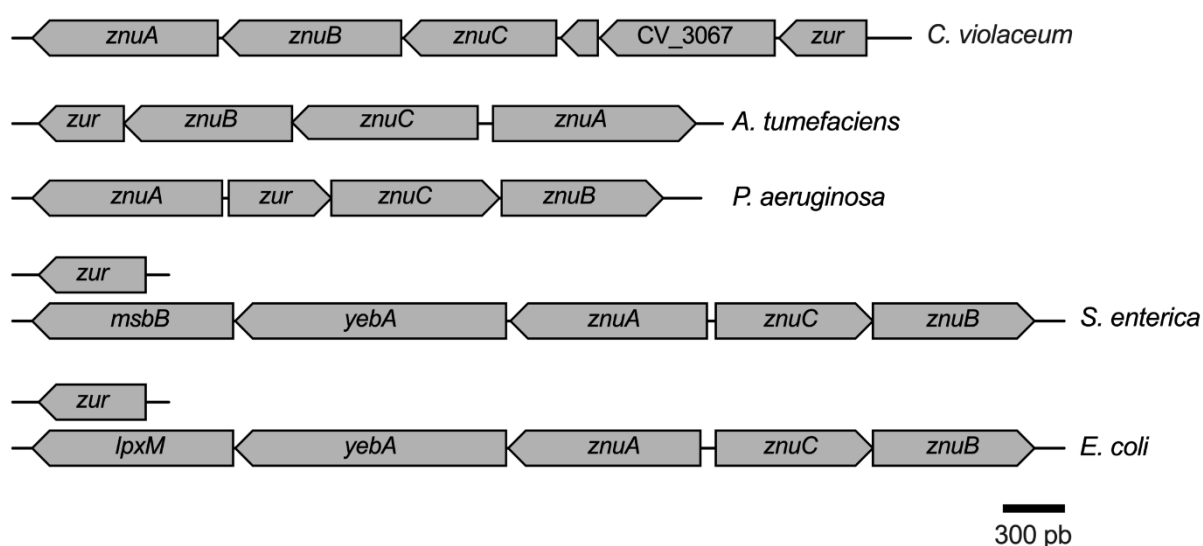


Figura 29 – Organização genômica dos loci contendo genes relacionados a homeostase de zinco em diferentes bactérias. Os genes analisados foram procurados em bancos de dados como *Microbial Genome Database for Comparative Analysis* (MGD, <http://mbgd.genome.ad.jp/>) e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, <https://www.kegg.jp/>) e plotados em escala, conforme indicado na figura. As bactérias e os genes indicados são as seguintes: *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, *zur* (CV_3068), CV_3067 (CV_RS15045), CV_RS15040, *znuC* (CV_3066), *znuB* (CV_3065) e *znuA*

(CV_3064); *Agrobacterium tumefaciens* C58, *zur* (Atu1518), *znuB* (Atu1519), *znuC* (Atu1520) e *znuA* (Atu1521); *Pseudomonas aeruginosa* PA14, *znuA* (PA14_72550), *zur* (PA14_72560), *znuC* (PA14_72580) e *znuB* (PA14_72590); *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi CT18, *zur* (STY4437), *msbB* (STY2097), *yebA* (STY2098), *znuA* (STY2099), *znuC* (STY2100) e *znuB* (STY2101); *Escherichia coli* K12 DH10B, *zur* (ECDH10B_4235), *lpxM* (ECDH10B_1996), *yebA* (ECDH10B_1997), *znuA* (ECDH10B_1998), *znuC* (ECDH10B_1999) e *znuB* (ECDH10B_2000).

Para determinar o papel de diferentes genes deste operon na homeostase de zinco e na virulência de *C. violaceum*, decidimos obter linhagens mutantes para *zur*, CV_3067 e *znuCBA*. O mutante Δzur foi obtido prontamente em seis de vinte e cinco colônias sensíveis a canamicina testadas (Figura 30A), sem a necessidade de modificação do meio de seleção para a segunda recombinação homóloga, como foi preciso para a obtenção do mutante Δfur . O mutante ΔCV_3067 foi obtido em todas as quatro colônias sensíveis a canamicina testadas (Figura 30B), também sem a necessidade de modificação do meio de cultura. O mutante $\Delta znuCBA$ (sem os três genes do transportador) foi obtido sem maiores problemas (IC, Waldir da Silva Júnior).

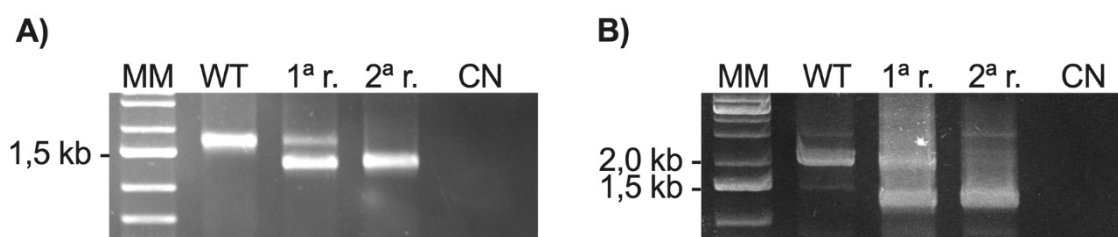


Figura 30 – Confirmação genotípica dos mutantes Δzur e ΔCV_3067 . A confirmação da obtenção dos mutantes foi feita por PCR, utilizando os oligonucleotídeos Zur_del1 e Zur_del4 ou CV3067_del1 e CV3067_del4 (Tabela 2). **A)** Mutante Δzur . O produto da primeira recombinação (1^a r.) possui a banda de 1568 pb, correspondendo ao gene de interesse mais as regiões flanqueadoras e a banda de 1234 pb, que contém apenas as regiões flanqueadoras. O produto da segunda recombinação (2^a r.) possui a banda de 1234 pb, indicando o genótipo mutante (Δzur). **B)** Mutante ΔCV_3067 . O produto da primeira recombinação (1^a r.) possui a banda de 2044 pb, correspondendo ao gene de interesse mais as regiões flanqueadoras e a banda de 1231 pb, que contém apenas as regiões flanqueadoras. O produto da segunda recombinação (2^a r.) possui a banda de 1234 pb, indicando o genótipo mutante (ΔCV_3067). CN = controle negativo. MM = padrão de marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

4.2.2. O operon *zur*-CV_3067-CV_RS15040-*znuCBA* é reprimido por Zur em resposta a zinco

Genes regulados por Zur possuem uma sequência regulatória palindrômica com comprimento entre 15 e 20 pb, conhecida como Zur-box, em suas regiões promotoras para ligação de Zur (CHOI et al., 2017; HUANG et al., 2008; MAZZON et

al., 2014; MIKHAYLINA et al., 2018). Hipotetizamos que deveria existir um Zur-box a montante do gene *zur* em *C. violaceum*. Para encontrá-lo, foram analisadas, usando o programa MEME, as regiões promotoras do gene *zur* de genomas de vinte e três espécies pertencentes ao gênero *Chromobacterium*. Essa análise retornou uma sequência, possível Zur-box de *C. violaceum* (Figura 31A), que se assemelha com os sítios de ligação de Zur já definidos e caracterizados para *Pseudomonas protegens* (LIM et al., 2013) e *Neisseria meningitidis* (PAWLIK et al., 2012). Além disso, a co-transcrição de *zur* a *znuA* foi verificada por RT-PCR, confirmando o operon (SANTOS et al., 2021, em colaboração com Waldir da Silva Júnior).

Para validar que o Zur-box encontrado em nossas análises *in silico* estava relacionado com a regulação do operon, foi gerada uma fusão da região promotora de *zur* (*pzur*) ao gene repórter *lacZ* (Tabelas 1 e 2) para avaliação da expressão por ensaios de β -galactosidase. Nesse ensaio, demonstramos que na linhagem WT, a fusão *pzur-lacZ* é desreprimida quando ocorre o tratamento com os agentes quelantes de zinco EDTA ou TPEN (Figura 31B). O EDTA é um quelante de cátions divalentes impermeável a membrana celular e TPEN é um quelante de íons com alta afinidade para zinco, mas permeável a membrana celular. No mutante Δzur , a fusão *pzur-lacZ* encontra-se desreprimida independentemente do tratamento adicionado às culturas (Figura 31B).

Como controle de que essa região promotora é regulada em resposta a zinco e não em resposta a outros metais, foram realizados os tratamentos com o agente quelante de ferro 2,2'-DP, assim como a adição de FeSO_4 às culturas. Nesse caso, a expressão de *pzur* permaneceu inalterada, equivalente aos níveis basais da linhagem WT não tratada e no mutante Δzur a modulação dos níveis de ferro não surtiu efeito na expressão de *pzur* (Figura 31B).

Em conjunto, essa caracterização inicial mostra que *C. violaceum* possui um operon contendo seis genes que é reprimido por Zur em suficiência de zinco e desreprimido em limitação deste metal.

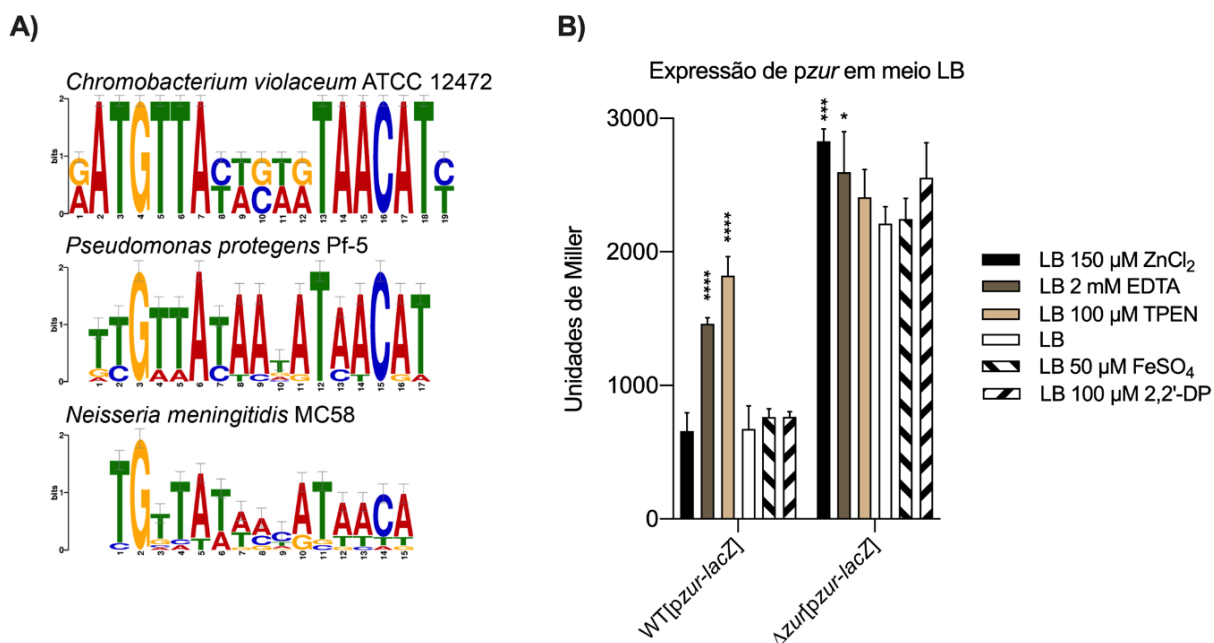


Figura 31 – Determinação de Zur box em *C. violaceum* e regulação transcricional mediada por Zur. **A)** A sequência palindrômica consenso de Zur box em *C. violaceum* ATCC 12472 foi gerada com o programa MEME (<https://meme-suite.org/meme/>). As comparações com Zur-boxes conhecidos de *P. protegens* Pf-5 e *N. meningitidis* MC58 foram realizadas com o programa Tomtom (<https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom/>). **B)** A expressão da região promotora de *zur* em fusão ao gene *lacZ* (*pzur-lacZ*) foi determinada por ensaios de β-galactosidase. As linhagens foram cultivadas em meio LB e as culturas foram não tratadas ou tratadas por 2 h com as concentrações indicadas de ZnCl₂, EDTA, TPEN, FeSO₄ e 2,2'-DP. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas. ****P<0,0001; ***P=0,0001; *P=0.0143; onde não indicado = não estatisticamente significativo.

4.2.3. A ausência de *znuCBA* e de *CV_3067*, mas não de *zur*, torna *C. violaceum* mais susceptível à carência de zinco

Para uma caracterização mais detalhada das funções dos genes regulados por Zur, foi determinado o perfil de sensibilidade a carência de zinco *in vitro*. Inicialmente foram definidas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de crescimento para os agentes EDTA e TPEN, onde obteve-se CIM de 0,7 mM para TPEN e CIM de 128 mM para EDTA na linhagem WT de *C. violaceum* (Figura 32).

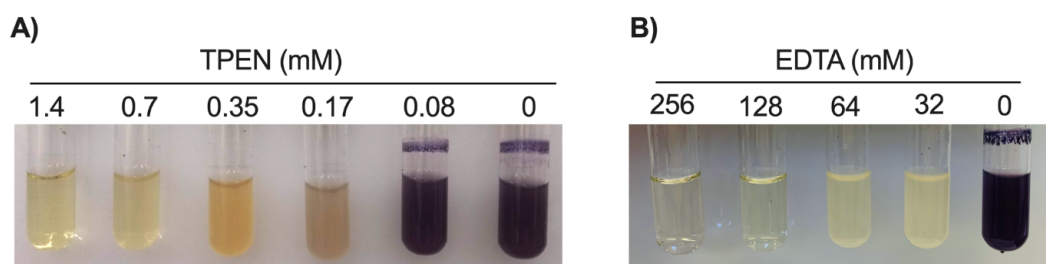


Figura 32 – Concentração inibitória mínima de TPEN e EDTA em *C. violaceum*. As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas em meio LB, a partir do cultivo da

linhagem WT de *C. violaceum* com diluições seriadas de **A)** TPEN e **B)** EDTA. Após incubação por 24 h a 37°C, os tubos de ensaio foram fotografados.

Uma vez que ZnuABC é um importante sistema de aquisição de zinco em várias bactérias (MIKHAYLINA et al., 2018), fomos verificar os efeitos que a carência de zinco poderia provocar nos diferentes mutantes obtidos em *C. violaceum*. A primeira característica observada foi que apesar da CIM para EDTA se manter em 128 mM no mutante $\Delta znuCBA$ (dado não mostrado), o tratamento com esse agente quelante provocou uma interrupção na síntese de violaceína em concentrações muito mais baixas do que na linhagem WT: enquanto EDTA 1 mM foi necessário para interrupção da síntese de violaceína na linhagem WT, apenas 0,125 mM foram necessários para obter o mesmo fenótipo no mutante $\Delta znuCBA$ (Figura 33, painel superior). Uma vez que EDTA é um agente quelante de vários cátions divalentes, para confirmar que esse fenótipo é relacionado com a homeostase de zinco, foi feita a ressuplementação de zinco em culturas tratadas com EDTA (Figura 33, painel inferior). Nas linhagens WT e $\Delta znuCBA$ [pMR20znuCBA] a suplementação com $ZnCl_2$ 0,1 mM foi o suficiente para as linhagens reverterem a síntese do pigmento. No mutante $\Delta znuCBA$ quelado com EDTA 0,5 mM, o mesmo fenótipo só foi obtido quando a cultura foi suplementada com $ZnCl_2$ 0,5 mM, indicando que esse mutante possui maior carência de zinco do que a linhagem WT (Figura 33, painel inferior).

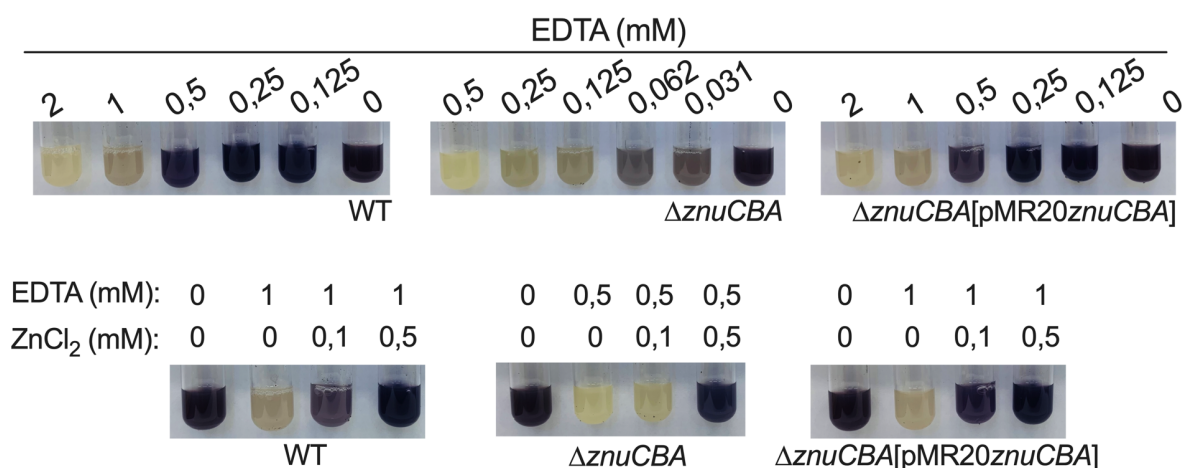


Figura 33 – Perfil de síntese de violaceína em carência de zinco. A) As linhagens foram cultivadas em meio LB por 24 h na presença das concentrações indicadas de EDTA. **B)** As linhagens foram cultivadas por 24 h em meio LB suplementado com EDTA e concentrações crescentes de $ZnCl_2$.

Quando o fenótipo de sensibilidade a EDTA foi avaliado pelo método de disco difusão em placas de meio LB, o mutante $\Delta znuCBA$ também mostrou-se mais

sensível do que a linhagem WT (Figura 34A), com halo de inibição de crescimento detectado a partir de 62,5 mM EDTA, enquanto que na linhagem WT a inibição só começou a ocorrer a partir dos 250 mM EDTA (Figura 34A). Além disso, o mutante ΔCV_3067 também apresentou maior sensibilidade a carência de zinco, embora em níveis menores que o mutante $\Delta znuCBA$, com halo de inibição de crescimento observado a partir dos 125 mM EDTA (Figura 34A). Como controle, o ensaio de disco difusão foi realizado com o quelante de ferro 2,2-DP, onde não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens (Figura 34B).

Como o EDTA é um agente quelante que pode ter atividade contra vários cátions divalentes, o perfil de crescimento em meio quelado e ressuplementado com o metal zinco foi avaliado (Figura 34C). Quando as linhagens WT, $\Delta znuCBA$ e $\Delta znuCBA[pMR20znuCBA]$ foram tratadas com EDTA 1 mM, houve uma pequena queda na DO_{600} ao final do ensaio, que foi revertido na linhagem WT e complementada quando $ZnCl_2$ 250 μM foi adicionado às culturas (Figura 34C). Entretanto, mesmo com a adição de zinco, o crescimento do mutante $\Delta znuCBA$ não foi revertido a níveis iguais aos das linhagens WT e complementada, demonstrando seu envolvimento com a aquisição desse metal. Como controle, quando ferro foi depletado, todas as linhagens tiveram queda acentuada na DO_{600} ao final do ensaio, mas ao adicionar $FeSO_4$ 1 mM, o crescimento foi revertido em todas as linhagens, sugerindo que o transportador $ZnuCBA$ não deve estar envolvido com o transporte de ferro (Figura 34C).

Por fim, curvas de crescimento foram realizadas em meio LB ou meio LB suplementado com EDTA 1 mM, utilizando pré-inóculos cultivados em meio LB. Nessas condições, não foram detectadas diferenças significativas no crescimento dos mutantes em relação a linhagem WT (Figura 34D e E). Quando o mesmo ensaio foi feito com o mutante $\Delta znuCBA$ e utilizando pré-inóculos tratados com EDTA 1 mM, houve pequeno atraso na curva de crescimento do mutante em meio LB. Quando a curva foi feita em meio LB suplementado com EDTA com os pré-inóculos tratados com EDTA, o atraso de crescimento do mutante $\Delta znuCBA$ em relação as linhagens WT e complementadas foi mais acentuado e não foi revertido quando $ZnCl_2$ foi adicionado ao meio (SANTOS et al., 2021, em colaboração com Waldir da Silva Júnior).

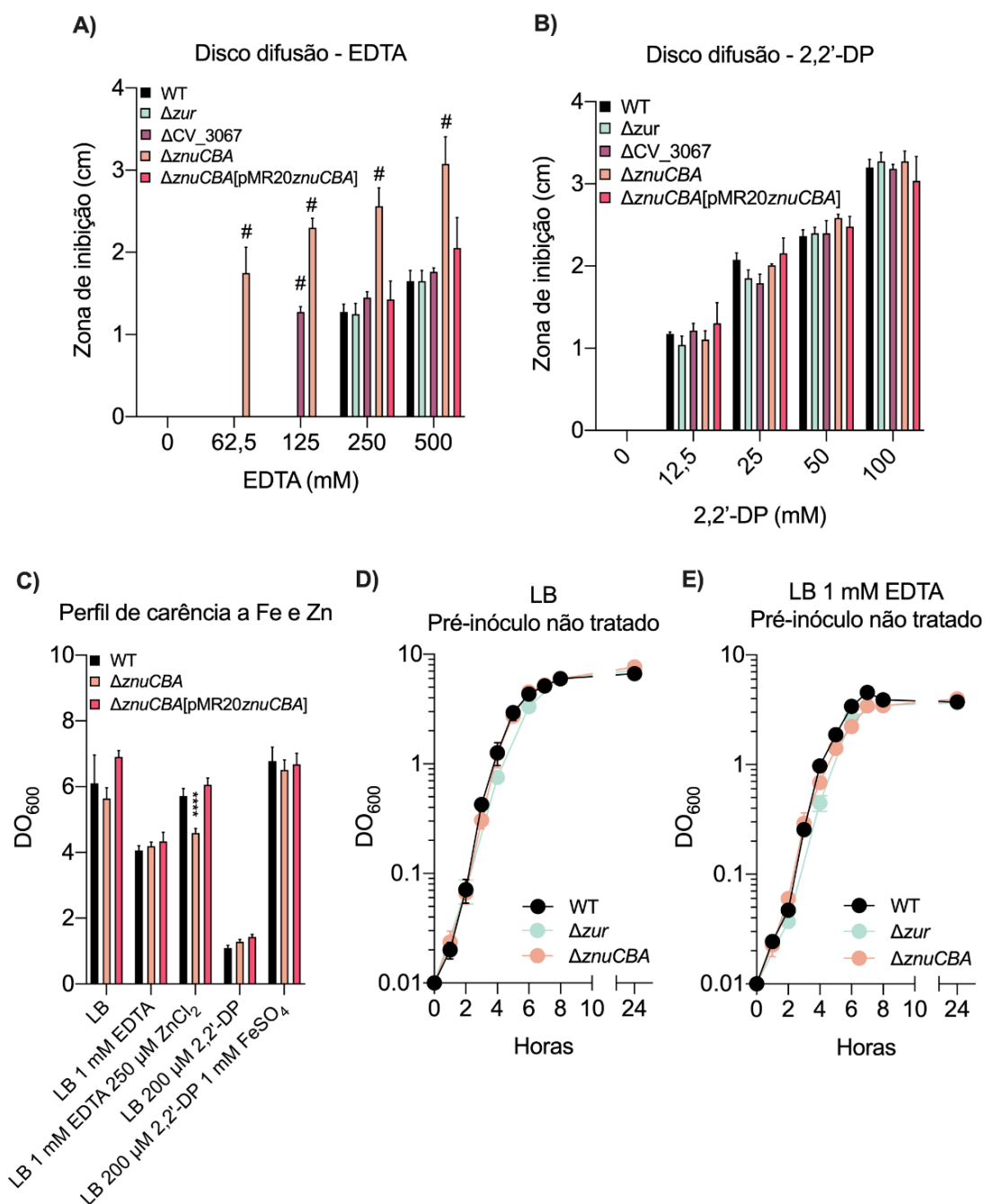


Figura 34 – Perfil de sensibilidade a carência de zinco mediada por EDTA. **A)** Ensaio de sensibilidade a EDTA medido através de disco difusão. As linhagens diluídas para DO₆₀₀ 0,1 foram plaqueadas em meio LB e diferentes concentrações de EDTA foram gotejadas em discos de papel filtro estéril. O halo de inibição do crescimento foi medido após 24 h de cultivo a 37°C. # $P < 0,0001$. **B)** O mesmo ensaio de disco difusão realizado com o quelante específico para ferro, 2,2'-dipiridil (2,2'-DP). Os ensaios foram realizados em triplicata biológica. **C)** Perfil de crescimento após tratamento com EDTA ou 2,2'-DP em meio líquido. As linhagens foram cultivadas por 24 h em meio LB tratado com as concentrações indicadas de EDTA, ZnCl₂, 2,2'-DP ou FeSO₄ seguida pela mensuração da DO₆₀₀. **** $P < 0,0001$. **D e E)** Curvas de crescimento em meio LB (D) ou meio LB suplementado com 1 mM EDTA (E). Nessas curvas os pré-inóculos não foram tratados com nenhum agente quelante. As curvas foram realizadas em triplicatas biológicas e estão representadas com a média e desvio-padrão.

Além do crescimento em carência de zinco induzida por EDTA, foi utilizada a proteína calprotectina (CP) em ensaios *in vitro* para avaliar o perfil de crescimento de *C. violaceum*. A CP é um heterodímero de proteínas S100A8/S100A9 liberado dos neutrófilos durante a ativação inflamatória, cuja principal função é quelar metais de transição como zinco e manganês (KEHL-FIE; SKAAR, 2010; KOZLYUK et al., 2019; ZYGIEL; NOLAN, 2018). Foram obtidas duas versões purificadas de CP em parceria com os laboratórios de Dr. Walter J. Chazin e Dr. Eric Skaar (Vanderbilt University): uma versão WT, denominada CP WT, e uma versão com mutações nos sítios ativos de ligação a metais, denominada CP Δ SI/SII. A versão Δ SI/SII contém mutações sítio-dirigidas nos seguintes resíduos de aminoácidos: S100A8 – H17N, H27N, H81N, H87N; S100A9 – H20N, D30S, H91N, H95N, H103N, H104N, H105N (DAMO et al., 2013), os símbolos H, N, D e S, representam os resíduos de aminoácidos histidina, asparagina, ácido aspártico e serina, respectivamente.

A ação antimicrobiana de CP foi definida para vários patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Shigella flexneri* (DAMO et al., 2013). Para investigar se CP exerceria alguma função antimicrobiana contra *C. violaceum*, foram realizadas curvas de crescimento utilizando as duas versões obtidas da proteína. Inicialmente, para garantir que a proteína utilizada estava ativa, foi determinada a concentração inibitória média (IC₅₀) de CP WT e CP Δ SI/SII para *C. violaceum* comparando com dados já publicados para *E. coli* (DAMO et al., 2013) (Tabela 4). *C. violaceum* se mostrou mais resistente aos tratamentos com CP do que *E. coli*, e a versão mutada da proteína (CP Δ SI/SII) teve menos atividade contra todas as linhagens testadas (Tabela 5). O valor médio da IC₅₀ de CP WT para *C. violaceum* foi de 534,6 μ g/ml e de CP Δ SI/SII foi de 635,2 μ g/ml.

Tabela 4 – IC₅₀ de calprotectina

Linhagem	CP WT (μg/ml)^a	CP ΔSI/SII (μg/ml)^a
<i>E. coli</i> DH5 α	287,5 \pm 22,3	361,4 \pm 18,4
<i>C. violaceum</i> WT	534,6 \pm 13,8	635,2 \pm 19,8

^aMédia e desvio padrão de três réplicas biológicas

Em seguida, foram realizados ensaios para padronização do uso da CP em curvas de crescimento (Figura 35). Como a proteína só tem atividade na presença de 62% (v/v) de tampão para CP (CP buffer), implica-se que as curvas devem ser realizadas com 38% (v/v) de meio LB. Assim, foi avaliado o perfil de crescimento da

linhagem WT de *C. violaceum* para determinar se a menor concentração de LB e a presença de CP buffer seriam prejudiciais para *C. violaceum*. As curvas foram realizadas nas seguintes condições: i) em meio LB; ii) em meio LB 38% (v/v) + água ultrapura estéril 62% (v/v); iii) em meio LB 38% (v/v) + CP buffer 62% (v/v); iv) em meio LB 38% (v/v) + CP buffer 62% (v/v) sem a adição de β -mercaptoetanol (BME); e v) meio LB 38% (v/v) + 5 mM BME (Figura 35A). A única condição em que houve uma diferença na DO₆₀₀ medida ao longo da curva foi na presença de LB 38% (v/v) + CP Buffer 62% (v/v), em que a DO₆₀₀ ficou em média 52,43% menor em cada ponto medido. Dessa maneira, ficou definido que os demais ensaios realizados com CP serão comparados com o meio LB 38% (v/v) + CP buffer 62% (v/v) e não com o meio LB 100% (v/v).

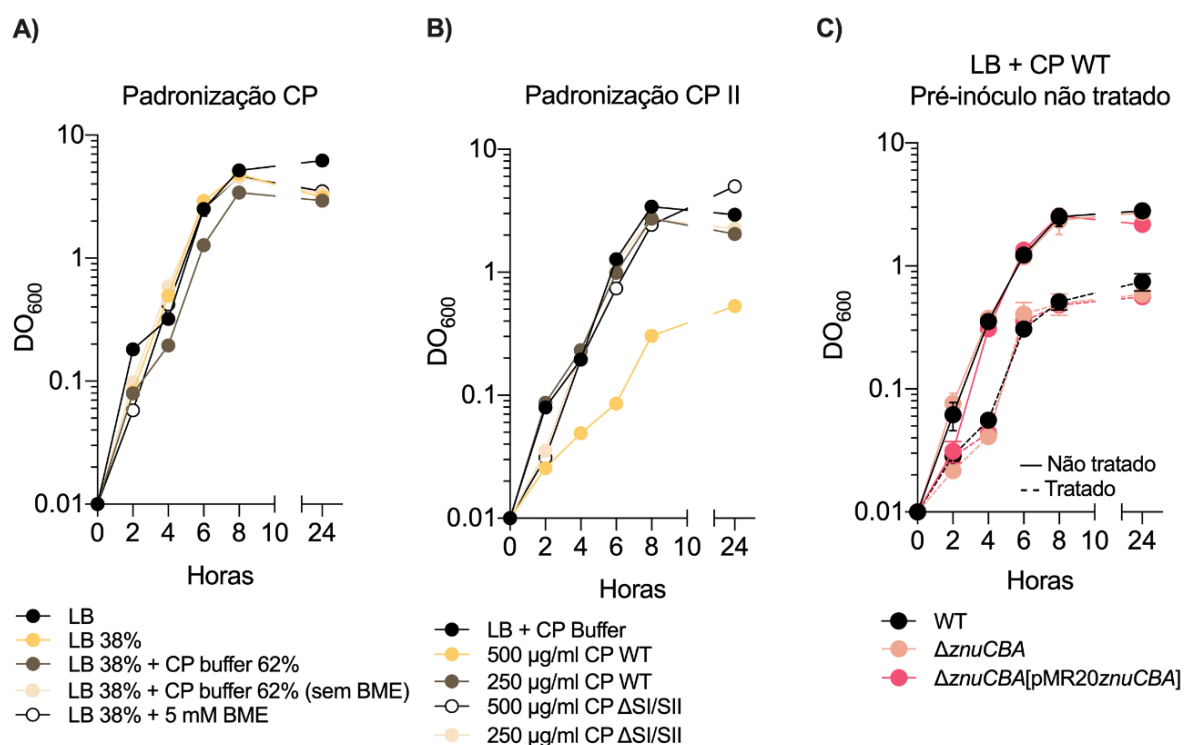


Figura 35 – Padronização do uso de calprotectina em *C. violaceum*. **A)** Curva de crescimento da linhagem WT com diferentes modificações no meio LB. **B)** Curva de crescimento da linhagem WT feita com meio LB 38% + CP buffer 62%, com 250 ou 500 μ g/ml CP WT ou Δ SI/SII. **C)** Curva de crescimento das linhagens indicadas feita com 500 μ g/ml CP WT (linha tracejada) ou sem a presença de CP (linha contínua). Os pré-inóculos utilizados nessas curvas não foram tratados com nenhum agente quelante de metais. Todas as curvas foram realizadas em triplicatas biológicas. BME = β -mercaptoetanol.

Uma vez definida a condição de cultivo, novas curvas de crescimento foram feitas comparando os efeitos de 250 e 500 μ g/ml das proteínas CP WT e CP Δ SI/SII na linhagem WT de *C. violaceum* (Figura 35B). A curva da linhagem WT na presença

de LB 38% (v/v) + CP Buffer 62% (v/v) foi utilizada como padrão para comparação. Em relação ao uso da proteína CP WT, apenas na concentração de 500 µg/ml foram observadas diferenças em relação ao padrão, sem a adição de proteína (Figura 35B). Já com o uso de 250 µg/ml de CP WT ou de CP Δ SI/SII em qualquer concentração, não foram observadas diferenças significativas em relação ao padrão (Figura 35B).

Por fim, novas curvas de crescimento foram feitas utilizando as linhagens WT, Δ *znuCBA* e Δ *znuCBA*[pMR20*znuCBA*] em meio LB suplementado com 500 µg/ml CP WT (Figura 35C). Nessas condições, houve um atraso no crescimento de todas as linhagens na presença de CP WT em relação ao cultivo sem CP, mas sem diferenças significativas entre as diferentes linhagens de *C. violaceum* (Figura 35C).

Para investigar com mais detalhes o efeito quelante de zinco de CP no crescimento de *C. violaceum*, as curvas de crescimento foram refeitas utilizando pré-inóculos também tratados com CP (Figura 36). Nessas condições, o mutante Δ *znuCBA* com pré-inóculo tratado com 500 µg/ml de CP WT e curva de crescimento feito no mesmo padrão, teve o crescimento mais prejudicado quando comparado com as linhagens WT e complementada (Figura 36A). O pré-tratamento e curva realizados com 500 µg/ml de CP Δ SI/SII não mostrou efeitos significativos em relação às curvas sem a presença da proteína (Figura 36B). Por fim, foi analisado a expressão da região promotora de *zur* (*pzur*) na presença de CP (Figura 36C). Ao contrário dos ensaios anteriores, onde foram realizados tratamentos com EDTA, TPEN e 2,2'-DP por pulsos de 2 h de culturas mid-log (Figura 31B), para o uso de CP foi necessário adicionar os tratamentos no início da curva e manter em cultivo por 4 h (Figura 36C). Nessas condições, foi observada uma maior indução na expressão de *pzur* na presença de CP WT e de EDTA, mas não houve efeitos significativos decorrentes do tratamento com CP Δ SI/SII (Figura 36C).

Em conjunto, os dados demonstram que a ausência de ZnuABC torna *C. violaceum* mais susceptível a condições de carência de zinco tanto em meio sólido quanto em meio líquido, independente do tipo de agente quelante utilizado (EDTA ou CP), sobretudo quando as culturas são pré-tratadas com estes agentes. Também foi demonstrado que a CP tem atividade microbicida contra *C. violaceum*, embora esta bactéria seja mais resistente ao tratamento do que outras. Por fim, o tratamento com CP induz a carência de zinco, conforme demonstrado pela expressão aumentada de *pzur* quando tratado com CP WT.

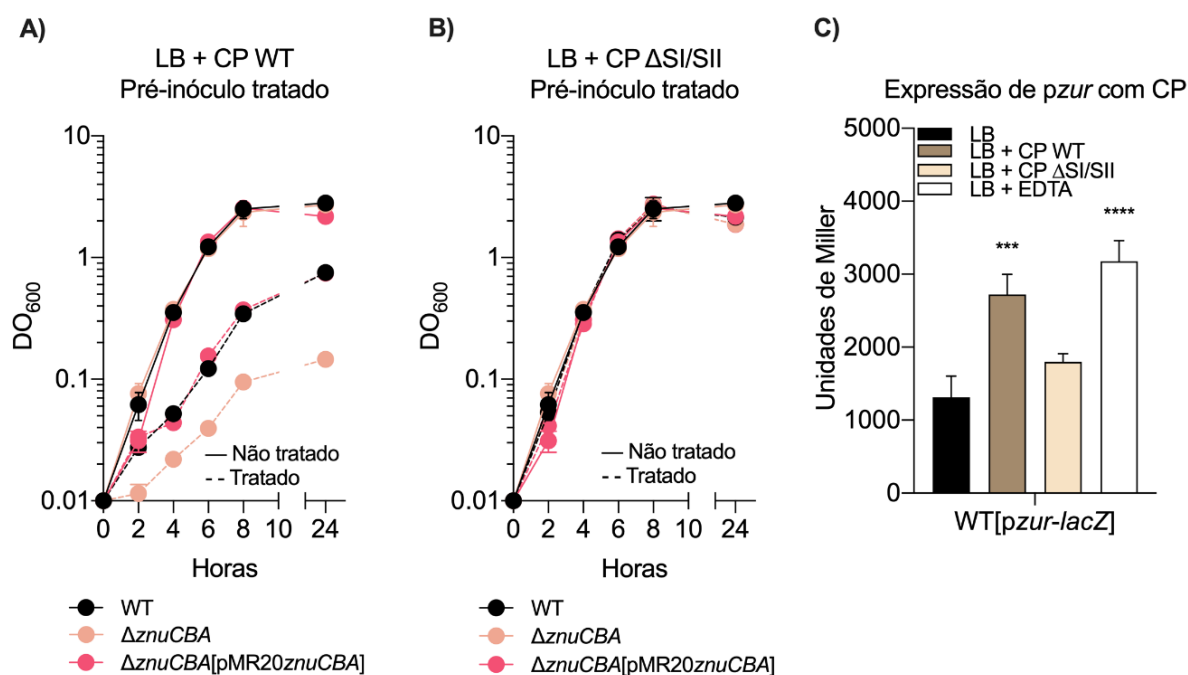


Figura 36 – Perfil de crescimento e expressão de pzur em carência de zinco mediada por calprotectina. A) Curva de crescimento com 500 $\mu\text{g/ml}$ de CP WT feita em LB 38% + CP buffer 62%. Durante a curva, as linhagens permaneceram (linhas tracejadas) ou não (linhas contínuas) com CP. Todos os pré-inóculos foram tratados com 500 $\mu\text{g/ml}$ CP WT. **B)** Curva de crescimento com 500 $\mu\text{g/ml}$ de CP $\Delta\text{SI/SII}$ feito em LB 38% + CP buffer 62%. Durante a curva as linhagens permaneceram (linhas tracejadas) ou não (linhas contínuas) com CP. Todos os pré-inóculos foram tratados com 500 $\mu\text{g/ml}$ CP $\Delta\text{SI/SII}$. As curvas foram realizadas em triplicatas biológicas. **C)** Ensaio de β -galactosidase avaliando a expressão da região promotora de *zur* (*pzur*) em presença de CP. A linhagem WT[*pzur-lacZ*] foi cultivada por 4 h na presença de 500 $\mu\text{g/ml}$ CP WT ou CP $\Delta\text{SI/SII}$ ou ainda em 1 mM EDTA antes da realização do ensaio. **** $P < 0,0001$; *** $P = 0,0004$.

A susceptibilidade a estresse oxidativo é um aspecto relacionado com a homeostase de zinco mediada por Zur em algumas bactérias, como em *Xanthomonas oryzae* (YANG et al., 2007), onde mutantes *zur* têm maior sensibilidade a tratamentos com H_2O_2 . Assim, o perfil de sensibilidade a H_2O_2 do mutante Δzur de *C. violaceum* foi determinado a partir de ensaios de disco-difusão (Figura 37). Nesse ensaio, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas em relação a linhagem WT, sugerindo que o regulador Zur de *C. violaceum* não possui um papel no combate ao estresse oxidativo.

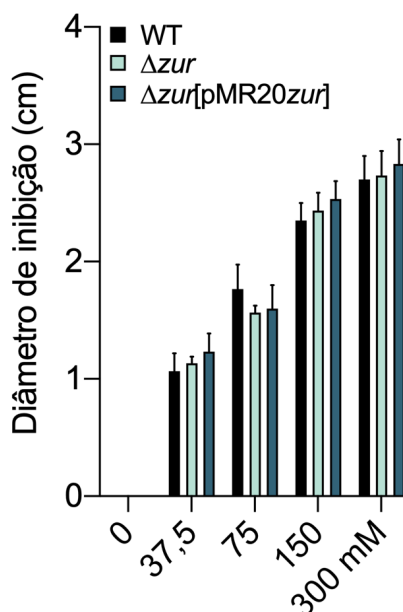


Figura 37 – Sensibilidade a H₂O₂ do mutante Δzur . Perfil de sensibilidade avaliado por ensaios de disco difusão. Mensuração do halo de inibição de crescimento das linhagens indicadas na presença de concentrações crescentes de H₂O₂. Ensaio realizado em triplicata biológica.

4.2.4. Efeitos pleiotrópicos da ausência de *zur* e *znuCBA* em *C. violaceum*

Para aumentar a compreensão de como a carência de zinco afeta *C. violaceum*, foram feitas análises de outros fenótipos que poderiam ser influenciados quando a homeostase deste metal é comprometida, seja pela ausência do regulador Zur ou pela ausência do transportador ZnuABC. Assim, foram realizadas a quantificação de biofilme estático e da produção de celulose em biofilme, utilizando todos os mutantes em estudo (Figura 38A e B). Em relação a produção de biofilme em meio LB, todas as linhagens mantiveram o mesmo padrão, sem diferenças estatísticas significativas em comparação à linhagem WT (Figura 38A). No entanto, quando o biofilme foi quantificado a partir de culturas tratadas com EDTA 100 μ M, houve uma queda na produção de biofilme em todas as linhagens, sendo que no mutante $\Delta znuCBA$, a diferença em relação à linhagem WT tratada foi ainda maior (Figura 38A). Quando avaliada a síntese de celulose em biofilme por coloração por vermelho congo, nenhuma das linhagens analisadas apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com a linhagem WT (Figura 38B).

A motilidade do tipo *swimming* também permaneceu inalterada nos mutantes Δzur e ΔCV_3067 quando comparados à linhagem WT (Figura 38C). Para o mutante $\Delta znuCBA$ houve diminuição significativa nos dois pontos (24 e 48 h) em que o diâmetro referente a motilidade foi mensurado (SANTOS et al., 2021, em

colaboração com Waldir da Silva Júnior). Além disso, quando o ensaio foi feito apenas com a linhagem WT e variando as concentrações de zinco presentes no meio semi-sólido, como a suplementação com EDTA, o fenótipo observado foi o mesmo de quando o mutante $\Delta znuCBA$ foi cultivado em meio semi-sólido sem adição de tratamentos (SANTOS et al., 2021, em colaboração com Waldir da Silva Júnior), demonstrando que a síntese de flagelo é um fator dependente dos níveis intracelulares de zinco.

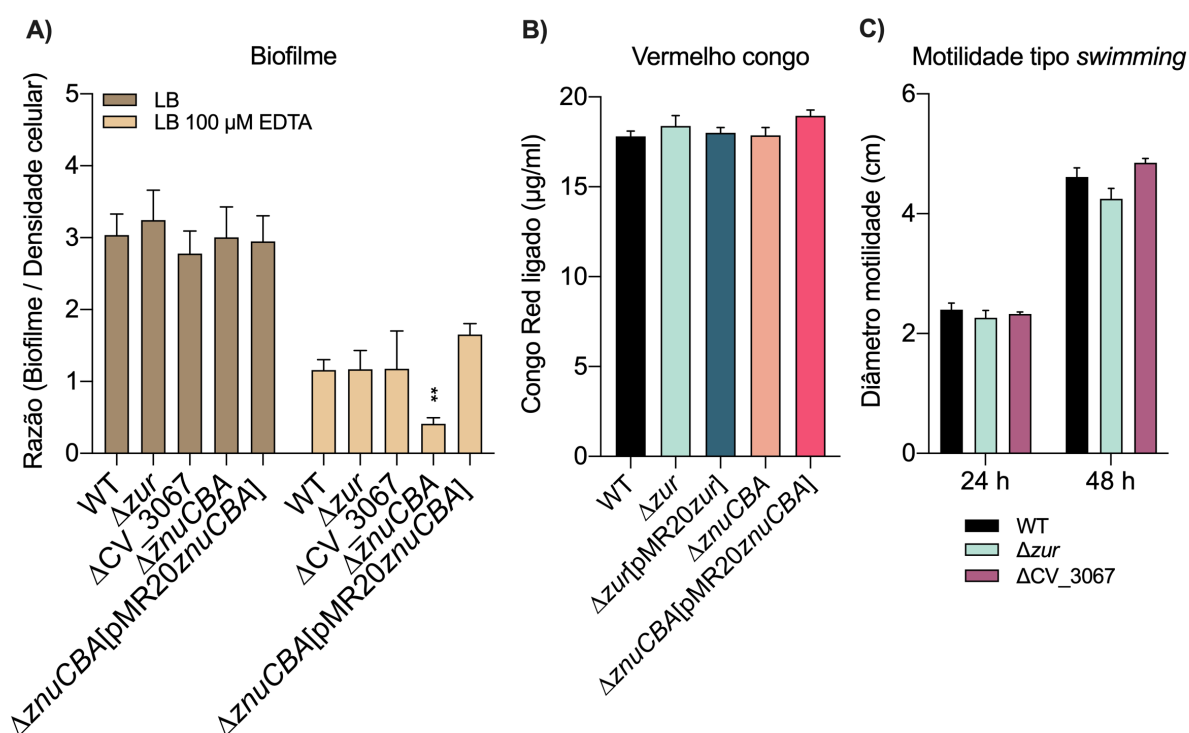


Figura 38 – Avaliação da produção de biofilme, celulose e motilidade do tipo *swimming*.

A) Ensaio para mensuração do biofilme em condições estáticas. Após 24 h de cultivo em meio LB ou meio LB suplementado com 100 µM EDTA, a formação do biofilme das linhagens indicadas foi determinada por coloração com cristal violeta. Os dados estão indicados como razão do biofilme pela densidade celular. ****** $P=0,003$. **B)** Ensaio para quantificação da produção de celulose em biofilmes via coloração com vermelho congo. Após 48 h de cultivo em meio LB, a síntese de celulose em biofilmes foi determinada por coloração com vermelho congo. A mensuração de biofilme e produção de celulose foram determinados em seis réplicas biológicas. **C)** Ensaio de motilidade do tipo *swimming*. As linhagens indicadas foram cultivadas em meio M9HC com 0,3% ágar e o diâmetro da motilidade foi mensurada 24 e 48 h após o inóculo. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas.

Como o zinco é um metal importante para a fisiologia bacteriana e participa como cofator de diversas enzimas, decidimos avaliar como o comprometimento na aquisição desse metal, decorrente da ausência de ZnuABC, poderia interferir com a capacidade de *C. violaceum* em competir com outros patógenos. Para isso, foram

realizados ensaios de co-cultivo entre as linhagens WT, $\Delta znuCBA$ e $\Delta znuCBA[pMR20znuCBA]$ de *C. violaceum* com as bactérias *Burkholderia cepacia*, *Salmonella Typhimurium* e *Streptococcus mutans* (Figura 39). Essas bactérias foram escolhidas devido a sensibilidade a ampicilina, um antibiótico que *C. violaceum* é resistente e que, portanto, permite seleção após o co-cultivo. Os ensaios foram realizados em meio LB ou em meio LB suplementado com $ZnCl_2$ 250 μM . Nesse ensaio foi demonstrado que as linhagens WT e $\Delta znuCBA[pMR20znuCBA]$ de *C. violaceum* são menos afetadas do que o mutante $\Delta znuCBA$ em relação a *B. cepacia*, *S. Typhimurium* e *S. mutans* (Figura 39). A adição de zinco, no entanto, não melhorou significativamente a competição de *C. violaceum* com as bactérias analisadas. Em conjunto, esses dados sugerem que o menor aporte de zinco no mutante $\Delta znuCBA$ prejudica a capacidade de *C. violaceum* de competir com outras bactérias.

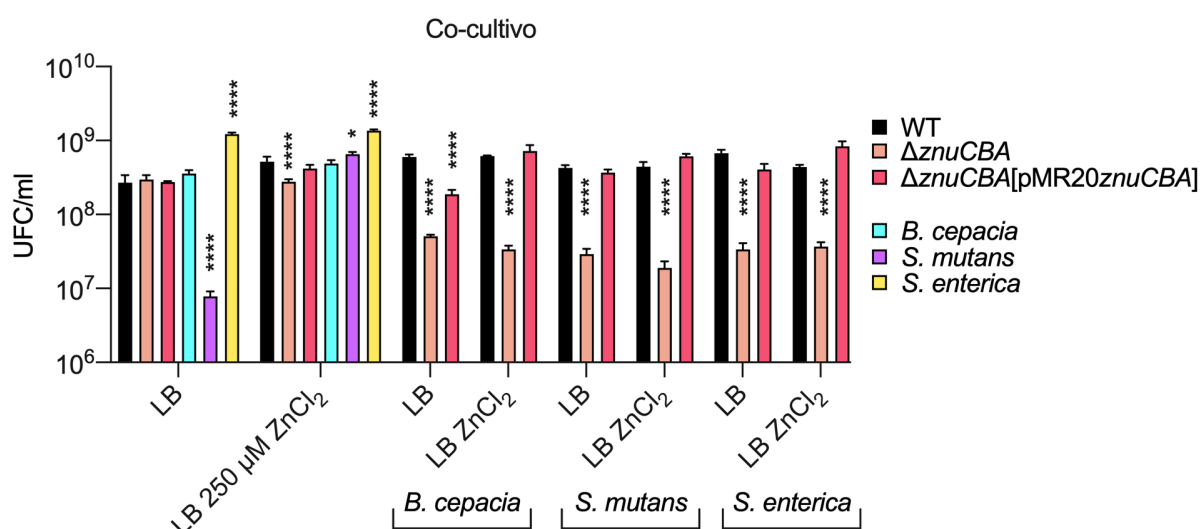


Figura 39 – A ausência do transportador ZnuABC diminui a competitividade de *C. violaceum* com outras bactérias. As linhagens WT, $\Delta znuCBA$ e $\Delta znuCBA[pMR20znuCBA]$ foram co-cultivadas com *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ou *Streptococcus mutans* ATCC 25175 por 2 h em meio LB, seguido por diluição e plaqueamento em meio LB suplementado com ampicilina, para seleção de *C. violaceum*. Como controle, as linhagens foram cultivadas individualmente nas mesmas condições (LB ou Lb 250 μM $ZnCl_2$) para quantificação das UFC. * $P=0,0028$; **** $P<0,0001$.

Além da estratégia de co-cultivo interespecífico previamente descrita, o mesmo ensaio foi realizado analisando a competição intra-específica, relacionando a presença ou ausência do transportador ZnuABC com a capacidade de *C. violaceum* em crescer na presença de bactérias da mesma espécie. Para isso foram utilizadas as linhagens WT e $\Delta znuCBA[pMR20]$, com seleção realizada na presença do antibiótico tetraciclina (Figura 40). Quando foi realizado o cultivo das linhagens WT e

$\Delta znuCBA[pMR20]$ individualmente em meio LB, as linhagens não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. Com a adição de $ZnCl_2$ 250 μM às culturas, foi demonstrado que há um aumento nas UFC da linhagem WT em relação a mesma linhagem cultivada em meio LB. Já o mutante $\Delta znuCBA[pMR20]$ não se beneficiou da suplementação de zinco quando comparado a mesma linhagem cultivada em meio LB. Quando foi realizado o co-cultivo entre WT e $\Delta znuCBA[pMR20]$, verificamos que independente do meio de cultivo (meio LB ou meio LB suplementado com zinco), o mutante $\Delta znuCBA$ apresentou uma diminuição nas UFC/ml quando comparado aos controles (Figura 40).

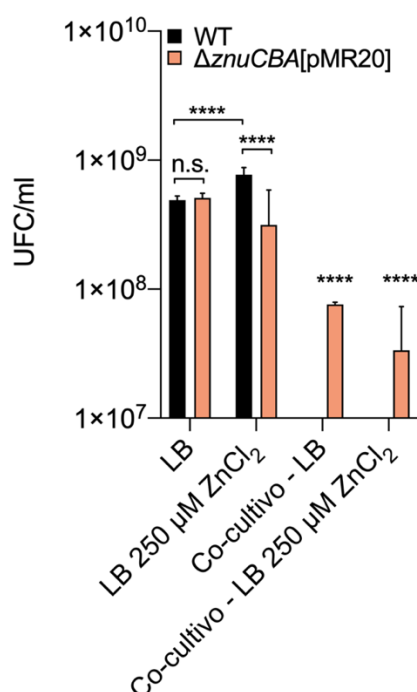


Figura 40 – A ausência do transportador ZnuABC de *C. violaceum* diminui a competitividade intra-específica. As linhagens WT e $\Delta znuCBA[pMR20]$ foram co-cultivadas por 2 h em meio LB, seguido por diluição e plaqueamento em meio LB suplementado com tetraciclina, para seleção do mutante $\Delta znuCBA$ de *C. violaceum*. Como controle, as linhagens foram cultivadas individualmente e plaqueadas em meio LB para quantificação das UFC.

De maneira geral, foi demonstrado que o mutante $\Delta znuCBA$ tem uma desvantagem competitiva em relação às bactérias testadas, tanto no contexto inter (Figura 39) e intraespecífico (Figura 40) e mesmo quando ocorre a adição de zinco. Esses dados indicam que o comprometimento da homeostase de zinco pode afetar negativamente *C. violaceum* de maneira a torná-la menos adaptada a competição intra e interbacteriana.

As metalo- β -lactamases pertencem a uma família de enzimas que requerem zinco para sua atividade (BEBRONE, 2007). Dada a importância de ZnuABC de *C. violaceum* na aquisição de zinco, foram realizados os perfis de sensibilidade a antibióticos da classe dos β -lactâmicos (piperacilina, penicilina de amplo espectro; cefoxitina, cefalosporina de 2ª geração; cefotaxime, cefalosporina de terceira geração; meropenem, carbapenem; aztreonam, monobactam) utilizando as linhagens WT, Δzur , $\Delta znuCBA$ e $\Delta znuCBA$ [pMR20znuCBA] cultivadas em meio LB ou meio LB suplementado com EDTA 1 mM. O objetivo desse ensaio foi investigar se a menor aquisição de zinco pelo mutante $\Delta znuCBA$ poderia comprometer a atividade de enzimas que necessitam deste metal como co-fator enzimático, como no caso das metalo- β -lactamases. Nesse ensaio foi demonstrado que o mutante $\Delta znuCBA$ tornou-se mais sensível a ação dos antibióticos após o pré-tratamento com EDTA (Figura 41A). O mutante Δzur ou a complementação $\Delta znuCBA$ [pMR20znuCBA] mantiveram o mesmo fenótipo da linhagem WT, independente do tratamento prévio com EDTA, sugerindo que a depleção prévia do estoque intracelular de zinco através do tratamento com EDTA associado a ausência do transportador de alta afinidade ZnuABC podem afetar a atividade de metalo- β -lactamases.

Também foi avaliado se Zur poderia estar envolvido com a regulação da síntese de moléculas autoindutoras do *quorum sensing*. Para isso, foi utilizado o mutante $\Delta cvil$ (Tabela 1), que não sintetiza as moléculas autoindutoras, para ser embebido em meio LB com orifícios preenchidos com sobrenadantes das linhagens WT, Δzur , Δzur [pMR20zur], $\Delta znuCBA$ e $\Delta cvil$. Dependendo da quantidade de moléculas autoindutoras presentes no sobrenadante de cada uma das linhagens analisadas, o halo de produção de violaceína do mutante $\Delta cvil$ embebido no ágar é produzido ou não. Nesse ensaio, foi mostrado que o sobrenadante do mutante Δzur induziu maior halo de produção de violaceína na linhagem repórter $\Delta cvil$ (Figura 41B), sugerindo que Zur possa estar envolvido com a regulação direta ou indireta da produção/secreção de moléculas indutoras de *quorum sensing* em *C. violaceum*. Como controle, foi utilizado o sobrenadante do mutante $\Delta cvil$, que não induz produção de violaceína no mutante embebido no ágar por não produzir as moléculas autoindutoras.

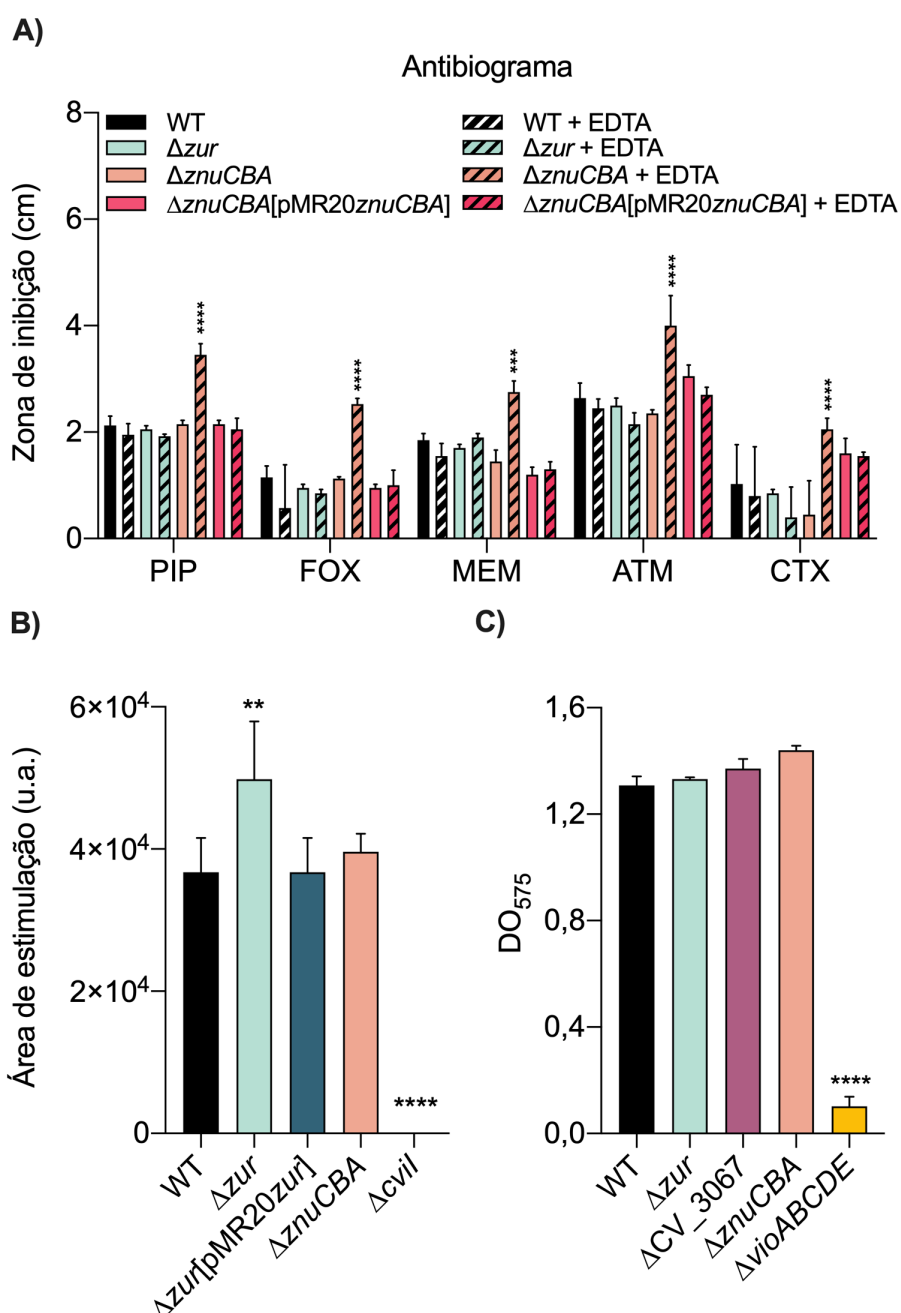


Figura 41 – Perfil de sensibilidade a antibióticos e produção de moléculas autoindutoras do *quorum sensing* e de violaceína. A) Antibiograma realizado com as linhagens WT, Δzur , $\Delta znuCBA$ e $\Delta znuCBA[pMR20znuCBA]$ cultivadas em meio LB ou em meio LB suplementado com 1 mM EDTA (colunas tracejadas). As linhagens foram diluídas para DO_{600} 0,1 e espalhadas em meio Mueller-Hinton e sobre as bactérias foram adicionados os discos dos antibióticos PIP (piperacilina), FOX (cefotaxima), MEM (meropenem), ATM (aztreonam) e CTX (cefotaxime). O halo de inibição do crescimento foi medido após 24 h de cultivo a 37°C. **B)** O mutante $\Delta cvil$ foi embebido em meio LB, e no ágar solidificado foram adicionados aproximadamente 80 μ l dos sobrenadantes de WT, Δzur , $\Delta zur[pMR20zur]$, $\Delta znuCBA$ e $\Delta cvil$, para avaliação de produção de violaceína pelo $\Delta cvil$ embebido no ágar. Após 48 h de incubação a 25°C, as placas foram fotografadas e os halos de produção de violaceína foram medidos no programa Fiji (<https://imagej.net/Fiji/>) e indicados como unidades arbitrárias (u.a.). **C)** Estimativa da produção de violaceína solubilizada em solvente orgânico (acetona). Ensaio realizado em triplicata.

Como o mutante Δzur parece produzir e/ou secretar maior quantidade de moléculas autoindutoras, e a síntese de violaceína relaciona-se com a via de *quorum sensing* (MCCLEAN et al., 1997; MOROHOSHI et al., 2008), foi realizado um ensaio de quantificação de violaceína para determinar se o mutante Δzur também produziria maior quantidade desse metabólito (Figura 41C). Na comparação da absorbância detectada nas linhagens Δzur , $\Delta znuCBA$ e ΔCV_3067 em relação a linhagem WT, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Assim, a maior presença de moléculas auto-indutoras do *quorum sensing* no sobrenadante do mutante Δzur não se refletiu em maior produção de violaceína.

Em síntese, esses dados demonstram que o transportador ZnuABC é requerido para a formação de biofilme em condições carenciadas de zinco e para a motilidade do tipo *swimming*. Além disso, a ausência de ZnuABC torna *C. violaceum* mais susceptível a competição intra e interespecífica e também aumenta a sensibilidade a antibióticos da classe dos β -lactâmicos. Em relação ao regulador Zur, os experimentos indicam que esse fator de transcrição possa estar envolvido com a produção/secreção de moléculas indutoras de *quorum sensing*, embora mais ensaios sejam necessários para comprovar essa relação.

4.2.5. A ausência de *zur* e de *CV_3067* não comprometem a virulência de *C. violaceum*

Para avaliar o papel do regulador Zur e da possível metalochaperona CV_3067 na virulência de *C. violaceum* foram realizados ensaios de infecção intraperitoneal de camundongos da linhagem BALB/c (Figura 42). Na infecção com os mutantes Δzur e ΔCV_3067 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparado com a curva de sobrevivência dos animais infectados com a linhagem WT (Figura 42A). O mutante $\Delta znuCBA$, no entanto, mostrou-se menos virulento, com 100% de sobrevivência dos animais após 10 dias de infecção e também com menor capacidade de colonização do fígado de camundongos (SANTOS et al., 2021, em colaboração com Waldir da Silva Júnior).

Quando foi realizada a infecção *in vitro* de neutrófilos isolados da cavidade peritoneal de camundongos com as linhagens WT, $\Delta znuCBA$ e $\Delta znuCBA[pMR20znuCBA]$, foi verificado que o mutante $\Delta znuCBA$ foi eliminado mais rapidamente pelos neutrófilos do que as linhagens WT e $\Delta znuCBA[pMR20znuCBA]$ (Figura 42B). Como controles endógenos, foi mensurada a dose inicial antes da

infecção dos neutrófilos (predita para ser 1×10^6 UFC/ml), assim como as UFC das linhagens mantidas apenas em meio HBSS $1 \times$ por 2 h (Bac. + HBSS $1 \times$), o mesmo tempo em que as bactérias ficaram em contato com os neutrófilos (Bac. + NØ). Ao comparar as bactérias incubadas com neutrófilos, é possível chegar à conclusão de que as linhagens WT e $\Delta znuCBA$ [pMR20znuCBA] também se replicaram ao longo do tempo, uma vez que a dose mensurada é maior que a dose inicial. Entretanto, devido a limitações metodológicas, não é possível diferenciar se a replicação ocorreu intra ou extracelularmente. Já no mutante $\Delta znuCBA$, que possui CFU menor que a dose inicial, pode-se concluir que houve atividade microbicida dos neutrófilos (Figura 42B).

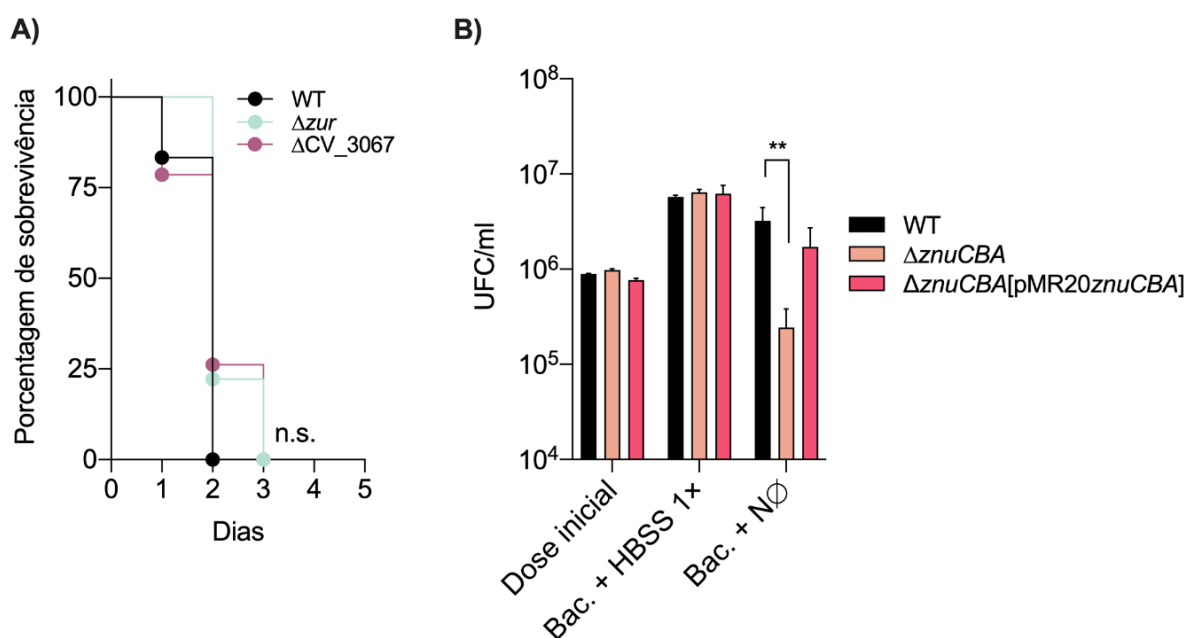


Figura 42 – Perfil de virulência e de infecção *in vitro* de neutrófilos. **A)** Curvas de sobrevivência de camundongos infectados com as linhagens indicadas. Os animais ($n = 8$) foram injetados com 10^6 UFC e a sobrevivência foi monitorada por até 3 dias. Análise estatística realizada com o teste log rank (Mantel-Cox). n.s = não significativo. **B)** Os neutrófilos foram infectados com as linhagens indicadas de *C. violaceum* em MOI 1:10 e mantidos em meio HBSS $1 \times$ com agitação leve a 37°C por 2 h. Após, os neutrófilos foram lisados e diluídos para a quantificação das UFC. Como controles, também foram mensuradas a UFC das linhagens sem estar em contato com os neutrófilos (Bac. + HBSS $1 \times$), assim como antes da adição aos neutrófilos (Dose inicial). $**P=0,0053$.

Em conjunto, os dados indicam que o transportador ZnuABC é bem mais importante para a virulência de *C. violaceum* do que o regulador Zur ou a possível metalochaperona CV_3067.

4.2.6. Análise preliminar de sistemas secundários para aquisição de zinco

Uma característica importante em relação a caracterização do mutante $\Delta znuCBA$ de *C. violaceum*, é que mesmo na ausência deste transportador a bactéria ainda consegue crescer em condições depletadas de zinco, como nos tratamentos com EDTA ou CP. Isso sugere que possam existir transportadores secundários para a aquisição de zinco, conforme demonstrado em diversas outras bactérias, como por exemplo o transportador ZupT de *S. enterica* (CERASI et al., 2014), a síntese de moléculas semelhantes aos sideróforos, denominadas metalóforos, como a *pseudopaline* de *P. aeruginosa* (LHOSPICE et al., 2017) ou ainda a própria utilização dos sideróforos, como o *yersiniabactin* de *Y. pestis* (BOBROV et al., 2014).

Assim, resolvemos investigar se os sideróforos *chromobactin* e *viobactin* sintetizados por *C. violaceum* e importantes para a aquisição de ferro poderiam ter algum papel também na aquisição de zinco. Para isso, foi obtido o mutante $\Delta cbaCEBA\Delta znuCBA$ que não possui genes da via de síntese de ambos os sideróforos (*cbaCEBA*) e do transportador de zinco (*znuCBA*) (Tabelas 1 e 2).

Para a caracterização inicial dessas linhagens foi comparado o perfil de crescimento das linhagens WT, $\Delta znuCBA$, $\Delta cbaCEBA$ e $\Delta cbaCEBA\Delta znuCBA$ em meio LB utilizando pré-inóculos não tratados (Figura 43A) ou pré-inóculos tratados com EDTA 100 μ M (Figura 43B). As linhagens foram tratadas com uma concentração mais baixa de EDTA do que nos outros ensaios porque o mutante $\Delta cbaCEBA\Delta znuCBA$ mostrou-se muito mais sensível ao tratamento com o agente quelante do que as demais linhagens analisadas nesse trabalho. Na comparação do perfil de crescimento das linhagens analisadas em meio LB utilizando pré-inóculos não tratados, não foram identificadas diferenças em relação a linhagem WT (Figura 43A). No entanto, quando o pré-tratamento com EDTA foi adicionado as culturas, o mutante $\Delta cbaCEBA\Delta znuCBA$ teve severo comprometimento no crescimento quando comparado as linhagens WT, $\Delta znuCBA$ e $\Delta cbaCEBA$ (Figura 43B).

Também foi realizado um ensaio de estimulação do crescimento do mutante $\Delta cbaCEBA\Delta znuCBA$ embebido em meio LB suplementado com 500 μ M EDTA, concentração que impede o crescimento do mutante em placas. Sobre o ágar solidificado foram adicionados 5 μ l das culturas das linhagens WT e $\Delta cbaCEBA$ ou 5 μ l de EDTA 50 mM, FeSO₄ 3 mM, MnCl₂ 100 μ M e ZnCl₂ 100 μ M (Figura 44A). Além disso, o mesmo ensaio foi realizado com os sobrenadantes das linhagens WT e

$\Delta cbaCEBA$ (Figura 44B). O estímulo de crescimento foi avaliado após 24 e 48 h de incubação a 37°C para o ensaio feito com as culturas bacterianas ou com os sobrenadantes, respectivamente. Tanto a linhagem WT quanto o seu sobrenadante estimularam mais o crescimento do mutante $\Delta cbaCEBA\Delta znuCBA$ embebido no ágar do que a linhagem $\Delta cbaCEBA$ ou seu sobrenadante (Figura 44A e B).

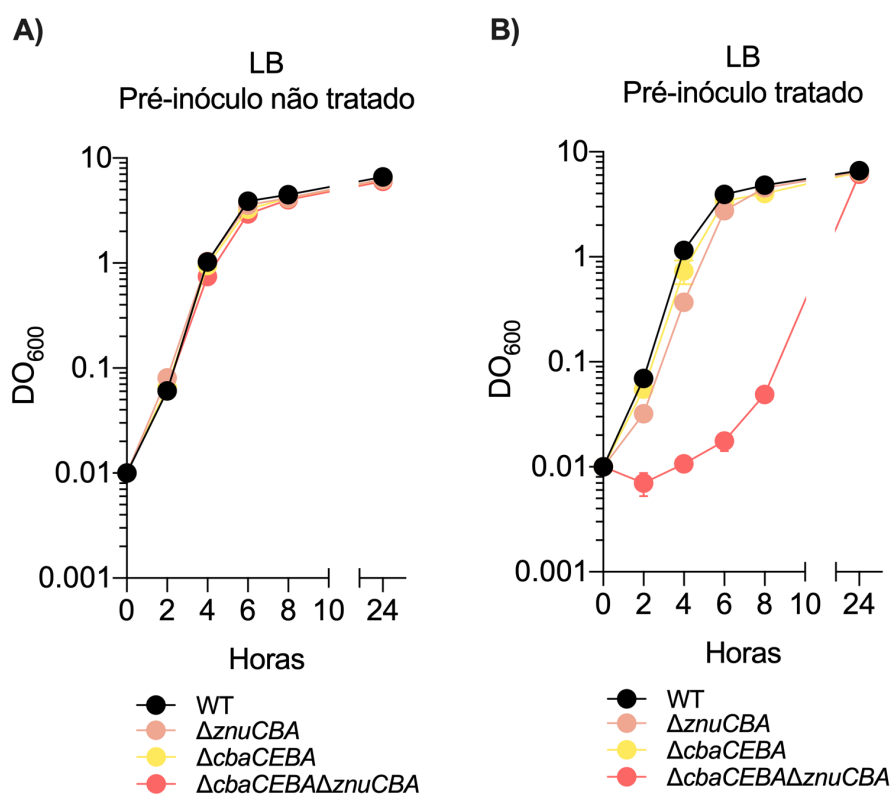


Figura 43 – Curvas de crescimento para investigação de vias secundárias para aquisição de zinco em *C. violaceum*. Curvas de crescimento em meio LB, utilizando pré-inóculos não tratados (A) ou tratados com 100 µM EDTA (B), e curva realizada com 1 mM EDTA. Ensaio realizado em triplicata biológica e representado como média e desvio padrão.

Mais ensaios foram realizados para investigar se existe relação entre os sideróforos e a captação de zinco em *C. violaceum*. Assim, o perfil de expressão dos receptores dependentes de TonB *cbuA* e *vbuA* na linhagem WT foi analisado por ensaio de atividade de β -galactosidase (Figura 44C). Nesse ensaio, as linhagens foram cultivadas por 1h30 sem tratamento (meio LB), com 100 µM 2,2'-DP, com 50 µM $FeSO_4$, com 2 mM EDTA e com 50 µM $ZnCl_2$. Em relação ao tratamento com 2,2'-DP e $FeSO_4$, foi comprovada a relação de ambos os receptores com a captação de ferro, uma vez que em carência deste metal (2,2'-DP) houve maior expressão de ambos os receptores quando comparado ao controle em meio LB (Figura 44C). Quanto a homeostase de zinco, o tratamento com EDTA também estimulou a

expressão de *cbuA* e *vbuA* e a adição de zinco sozinho não afetou a expressão de ambos os receptores (Figura 40C).

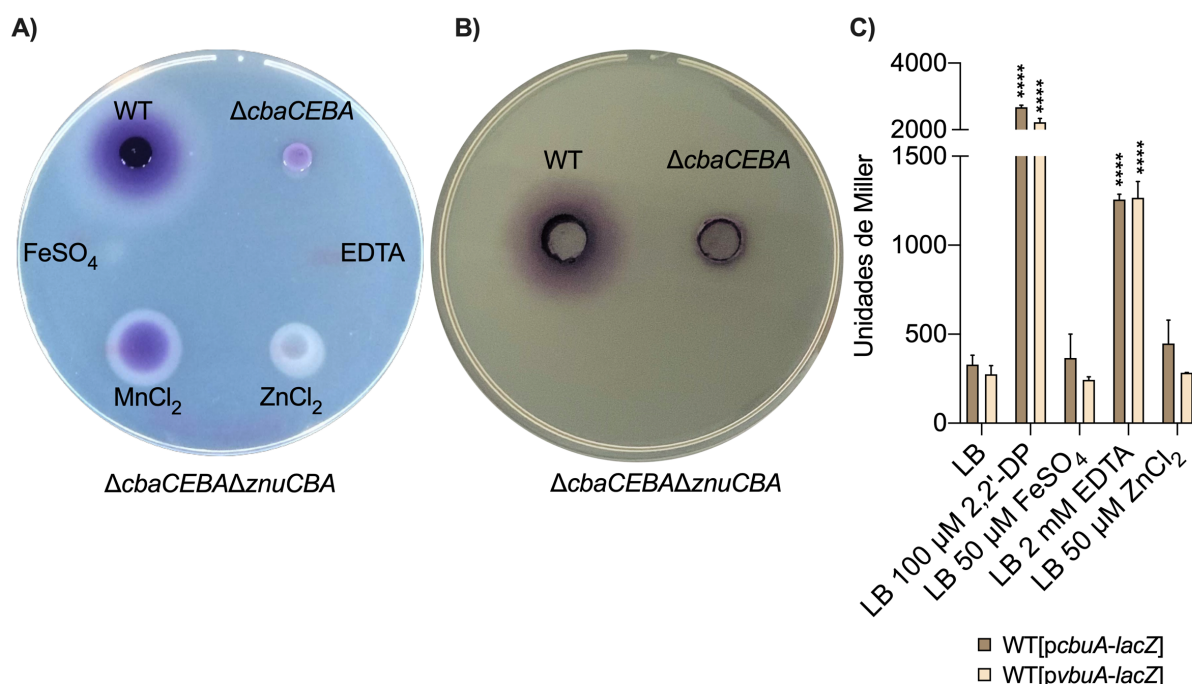


Figura 44 – Ensaio de estimulação e perfil de expressão dos receptores dependentes de TonB *cbuA* e *vbuA* aos tratamentos com zinco e EDTA. Ensaio de estimulação de crescimento do mutante $\Delta cb a C E B A \Delta z n u C B A$ embebido em meio LB suplementado com 500 μM EDTA. Ensaio realizado com as culturas (A) ou com os sobrenadantes (B). 5 μl de $F e S O_4$ 3 mM, EDTA 50 mM, $M n C l_2$ 100 μM e $Z n C l_2$ 100 μM foram utilizados como controles do ensaio. (C) Perfil de expressão dos receptores dependentes de TonB *cbuA* e *vbuA* na linhagem WT de *C. violaceum* após 1h30 de tratamento em meio LB em diferentes condições (não-tratado, 2,2'-DP, $F e S O_4$, EDTA e $Z n C l_2$). **** $P < 0,0001$. Ensaio realizado em triplicata biológica.

Quando a atividade de β -galactosidase das regiões promotoras de *cbuA* e *vbuA* foi medida ao realizar o tratamento conjunto com EDTA e $Z n C l_2$ (Figura 45), verificou-se que a expressão da região promotora de *cbuA* não foi reprimida com a adição de zinco (Figura 45A). No entanto, a expressão da região promotora de *vbuA* foi responsiva a altas concentrações de zinco (Figura 45B).

Em conjunto, esses dados sugerem uma possível relação entre a síntese e a captação de sideróforos com a aquisição de zinco em *C. violaceum*, embora mais ensaios sejam necessários para comprovar esta relação.

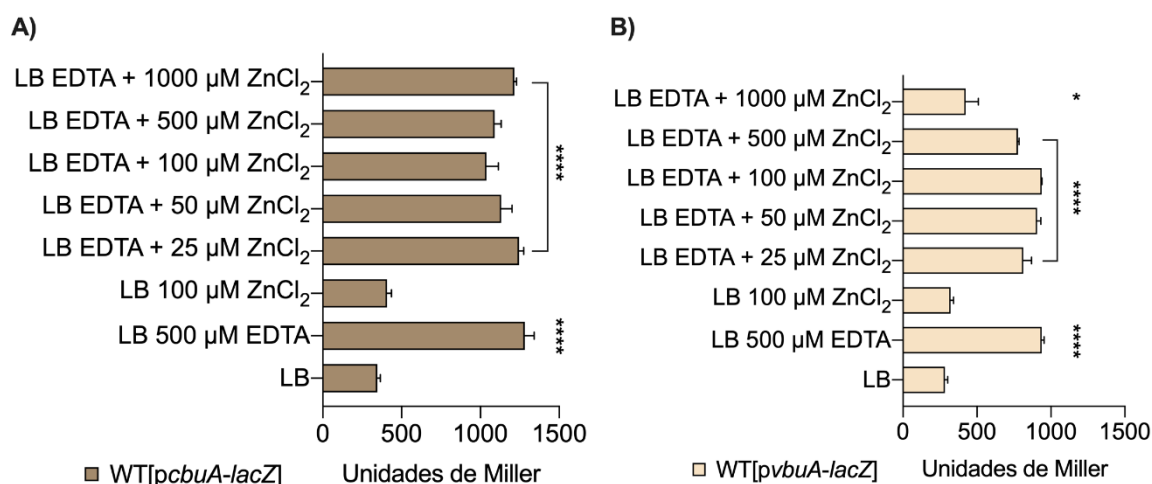


Figura 45 – Expressão de *cbuA* e *vbuA* em resposta ao tratamento conjunto com zinco e EDTA. Perfil de expressão dos receptores dependentes de TonB *cbuA* (A) e *vbuA* (B) na linhagem WT de *C. violaceum* após 1h30 de tratamento em meio LB em diferentes tratamentos. Para o agente EDTA foi utilizado 500 μM em todas as condições enquanto que ZnCl_2 utilizou-se de 25 a 1000 μM . **** $P < 0,0001$; * $P = 0,0263$. Ensaios realizados em triplicata biológica.

4.2.7. Análise de membros da família COG0523 e da proteína CV_RS15040

Embora nossos dados sugiram que o gene CV_3067 relacione-se com a homeostase de zinco em *C. violaceum*, como a maior sensibilidade a carência de zinco induzida por EDTA (Figura 34A) e a co-transcrição com os genes *zur* e *znuCBA*, sua função não foi determinada. A fim de analisar as evidências de que esta proteína pertença a família COG0523, foi realizada uma análise *in silico* comparando a sequência de aminoácidos da proteína CV_3067 com diversas outras proteínas também preditas como pertencentes à mesma família (Figura 46). Das proteínas presentes nesta análise, apenas YjiA (SYDOR et al., 2013) e YeiR (BLABY-HAAS et al., 2012) de *E. coli* já foram caracterizadas.

Em relação a proteína YjiA de *E. coli*, a identidade das proteínas analisadas variou de 26,3% (*N. meningitidis*) a 88,5% (*Klebsiella pneumoniae*). As proteínas CV_1561 e CV_3067, ambas possíveis membros da família COG0523, têm 29,5 e 27,5% de identidade, respectivamente (Figura 46). Já em relação a proteína YeiR de *E. coli*, a identidade das proteínas variou de 26,9% (*K. pneumoniae*) a 36% (*C. violaceum* CV_3067). A proteína CV_3067 de *C. violaceum* apresentou maior identidade com a proteína de *N. meningitidis* (59,4%), que está nomeada no banco de dados Uniprot como YjiA (<https://www.uniprot.org/uniprot/X5F7C9>), embora não tenham sido encontrados na literatura dados que confirmem essa anotação.

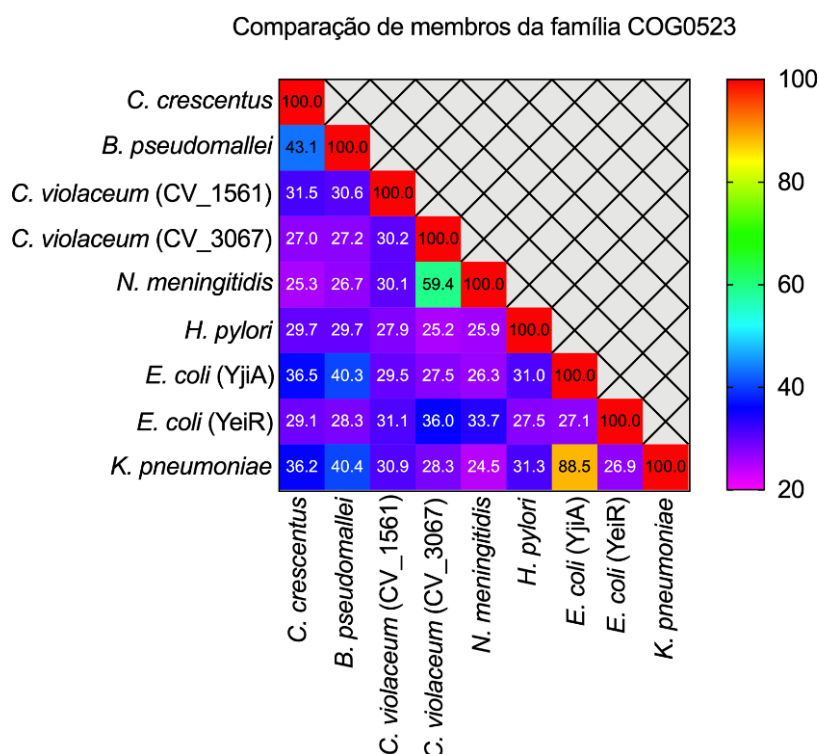


Figura 46 – Identidade de proteínas pertencentes ao COG0523. A comparação foi feita obtendo as sequências em formato FASTA do banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) das proteínas pertencentes ao COG0523 das seguintes bactérias: 1) *Caulobacter crescentus* (Acesso: Q9ABB0), 2) *Burkholderia pseudomallei* (Acesso: Q63YI1), 3) *C. violaceum*, proteína CV_1561 (Acesso: Q7NXR5), 4) *C. violaceum*, proteína CV_3067 (Acesso: Q7NTI7), 5) *N. meningitidis* (Acesso: X5F7C9), 6) *H. pylori* (Acesso: O25082), 7) *E. coli*, proteína YjiA (Acesso: P24203), 8) *E. coli*, proteína YeiR (Acesso: P33030) e 9) *Klebsiella pneumoniae* (Acesso: W9BQ76). As sequências foram alinhadas em pares utilizando o programa EMBOSS MATCHER (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/) e a porcentagem de identidade entre cada par encontra-se plotado na figura.

Além do gene CV_3067, o operon em estudo possui um segundo gene não caracterizado com 192 pb, codificando para uma pequena proteína de 63 aminoácidos (Referência NCBI: CV_RS15040 ou WP_043596425.1). A análise da sequência dessa proteína mostrou uma região rica em resíduos de histidina (Figura 47A), um aminoácido notadamente relacionado com a ligação a zinco (ALBERTS; NADASSY; WODAK, 1998), o que levantou a hipótese de que essa pequena proteína pudesse estar relacionada com a aquisição de zinco em *C. violaceum*. A localização genômica de CV_RS15040 em bactérias do gênero *Chromobacterium* foi bem conservada, localizada entre as proteínas CV_3067 e *znuC* (Figura 47B).

A)

>CV_RS15040 (WP_043596425.1)

1 - MSGQHS^HSDHGHGHA^HAP^HRR^HVTAANLRAPLSLLSMSAARRVALTLLPLAGLWLLVWVALRELA - 63

B)

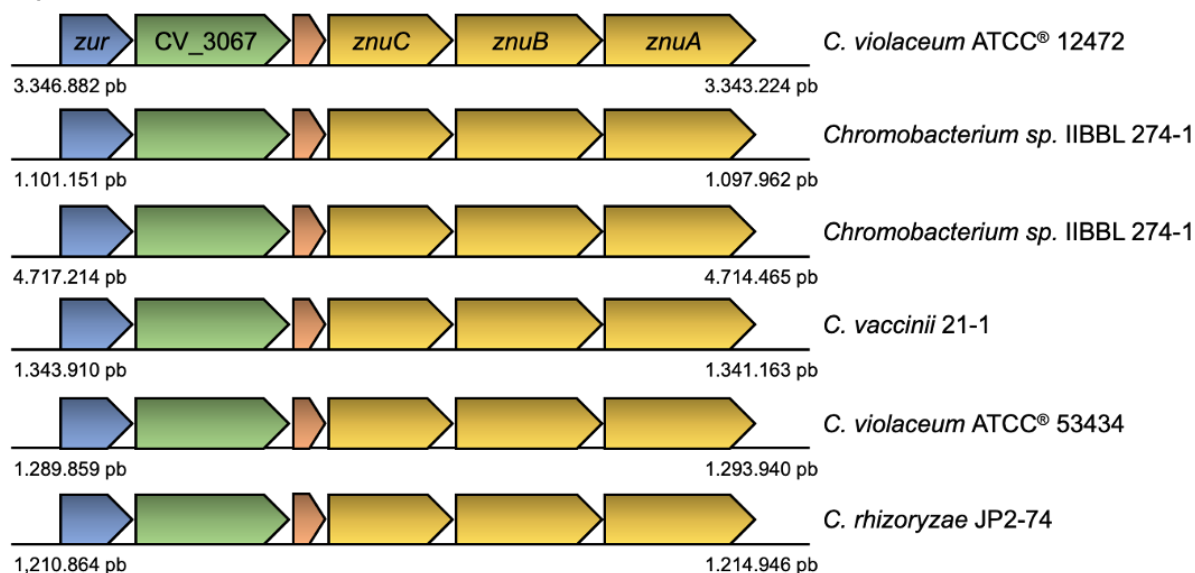


Figura 47 – Análise de sequência e distribuição da proteína CV_RS15040 em bactérias do gênero *Chromobacterium*. A) Sequência de aminoácidos da proteína CV_RS15040, destacando a presença de oito resíduos de histidina (H) na região amino-terminal da proteína. B) Distribuição e localização da proteína em bactérias do gênero *Chromobacterium*. Em todas as bactérias em que foi possível localizar a pequena proteína CV_RS15040 (em laranja), esta encontrava-se entre os genes CV_3067 e znuC.

A análise da predição da topologia da proteína CV_RS15040 utilizando o servidor TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) sugere que ela possui domínio transmembrana entre os aminoácidos 37 e 59 (Figura 48). O mesmo resultado foi obtido ao analisar a sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta PSORTb (<http://www.psорт.org/psорт/>). Embora a sua localização possa ser predita, não possuímos evidências sobre a função da proteína. Hipotetizamos que ela poderia estar relacionada com a atividade de CV_3067 ou como uma proteína acessória ao transportador ZnuABC, visto que CV_RS15040 possui um domínio rico em histidina que poderia ligar zinco (Figura 47A).

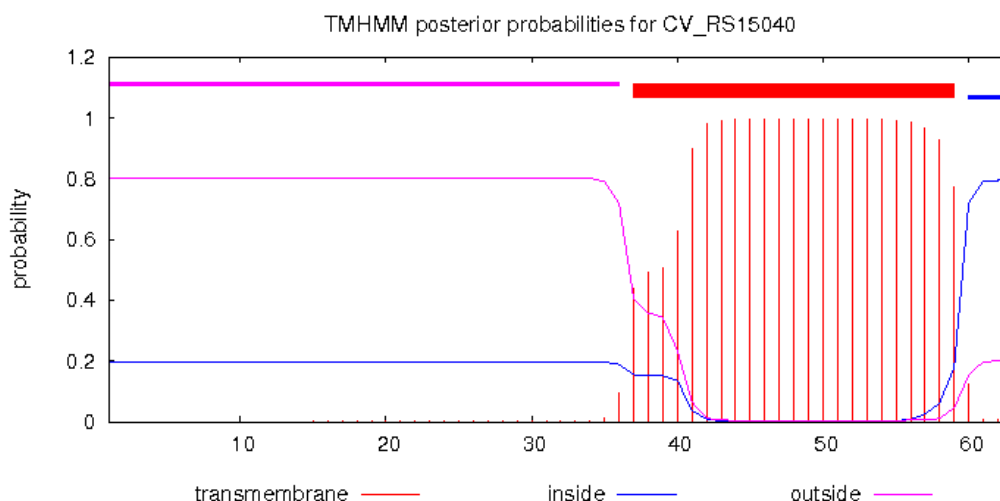


Figura 48 – Predição da topologia da proteína CV_RS15040. Análise realizada com a sequência de aminoácidos da proteína CV_RS15040 no servidor TMHMM v. 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

Análises na literatura não demonstraram que proteínas do COG0523 necessitam de proteínas acessórias como a presente em *C. violaceum*. Entretanto, ao utilizar o algoritmo para comparação de informações de sequências biológicas primárias (PSI-BLAST) foi observado que essa pequena proteína também está distribuída em outras bactérias (Figura 49).

Ortólogos de CV_RS15040 foram encontrados em mais β -proteobactérias (*Aquitalea* spp., *Gulbenkiania indica* e *Rivicola pingtungensis*), além de uma γ -proteobactéria (*Halomonas massiliensis*) e três α -proteobactérias (*Bradyrhizobium canariense*, *Methylopila* sp. Yamaguchi e *Rhodoblastus acidophilus*). Curiosamente, nas γ e α -proteobactérias, os ortólogos de CV_RS15040 encontram-se associados ao transportador ZnuABC (Figura 49), sugerindo que essa proteína especializada seja auxiliar desse transportador nessas bactérias.

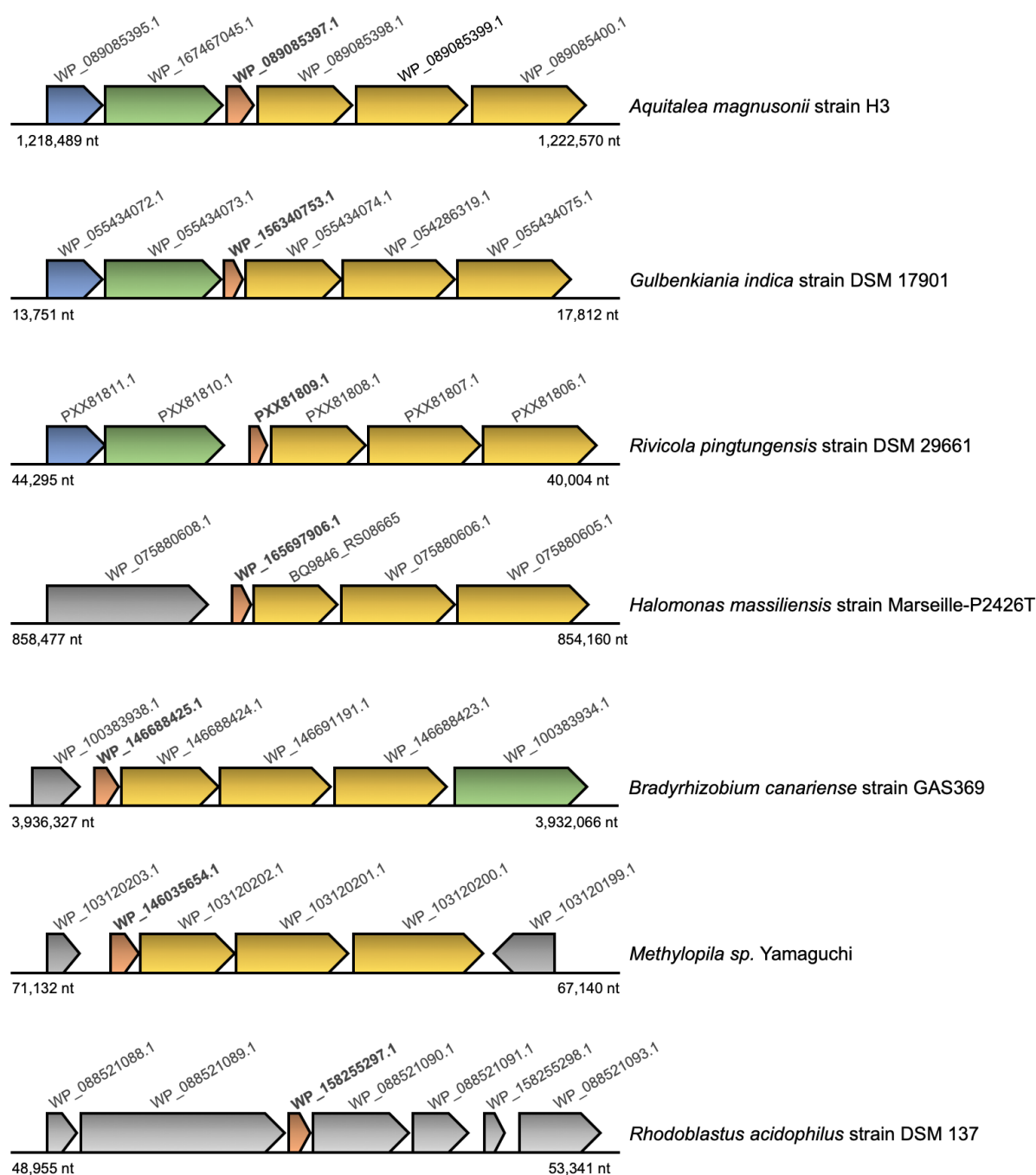


Figura 49 – Comparação da distribuição de ortólogos de CV_RS15040. Representação esquemática baseado nos dados de alinhamento múltiplo (PSI-BLAST) com a proteína CV_RS15040 de *C. violaceum*. As cores dos genes correspondem àquelas presentes na Figura 47: em azul, *zur*; em verde, um membro do COG0523; em laranja, um ortólogo de CV_RS15040 e em amarelo os genes do transportador ZnuABC.

Quando analisamos a filogenia de β -proteobactérias, verificamos que os ortólogos de CV_RS15040 estão presentes em todos os membros da família Chromobacteriaceae (*Aquitalea* spp., *Chromobacterium* spp., *Gulbenkiania* spp. e *Pseudogulbenkiania* spp.) e em um membro da família Neisseriaceae (*Rivicola* spp.) (Figura 50).

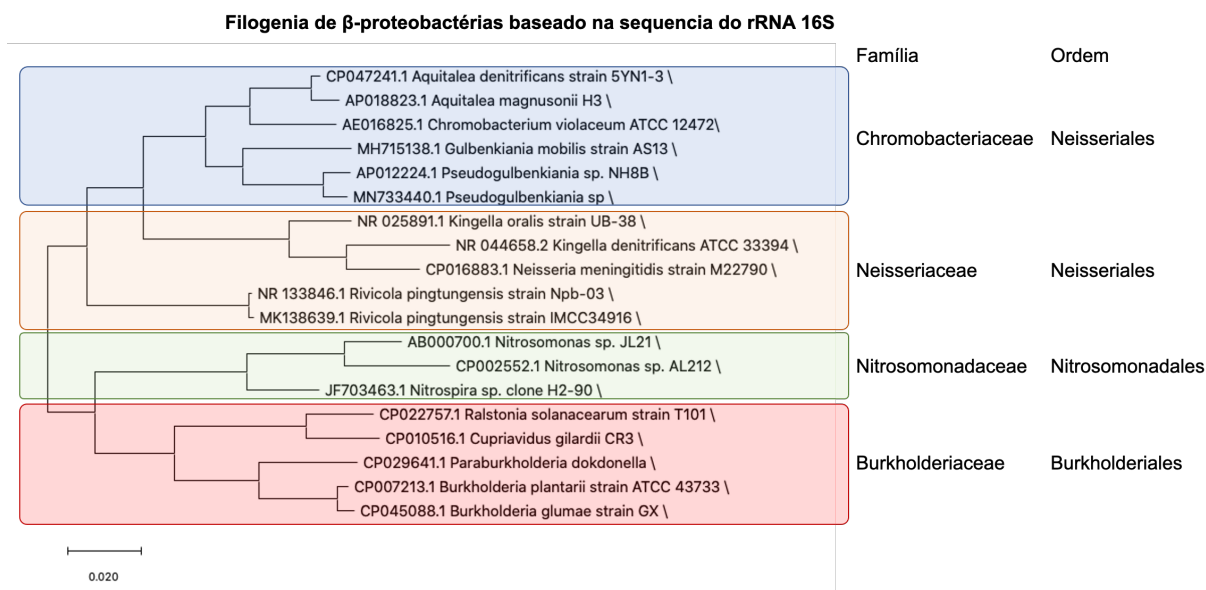


Figura 50 – Filogenia de β -proteobactérias baseado na sequência do rRNA 16S. A árvore filogenética foi feita com o programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <https://www.megasoftware.net/>) utilizando sequências do rRNA 16S obtidas do banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) das bactérias indicadas na figura. O método utilizado para determinação da filogenia foi o de Máxima verossimilhança.

Em conjunto, as análises *in silico* sugerem que no operon regulado por Zur existem duas proteínas ainda sem função definida, sendo uma delas não encontrada usualmente em outros gêneros de bactérias. Hipotetizamos que a proteína CV_3067 seja uma metalochaperona relacionada às proteínas YeiR e YjiA, por pertencerem ao mesmo grupo COG0523, e que a proteína CV_RS15040 seja uma proteína acessória do transportador ZnuABC e pouco distribuída em proteobactérias.

5. DISCUSSÃO

A importância de metais de transição como ferro, zinco e manganês em bactérias se reflete pela ampla quantidade de mecanismos presentes para garantir a manutenção da homeostase destes metais, que é conseguida, sobretudo, pela expressão de transportadores para aquisição ou efluxo de metais (BECKER; SKAAR, 2014; WANG; CAPDEVILA; GIEDROC, 2019; CHANDRANGSU; RENSING; HELMANN, 2017). Do ponto de vista transcricional, as bactérias possuem diferentes famílias de fatores de transcrição para a modulação da expressão de transportadores, da síntese de compostos especializados na aquisição de metais do hospedeiro ou do meio ambiente e, ainda, mecanismos para evitar a intoxicação decorrente do excesso desses micronutrientes (FILLAT, 2014; KEHL-FIE; SKAAR, 2010; PI; HELMANN, 2017; TROXELL; HASSAN, 2013; WATERS, 2020). Embora membros da família Fur de fatores de transcrição estejam preditos em mais de 6.700 espécies bacterianas, com mais de 18.500 sequências disponíveis segundo o banco de dados Pfam (<https://pfam.xfam.org/family/FUR>), em *Chromobacterium violaceum* a descrição e caracterização desses fatores de transcrição ainda não foi realizada. Visto que em muitas bactérias os membros dessa família possuem um papel importante na virulência bacteriana (FILLAT, 2014; PORCHERON; DOZOIS, 2015; TROXELL; HASSAN, 2013), é de grande interesse caracterizá-los a fim de conhecer o arsenal utilizado por bactérias para se estabelecer no hospedeiro vertebrado.

C. violaceum, uma bactéria patogênica oportunista de humanos e de animais, possui dois fatores de transcrição da família Fur, os reguladores transcricionais Fur e Zur, os quais foram caracterizados neste trabalho (Figura 51). Demonstramos que Fur desempenha um importante papel na proteção ao estresse oxidativo, assim como na repressão da síntese de sideróforos em condições de suficiência de ferro. Além disso, outros fenótipos que não necessariamente estão relacionados com a homeostase de ferro foram afetados no mutante Δfur , como a redução na produção de biofilme e na motilidade do tipo *swimming*. A virulência do mutante Δfur foi atenuada em modelo de infecção *in vivo* utilizando camundongos da linhagem BALB/c (Figura 51). A forte atenuação de virulência do mutante Δfur não pode ser atribuída apenas aos problemas de crescimento desta linhagem, pois, com o uso do transposon T8, mostramos que uma inserção aleatória numa região de repetição de um locus CRISPR/Cas melhora o *fitness* do mutante Δfur , mas mantém o fenótipo de atenuação da virulência provocado pela ausência de Fur. Além do

mutante nulo Δfur , também caracterizamos uma linhagem com mutação pontual em Fur, denominada Fur^{R40S}, que foi obtida como um mutante espontâneo selecionado em excesso de manganês. A linhagem Fur^{R40S} apresentou diminuição na expressão de Fur, desrepressão na síntese de sideróforos e maior susceptibilidade ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂. Entretanto, essa linhagem não compartilhou os demais fenótipos observados no mutante nulo Δfur , como a atenuação da virulência ou menor produção de biofilme e *fitness* diminuído em meio sólido, sugerindo que a substituição R40S compromete parcialmente o funcionamento do regulador Fur (SANTOS et al., 2020).

Em relação a Zur, demonstramos que esse regulador reprime, em suficiência de zinco, a expressão do operon que codifica Zur, o transportador de zinco ZnuABC e duas proteínas hipotéticas não caracterizadas (Figura 51). A ausência de *zur* não compromete a virulência ou outros fenótipos investigados em *C. violaceum*, como a motilidade do tipo *swimming*, a produção de biofilme ou a sensibilidade a antibióticos. Entretanto, foi observada uma maior produção/secreção de moléculas autoindutoras de *quorum sensing* no mutante Δzur , embora a produção de violaceína não tenha sido afetada nesse mutante (Figura 51). Os maiores efeitos relacionados com a homeostase de zinco foram decorrentes da ausência do transportador ZnuABC. Sem este transportador, *C. violaceum* tornou-se mais susceptível a carência de zinco induzida por tratamentos com o agente quelante sintético EDTA e a proteína ligadora de metal do hospedeiro calprotectina. Foi demonstrado pela primeira vez os efeitos antimicrobianos da calprotectina em *C. violaceum*, assim como o papel de ZnuABC na virulência desta bactéria através de ensaios *in vitro* de infecção de neutrófilos isolados de camundongos da linhagem BALB/c (SANTOS et al., 2021). Em conjunto, as caracterizações realizadas neste trabalho fornecem dados inéditos a respeito do controle da homeostase de ferro e de zinco em *C. violaceum*, demonstrando a importância de Fur, Zur e ZnuABC na fisiologia e na patogenicidade dessa bactéria (Figura 51).

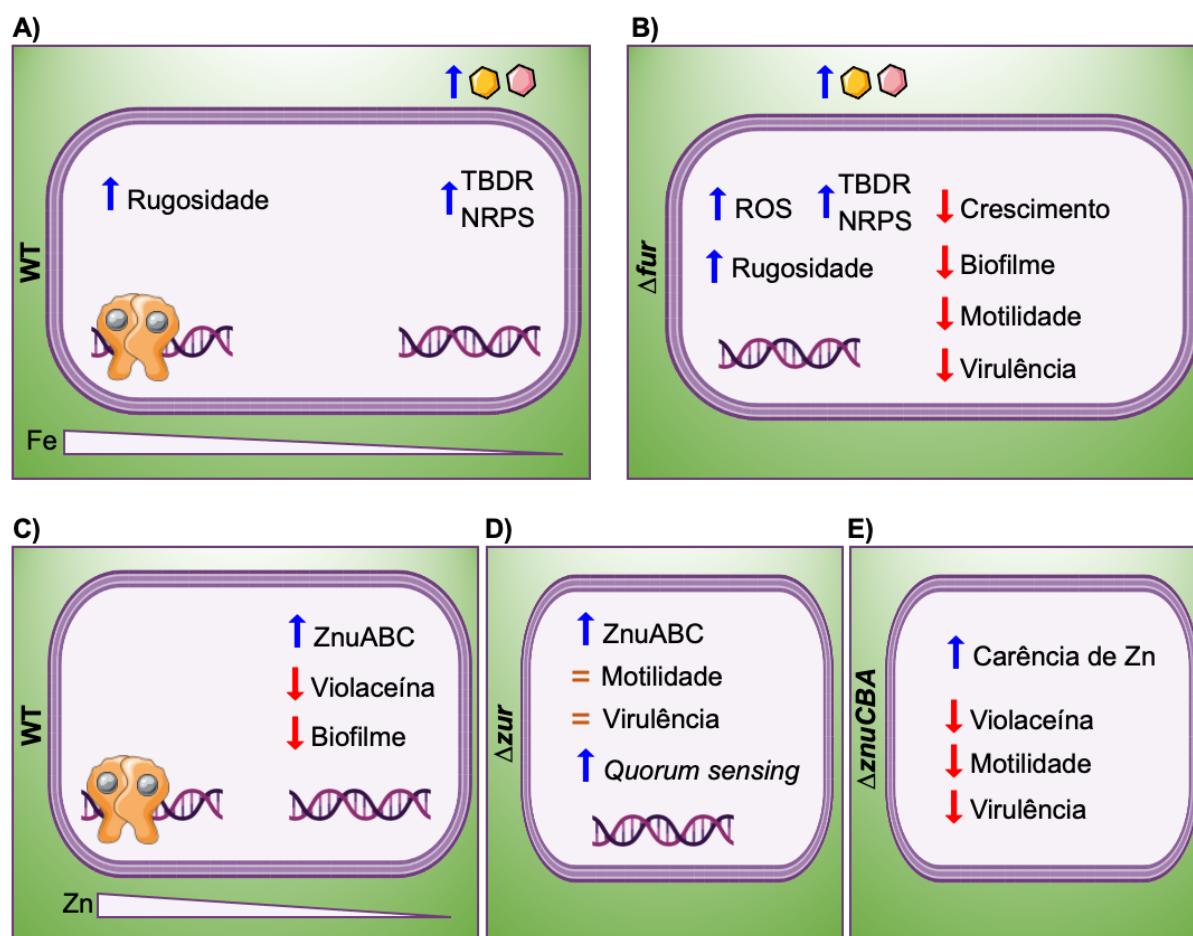


Figura 51 – Papel de Fur, Zur e ZnuABC na fisiologia e virulência de *C. violaceum*. **A)** Na linhagem WT, em suficiência de ferro, observamos aumento da rugosidade do biofilme em meio sólido. Em carência de ferro, a expressão de genes das vias de biossíntese e captação de sideróforos, como a NRPS *cbaF* e o TBDR *cbuA*, encontra-se aumentada. **B)** No mutante Δfur , foi observado que mesmo em suficiência de ferro a via de biossíntese e captação de sideróforos encontra-se desreprimida, confirmando a participação de Fur na repressão destes genes. Além disso, essa linhagem encontra-se intrinsecamente sob estresse oxidativo, sendo mais sensível ao tratamento com peróxido de hidrogênio. O mutante Δfur apresentou ainda decréscimo no crescimento em meio sólido e líquido, redução da motilidade do tipo *swimming* e da formação de biofilme e grande atenuação na virulência. **C)** A linhagem WT quando cultivada em carência de zinco desreprime o operon que codifica o transportador de alta afinidade ZnuABC, além de diminuir a formação de biofilme. Em condições extremas de carência de zinco, a produção de violaceína é comprometida. **D)** No mutante Δzur , o operon que contém o transportador ZnuCBA encontra-se desreprimido, indicando o papel de Zur como repressor transcricional. Além disso, Zur parece estar envolvido direta ou indiretamente com a regulação de *quorum sensing*. Outros fenótipos, como motilidade e virulência, permaneceram inalterados no mutante Δzur quando comparado a linhagem WT. **E)** A ausência do transportador ZnuABC torna *C. violaceum* muito mais sensível a carência de zinco, avaliada pelos tratamentos com EDTA e calprotectina. Além disso, a síntese de violaceína é afetada de maneira mais pronunciada nesse mutante quando comparado a linhagem WT. Foi comprovado que a motilidade do tipo *swimming* necessita de zinco e que a ausência de ZnuCBA compromete essa via. Por fim, foi demonstrado que o mutante $\Delta znuCBA$ é altamente atenuado para virulência em modelo de infecção em camundongos. Legenda: Fe

= ferro. Zn = zinco. NRPS = sintetase de peptídeo não-ribossomal (do inglês, *nonribosomal peptide synthetase*). TBDR = receptor dependente de TonB (do inglês, *TonB-dependent receptor*). ROS = espécies reativas do oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*). Fonte: O autor, 2021; com representações gráficas obtidas do site BioRender (<https://biorender.com/>) e SMART Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

5.1. Caracterização de Fur na homeostase de ferro em *C. violaceum*

A primeira etapa para a caracterização de Fur em *C. violaceum* foi a obtenção de uma linhagem mutante nula com deleção de *fur*, utilizando um procedimento de troca alélica por recombinação homóloga, um método amplamente utilizado para a obtenção de mutantes em *C. violaceum* (BARROSO et al., 2018; BATISTA et al., 2019, 2020; DA SILVA NETO; NEGRETTO; NETTO, 2012). Entretanto, a obtenção de um mutante nulo *fur* parecia ser inviável, uma vez que todas as colônias resultantes da seleção em sacarose na segunda recombinação homóloga apresentavam reversão ao genótipo da linhagem selvagem. Essa característica sugeriu que *fur* de *C. violaceum* fosse um gene essencial, assim como observado em *Neisseria gonorrhoeae* e *P. aeruginosa* (BARTON et al., 1996; THOMAS; SPARLING, 1996) ou semelhante a *Mycobacterium tuberculosis*, onde não é possível obter mutantes nulos para o regulador da homeostase de ferro e estresse oxidativo IdeR, da família DtxR (RODRIGUEZ et al., 2002). No entanto, a obtenção de mutante nulo Δfur em *C. violaceum* foi possível em situação de limitação de ferro, caracterizando Fur como condicionalmente essencial nesta bactéria.

Em paralelo a obtenção do mutante Δfur em *C. violaceum*, Pasqua e colaboradores publicaram um trabalho caracterizando Fur de *P. aeruginosa* como condicionalmente essencial (PASQUA et al., 2017). Os autores fizeram a caracterização de uma linhagem previamente construída em que o gene *fur* de *P. aeruginosa* foi inserido em uma região neutra do genoma com um promotor induzível por arabinose, permitindo a deleção da cópia endógena de *fur* em condições permissivas (VISAGGIO et al., 2015). A caracterização desse mutante condicional mostrou um severo comprometimento no crescimento em meio sólido (PASQUA et al., 2017). Para investigar os mecanismos de inibição ou toxicidade mediado pela ausência de Fur, os autores selecionaram mutantes com inserção do transposon mini-Tn5 capazes de crescer em meio sólido sem a adição de arabinose. A identificação dos sítios de inserção do transposon mostrou que três clones possuíam inserção na via de regulação e biossíntese do sideróforo *pyochelin*. Para confirmação desse

achado, os autores combinaram o mutante condicional de *fur* com um mutante nulo para o gene *pchD*, envolvido na biossíntese de *pyochelin*. Esse mutante apresentou melhora no fenótipo de crescimento em meio sólido (PASQUA et al., 2017).

De modo similar, o mutante combinado $\Delta cbaCEBA\Delta fur$ de *C. violaceum* também apresentou melhora no crescimento em meio sólido e em meio líquido, além de não necessitar de adição do quelante 2,2'-DP na seleção da segunda recombinação homóloga para deleção de *fur*. O operon *cbaCEBA* de *C. violaceum* é o responsável pela síntese do precursor dos sideróforos 2,3-DHB (do inglês, *2,3-dihydroxybenzoic acid*, ácido 2,3-di-hidroxibenzóico) e sua deleção resulta na completa ausência dos sideróforos *chromobactin* e *viobactin* (BATISTA et al., 2019). Em conjunto, esses dados sugerem que o excesso da captação de ferro via sideróforos em mutantes *fur* é prejudicial para a seleção e para o crescimento destes mutantes em meio sólido, tanto em *P. aeruginosa* quanto em *C. violaceum*.

Em bactérias onde o gene *fur* é ou parece ser essencial como em *P. aeruginosa* (BARTON et al., 1996), *N. gonorrhoeae* (THOMAS; SPARLING, 1996) e *Bradyrhizobium japonicum* (BENSON; LEVIER; GUERINOT, 2004), utiliza-se como estratégia para a caracterização de Fur a obtenção de mutantes espontâneos selecionados em excesso de manganês, um método definido para Fur de *E. coli* (HANTKE, 1981; HANTKE, 1987). Utilizando esse método, Barton e colaboradores obtiveram três mutantes espontâneos em Fur de *P. aeruginosa* PAO1, e os nomearam como A2, A4 e C6. Todos os mutantes apresentaram desrepressão na síntese de sideróforos e foram identificadas mutações em diferentes resíduos de aminoácidos. Embora não tenha sido validado experimentalmente, os autores utilizaram o método Chou-Fasman para predição de mudanças na estrutura secundária das proteínas. Esse método indicou que apenas na linhagem C6 haveria uma quebra na α -hélice de Fur (BARTON et al., 1996).

Utilizando esta estratégia de seleção em manganês seguida de varredura em placas PSA-CAS para desrepressão na síntese de sideróforos, isolamos e caracterizamos uma linhagem com mutação pontual em Fur (troca de arginina para serina na posição 40), chamada Fur^{R40S}. Demonstramos que a substituição R40S em Fur de *C. violaceum* diminui os níveis de expressão da proteína Fur, mas que apesar disso, a proteína retém parcialmente suas funções, visto que o perfil fenotípico do mutante Fur^{R40S} não é idêntico ao do mutante nulo Δfur . Por fim, descartamos a possibilidade de que a seleção em excesso de manganês pudesse ter induzido

mutações em outras vias de *C. violaceum*, uma vez que a complementação das linhagens Δfur e Fur^{R40S} com a cópia mutada de *fur* clonada no plasmídeo pMR20 (pMR20*fur*^{C118A}) não foi capaz de reverter completamente o fenótipo de síntese de sideróforos aumentado, sugerindo que a proteína Fur^{R40S} não é totalmente funcional quando considerado esse aspecto.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar o efeito da substituição R40S em Fur na linhagem mutante Fur^{R40S}: i) a troca causou alteração da estabilidade da proteína; ii) o aminoácido arginina seja alvo de modificações pós traducionais e que a substituição para serina impeça esse processo e comprometa a função da proteína. Analisando as sequências da proteína WT e da proteína Fur^{R40S} pelo método Chou-Fasman (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/MIX/>) e pelo método Garnier-Osguthorpe-Robson (GOR, <http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/GOR/>) de predição de estrutura secundária de proteínas, foi verificado que a mutação R40S pode alterar a conformação da α -hélice em que este resíduo de arginina está contido. As mudanças foram observadas nos resíduos de aminoácidos 36 ao 48, e sugerem que o comprometimento do funcionamento da proteína pode estar relacionado a essa mudança conformacional. Além disso, resíduos de arginina estão sujeitos a modificações pós-traducionais (PTM, do inglês, *post-translational modifications*) tanto em células eucarióticas quanto em células procarióticas. Em bactérias, a fosforilação e a ADP-ribosilação são exemplos de PTM já descritos (SLADE et al., 2014). Assim, podemos especular que o resíduo de arginina 40 de Fur pudesse ser alvo de tais PTM. De fato, foi descrito inibição de Fur por nitrosilação em presença de óxido nítrico, mas agindo no ferro ao invés de aminoácidos da proteína (D'AUTREAUX et al., 2002).

As curvas de crescimento em meio rico e meio mínimo indicaram que a ausência de Fur compromete o crescimento de *C. violaceum* mesmo em situação ideal de cultivo *in vitro* e o mutante Δfur torna-se ainda mais prejudicado na presença de ferro. Em outras bactérias, o perfil de crescimento de mutantes *fur* é variável. Em *Enterococcus faecalis*, por exemplo, não foram observadas alterações do mutante nulo Δfur em curvas de crescimento feitas em meio N, independente da adição de FeCl₃ ou 2,2'-DP (LATORRE et al., 2018). Para *P. aeruginosa*, o crescimento de mutantes espontâneos *fur* foi atenuado em curvas realizadas em meio DTSB suplementado ou não com ferro (HASSETT et al., 1996). Já para *S. enterica*, o crescimento de mutantes Δfur variou de acordo com o sorotipo avaliado. Para *S. enterica* sorotipo Typhi, o crescimento foi atenuado em curvas realizadas em meio LB

ou meio LB suplementado com 2,2'-DP, enquanto que para *S. enterica* sorotipo Typhimurium, o fenótipo de atenuação do crescimento só foi observado quando a curva foi realizada em meio LB suplementado com 2,2'-DP (LECLERC; DOZOIS; DAIGLE, 2017). Esses dados demonstram que o fenótipo de crescimento de mutantes Δfur depende de vários fatores, como os genes regulados por Fur em cada bactéria ou ainda o modo com que cada bactéria supera a toxicidade decorrente da desrepressão dos sistemas de captação de ferro.

Sugere-se que a maior aquisição de ferro mediada pelo regulador Fur ocorra durante a fase de latência (lag) de crescimento bacteriano, um mecanismo existente para contrapor a imunidade nutricional imposta pelos hospedeiros (BERTRAND, 2014, 2019). Isto poderia servir como justificativa para explicar os casos de mutantes *fur* que atingem menor densidade celular nas curvas de crescimento: na fase inicial de crescimento, as células estariam mais sujeitas ao estresse oxidativo decorrente do acúmulo intracelular de ferro, e em linhagens em que o regulador Fur esteja ausente, a contraposição ao mecanismo de maior influxo de metal é perdida. Portanto, a linhagem permanece com altos níveis de ferro intracelular e, conseqüentemente, sob contínuo estresse oxidativo, o que pode levar a diminuição da viabilidade e do crescimento celular.

Um aspecto único observado no mutante Δfur de *C. violaceum* foi a coloração das culturas em roxo no meio M9HC e em castanho quando as curvas de crescimento foram realizadas em M9HC com a adição de $FeSO_4$. Normalmente, em meio M9HC líquido, as culturas de *C. violaceum* WT não ficam roxas. A explicação para esse fenômeno ainda não foi desvendada, mas deve envolver mecanismos que afetem a produção de moléculas autoindutoras de *quorum sensing*, que ativam a expressão do operon *vioABCDE* de síntese de violaceína (MCCLEAN et al., 1997; PARK et al., 2021). Como a violaceína é sintetizada a partir do aminoácido triptofano (FÜLLER et al., 2016), poderíamos pressupor que o regulador Fur de *C. violaceum* esteja relacionado com a repressão da síntese de triptofano, e em sua ausência a maior quantidade do aminoácido permita que a violaceína seja sintetizada mesmo que a cultura não tenha atingido uma alta densidade celular. Esse efeito seria potencializado quando adicionado ferro às culturas e poderia estar relacionado com reações químicas ou a lise de células do mutante Δfur observada nessas condições.

Além da influência do ferro no crescimento em culturas planctônicas, também foi observado que a presença deste metal em placas de meio PSA influenciou

a morfologia do biofilme. A linhagem WT e o mutante Fur^{R40S} assumiram aspecto rugoso quando na presença de ferro e aspecto liso quando na presença de NaNO₃. No mutante Δfur , o aspecto da colônia sempre se manteve rugoso, independente do tratamento adicionado ao meio de cultivo. A hipótese de que o nitrato pudesse reverter o fenótipo de rugosidade observado em *C. violaceum* decorreu de trabalhos prévios caracterizando a morfologia de comunidades bacterianas de *P. aeruginosa* e sua relação com o estado redox intracelular (DIETRICH et al., 2013; KAHL; PRICE-WHELAN; DIETRICH, 2020). No trabalho de Dietrich e colaboradores foi demonstrado que as fenazinas produzidas por *P. aeruginosa* agem como aceptores de elétrons alternativos ao oxigênio e ao nitrato para oxidar o estado redox intracelular e influenciam na morfologia das colônias. Foi demonstrado que o biofilme da colônia se manteve com a morfologia lisa até 48 h de cultivo em meio sólido devido a acessibilidade de toda a comunidade bacteriana ao oxigênio. Após 48 h de cultivo, a colônia possui uma altura em que as células contidas na base da colônia possuem menor ou nenhum acesso ao oxigênio, tornando-se anóxicas. Células nessa zona mantêm a homeostase redox através da redução de fenazinas ou de nitrato. Na ausência desses compostos a homeostase redox é atingida através da modificação da morfologia da comunidade bacteriana, que se torna rugosa e/ou mais espalhada no ágar para aumentar a área de superfície da colônia e a acessibilidade ao oxigênio (DIETRICH et al., 2013).

O mecanismo descrito para *P. aeruginosa* nos levou a hipotetizar que o mesmo cenário pudesse estar ocorrendo em *C. violaceum*. A interferência com o estado redox intracelular, seja devido a adição de ferro ou devido a ausência de Fur, poderia ser contraposta pela presença de fenazinas ou de nitrato. Análises *in silico* não demonstraram a presença de todos os genes responsáveis pela via de síntese de fenazinas, sugerindo que *C. violaceum* não sintetize esse metabólito. Assim, foi utilizado uma fonte de nitrato (NaNO₃) para verificar se esse composto auxiliaria na manutenção do estado redox intracelular. Conforme indicado nas linhagens WT e Fur^{R40S}, na presença de NaNO₃ a formação de biofilme rugoso foi inibida, e apenas colônias lisas foram detectadas. Já no mutante Δfur , mesmo com a adição de NaNO₃ a reversão a colônias lisas não foi observada, servindo como uma evidência de que esse mutante encontra-se intrinsecamente sob estresse oxidativo severo, não reversível com o tratamento com NaNO₃.

Além dessa evidência indireta, o estado redox oxidante do mutante Δfur foi confirmado com a sonda fluorescente sensível a ROS H₂DCFDA e este mutante foi mais susceptível a H₂O₂. Mutantes Δfur tem seu crescimento e sobrevivência afetados por ROS como H₂O₂ em várias outras bactérias, como em *Acinetobacter baumannii* (AJIBOYE; SKIEBE; WILHARM, 2018), em *Pectobacterium carotovorum* (TANUI et al., 2017) e em *Caulobacter crescentus* (DA SILVA NETO et al., 2009), onde também foi demonstrada perturbação do estado redox em mutante Δfur (LEADEN et al., 2018).

Classicamente, o meio indicativo CAS é utilizado para demonstrar que mutantes Δfur têm a atividade de sideróforos aumentada quando em comparação com a linhagem selvagem, como foi o caso em *C. violaceum*. Esse fenótipo foi demonstrado em várias bactérias, como o mutante Δfur de *P. carotovorum* (TANUI et al., 2017), os mutantes selecionados em excesso de manganês F9 e F11 de *X. campestris* (JITTAWUTTIPOKA et al., 2010) e o mutante nulo *fur* em *X. vesicatoria* (LIU et al., 2016). Semelhante ao observado em *C. violaceum*, em *P. carotovorum* (TANUI et al., 2017) e em *X. vesicatoria* (LIU et al., 2016) a formação de biofilme em mutantes *fur* também foi diminuída. Apesar disso, essa característica parece não ser intrínseca da ausência ou comprometimento da funcionalidade de Fur, já que em bactérias como *P. aeruginosa* Fur não influencia na formação de biofilme (PASQUA et al., 2017).

Quando considerado o perfil de motilidade do tipo *swimming* em mutantes *fur* verificamos que os fenótipos são diferentes dependendo da bactéria. Em *H. pylori* (LEE et al., 2017), *P. carotovorum* (TANUI et al., 2017), *X. vesicatoria* (LIU et al., 2016) e *S. enterica* sorotipo Typhi (LECLERC; DOZOIS; DAIGLE, 2017), a motilidade é diminuída em mutantes *fur* quando comparados à linhagem selvagem. Em *S. enterica* sorotipo Typhimurium a motilidade não apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação à linhagem selvagem (LECLERC; DOZOIS; DAIGLE, 2017). Já em *E. coli* uropatogênica, a motilidade do mutante Δfur é aumentada (KURABAYASHI et al., 2016). Os mecanismos envolvendo a regulação da motilidade não foram investigados em *C. violaceum* e poderiam ser elucidados através de uma análise de expressão gênica global, que não foi realizada nesse trabalho. Em *H. pylori* e *P. carotovorum*, entretanto, foi demonstrado que a diminuição da motilidade é devido à regulação mediada por Fur de genes como *flhC*, *motA* ou perturbação do motor flagelar (LEE et al., 2017; TANUI et al., 2017). Já em *E. coli* uropatogênica foi demonstrado que Fur reprime a expressão de *flhD*, um ativador da expressão flagelar,

assim como dos genes *fliA* e *fliC*, que codificam uma proteína regulatória da expressão flagelar e um componente principal dos flagelos, respectivamente (KURABAYASHI et al., 2016). A repressão mediada por Fur nesses genes justifica o aumento da motilidade do mutante *fur* nesta bactéria.

A virulência do mutante Δfur de *C. violaceum* foi bastante atenuada quando em comparação à linhagem WT. Verificamos que 100% dos animais sobrevivem a presença de Δfur , enquanto que com a infecção por WT e Fur^{R40S} todos os animais foram mortos entre 2 e 4 dias após a infecção. Isso sugere que a retenção da atividade do regulador Fur na linhagem com a substituição R40S é importante para determinar a virulência de *C. violaceum*. Além da curva de sobrevivência, a colonização do fígado e a produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos também foram atenuadas no mutante Δfur de *C. violaceum*. Esse cenário é compatível com o mostrado em algumas outras bactérias, como em *X. vesicatoria*, onde a virulência do mutante *fur* em folhas de tomate é diminuída (LIU et al., 2016); em *S. enterica* sorotipo Typhi a interação e a sobrevivência de mutantes *fur* são diminuídas em macrófagos humanos (LECLERC; DOZOIS; DAIGLE, 2017); em *P. carotovorum* a colonização de tubérculos de batata é diminuída (TANUI et al., 2017); em *X. campestris*, é observado menor dano em folhas de repolho chinês (JITTAWUTTIPOKA et al., 2010).

Existem exemplos, no entanto, em que a virulência de mutantes *fur* é inalterada ou aumentada em relação à linhagem WT, como em *S. enterica* sorotipo Typhimurium onde não foram observadas diferenças em relação à linhagem WT na adesão e sobrevivência de mutantes *fur* em macrófagos (LECLERC; DOZOIS; DAIGLE, 2017). Em *E. coli* uropatogênica, mutantes Δfur tem a adesão e a internalização em células epiteliais da bexiga aumentadas quando comparados à linhagem WT. Os autores desse trabalho discutem que Fur é um regulador negativo da virulência de *E. coli* quando há suficiência de ferro no meio, mas em condições de carência do metal – o que se supõe que ocorra com o hospedeiro vertebrado no contexto de infecção por *E. coli* uropatogênica – outros fatores de virulência são expressos e aumentam a adesão e internalização da bactéria. Os autores acabam por sugerir que a inibição da atividade de Fur pode não ser um método eficaz para tratar infecções causadas por *E. coli* uropatogênica (KURABAYASHI et al., 2016).

Além da atenuação de virulência do mutante Δfur de *C. violaceum*, nosso grupo de pesquisa já descreveu um fenótipo semelhante para outros genes relacionados com a homeostase de ferro, como no mutante $\Delta cbaCEBA$, no mutante

duplo para os receptores dependentes de TonB $\Delta vbuA/\Delta cbuA$ e para o mutante duplo das sintetases de peptídeo não-ribossomal $\Delta cbaF/vbaF::pNPT$ (BATISTA et al., 2019). Como Fur regula estes genes, é possível que pelo menos parte do efeito de Fur na virulência de *C. violaceum* seja por Fur modular a síntese e a captação de sideróforos.

Uma observação importante quando analisamos o fenótipo de virulência diminuído nessas bactérias é a relação que pode haver entre a menor motilidade, crescimento e *fitness* celular com a atenuação de virulência, características presentes no mutante Δfur de *C. violaceum*. Para investigar se poderia haver uma relação entre o menor crescimento de Δfur com a atenuação de virulência, resolvemos utilizar o transposon T8, uma ferramenta previamente estabelecida no laboratório, para selecionar mutantes *fur* com inserções em que o *fitness* bacteriano fosse mais próximo ao da linhagem selvagem. Assim, poderíamos revisitar alguns fenótipos, como a atividade de sideróforos, o crescimento e quantificação de UFC em meio líquido, a motilidade do tipo *swimming* e a virulência. Dos mutantes obtidos, resolvemos caracterizar um em que houve inserção do transposon T8 em uma região de repetição de um dos locus CRISPR/Cas de *C. violaceum*. Através da utilização da ferramenta para análise de loci CRISPR em bactérias (SCRISPRdb, http://bioinfolab.miamioh.edu/crf/db_home.php), verificamos que *C. violaceum* possui quatro loci: CRISPR_1 (1.293.342 a 1.295.116 pb); CRISPR_2 (1.452.712 a 1.454.024 pb); CRISPR_3 (1.461.308 a 1.462.500 pb); CRISPR_4 (1.900.978 a 1.902.570 pb). A identificação do sítio de inserção mostrou que o transposon T8 inseriu-se no primeiro locus CRISPR, mais especificamente na última sequência espaçadora da região de repetição (regiões espaçadoras intercaladas por sequências repetitivas).

Alguns fenótipos da linhagem Δfur CRISPR/Cas::T8, como UFC e crescimento em meio líquido, indicam uma melhora no *fitness* desse mutante quando comparado ao mutante Δfur . Apesar disso, a virulência e a motilidade do tipo *swimming* mantiveram-se atenuadas em relação à linhagem WT. Outro aspecto interessante foi em relação ao crescimento em ágar, que foi melhorado na linhagem Δfur CRISPR/Cas::T8. Ao analisar a liberação de sideróforos em meio indicativo PSA-CAS, verificamos que o halo formado nesse mutante foi ainda maior do que o halo formado no mutante Δfur , sugerindo que o dado obtido para o mutante nulo encontra-se subestimado devido ao déficit de crescimento do mutante Δfur em meio sólido. Em

conjunto, essas análises demonstram que fenótipos importantes, como a virulência, não são exclusivamente dependentes do menor *fitness* de Δfur , mas podem estar relacionado com gene(s) e fator(es) de virulência alvos de regulação por Fur.

Embora não tenha sido investigada a relação entre a inserção do transposon T8 no locus CRISPR/Cas e a melhora de *fitness* do mutante Δfur de *C. violaceum*, podemos especular que os RNAs formados a partir das sequências espaçadoras possam exercer funções regulatórias além do mecanismo clássico de clivagem de genomas externos ao de *C. violaceum*. Na verdade, funções não canônicas de loci CRISPR já foram relatadas em diferentes bactérias (BONDY-DENOMY; DAVIDSON, 2014). Em *Francisella novicida*, foi descrita a regulação gênica endógena de uma lipoproteína bacteriana mediada por um RNA associado a CRISPR/Cas. Essa regulação mostrou-se necessária para a completa virulência da bactéria em camundongos (SAMPSON et al., 2013).

Por fim, um aspecto importante quando considerado o estudo de fatores de transcrição é a definição global dos genes alvos de sua regulação, que infelizmente não foi realizado para Fur e Zur de *C. violaceum*. Apesar disso, identificamos um possível Fur-box em genes de síntese e captação de sideróforos de *C. violaceum* e validamos genes do regulon Fur por ensaio de atividade de β -galactosidase. Definimos que em meio LB, mas não em meio M9HC, *C. violaceum* está em suficiência de ferro, uma vez que a expressão de *pcbaF* e *pcbuA* em meio LB é igual ao meio sem a adição de ferro, mas esta expressão só atinge níveis basais em M9HC quando ferro é adicionado ao meio.

5.2. Caracterização de Zur na homeostase de zinco em *C. violaceum*

Ao identificar o gene *zur* no genoma de *C. violaceum* percebemos que ele parecia parte de um operon com outros genes potencialmente envolvidos em homeostase de zinco, uma característica amplamente presente em diversas bactérias (MIKHAYLINA et al., 2018). O operon predito *in silico* em *C. violaceum* e confirmado por RT-PCR codifica Zur, uma possível metalochaperona (CV_3067), uma proteína hipotética (CV_RS15040) e o transportador ZnuABC. Inicialmente, associamos este operon com Zur e zinco de duas maneiras: i) Por análise *in silico* foi possível identificar em várias espécies do gênero *Chromobacterium* um possível sítio de ligação de Zur (Zur-box) imediatamente a montante de *zur*, o primeiro gene do operon; ii) Utilizando o sistema repórter *lacZ* (*pzur-lacZ*) foi determinado que a expressão da região

promotora de *zur* (*pzur*) é reprimida por Zur em suficiência de zinco e desreprimida em carência deste metal.

Quanto ao possível Zur-box identificado em *C. violaceum*, destacamos que ele mostra grande semelhança com sítios descritos já caracterizados de Zur de *P. protegens* (LIM et al., 2013) e *N. meningitidis* (PAWLIK et al., 2012). Em *Agrobacterium tumefaciens*, foi utilizado o ensaio de DNase I footprint para identificação do dois Zur-box entre os genes *znuA* e o operon adjacente contendo *znuC*, *znuB* e *zur* (NUONMING et al., 2020). Em outras bactérias, como *E. coli*, embora Zur seja o repressor do operon contendo os genes para o transportador ZnuABC, *zur* não é codificado no mesmo operon e não foram encontradas evidências de que Zur seja autorregulado (PATZER; HANTKE, 2000).

As principais diferenças observadas durante a caracterização dos mutantes Δzur , ΔCV_3067 e $\Delta znuCBA$ relacionam-se com o mutante do transportador ZnuABC em relação à linhagem WT. Notadamente, demonstramos a importância deste transportador na manutenção da homeostase de zinco em *C. violaceum* devido à maior sensibilidade à carência de zinco que $\Delta znuCBA$ mostrou quando em comparação à linhagem WT. Nesses ensaios foram utilizados o quelante de cátions divalente EDTA ou a proteína humana CP purificada. Nas curvas de crescimento, só foram observadas diferenças quando as culturas foram tratadas com cada agente quelante previamente a realização do ensaio, estratégia já utilizada em outras bactérias como *P. aeruginosa*, onde o pré-tratamento das culturas WT ou $\Delta znuA$ com TPEN 10 μM induziu uma queda na densidade celular quando as curvas foram realizadas com 30 ou 60 μM de TPEN (PEDERICK et al., 2015). Entretanto, no trabalho com *P. aeruginosa* o pré-tratamento também surtiu efeito no crescimento da linhagem selvagem, fato não observado em *C. violaceum* tanto no tratamento com EDTA quanto no tratamento com CP WT.

Demonstramos que *C. violaceum* é mais resistente ao tratamento com CP quando comparada a outras bactérias e que ZnuABC tem importante papel nesta resistência, pois o mutante $\Delta znuCBA$ foi sensível ao tratamento com CP. A resistência de *C. violaceum* a CP foi determinada por IC₅₀, que ficou aproximadamente 500 $\mu g/ml$ para a linhagem WT enquanto que em *S. aureus*, por exemplo, a IC₅₀ é de aproximadamente 100 $\mu g/ml$ (DAMO et al., 2013). Esse dado sugere que a presença do transportador ZnuABC pode ser de grande importância para *C. violaceum* superar a imunidade nutricional imposta pelo hospedeiro. Além disso, esse dado é

corroborado com a atenuação de virulência e colonização do fígado observado para o mutante $\Delta znuCBA$, fenótipo que também já foi descrito em outras bactérias. Em *S. enterica* sorotipo Typhimurium, a virulência do mutante *znuA::kan* em camundongos da linhagem BALB/c e DBA-2 é diminuída em relação à linhagem WT, independente da via de infecção (intraperitoneal ou oral) (AMMENDOLA et al., 2007). Em *Y. pestis*, o mutante $\Delta znuA$ tem atenuação na virulência em modelo de infecção em camundongos, assim como o mutante $\Delta zntA/zur::kan$ (BOBROV et al., 2017). ZntA codifica uma ATPase do tipo P responsável pelo efluxo de zinco (RENSING; MITRA; ROSEN, 1997).

Em *C. violaceum*, o perfil de virulência do mutante Δzur foi o mesmo da linhagem WT. O fenótipo de virulência de mutantes *zur* é variável em bactérias e pode estar relacionado com a regulação de sistemas de efluxo de zinco para evitar a intoxicação com este metal decorrente do seu maior influxo, uma vez que a expressão do transportador ZnuABC encontra-se aumentada na ausência de Zur. Em *A. tumefaciens*, por exemplo, o mutante *zur* e o mutante combinado *znuA/znuB* não apresentam diferença no perfil de virulência de plantas da espécie *Nicotiana benthamiana*, demonstrando que genes relacionados com a homeostase de zinco possuem menos importância na determinação de virulência de *A. tumefaciens* (BHUBHANIL et al., 2014). No entanto, em *X. oryzae*, a virulência do mutante *zur* foi atenuada em folhas de arroz em comparação à linhagem WT (YANG et al., 2007). Uma estratégia interessante para corroborar a hipótese de que o maior efluxo de zinco possa contribuir para não atenuar a virulência, é a geração de mutantes combinados *zur* e *zntA*, conforme previamente descrito para *Y. pestis* (BOBROV et al., 2017).

Além dos transportadores para influxo e efluxo de zinco, algumas bactérias podem utilizar mecanismos alternativos para a captação deste metal, como por exemplo a síntese de moléculas especializadas chamadas de metalóforos (ou zincóforos), como *staphylopine* em *Staphylococcus aureus* (GHSSEIN et al., 2016; GRIM et al., 2017) e *pseudopaline* em *P. aeruginosa* (LHOSPICE et al., 2017). Além disso, a aquisição de zinco pode ser mediada por sideróforos, como o metalóforo *yersiniabactin* sintetizado por *Y. pestis* e *E. coli* e utilizando na aquisição de ferro, zinco e níquel (BEHNSEN et al., 2018; BOBROV et al., 2014; ROBINSON et al., 2018). Esses mecanismos podem explicar o porquê do mutante $\Delta znuCBA$ de *C. violaceum* ser capaz de crescer em condições de carência de zinco, como nos tratamentos com EDTA e CP sem pré-tratamento, sugerindo a existência de mecanismos secundários

para a aquisição desse metal. O fato do mutante $\Delta cbaCEBA\Delta znuCBA$ apresentar grande atraso nas curvas de crescimento pré-tratadas com o agente quelante EDTA quando comparado à linhagem WT ou aos mutantes simples $\Delta cbaCEBA$ e $\Delta znuCBA$ e a regulação de *vbuA* em EDTA são evidências ainda preliminares de que os sideróforos de *C. violaceum* poderiam estar relacionados com a aquisição de zinco.

Além da virulência bacteriana, também foi avaliado se o comprometimento da homeostase de zinco no mutante $\Delta znuCBA$ poderia afetar a capacidade de *C. violaceum* competir e se sobressair em co-cultura com outras bactérias. De maneira geral, foi demonstrado que a suplementação do meio com zinco não melhorou significativamente a competição de *C. violaceum* e que o mutante $\Delta znuCBA$ competiu pior com as bactérias avaliadas. Esse aspecto também já foi investigado na interação de *Streptococcus sanguinis* e *P. aeruginosa* (LI et al., 2020). Nesse trabalho, os autores realizaram uma varredura genética para identificar mutantes de *S. sanguinis* cujo crescimento não é melhorado na presença de *P. aeruginosa*. Dos mutantes encontrados, os autores caracterizaram quatro transportadores do tipo ABC responsáveis pela aquisição de zinco em *S. sanguinis*, demonstrando a importância da manutenção da homeostase desse metal no contexto de infecções polimicrobianas.

A importância de zinco para a motilidade do tipo *swimming* em *C. violaceum* foi demonstrada na linhagem WT e no mutante $\Delta znuCBA$. Uma vez que genes importantes para essa via requerem zinco (AMMENDOLA et al., 2016; NIELUBOWICZ; SMITH; MOBLEY, 2010), seria esperado encontrar certa atenuação da motilidade quando se estudam mutantes em que a aquisição de zinco é comprometida. Em *E. coli* uropatogênica, por exemplo, a motilidade do tipo *swimming* do mutante $\Delta znuB$ também é diminuída em relação a linhagem WT (GUNASEKERA; HERRE; CROWDER, 2009). Em *P. aeruginosa*, o mesmo fenótipo é observado no mutante $\Delta znuA\Delta zrmA$ (MASTROPASQUA et al., 2018). ZrmA codifica para o receptor dependente de TonB responsável pela captação do metalóforo sintetizado por *P. aeruginosa* (MASTROPASQUA et al., 2017).

A formação de biofilme em meio LB não foi modificada em relação à linhagem WT nos mutantes Δzur , ΔCV_3067 e $\Delta znuCBA$. Entretanto, quando o cultivo foi feito em meio suplementado com EDTA 100 μM , houve uma diminuição geral na formação de biofilme em *C. violaceum* e que foi mais acentuado no mutante $\Delta znuCBA$. Os efeitos do tratamento do EDTA na formação de biofilme já foram descritos em

Listeria monocytogenes, onde a adição de EDTA 100 μ M no início da formação do biofilme impede a adesão das células e, conseqüentemente, diminui a formação do biofilme (CHANG; GU; MCLANDBOROUGH, 2012). É importante salientar que esse efeito inibitório só foi observado quando o tratamento foi adicionado no início do experimento, da mesma maneira realizada em *C. violaceum*; quando adicionado às 8 h de cultivo, EDTA se mostrou ineficaz na diminuição da formação de biofilme (CHANG; GU; MCLANDBOROUGH, 2012). Em conjunto, pode-se sugerir que tanto a presença de zinco quanto a sua captação são importantes para a formação de biofilme em *C. violaceum*.

Ao considerar a susceptibilidade a antibióticos da classe dos β -lactâmicos, foi verificado que o tratamento prévio com EDTA aumentou a sensibilidade do mutante $\Delta znuCBA$ a antibióticos quando comparado às linhagens WT e Δzur . As enzimas β -lactamases inativam antibióticos β -lactâmicos ao hidrolisarem o anel β -lactâmico destes antibióticos. As metalo- β -lactamases utilizam zinco nesta hidrólise (BEBRONE, 2007; GONZÁLEZ et al., 2007; KARSISIOTIS; DAMBLON; ROBERTS, 2014). *C. violaceum* possui duas potenciais enzimas β -lactamases, CV_1310 e CV_3150. Assim, sugere-se que o tratamento prévio com EDTA leva a uma diminuição drástica dos níveis intracelulares de zinco no mutante $\Delta znuCBA$, o que acarreta no comprometimento de várias vias, incluindo a resistência a antibióticos.

Um fenótipo observado no mutante Δzur de *C. violaceum* foi a maior produção e/ou secreção de moléculas autoindutoras de *quorum sensing*. O *quorum sensing* em *C. violaceum* é determinante para a síntese de violaceína através do operon *vioABCDE*, que é regulado negativamente por VioS e positivamente por CviR/Cvil (DEVESCOVI et al., 2017). Até o momento, nenhum trabalho demonstrou a relação de Zur com a regulação direta ou indireta de genes envolvidos com a síntese de violaceína. Mais ensaios são necessários para determinar esse possível envolvimento. A única relação encontrada entre Zur e *quorum sensing* foi em *X. campestris*, onde foi demonstrado que o sistema de dois componentes RpfC/RpfG participa na transdução de sinal da molécula de sinalização DSF (do inglês, *diffusible signal factor*), que modula os níveis de c-di-GMP. Os níveis de DSF, por sua vez, são regulados por Clp, que compartilha seu regulon com outros dois reguladores, FhrR e Zur (HE et al., 2007; HE; ZHANG, 2008).

Além do regulador Zur e do transportador ZnuABC, o operon de *C. violaceum* codifica duas proteínas não caracterizadas (CV_3067 e CV_RS15040). A

proteína CV_3067 possui um domínio C-terminal CobW e é anotada como uma proteína relacionada com a síntese de cobalamina. No banco de dados filogenômico eggNOG, a proteína é classificada como pertencente ao COG0523, uma família de G3E GTPases. Apesar da presença do domínio CobW, um outro operon de *C. violaceum*, que contém o gene CV_1561, possui diversas outras proteínas preditas para a síntese de cobalamina. Assim, sugere-se que a anotação para o gene CV_3067 esteja incorreta, e a atividade dessa proteína seja diferente da predita. Em relação à classificação filogenômica, membros do COG0523 estão distribuídos em Archea, Bacteria e Eucariotos e, em várias bactérias, membros desse grupo relacionam-se com o homeostase de zinco e a virulência bacteriana (HAAS et al., 2009). Em *Brucella melitensis*, por exemplo, *yciC*, que codifica uma proteína do COG0523, é transcrito adjacente à *znuA* e divergente à *znuC*, *znuB* e *zur* (HAAS et al., 2009). Quanto a sua função, estima-se que membros desse grupo atuem facilitando a incorporação de zinco a proteínas (PANINA; MIRONOV; GELFAND, 2003). Em *B. subtilis*, por exemplo, foi demonstrado que YciC (renomeado ZagA) liga-se a GTP e interage com FolE para manter a biossíntese de folato em condições de carência de zinco (CHANDRANGSU et al., 2019). Em *E. coli*, a proteína YeiR foi caracterizada quanto a sua atividade de GTPase. Foi demonstrado que mutantes $\Delta yeiR$ são mais sensíveis ao tratamento com EDTA (BLABY-HAAS et al., 2012), o que é consistente com nossos dados ainda preliminares para o mutante CV_3067 de *C. violaceum*. Em *A. tumefaciens*, o gene *atu3184*, que codifica uma proteína do COG0523, foi caracterizado. Os autores demonstraram que esse gene é regulado por Zur, mas o mutante *atu3184::Gm* não tem maior sensibilidade a carência de zinco induzida por tratamento com EDTA e nem atenuação de virulência em folhas de *N. benthamiana* (KHEMTHONG et al., 2019). Em *C. violaceum*, são necessários mais experimentos para definir a função de CV_3067 e comprovar que essa proteína esteja envolvida com a homeostase de zinco.

A partir das análises e comparações *in silico* da proteína hipotética CV_RS15040 de *C. violaceum*, hipotetizamos que essa proteína possa ser uma especialização presente em poucas β -proteobactérias, sobretudo da ordem Neisseriales, e que este gene possa ter sido transferido horizontalmente a outras bactérias filogeneticamente distantes (como as raras presenças encontradas em α e γ -proteobactérias). Em relação a sua função, uma vez que em *Halomonas massiliensis*, *Bradyrhizobium canariense* e *Methylophila* sp. os genes ortólogos de

CV_RS15040 são encontrados adjacentes aos genes do transportador ZnuABC, sugere-se que sua função seja acessória a este transportador. Na literatura não existem evidências da existência e caracterização de proteínas similares a esta encontrada em *C. violaceum*. O relato mais próximo são das proteínas da tríade de poli-histidina (Pht, do inglês, *polyhistidine triad proteins*) encontradas na superfície de estreptococos patogênicos, desempenhando diferentes funções como manutenção da homeostase de metais e aderência bacteriana às células do hospedeiro (PLUMPTRE; OGUNNIYI; PATON, 2012). Entretanto, é importante ressaltar que apesar de conter um domínio HxxHxH em tríade, similar ao que ocorre com CV_RS15040, essas proteínas são muito diferentes em relação ao tamanho (são maiores) e à localização dos genes no genoma (não estão adjacentes a genes de captação de zinco). Quanto à sua regulação, os genes *pht* são alvo do regulador AdcR, um regulador com atividade repressora e ativadora de genes relacionados a homeostase de zinco em estreptococos (MAKTHAL et al., 2020).

Da mesma maneira que o regulador Fur, ensaios adicionais para a caracterização do regulon Zur de *C. violaceum* são necessários, com o intuito de elucidar outras vias que possam estar comprometidas na bactéria e que não foram caracterizadas nesse trabalho, assim como fornecer evidências mais robustas para confirmação de alguns fenótipos avaliados. Portanto, destaca-se a importância de ambos os reguladores da família Fur na fisiologia e na homeostase de ferro e zinco em *C. violaceum*, assim como sua relevância na virulência desta bactéria.

6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho caracterizamos os fatores de transcrição Fur e Zur como envolvidos na homeostase de ferro e de zinco em *Chromobacterium violaceum*, demonstrando sua importância para uma ampla gama de processos relacionados a fisiologia e virulência desta bactéria. As principais conclusões do trabalho foram:

- ◆ Fur possui um papel importante no controle da homeostase de ferro, atuando como repressor de genes relacionados a síntese e captação de sideróforos em condições de suficiência de ferro;
- ◆ No mutante espontâneo Fur^{R40S} a proteína Fur permanece parcialmente funcional, permitindo usar esta linhagem para caracterizar alguns processos controlados por Fur, como produção de sideróforos e resposta a ROS;
- ◆ *C. violaceum* tolera a ausência total de Fur somente em condição de limitação de ferro, na qual foi possível obter o mutante nulo Δfur , indicando que Fur é condicionalmente essencial nesta bactéria;
- ◆ Fur é importante para o crescimento em condições regulares de cultivo, assim como para a produção de biofilme e para a motilidade do tipo *swimming*;
- ◆ A interferência com a homeostase de ferro no mutante Δfur se revela pela intrínseca produção de ROS e maior susceptibilidade deste mutante ao estresse oxidativo e ao excesso de ferro;
- ◆ O crescimento comprometido do mutante Δfur não é o único responsável pelos fenótipos caracterizados, uma vez que inserção de transposon em um locus CRISPR/Cas resgata o *fitness* do mutante, mas mantém outros fenótipos;
- ◆ O regulador Zur atua como repressor de um operon que codifica Zur, duas proteínas hipotéticas e o transportador de alta afinidade ZnuABC;
- ◆ Os principais fenótipos relacionados com a homeostase de zinco são decorrentes da ausência de ZnuABC, e se revelam como a maior susceptibilidade a carência de zinco induzida por EDTA ou calprotectina;
- ◆ Foi demonstrada a necessidade de manter níveis fisiológicos de zinco via ZnuABC para síntese de violaceína, formação de biofilme e competição bacteriana;
- ◆ O regulador Fur e o transportador ZnuABC têm papel importante na virulência de *C. violaceum*, demonstrando a relevância que a homeostase de ferro e de zinco possui na relação desta bactéria com o hospedeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- AJIBOYE, T. O.; SKIEBE, E.; WILHARM, G. Contributions of Ferric Uptake Regulator Fur to the sensitivity and oxidative response of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics. **Microbial Pathogenesis**, v. 119, p. 35-41, 2018.
- ALBERTS, I. L.; NADASSY, K.; WODAK, S. J. Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. **Protein Science**, v. 7, n. 8, p. 1700-1716, 1998.
- AMMENDOLA, S. et al. Zinc is required to ensure the expression of flagella and the ability to form biofilms in *Salmonella enterica* sv Typhimurium. **Metallomics**, v. 8, n. 10, p. 1131-1140, 2016.
- AMMENDOLA, S. et al. High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5867-5876, 2007.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K. RODRIGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 215-237, 2003.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D.; SEIDMAN, J. In: **Short Protocols in Molecular Biology**. 3^a ed. [s.l.]: Greene Publishing Associates and John Wiley & Sens, 1993.
- AZIMI, S.; KLEMENTIEV, A. D.; WHITELEY, M.; DIGGLE, S. P. Bacterial Quorum Sensing During Infection. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 201–219, 2020.
- BAGG, Anne; NEILANDS, J. B. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 26, n. 17, p. 5471-5477, 1987.
- BAGGS, R. B.; MILLER, S. A. Nutritional iron deficiency as a determinant of host resistance in the rat. **The Journal of Nutrition**, v. 103, n. 11, p. 1554-1560, 1973.
- BARON, Ellen J.; PROCTOR, R. A. Elicitation of peritoneal polymorphonuclear neutrophils from mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 49, n. 3, p. 305-313, 1982.

¹ As citações e referências bibliográficas adotadas nesta tese adotam o sistema Autor-Data, de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP, 3^a edição.

- BARROSO, K. C. M. et al. EmrR-dependent upregulation of the efflux pump EmrCAB contributes to antibiotic resistance in *Chromobacterium violaceum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2756, 2018.
- BARTON, H. A. et al. Ferric Uptake Regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 1001-1017, 1996.
- BATISTA, B. B. et al. Production and uptake of distinct endogenous catecholate-type siderophores are required for iron acquisition and virulence in *Chromobacterium violaceum*. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 12, p. e00577-19, 2019.
- BATISTA, J. H.; DA SILVA NETO, J. F. *Chromobacterium violaceum* pathogenicity: updates and insights from genome sequencing of novel *Chromobacterium* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2213, 2017.
- BATISTA, J. H. et al. Interplay between two quorum sensing-regulated pathways, violacein biosynthesis and VacJ/Yrb, dictates outer membrane vesicle biogenesis in *Chromobacterium violaceum*. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 2432-2442, 2020.
- BEBRONE, C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 12, p. 1686-1701, 2007.
- BECERRA, G. et al. Characterization of a Ferric Uptake Regulator (Fur)-mutant of the cyanotrophic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. **Journal of Biotechnology**, v. 190, p. 2-10, 2014.
- BECKER, K. W.; SKAAR, E. P. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 6, p. 1235-1249, 2014.
- BEGG, S. L. The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 1, p. 77-87, 2019.
- BEHNSEN, J. et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Uses Zinc Transporters and the Siderophore Yersiniabactin to Acquire Zinc in the Inflamed Gut and Outcompete *Salmonella* Typhimurium. **The FASEB Journal**, v. 31, p. 622.6-622.6, 2017.

- BEIER, D.; GROSS, R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 143-152, 2006.
- BENSON, H. P.; LEVIER, K.; GUERINOT, M. L. A dominant-negative *fur* mutation in *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1409-1414, 2004.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Hemoglobin transports oxygen efficiently by binding oxygen cooperatively. **Biochemistry**, v. 5, 2002.
- BERGONZINI, C. Um nuovo bacterio colorato. **Ann. Soc. Natural. Modena. Ser.**, v. 2, n. 14, p. 149-158, 1881.
- BERTRAND, R. L. Lag phase-associated iron accumulation is likely a microbial counter-strategy to host iron sequestration: role of the Ferric Uptake Regulator (Fur). **Journal of Theoretical Biology**, v. 359, p. 72-79, 2014.
- BERTRAND, R. L. Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 7, p. e00697-18, 2019.
- BHUBHANIL, S. et al. Control of zinc homeostasis in *Agrobacterium tumefaciens* via *zur* and the zinc uptake genes *znuABC* and *zinT*. **Microbiology**, v. 160, n. 11, p. 2452-2463, 2014.
- BLABY-HAAS, C. E. et al. YeiR: a metal-binding GTPase from *Escherichia coli* involved in metal homeostasis. **Metallomics**, v. 4, n. 5, p. 488-497, 2012.
- BLENCOWE, D. K.; MORBY, A. P. Zn (II) metabolism in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 291-311, 2003.
- BOBROV, A. G. et al. Zinc transporters YbtX and ZnuABC are required for the virulence of *Yersinia pestis* in bubonic and pneumonic plague in mice. **Metallomics**, v. 9, n. 6, p. 757-772, 2017.
- BOBROV, A. G. et al. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicaemic plague in mice. **Molecular Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 759-775, 2014.
- BONDY-DENOMY, J.; DAVIDSON, A. R. To acquire or resist: the complex biological effects of CRISPR–Cas systems. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 218-225, 2014.

- BOTELLA, H. et al. Mycobacterial P1-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. **Cell Host & Microbe**, v. 10, n. 3, p. 248-259, 2011.
- BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 11660-11665, 2003.
- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.
- BURNSIDE, D. M. et al. The *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin is a polycarboxylate that is identical in structure to rhizoferrin. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 10, p. 3937-3945, 2015.
- BUTCHER, J. et al. Structure and regulon of *Campylobacter jejuni* Ferric Uptake Regulator Fur define apo-Fur regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 25, p. 10047-10052, 2012.
- CALDAS, L.R. Photochemistry and photobiology in a virgin land. **Photochemistry and Photobiology**, v. 26, n. 1, p. 1-2, 1977.
- CAPDEVILA, D. A.; WANG, J.; GIEDROC, D. P. Bacterial strategies to maintain zinc metallostasis at the host-pathogen interface. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 40, p. 20858-20868, 2016.
- CASSON, C. N. et al. Caspase-11 activation in response to bacterial secretion systems that access the host cytosol. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003400, 2013.
- CAUZ, A. C. G. et al. Violacein targets the cytoplasmic membrane of bacteria. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 539-549, 2019.
- CERASI, M. et al. The ZupT transporter plays an important role in zinc homeostasis and contributes to *Salmonella enterica* virulence. **Metallomics**, v. 6, n. 4, p. 845-853, 2014.
- CHANDRANGSU, P. et al. *Bacillus subtilis* FoIE is sustained by the ZagA zinc metallochaperone and the alarmone ZTP under conditions of zinc deficiency. **Molecular Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 751-765, 2019.

- CHANDRANGSU, P.; RENSING, C.; HELMANN, J. D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 338-350, 2017.
- CHANG, Y.; GU, W.; MCLANDBOROUGH, L. Low concentration of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) affects biofilm formation of *Listeria monocytogenes* by inhibiting its initial adherence. **Food Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 10-17, 2012.
- CHATTERJEE, S.; SONTI, R. V. *rpfF* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v. 15, n. 5, p. 463-471, 2002.
- CHOI, S. Y. et al. *Chromobacterium violaceum* delivers violacein, a hydrophobic antibiotic, to other microbes in membrane vesicles. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 705-713, 2020.
- CHOI, S.H. et al. Zinc-dependent regulation of zinc import and export genes by Zur. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2017.
- COLOMER-WINTER, C. et al. Manganese acquisition is essential for virulence of *Enterococcus faecalis*. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. e1007102, 2018.
- CONRAD, M. E.; UMBREIT, J. N. Iron absorption and transport—an update. **American Journal of Hematology**, v. 64, n. 4, p. 287-298, 2000.
- COUSINS, R. J.; LIUZZI J. P.; LICHTEN, L.A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 24085-24089, 2006.
- COYKENDALL, A. L. Proposal to elevate the subspecies of *Streptococcus mutans* to species status, based on their molecular composition. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 26-30, 1977.
- CROOKS, C.; PALMER, J. M.; LINDNER, D. L. Draft genome sequence of *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, a polyhydroxybutyrate-co-valerate copolymer-producing bacterium. **Genome Announcements**, v. 6, n. 17, p. e00348-18, 2018.
- D'AUTREAU, B. et al. Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 26, p. 16619-16624, 2002.

- DA SILVA NETO, J. F. et al. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 14, p. 4812-4825, 2009.
- DA SILVA NETO, J. F.; NEGRETTO, C. C.; NETTO, L. E. S. Analysis of the organic hydroperoxide response of *Chromobacterium violaceum* reveals that OhrR is a cys-based redox sensor regulated by thioredoxin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47090, 2012.
- DAMO, S. M. et al. Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 10, p. 3841-3846, 2013.
- DAVIES, B. W.; BOGARD, R. W.; MEKALANOS, J. J. Mapping the regulon of *Vibrio cholerae* Ferric Uptake Regulator expands its known network of gene regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 30, p. 12467-12472, 2011.
- DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; SCARLATO, V. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1081-1090, 2004.
- DENG, Z. et al. Mechanistic insights into metal ion activation and operator recognition by the Ferric Uptake Regulator. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2015.
- DEPAS, W. H. et al. Iron induces bimodal population development by *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 7, p. 2629-2634, 2013.
- DEVESCOVI, G. et al. Negative regulation of violacein biosynthesis in *Chromobacterium violaceum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 349, 2017.
- DIETRICH, L. E. P. et al. Bacterial community morphogenesis is intimately linked to the intracellular redox state. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 7, p. 1371-1380, 2013.
- DUNN, J.-OC; MYTHEN, M. G.; GROCCOTT, M. P. Physiology of oxygen transport. **Bja Education**, v. 16, n. 10, p. 341-348, 2016.

- DURÁN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201-222, 2001.
- EIJKELKAMP, B. A.; MCDEVITT, C. A.; KITTEN, T. Manganese uptake and streptococcal virulence. **Biometals**, v. 28, n. 3, p. 491-508, 2015.
- ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S.. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In: **Advanced Protocols in Oxidative Stress**. Humana Press, Totowa, NJ, 2010. p. 57-72.
- FEELEY, E. M. et al. Galectin-3 directs antimicrobial guanylate binding proteins to vacuoles furnished with bacterial secretion systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 9, p. E1698-E1706, 2017.
- FILLAT, M. F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 546, p. 41-52, 2014.
- FLEMMING, H. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.
- FRAKER, P. J.; CARUSO, R.; KIERSZENBAUM, F.. Alteration of the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Nutrition**, v. 112, n. 6, p. 1224-1229, 1982.
- FRAWLEY, E. R.; FANG, F. C. The ins and outs of bacterial iron metabolism. **Molecular Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 609-616, 2014.
- FRIEDMAN, Y. E.; O'BRIAN, M. R. The Ferric Uptake Regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum* is an iron-responsive transcriptional repressor *in vitro*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32100-32105, 2004.
- FÜLLER, J. J. et al. Biosynthesis of violacein, structure and function of L-Tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 38, p. 20068-20084, 2016.
- GADDY, J. A. et al. The host protein calprotectin modulates the *Helicobacter pylori* *cag* type IV secretion system via zinc sequestration. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004450, 2014.

- GAL-MOR, O.; FINLAY, B. B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1707-1719, 2006.
- GANZ, T.; NEMETH, E. Hepcidin and iron homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 9, p. 1434-1443, 2012.
- GHOSH, A. R. Appraisal of microbial evolution to commensalism and pathogenicity in humans. **Clinical Medicine Insights: Gastroenterology**, v. 6, p. CGast. S11858, 2013.
- GHSSEIN, G. et al. Biosynthesis of a broad-spectrum nicotianamine-like metallophore in *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 352, n. 6289, p. 1105-1109, 2016.
- GILSTON, B. A. et al. Structural and mechanistic basis of zinc regulation across the *E. coli* Zur regulon. **PLoS Biology**, v. 12, n. 11, p. e1001987, 2014.
- GOBER, J. W.; SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. **Molecular Biology of the Cell**, v. 3, n. 8, p. 913-926, 1992.
- GONZÁLEZ, J. M. et al. The Zn²⁺ position in metallo-β-lactamases is critical for activity: a study on chimeric metal sites on a conserved protein scaffold. **Journal of Molecular Biology**, v. 373, n. 5, p. 1141-1156, 2007.
- GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial secretion systems: an overview. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, p. 4.1. 13, 2016.
- GREEN, J.; ROLFE, M. D.; SMITH, L. J. Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide. **Virulence**, v. 5, n. 8, p. 794-809, 2014.
- GRIM, K. P. et al. The metallophore staphylopine enables *Staphylococcus aureus* to compete with the host for zinc and overcome nutritional immunity. **mBio**, v. 8, n. 5, p. e01281-17, 2017.
- GRUNENWALD, C. M. et al. Manganese detoxification by MntE is critical for resistance to oxidative stress and virulence of *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 10, n. 1, p. e02915-18, 2019.
- GUNASEKERA, T. S.; HERRE, A. H.; CROWDER, M. W. Absence of ZnuABC-mediated zinc uptake affects virulence-associated phenotypes of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073 under Zn (II)-depleted conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 300, n. 1, p. 36-41, 2009.

- GUTTERIDGE, J. M. C. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. **FEBS Letters**, v. 201, n. 2, p. 291-295, 1986.
- HA, D. G.; KUCHMA, S. L.; O'TOOLE, G. A. Plate-based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. In: **Pseudomonas Methods and Protocols**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 59-65.
- HAAS, C. E. et al. A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 1-21, 2009.
- HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W. Regulation of biological nitrogen fixation. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1081-1084, 2000.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.
- HANTKE, K. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: Fur not only affects iron metabolism. **Molecular and General Genetics**, v. 210, n. 1, p. 135-139, 1987.
- HANTKE, K. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. **Molecular and General Genetics**, v. 182, n. 2, p. 288-292, 1981.
- HANTKE, K. Bacterial zinc transporters and regulators. **Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis**, p. 53-63, 2001.
- HANTKE, K. Iron and metal regulation in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 172-177, 2001.
- HANTKE, K. Bacterial zinc uptake and regulators. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 196-202, 2005.
- HASSETT, D. J. et al. Ferric Uptake Regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 3996-4003, 1996.
- HE, Y. W. et al. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 281-292, 2007.

- HE, Y. W.; ZHANG, L. H. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 5, p. 842-857, 2008.
- HOOD, M. I. et al. Identification of an *Acinetobacter baumannii* zinc acquisition system that facilitates resistance to calprotectin-mediated zinc sequestration. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 12, p. e1003068, 2012.
- HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 525-537, 2012.
- HUANG, D. L. et al. The Zur of *Xanthomonas campestris* functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 13, p. 4295-4309, 2008.
- HUBER, P. et al. *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, n. 5, p. 564-571, 2016.
- JACOBS, M. A. et al. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14339-14344, 2003.
- JIN, B. et al. Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1185-1198, 2006.
- JITTAWUTTIPOKA, T. et al. Mutations of ferric uptake regulator (*fur*) impair iron homeostasis, growth, oxidative stress survival, and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 5, p. 331-339, 2010.
- JOHNSON, D. I. Bacterial virulence factors. In: **Bacterial Pathogens and their Virulence Factors**. Springer, Cham, 2018. p. 1-38.
- JOHNSON, R. et al. The type III secretion system effector SptP of *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 4, p. e00647-16, 2017.
- JOO, H.S.; OTTO, M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 12, p. 1503-1513, 2012.

- KAHL, L. J.; PRICE-WHELAN, A.; DIETRICH, L. E. P. Light-mediated decreases in cyclic di-GMP levels inhibit structure formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 202, n. 14, p. e00117-20, 2020.
- KAMBE, T. et al. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 3, p. 749-784, 2015.
- KANDARI, D.; JOSHI, H.; BHATNAGAR, R.. Zur: Zinc-sensing transcriptional regulator in a diverse set of bacterial species. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 344, 2021.
- KAPETANOVIC, R. et al. *Salmonella* employs multiple mechanisms to subvert the TLR-inducible zinc-mediated antimicrobial response of human macrophages. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 5, p. 1901-1912, 2016.
- KARSISIOTIS, A. I.; DAMBLON, C. F.; ROBERTS, G. C. K. A variety of roles for versatile zinc in metallo- β -lactamases. **Metallomics**, v. 6, n. 7, p. 1181-1197, 2014.
- KEHL-FIE, T. E. et al. Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. **Cell Host & Microbe**, v. 10, n. 2, p. 158-164, 2011.
- KEHL-FIE, T. E.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 2, p. 218-224, 2010.
- KHEMTHONG, S. et al. The *Agrobacterium tumefaciens atu3184* gene, a member of the COG0523 family of GTPases, is regulated by the transcriptional repressor Zur. **Microbiological Research**, v. 222, p. 14-24, 2019.
- KLINE, K. A. et al. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 6, p. 580-592, 2009.
- KOZLYUK, N. et al. S100 proteins in the innate immune response to pathogens. In: **Calcium-Binding Proteins of the EF-Hand Superfamily**. Humana Press, New York, NY, 2019. p. 275-290.
- KURABAYASHI, K. et al. Fur represses adhesion to, invasion of, and intracellular bacterial community formation within bladder epithelial cells and motility in uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 11, p. 3220-3231, 2016.

- LAMONT, I. L.; KONINGS, A. F.; REID, D. W. Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. **Biometals**, v. 22, n. 1, p. 53-60, 2009.
- LATORRE, M. et al. The role of Fur in the transcriptional and iron homeostatic response of *Enterococcus faecalis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1580, 2018.
- LEADEN, L. et al. Iron deficiency generates oxidative stress and activation of the SOS response in *Caulobacter crescentus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2014, 2018.
- LECLERC, J. M.; DOZOIS, C. M.; DAIGLE, F. *Salmonella enterica* serovar Typhi siderophore production is elevated and Fur inactivation causes cell filamentation and attenuation in macrophages. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 15, 2017.
- LEE, A. Y. et al. Inactivation of Ferric Uptake Regulator (Fur) attenuates *Helicobacter pylori* J99 motility by disturbing the flagellar motor switch and autoinducer-2 production. **Helicobacter**, v. 22, n. 4, p. e12388, 2017.
- LEIJH, P. C. et al. Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 448-452, 1984.
- LHOSPICE, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
- LI, K. et al. Availability of zinc impacts interactions between *Streptococcus sanguinis* and *Pseudomonas aeruginosa* in coculture. **Journal of Bacteriology**, v. 202, n. 2, p. e00618-19, 2020.
- LIM, C. K. et al. The effect of zinc limitation on the transcriptome of *Pseudomonas protegens* Pf-5. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 702-715, 2013.
- LIN, J. et al. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2017.
- LINDSAY, J. A.; FOSTER, S. J. Zur: a Zn²⁺-responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v. 147, n. 5, p. 1259-1266, 2001.

- LIU, H. et al. Functional analysis of the Ferric Uptake Regulator gene *fur* in *Xanthomonas vesicatoria*. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149280, 2016.
- LIU, J. Z. et al. Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances *Salmonella* growth in the inflamed gut. **Cell Host & Microbe**, v. 11, n. 3, p. 227-239, 2012.
- LOBATO-MÁRQUEZ, D.; DÍAZ-OREJAS, R.; GARCIA-DEL PORTILLO, F. Toxin-antitoxins and bacterial virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 5, p. 592-609, 2016.
- LONERGAN, Z. R. et al. An *Acinetobacter baumannii*, zinc-regulated peptidase maintains cell wall integrity during immune-mediated nutrient sequestration. **Cell Reports**, v. 26, n. 8, p. 2009-2018. e6, 2019.
- LONERGAN, Z. R.; SKAAR, E. P. Nutrient zinc at the host–pathogen interface. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 44, n. 12, p. 1041-1056, 2019.
- LOPEZ, C. A. et al. The immune protein calprotectin impacts *Clostridioides difficile* metabolism through zinc limitation. **mBio**, v. 10, n. 6, p. e02289-19, 2019.
- LOUDEN, B. C.; HAARMANN, D.; LYNNE, A. M. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. **Journal of Microbiology & Biology Education**, v. 12, n. 1, p. 51-53, 2011.
- MACIĄG, A. et al. Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 730-740, 2007.
- MACOMBER, L.; IMLAY, J. A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 20, p. 8344-8349, 2009.
- MAKTHAL, N. et al. Group A Streptococcus AdcR regulon participates in bacterial defense against host-mediated zinc sequestration and contributes to virulence. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 8, p. e00097-20, 2020.
- MALTEZ, V. I. et al. Inflammasomes coordinate pyroptosis and natural killer cell cytotoxicity to clear infection by a ubiquitous environmental bacterium. **Immunity**, v. 43, n. 5, p. 987-997, 2015.

- MARET, W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 82-91, 2013.
- MARTIN, L. W. et al. Pseudomonas siderophores in the sputum of patients with cystic fibrosis. **Biometals**, v. 24, n. 6, p. 1059-1067, 2011.
- MASSÉ, E.; GOTTESMAN, S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 7, p. 4620-4625, 2002.
- MASTROPASQUA, M. C. et al. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in zinc poor environments is promoted by a nicotianamine-related metallophore. **Molecular Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 543-561, 2017.
- MASTROPASQUA, M. C. et al. Efficient zinc uptake is critical for the ability of *Pseudomonas aeruginosa* to express virulence traits and colonize the human lung. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 48, p. 74-80, 2018.
- MAZZON, R. R. et al. Analysis of the *Caulobacter crescentus* Zur regulon reveals novel insights in zinc acquisition by TonB-dependent outer membrane proteins. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2014.
- MCCLEAN, K. H. et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, n. 12, p. 3703-3711, 1997.
- MCDEVITT, C. A. et al. A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002357, 2011.
- MIKHAYLINA, A. et al. Bacterial zinc uptake regulator proteins and their regulons. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 4, p. 983-1001, 2018.
- MIKI, T. et al. The *Chromobacterium violaceum* type III effector CopE, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42, is involved in bacterial invasion of epithelial cells and pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1186-1203, 2011.
- MIKI, T. et al. Chromobacterium pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell

- death in hepatocytes. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 855-872, 2010.
- MILLER, Jeffrey H. **Experiments in molecular genetics**. [s.l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.
- MION, S. et al. Disrupting quorum sensing alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2021.
- MOROHOSHI, T. et al. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n. 1, p. 124-130, 2008.
- NEMETH, E. et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090-2093, 2004.
- NEVO, Y.; NELSON, N.. The NRAMP family of metal-ion transporters. **Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 609-620, 2006.
- NIELUBOWICZ, G. R.; SMITH, S. N.; MOBLEY, H. L. T. Zinc uptake contributes to motility and provides a competitive advantage to *Proteus mirabilis* during experimental urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2823-2833, 2010.
- NUONMING, P. et al. Identification of Zur boxes and determination of their roles in the differential regulation of the Zur regulon in *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 2109-2123, 2020.
- OGLESBY-SHERROUSE, A. G.; MURPHY, E. R. Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme. **Metallomics**, v. 5, n. 4, p. 276-286, 2013.
- OVERHAGE, J. et al. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4176-4182, 2008.
- PALMER, L. D.; SKAAR, E. P. Transition metals and virulence in bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 50, p. 67-91, 2016.
- PANINA, E. M.; MIRONOV, A. A.; GELFAND, M. S. Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. **Proceedings of the National**

- Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 17, p. 9912-9917, 2003.
- PAPP-WALLACE, K. M.; MAGUIRE, M. E. Manganese transport and the role of manganese in virulence. **Annuals Reviews of Microbiology**, v. 60, p. 187-209, 2006.
- PARK, H. A. et al. Microbial synthesis of violacein pigment and its potential applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1-23, 2021.
- PARKER, W. L. et al. Aerocyanidin, a new antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 41, n. 4, p. 454-460, 1988.
- PASQUA, M. et al. Ferric Uptake Regulator Fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 22, p. e00472-17, 2017.
- PATEL, S.; MATHIVANAN, N.; GOYAL, A. Bacterial adhesins, the pathogenic weapons to trick host defense arsenal. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 763-771, 2017.
- PATZER, S. I.; HANTKE, K. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 32, p. 24321-24332, 2000.
- PAWLIK, M. C. et al. The zinc-responsive regulon of *Neisseria meningitidis* comprises 17 genes under control of a Zur element. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 23, p. 6594-6603, 2012.
- PEDERICK, V. G. et al. ZnuA and zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2015.
- PÉREZ-BROCAL, V.; LATORRE, A.; MOYA, A. Symbionts and pathogens: what is the difference?. In: **Between Pathogenicity and Commensalism**, Elsevier, p. 215-243, 2011.
- PETRARCA, P. et al. The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 6, p. 1553-1564, 2010.
- PI, H.; HELMANN, J. D. Ferrous iron efflux systems in bacteria. **Metallomics**, v. 9, n. 7, p. 840-851, 2017.

- PLUMPTRE, C. D.; OGUNNIYI, A. D.; PATON, J. C. Polyhistidine triad proteins of pathogenic streptococci. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 485-493, 2012.
- POHL, E. et al. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the Ferric Uptake Regulator. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 903-915, 2003.
- PORCHERON, G.; DOZOIS, C. M. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 1-2, p. 2-14, 2015.
- PREVIATO-MELLO, M. et al. Global transcriptional response to organic hydroperoxide and the role of OhrR in the control of virulence traits in *Chromobacterium violaceum*. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 8, p. e00017-17, 2017.
- PUIG, S. et al. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. **Metallomics**, v. 9, n. 11, p. 1483-1500, 2017.
- RENSING, C.; MITRA, B.; ROSEN, B. P. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn (II)-translocating P-type ATPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 26, p. 14326-14331, 1997.
- ROBERTS, R. C. et al. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 7, p. 1829-1841, 1996.
- ROBINSON, A. E. et al. Uropathogenic enterobacteria use the yersiniabactin metallophore system to acquire nickel. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 39, p. 14953-14961, 2018.
- RODRIGUEZ, G. M. et al. *ideR*, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3371-3381, 2002.
- RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, p. a012427, 2012.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 2001.

- SAMPSON, T. R. et al. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 254-257, 2013.
- SANTOS, R. E. R. S.; BATISTA, B. B.; DA SILVA NETO, J. F. Ferric Uptake Regulator Fur coordinates siderophore production and defense against iron toxicity and oxidative stress and contributes to virulence in *Chromobacterium violaceum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 21, p. e01620-20, 2020.
- SANTOS, R. E. R. S. et al. The zinc transporter ZnuABC is critical for the virulence of *Chromobacterium violaceum* and contributes to diverse zinc-dependent physiological processes. **Infection & Immunity**, v. 89, n. 11, p. e00311-21, 2021.
- SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. Iron and microbial infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 12, p. 946-953, 2004.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.
- SHIN, J. H.; HELMANN, J. D. Molecular logic of the Zur-regulated zinc deprivation response in *Bacillus subtilis*. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2016.
- SI, M. et al. The type VI secretion system engages a redox-regulated dual-functional heme transporter for zinc acquisition. **Cell Reports**, v. 20, n. 4, p. 949-959, 2017.
- SILVA-ROCHA, R. et al. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D666-D675, 2013.
- SILVER, S. et al. Manganese-resistant mutants of *Escherichia coli*: physiological and genetic studies. **Journal of Bacteriology**, v. 110, n. 1, p. 186-195, 1972.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Bio/technology**, v. 1, n. 9, p. 784-791, 1983.
- SINGH, P. D. et al. Aerocavin, a new antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 41, n. 4, p. 446-453, 1988.

- SIVENDRA, R.; LO, H. S.; LIM, K. T. Identification of *Chromobacterium violaceum*: pigmented and non-pigmented strains. **Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 21-31, 1975.
- SLADE, D. J. et al. Chemical and biological methods to detect post-translational modifications of arginine. **Biopolymers**, v. 101, n. 2, p. 133-143, 2014.
- SNEATH, P. H. A. et al. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. **The Lancet**, v. 262, n. 6780, p. 276-277, 1953.
- STORK, M. et al. An outer membrane receptor of *Neisseria meningitidis* involved in zinc acquisition with vaccine potential. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. e1000969, 2010.
- STORK, M. et al. Zinc piracy as a mechanism of *Neisseria meningitidis* for evasion of nutritional immunity. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003733, 2013.
- SYDOR, A. M. et al. Metal binding properties of *Escherichia coli* YjiA, a member of the metal homeostasis-associated COG0523 family of GTPases. **Biochemistry**, v. 52, n. 10, p. 1788-1801, 2013.
- TANUI, C. K. et al. Influence of the Ferric Uptake Regulator (Fur) protein on pathogenicity in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0177647, 2017.
- TEIXIDÓ, L. et al. Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator in vivo and in vitro. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19711, 2011.
- THOMAS, C. E.; SPARLING, P. F. Isolation and analysis of a *fur* mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4224-4232, 1996.
- TIWARI, S. et al. Nonpigmented strain of *Chromobacterium violaceum* causing neonatal septicemia: A rare case report. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 427, 2017.
- TROXELL, B; HASSAN, H. M.. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 59, 2013.
- VISAGGIO, D. et al. Cell aggregation promotes pyoverdine-dependent iron uptake and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 902, 2015.

- WANG, J.; CAPDEVILA, D. A.; GIEDROC, D. P. Metal Ion Homeostasis. *In: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. [s.l.] : Elsevier, 2019.
- WANG, T. et al. Type VI secretion system transports Zn²⁺ to combat multiple stresses and host immunity. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1005020, 2015.
- WATERS, L. S. Bacterial manganese sensing and homeostasis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 55, p. 96-102, 2020.
- WEINBERG, E. D. Nutritional immunity: host's attempt to withhold iron from microbial invaders. **JAMA**, v. 231, n. 1, p. 39-41, 1975.
- WINTER, W. E.; BAZYDLO, L. A. L; HARRIS, N. S. The molecular biology of human iron metabolism. **Laboratory Medicine**, v. 45, n. 2, p. 92-102, 2014.
- WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v. 82, p. 969-974, 1995.
- YAN, F. et al. Threonine ADP-ribosylation of ubiquitin by a bacterial effector family blocks host ubiquitination. **Molecular Cell**, v. 78, n. 4, p. 641-652. e9, 2020.
- YANG, C. H. Nonpigmented *Chromobacterium violaceum* bacteremic cellulitis after fish bite. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, n. 5, p. 401-405, 2011.
- YANG, C. H.; LI, Y. H. *Chromobacterium violaceum* infection: a clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 74, n. 10, p. 435-441, 2011.
- YANG, W. et al. Zinc Uptake Regulator (zur) gene involved in zinc homeostasis and virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. **Current Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 307-314, 2007.
- ZYGIEL, E. M.; NOLAN, E. M. Transition metal sequestration by the host-defense protein calprotectin. **Annual Review of Biochemistry**, v. 87, p. 621-643, 2018.

8. APÊNDICE

Publicações resultantes desta tese (artigos de primeira autoria):

01. **Santos RERS**, Batista BB, da Silva Neto JF. 2020. Ferric uptake regulator Fur coordinates siderophore production and defense against iron toxicity and oxidative stress and contributes to virulence in *Chromobacterium violaceum*. Appl Environ Microbiol 86:e01620-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01620-20>.
02. **Santos RERS**, da Silva Júnior WP, Harrison S, Skaar EP, Chazin WJ, da Silva Neto JF. 2021. The zinc transporter ZnuABC is critical for the virulence of *Chromobacterium violaceum* and contributes to diverse zinc-dependent physiological processes. Infect Immun. IAI0031121. <https://doi.org/10.1128/IAI.00311-21>. Epub ahead of print.

Artigo de co-autoria:

01. Batista BB, **Santos RERS**, Ricci-Azevedo R, da Silva Neto JF. 2019. Production and uptake of distinct endogenous catecholate-type siderophores are required for iron acquisition and virulence in *Chromobacterium violaceum*. Infect Immun. 87:e00577-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00577-19>.