

PATRÍCIA RIBEIRO LEAL DA SILVA DINIZ

ASPECTOS DA PATOGENIA DA PIÓMETRA NA
CADELA: FÍMBRIAS TIPO 1 DE *ESCHERICHIA COLI* E
MECANISMOS DE DEFESA NO ENDOMÉTRIO

Orientadora: Professora Doutora Luísa Mateus

Co-Orientadora: Professora Doutora Susana Santos

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia

Lisboa

2017

PATRÍCIA RIBEIRO LEAL DA SILVA DINIZ

ASPECTOS DA PATOGENIA DA PIÓMETRA NA
CADELA: FÍMBRIAS TIPO 1 DE *ESCHERICHIA COLI* E
MECANISMOS DE DEFESA NO ENDOMÉTRIO

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 13/ 03/2017, perante o Júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 74/2017, conforme o artigo 22o, do Decreto-Lei n.º 74/2016, de 24 de Março, atendendo à nova redacção apresentada pelo Decreto-Lei no 63/2016 de 13 de Setembro, bem como o Artigo 39º do Regulamento do Pedagógico da ULHT, com a seguinte composição:

Presidente:

Professora Doutora Maria Adília Lourenço Januário Charmier

Vogais:

Professora Doutora Graça Ferreira Dias da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Arguente

Orientadora: Professora Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa,

Co-Orientadora Professora Doutora Susana Santos, Orientadora Interna

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia

Lisboa

2017

A todos aqueles que vivem no meu coração. Sem Amor, sem
Esperança e sem Sonhos não há Futuro.

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha gratidão para com todos os que directa ou indirectamente ajudaram durante a elaboração da minha tese e na finalização da mesma. Os últimos anos foram desafiantes em muitos aspectos, neste tempo cresci não só academicamente mas também individualmente e por isto estou grata há aqueles que me acompanharam ao longo do caminho.

Agradeço à secção de Reprodução e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, na pessoa do Professor Doutor Luís Lopes da Costa por me acolherem e providenciarem todo o suporte necessário à elaboração da minha tese. Uma excelente oportunidade de trabalhar com uma equipa brilhante.

Em primeiro gostaria de agradecer à minha orientadora externa a Professora Doutora Luísa Mateus por aceitar e providenciar o suporte necessário para que a elaboração desta tese fosse possível. Obrigado por todos os conhecimentos transmitidos, pelo tempo dedicado e especialmente pela longa amizade. Obrigado por acreditares em mim.

À Doutora Elisabete Silva, eu não posso agradecer o suficiente pelo apoio dado. Sempre paciente e disponível, dentro e fora de horas, sempre que necessitei de ajuda. Durante esta jornada, foste possivelmente a pessoa que mais me ajudou nas dúvidas, nas descobertas e ao longo do caminho houve sempre uma lição e uma palavra de incentivo que me fez seguir em frente. Obrigado.

À Doutora Sofia Henriques por toda a ajuda e disponibilidade prestadas durante este trabalho. Por todos os procedimentos ensinados e trabalho que foi feito para me ajudar.

À Doutora Ana Catarina Torres, Dr.^a Mariana Batista por todo o apoio e amizade ao longo destes anos, as minhas companheiras de bancada.

À Ana Cristina Valado pela longa e inestimável amizade, todos os incentivos e apoios ao longo destes anos, e já são muitos. Obrigado por seres quem és, a tua amizade não tem valor.

Na FMV não teria alcançado os meus objectivos sem a ajuda das *Rep Girls*. A todos da equipa da Reprodução e Obstetrícia que me acompanham tão bem. Nunca irei esquecer alguns dos momentos deste estágio, particularmente os momentos de convívio e alimentação.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) pelo apoio financeiro concedido e por ter permitido a utilização das suas instalações e equipamentos para a elaboração deste trabalho. Agradeço também a todos os que trabalham no laboratório pela simpatia com que me receberam.

A elaboração desta tese não seria possível sem todo o suporte da minha Universidade, a Lusófona, onde aprendi tudo e onde iniciei a minha jornada. Nesta casa tive o privilégio de ter os melhores professores, todos tiveram um grande impacto na minha formação e amadurecimento científico.

À minha orientadora interna Professora Doutora Susana Santos por tudo o que me ensinou e pela paciência mostrada em todo o processo. Pelas suas correcções e orientação durante este trabalho.

O meu agradecimento à Lusófona não estaria completo sem mencionar o bom trabalho e apoio administrativo da Susana Morgado.

Sem uma instituição de acolhimento e sem o suporte da minha Universidade, este trabalho seria difícil mas sem o apoio de toda a minha família e amigos seria impossível!

Ao meu marido Tozé e aos meus filhos, Carolina, Margarida e António, nascido durante este Mestrado, eu devo tudo. Vocês são o meu apoio a minha Vida, sem o vosso sorriso, Amor e apoio os meus dias seriam cinzentos. Sem os meus amores eu não seria Eu.

À minha família, ao meu Pai e minha Mãe, a minha querida Avó Margarida que me tornaram na pessoa que sou hoje. O vosso Amor conforta-me todos os dias.

À Lena a minha irmã do coração, tu completas-me. Aos meus sobrinhos lindos Miguel e Erica.

Ana Pires, conhecemo-nos no início desta jornada e acabamos melhores amigas, obrigado por todo o apoio, por seres colega de bancada, de grupo, das noites de estudo e das loucuras juntas. Ganhei uma amiga para a vida, obrigado por estares sempre lá quando eu preciso.

Por último, gostaria de agradecer a todos aqueles que eu possa ter esquecido mas considerando-me sortuda por ter todos estas pessoas maravilhosas na minha vida. A todos aqueles que me fizeram e fazem sorrir, um sincero obrigado.

Trabalhos científicos

Este trabalho foi financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA)/Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) - PEst-OE/AGR/UI0276/2014.

Parte do trabalho realizado foi apresentada no VI Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias que decorreu entre os dias 3 e 5 de 2014, no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) em Oeiras, Lisboa com o seguinte título:

Comunicação em painel: Diniz, P., Mateus, L., Henrique, S., Lopes-da-Costa, L., & Silva E. (2014). Analysis of the phase variation of type 1 fimbrial genes in canine pyometra *Escherichia coli* isolates. VI Congress of the Portuguese Society of Veterinary Science, INIAV, Oeiras, 2014. (em anexo).

Resumo

Piómetra é uma doença do foro reprodutivo comum em cadelas sendo *Escherichia coli* a bactéria mais frequentemente isolada. Neste estudo estabelecemos dois objectivos distintos: a) avaliar a capacidade de *E. coli* associada a piómetra para transcrever os genes *fim* e expressar fímbrias tipo 1; b) estudar a resposta imune inata do endométrio, sob a forma de explantes, após estimulação com *E. coli*.

De modo a determinar se os genes *fim* são transcritos, a orientação (*On/Off*) do elemento de ADN que contém o promotor e conduz à transcrição dos genes *fim*, foi determinada por amplificação da região do promotor por PCR, seguida da digestão com a enzima *HinfI*. Para tal, foram efectuados ensaios em três condições de cultura; agar, arejada, estática. Os resultados mostraram que a maioria dos isolados tem a capacidade de mudar da posição *Off* para a posição *On*. Em agar, a posição *Off* foi predominante (60% dos isolados) e 40% dos isolados apresentaram uma mistura de células na posição *On* e *Off*. Na cultura arejada, 80% dos isolados tinham células em posições *On* e *Off* e 20% estavam na posição *Off*. Na cultura estática, a maioria dos isolados (67%) tinha células nas posições *On* e *Off* e 7% mudaram completamente para a posição *On*. Neste estudo demonstrámos ainda que os isolados de *E. coli* associados a piómetra têm a capacidade de expressar fímbrias tipo 1, uma vez que aglutinam células de levedura. No que se refere ao primeiro objectivo, concluímos que os isolados de *E. coli* de piómetra têm a capacidade de transcrever genes *fim* e expressar fímbrias tipo 1. No entanto, a transcrição e expressão estão dependentes de estímulo ambiental. Quanto ao segundo objectivo, mostrámos que os *explantes* endometriais estimulados com *E. coli* transcrevem genes que codificam para mediadores de inflamação. Os níveis de transcrição dos genes que codificam para o $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e CXCL10 foram significativamente mais elevados em *explantes* estimulados com *E. coli*., comparativamente a *explantes* não estimulados. Por outro lado, a transcrição do gene *IL-1 β* foi menor nos *explantes* estimulados. Estes resultados demonstram que os *explantes* de endométrio foram capazes de montar uma resposta imunitária.

Palavras-chave: Piómetra canina; Endométrio; *Escherichia coli*; Fímbrias tipo 1; Citocinas.

Abstrat

Pyometra is a common reproductive disease of bitches and *Escherichia coli* is the most frequently isolated bacteria. In this study we establish two distinct objectives: a) evaluate the capacity of *E. coli* isolated from pyometra to transcribe *fim* genes and express type 1 fimbriae; b) study the innate immune response of endometrial explants to *E. coli* stimulation.

Although, *fimA* and *fimH* genes are the most prevalent adhesin genes in *E. coli* pyometra isolates, their capacity to express type 1 fimbriae is unclear. To determine whether type 1 fimbriae genes are transcribed, the orientation (On or Off) of the invertible promoter element, that drives the transcription of the *fim* genes, was assessed by PCR amplification, followed by *HinfI* digestion. The capacity of *E. coli* isolates to transcribe *fim* genes was evaluate in three culture conditions: agar, aerated, static. Results showed that the majority of the isolates have the ability to switch from Off to On position. In agar, the Off position was predominant (60% of the isolates) and 40% of isolates had a mixture of cells in the On and Off position. In the aerated culture, 80% of the isolates had cells in On and Off positions and 20% of the isolates were in the Off position. In static culture most of the isolates (67%) had cells on On and Off positions and 7% of the isolates switch completely to On position. In addition, we demonstrate that pyometra *E. coli* isolates had the capacity to express type 1 fimbriae, as they agglutinate yeast cells. Concerning the first objective, we conclude that pyometra *E. coli* isolates had the ability to transcribe *fim* genes and express type 1 fimbriae. However, transcription and expression are dependent on environmental stimulus. Regarding the second objective, we show that the endometrial explants stimulated with *E. coli* transcribe inflammatory mediators. Differential cytokine gene transcription (qRT-PCR) was also observed in endometrial explants stimulated with *E. coli* and non-stimulated endometrial explants. The transcription levels of *TNF α* , *IL-6* and *CXCL10* genes were significantly higher in *E. coli* stimulated explants. In contrast, *IL-1 β* gene transcription was lower in the stimulated endometrial explants. These results show that the endometrial explants were capable of mounting immune responses.

Keywords: Canine pyometra; endometrium; *Escherichia coli*; type 1 fimbriae; cytokines.

Lista de Abreviações e Símbolos

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrometros
ADN	Ácido deoxiribonucleico
ADNc	Ácido deoxiribonucleico complementar
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
bp	<i>base pair</i>
CdC42	Proteína de controlo da divisão celular 42
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
CNF	Factor necrosante citotóxico
CNF1	Fator citotóxico necrosante 1
COS	Agar Columbia com 5% de sangue de carneiro
CXCL8	Quimiocina com grupo C-X-C 8
CXCL10	Quimiocina com grupo C-X-C 10
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DO	Densidade óptica
<i>EHEC</i>	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
<i>EPEC</i>	<i>E. coli</i> enteropatogénica
<i>ETC</i>	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
ExPEC	Escherichia coli patogénica extraintestinal
<i>ExPEC</i>	<i>E. coli</i> patogénica extraintestinal
FV	Factores de virulência
GTPases	Guanina trifosfato hidrólase
H	Horas
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>

HlyA	α -hemolisina
HQE	Hiperplasia Quística do Endométrio
IL-1	Interleucina -1
IL-4	Interleucina – 4
IL-6	Interleucina -6
IL-7	Interleucina – 7
IL-8	Interleucina -8
IL-10	Interleucina -10
IL-11	Interleucina – 11
IL-13	Interleucina – 13
IL-15	Interleucina – 15
IL-18	Interleucina – 18
InPEC	<i>E. coli</i> patogénica intestinal
kb	Kilobase
L	Litros
LB	Meio de Lúria Bertani
LPS	Lipopolissacárido
M	Molar
Mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Mmol	Milimole
MR	Manose-resistente
MS	Manose-sensível
MyD88	Factor de diferenciação mielóide 88
NF- κ B	Factor nuclear- κ B
Ng	Nanograma
Nm	Nanometros
NMEC	<i>E. coli</i> associadas a meningite neonatal

°C	Graus Celsius
OVH	Ovariohisterectomia
P4	Progesterona
PAI	Pathogenicity-associated Island
PAMP	Padrão molecular associado a agentes patogénicos
PAMP	Padrão molecular associado a agentes patogénicos
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PRR	Recetor de reconhecimento de padrões
qRT-PCR	PCR em tempo real quantitativo
Rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Segundos
SEPEC	<i>E. coli</i> associadas a sépsis
SRIS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistémica
TGF- α	Fator de crescimento transformador- α
Th1	T helper tipo 1
TIR	Domínio homólogo ao do Toll/Recetor de IL-1
TLR	Recetor do tipo Toll
UFC	Unidades formadoras de colónias
UI	Unidade internacional
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogénica
UV	Ultra-violeta

Índice

Introdução – Apresentação do Tema e Objectivos

	1
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica	3
1.1 - Piómetra	3
1.2 - <i>Escherichia coli</i>	4
1.2.1 - Factores de virulência de <i>Escherichia coli</i>	6
1.2.1.1 - Adesinas	7
1.2.1.2 - Toxinas: α -Hemolisina e CNF1	10
1.2.1.3 - Outros factores de virulência	12
1.2.1.4 - Mecanismos de imunidade inata do útero	14
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	18
2.1 - Variação de fase das fímbrias tipo 1 de <i>Escherichia coli</i>	18
2.1.1 - Isolados	18
2.1.2 - Condições de cultura	20
2.1.3 - Extracção de ADN total pelo método de <i>boiling</i> .	21
2.1.4 - Determinação da posição <i>On e Off</i> do <i>fim switch</i>	23
2.2 - Análise fenotípica da expressão das fímbrias tipo 1 – estudos de aglutinação	25
2.2.1 - Cultura da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.2.2 - Reacção de Aglutinação e bloqueio com D-manose	27
2.3 - Cultura de <i>explantes</i> uterinos de cadelas	27
2.3.1 - Cultura de <i>explantes</i>	28
2.3.2 - Estirpes	29
2.4 - Imunohistoquímica	30
2.5 - Avaliação da transcrição dos genes que codificam para mediadores de inflamação por RT-PCR	32
2.5.1 - Extracção de ARN e síntese de ADNc	32
2.5.2 - PCR	33

2.6 - Quantificação relativa da transcrição de componentes das vias dos TLRs por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	35
2.6.1 - Oligonucleotídeos iniciadores	36
2.6.2 - PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	37
Capítulo 3 - Resultados	38
3.1 - Análise da expressão de fímbrias tipo 1 em diferentes condições de cultura	38
3.1.1 - Análise fenotípica	41
3.2 - Cultura de <i>explantes</i> de útero	44
3.2.1 - Imunohistoquímicas	45
3.2.2 - Transcrição de genes que codificam para mediadores de inflamação	46
3.2.3 - Quantificação da transcrição de citocinas pro e anti – inflamatórias em <i>explantes</i> de endométrio de cadelas	48
Capítulo 4 - Discussão	51
Conclusão	57
Referências Bibliográficas	58
Apendix	I
A- Factores de virulência	I
B-Aglutinação de células de levedura	II
C-AApresentação em painel	III

Lista de Figuras

Figura 1 - Principais factores envolvidos no estabelecimento da piómetra.	4
Figura 2 - Representação das etapas de infecção por <i>E. coli</i>	6
Figura 3 - Estruturas adesivas, pili e células alvo.....	7
Figura 4 - Representação esquemática da da fímbria tipo 1.	9
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura α -hemolisina.	10
Figura 6 - Representação esquemática da estrutura LPS de <i>E. coli</i>	213
Figura 7 - Propagação da culturade <i>E. coli</i>	20
Figura 8 - Condições de cultura dos isolados de <i>E. coli</i>	21
Figura 9- Procedimento experimental utilizado na extracção de ADN total de <i>E. coli</i>	252
Figura 10 - Representação esquemática da orientação do elemento de ADN que contém o promotor do gene <i>fimA</i> (a) e resultados esperados após digestão do produto de PCR, com a enzima <i>HinfI</i> (b).....	25
Figura 11 - (a) Representação esquemática da reacção da aglutinação da suspensão de células de <i>S. cerevisiae</i> e respectivo bloqueio com D-manose. (b) Resultado esperado após reacção de aglutinação.....	296
Figura 12- Esquema experimental de cultura de <i>explants</i> do endométrio de cadela. ...	29
Figura 13 - Fracção da cultura de <i>E. coli</i> utilizado na estimulação dos <i>explantes</i>	30
Figura 14 - Resultados representativos da digestão do produto de PCR com a enzima <i>Hinf I</i>	39
Figura 15 - Posição do promotor do gene <i>fimA</i> em isolados de <i>E. coli</i> de piómetra crescidos em meio LB líquido sem agitação (condição de crescimento estática), cultura arejada (LB líquido com agitação) e LB sólido.....	431
Figura 16 - Ensaio de aglutinação de células da levedura (fenótipo de aglutinação específico da expressão de fímbrias tipo 1 para os isolados <i>Pyo5</i> e <i>Pyo7</i>	43
Figura 17 - Análise imunohistoquímica dos explantes de útero de cadelas contaminados com <i>E. coli</i>	475

Figura 18 - Exemplo dos produtos de amplificação obtidos por RT-PCR para os transcritos de citocinas pró-inflamatórias em explantes de úteros de cadelas saudáveis..

.....47

Figura 19 - Expressão relativa do ARNm do TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e CXCL10 após incubação do explantes com o isolado de *Pyo7* e o seu mutante isogénico *Pyo7 Δ hlyA* às 2, 6 e 24 horas.....50

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Identificação dos isolados de <i>E. coli</i> recolhidos de cadelas com piómetra...	19
Tabela 2 - Oligonucleotidos iniciadores utilizados na amplificação da região que inclui o promotor do gene <i>fimA</i>.	23
Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores usados nas reacções de RT-PCR.....	34
Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores usados nas reacções de qRT-PCR.....	36
Tabela 5 - Análise dos resultados da digestão do produto de PCR com a enzima <i>Hinf I</i>	40
Tabela 6 - Nível de significância dos resultados da transcrição no endométrio controlo versus endométrio estimulado com <i>Pyo7</i> ou <i>Pyo7ΔhlyA</i>.....	49

Introdução – Apresentação do Tema e Objectivos

A piómetra é uma doença bastante frequente em cadelas adultas que numa situação extrema pode conduzir à endotoxémia e morte. O tratamento, na maioria dos casos, é a ovariosterectomia (OVH), que corresponde à remoção cirúrgica do útero e dos ovários. Contudo, em cadelas jovens, cadelas com interesse reprodutivo, e casos sem hiperplasia quística do endométrio, poder-se-á optar por tratamento médico (Arnold *et al.*, 2006). A dificuldade de estabelecer um tratamento médico, sem recorrer à OVH, reside no facto da piómetra ser diagnosticada numa fase tardia da doença. Assim, por um lado, a identificação de marcadores moleculares da infecção e, por outro lado, a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina, poderiam colmatar este problema associado ao diagnóstico tardio da doença. Para tal, torna-se pertinente caracterizar a doença numa fase inicial. No entanto, a maioria dos estudos em piómetra canina descritos na literatura são conduzidos na altura do diagnóstico, numa fase tardia da doença. Por outro lado, também não têm em conta o potencial de virulência das estirpes de *E. coli*.

O estabelecimento e progressão da piómetra na cadela estão dependentes, por um lado da espécie bacteriana que coloniza o útero e do seu potencial de virulência, por outro lado da capacidade do hospedeiro responder à infecção. A gravidade da doença está dependente do balanço entre estas duas componentes. *Escherichia coli* é a principal bactéria isolada do conteúdo uterino de cadela com piómetra e a gravidade da doença está maioritariamente associada a *E. coli* pertencente ao grupo filogenético B2. Apesar de recentemente o nosso grupo de investigação ter contribuído para o esclarecimento do papel individual das células epiteliais e do estroma na resposta a *E.coli*, é também importante fazer esta avaliação utilizando um modelo que permita a interacção entre estes dois tipos celulares.

Com o intuito de estudar os mecanismos envolvidos no estabelecimento e progressão da piómetra na cadela, os dois objectivos deste trabalho visaram:

- a) Avaliação da transcrição dos genes do operão *fim* e expressão de fimbrias tipo 1 numa colecção de isolados de *Escherichia coli* recolhidos de úteros de cadelas com piómetra.

b) Estabelecimento de um modelo *ex vivo* de explantes de útero de cadelas de modo a caracterizar os mecanismos de resposta imunitária inata desencadeados pelo endométrio em resposta à estimulação por estirpes de *E. coli* com diferentes genótipos de virulência.

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

1.1 - Piómetra

A piómetra é uma afecção do foro reprodutivo caracterizada por uma infecção bacteriana ao nível do útero, com a consequente acumulação de exsudado purulento no seu interior (Voorwald *et al.*, 2015). É uma doença que afecta cerca de 25% das cadelas adultas com mais de 10 anos e que é diagnosticada maioritariamente na primeira metade do diestro (Sugiura *et al.*, 2004), fase do ciclo éstrico caracterizada por concentrações elevadas de progesterona. A progesterona tem sido reportada como estando envolvida na estimulação das secreções das glândulas endometriais, supressão da resposta imunitária e indução do encerramento do cérvix, originando um ambiente propício ao crescimento bacteriano. Os estrogénios, por sua vez, limitam a adesão bacteriana (Nishikawa, 1985; Nishikawa & Baba, 1985), e estimulam a produção de lactoferrina, uma glicoproteína com acção bactericida expressa pelas células epiteliais luminais e glandulares do endométrio (Teng, Beard, & Gladwell, 2002; Kida *et al.*, 2006). Adicionalmente, a adesão bacteriana ao endométrio da cadela no início de diestro poderá ser favorecida pela menor produção de mucina-1 (Ishiguro *et al.*, 2007), um importante mecanismo de defesa local.

A importância do diagnóstico e tratamento atempados da piómetra está associada à sua gravidade (Egenvall *et al.*, 2001). As características do cérvix é um dos factores que mais contribui para a gravidade da doença. Na piómetra aberta (cérvix aberto) a inflamação leva a uma distensão do útero e a corrimento vaginal purulento ou sanguíneo-purulento, pelo contrário, na piómetra fechada o conteúdo intra-uterino acumula-se levando a um aumento do risco de sépsis e subsequente morte do animal. A ovário-histerectomia permite a prevenção da doença.

O desenvolvimento de piómetra está dependente da interacção entre vários factores etiológicos (Payan-Carreira & Pires, 2015). Destacam-se as alterações morfológicas do endométrio, influência hormonal no ambiente uterino, espécie bacteriana e respectivo grau de virulência e a capacidade individual do hospedeiro de combater a infecção. *Escherichia*

coli é a bactéria mais frequentemente isolada do conteúdo uterino de cadelas com piómetra (Mateus *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014), sendo também atribuída a esta bactérias uma maior severidade dos sinais clínicos (Silva *et al.*, 2012). A hiperplasia quística do endométrio (HQE), um processo proliferativo progressivo do endométrio mediado pela progesterona (P4) e estrogénio, é outro dos factores que pode predispor ao desenvolvimento de piómetra na cadela (Schlafer, 2012). Na figura 1 estão representados os principais factores associados ao desenvolvimento de piómetra.

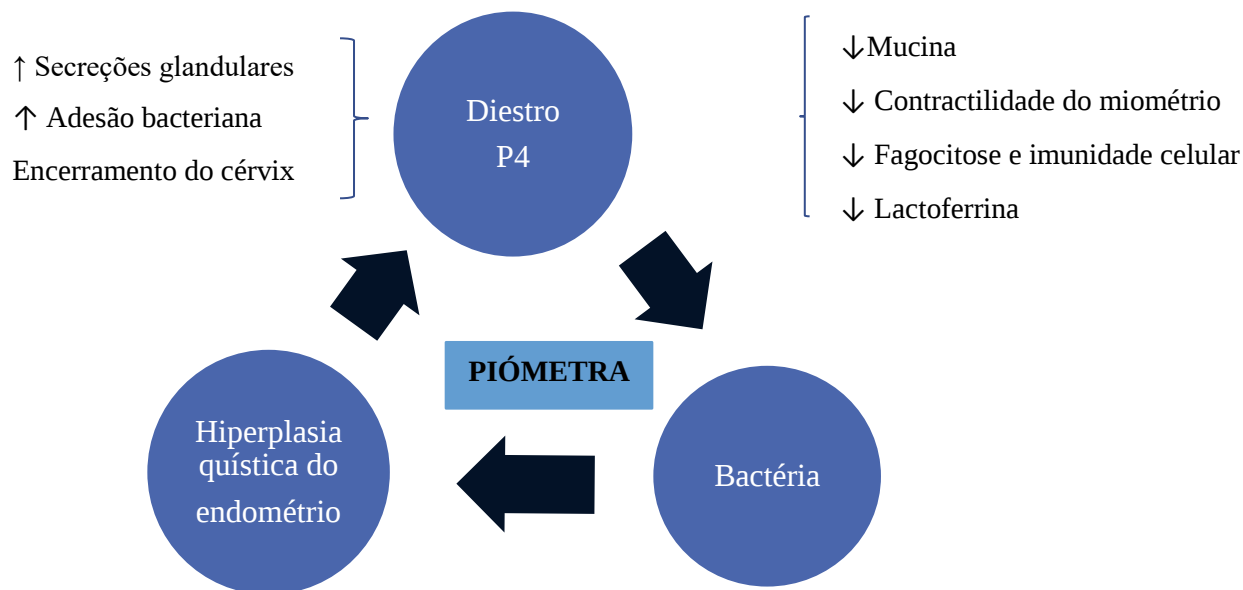


Figura 1 - Principais factores envolvidos no estabelecimento da piómetra. Adaptado de Silva, 2014.

1.2 - *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, comum do tracto gastrointestinal de humanos e animais fazendo parte da sua microflora (Bien, Sokolova & Bozko, 2012). As estirpes de *E. coli* são anaeróbias

facultativas, assumem a forma de bacilo (Sousa, 2006) e são caracterizadas por possuírem múltiplos flagelos dispostos a volta da célula e fímbrias que permitem a sua adesão às células do hospedeiro. Como todas as gram-negativas, possuem lipopolissacarídeo (LPS) na parede celular, que funcionam como um factor de virulência podendo activar o sistema imunitário de forma desproporcionada e levar ao choque séptico e morte em casos de septicémia. As estirpes de *E. coli* patogénicas podem ser classificadas em dois grandes patótipos de acordo com o local onde provocam doença. *E. coli* patogénica extraintestinal (*ExPEC-Extraintestinal pathogenic E. coli*), que provoca doença fora do tracto intestinal, e *E. coli* patogénica intestinal (*InPEC-intestinal pathogenic E. coli*), que provoca doença no intestino. De entre as *ExPEC*, destacam-se uropatogénicas (*UPEC-Uropathogenic E. coli*-infecções do tracto urinário), associadas à meningite neonatal (*NMEC-meningitis-associated E. coli*) e a sépsis (*SEPEC-Sepsis associated E. coli*). As *InPEC* incluem a *E. coli* enterohemorrágica (*EHEC-Enterohemorrhagic E. coli*), a enteropatogénica (*EPEC-Enteropathogenic E. coli*) e a enterotoxigénica (*ETC-Enterotoxigenic E. coli*) (Bekal, 2003).

Estudos filogenéticos demonstraram que as estirpes de *E. coli* podem ser agrupadas em quatro principais grupos, A, B1, B2, D (Clermont *et al.*, 2000; Doumith *et al.*, 2012). Estes estudos permitiram também concluir que existe uma associação entre o grupo filogenético e o potencial de virulência das estirpes. As estirpes *ExPEC* pertencem maioritariamente ao grupo filogenético B2, e mais raramente ao grupo D (Chakraborty *et al.*, 2015), enquanto a maioria das estirpes comensais pertencem ao grupo A e B (Nowrouzian *et al.*, 2005). Os isolados de *E. coli* associados à piómetra de cadela pertencem maioritariamente ao grupo filogenético B2 (Mateus *et al.*, 2013), de maior potencial de virulência. De facto, estes isolados têm no seu genoma um elevado número de genes que codificam para factores de virulência (FV) e marcadores genéticos de ilhas de patogenecidade (*PAIs –pathogenic associated islands*) (Mateus *et al.*, 2013)

1.2.1 - Factores de virulência de *Escherichia coli*

O genoma de *E. coli* varia entre 4.6 a 5.6 Mb no qual estão incluídos genes que codificam para factores de *fitness* e genes que codificam para factores de virulência (Vejborg *et al.*, 2011). Estes FV intervêm em diferentes etapas da infecção, nomeadamente na adesão às células do hospedeiro, colonização dos tecidos, multiplicação, invasão e destruição celular (figura 2). Assim, os factores de virulências podem ser agrupados em diferentes classes de acordo com o seu papel na infecção: adesinas/invasinas, sistemas de aquisição de ferro (sideróforos), toxinas e factores envolvidos na subversão das defesas do hospedeiro.

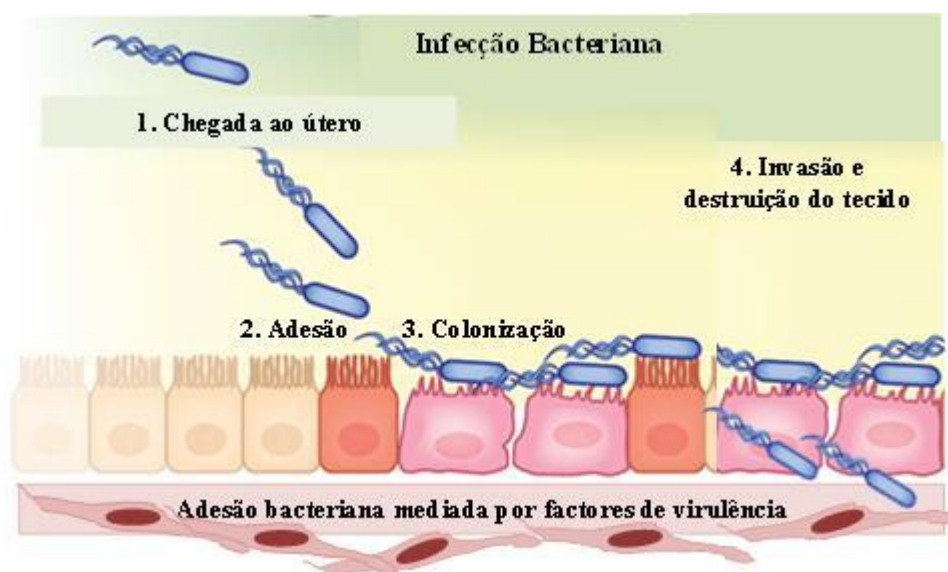


Figura 2: **Representação das etapas de infecção por *E. coli*.** Adaptado de Kamada *et al.* (2012).

Os genes associados à virulência podem estar organizados no cromossoma bacteriano ou em elementos genéticos móveis como é o caso dos plasmídeos, genomas de bacteriófagos e transposões (Kaizer *et al.*, 2005). Estes genes encontram-se ainda frequentemente agrupados em grandes blocos de ácido desoxirribonucleico (ADN), denominados ilhas de patogenicidade (*PAIs*). As *PAIs* podem ser disseminadas entre bactérias por transferência horizontal e conferem uma vantagem adaptativa à bactéria na colonização de diferentes

ambientes (Lloyd *et al.*, 2009). Apesar de as estirpes de *E. coli* patogénicas possuírem inúmeros genes que codificam para factores de virulência, a sua expressão é regulada por estímulos ambientais de forma selectiva de acordo com a especificidade do ambiente a colonizar.

1.2.1.1 - Adesinas

A adesão é um processo específico de reconhecimento entre a bactéria e as células do hospedeiro e ocorre através de adesinas fimbriais ou afimbriais que se ligam a receptores na superfície das células (proteínas D-manosiladas, glicoesfingolípidos, ácido neuramínico, lactosilceramida e proteínas de matriz). A ligação ao receptor é tecido-específica e espécie-específica, sendo esta especificidade que determina a colonização de determinado tecido/hospedeiro (Figura 3).

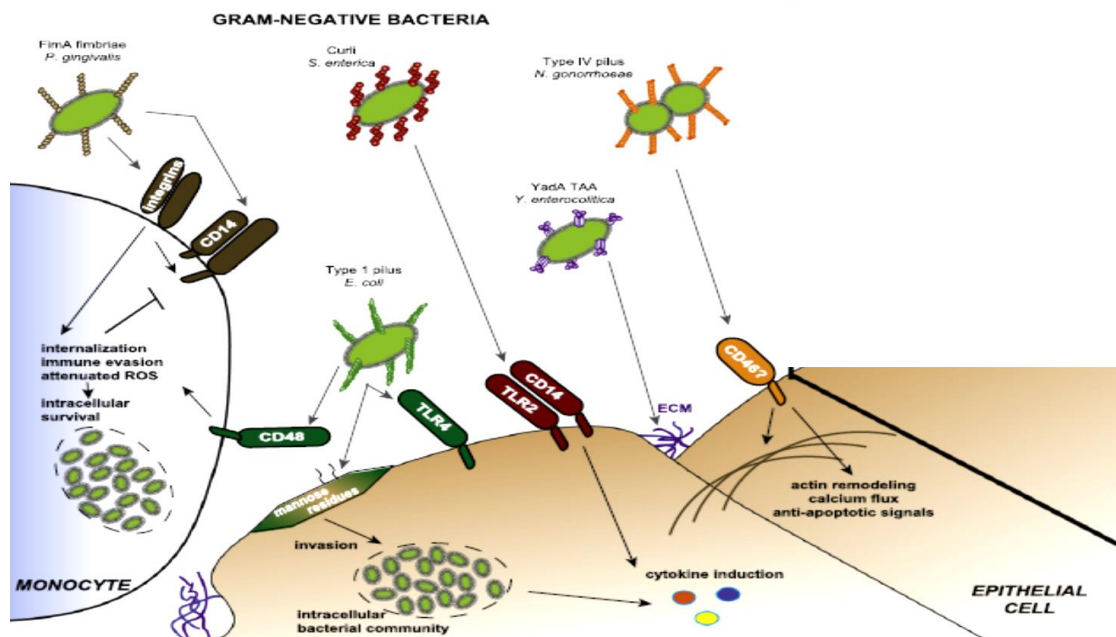


Figura 3: **Estruturas adesivas e células alvo.** Os receptores da célula hospedeira e respectiva adesina com a mesma cor. As setas indicam ligandos conhecidos do hospedeiro e/ou receptores, sinalização a jusante e resultados esperados associados a ligação adesina-ligando. (ROS- espécies reactivas de oxigénio; EMC – matriz extracelular) (Adaptado de Kline *et al.*, 2009).

As fímbrias podem ser de vários tipos, consoante as subunidades proteicas que as constituem e a sua organização. São apêndices filamentosos, de 2-7 nanómetros de comprimento, ancorados à membrana externa da bactéria. A sua estrutura consiste em aproximadamente 1000 unidades repetidas de um único polipéptido (Eisenstein *et al.*, 1987). Destacam-se, pela sua importância, as fímbrias tipo 1, as fímbrias P, fímbrias S e fímbrias F1C, sendo a adesão mediada pelas adesinas montadas na extremidade distal da fímbria, FimH, PapG, SfaS e FocH, respectivamente. Adicionalmente, as proteínas CsgA (fímbria *Curli*) e DrA (Dr fímbria) também estão implicadas na adesão a células epiteliais (Antão *et al.*, 2009).

As fímbrias mais comuns são as fímbrias tipo 1, presentes em mais de 90 % das estirpes de *E. coli* (Blanco *et al.*, 1997; Miyazaki *et al.*, 2002), conferindo à bactéria a capacidade de colonizar diferentes ambientes como o epitélio bucal, vesical, vaginal, pulmonar e intestinal e várias células inflamatórias (Johnson, 1991; Jones *et al.*, 1995). Algumas destas adesinas, para além de desempenharem um papel fulcral na ligação da bactéria à célula do hospedeiro, também despoletam vias de sinalização intracelular, facilitam o contacto de toxinas produzidas pela bactéria com as células do hospedeiro e promovem a invasão bacteriana (Bien *et al.*, 2012).

As fímbrias tipo 1 e P são diferenciadas pelo tipo de receptor a que se ligam: as tipo 1 a receptores glicoproteicos que contêm resíduos de manose e as P a glicolípidos com um digalactosido Gal(α -1-4)Gal. A expressão das fímbrias de *E. coli* pode ainda ser fenotipicamente avaliada e diferenciada pela sua capacidade de aglutinar, quer extracto de levedura (aglutinação), quer eritrócitos de várias espécies (hemaglutinação). As fímbrias tipo 1 apresentam a capacidade de aglutinação/hemaglutinação que pode ser bloqueada pela D-manose (fímbrias manose sensíveis-MS). Pelo contrário, as fímbrias P apresentam apenas a capacidade de hemaglutinação, que não é bloqueada pela D-manose (manose resistentes-MR) (van der Bosch *et al.*, 1980). As fímbrias S reconhecem resíduos de sialyl-galactosídeos e apresentam hemaglutinação positiva que pode ser bloqueada pela neurominidase (Kunin *et al.*, 1993). As fímbrias F1C não provocam hemaglutinação (Khan *et al.*, 2000).

As fímbrias tipo 1 são codificadas pelo operão *fim*, que contém 9 genes no qual se inclui o gene *fimA*, que codifica para a subunidade principal da fímbria (Klemm *et al.*, 1995). Os genes *fim* estão localizados no cromossoma, em contraste com os genes que codificam

para as fímbrias P, que estão localizados em PAIs. Estas fímbrias são estruturas helicoidais compostas por repetições da subunidade principal FimA, pelas proteínas FimF e FimG e pela adesina FimH (codificada pelo gene *fimH*) (Schilling, Mulvey & Hultgren, 2001).

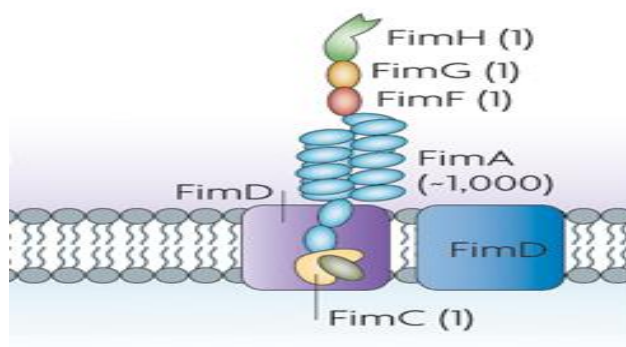


Figura 4 - **Representação esquemática da estrutura da fímbria tipo 1** (Adaptado de Vetsch *et al.*, 2004)

Em *E. coli*, a expressão das fímbrias tipo 1 é regulada por um fenómeno denominado de “variação de fase”. A variação de fase é mediada por um elemento de ADN invertível de 314 pb que contém o promotor do gene *fimA* permitindo a alteração reversível entre o estado fimbriado (promotor na orientação *On* - transcrição dos genes do operão *fim*) e afimbriado (promotor na orientação *Off* - transcrição dos genes silenciada) em células individuais (Struve & Krogfelt, 1999; Schwan *et al.*, 2011). Entre os vários factores reguladores da expressão destes genes, estão incluídos os estímulos ambientais como a temperatura, osmolaridade e meio de crescimento que determinam a resistência do elemento interconvertível à alteração de orientação (*On versus Off*) (Olsen *et al.*, 1998).

As fímbrias do tipo 1 são particularmente importantes no estabelecimento de infecções do trato urinário por estirpes UPEC. A sua especificidade de ligação a receptores de manose permite a adesão às células epiteliais da bexiga e células proximais do rim (Jones *et al.*, 1995).

No que se refere à piómetra, trabalhos anteriores da nossa equipa e de outros autores mostraram que os genes do operão que codifica para estas fímbrias (*fimA* e *fimH*) estão presentes em 100 % dos isolados recolhidos de úteros de cadelas com piómetra (Mateus *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014). Para além dos genes que codificam para fímbrias tipo 1,

os genes que codificam para as fímbrias P e F1C estão entre os mais frequentemente detectados no genoma de isolados de *E. coli* associados a piómetra (Henriques *et al.*, 2014; Mateus *et al.*, 2013). No entanto, continua por esclarecer o papel destas adesinas no estabelecimento da piómetra. Krekeler *et al.*, (2012) demonstraram que as fímbrias tipo 1 facilitam a adesão *E. coli* ao endométrio canino. Contudo, em estudos posteriores os mesmos autores verificaram que *E. coli* é capaz de compensar a deleção de um ou mais genes que codificam para adesinas (*fimH*, *papGIII* e *sfa*) sem apresentar diminuição significativa da adesão da bactéria ao endométrio da cadela (Krekeler *et al.*, 2013). Este facto reforça a ideia de existência de redundância funcional entre estas adesinas.

1.2.1.2 - Toxinas: α -Hemolisina e CNF1

As toxinas assumem um papel crucial na patogenia das doenças provocadas por *E. coli*. A HlyA é uma exotoxina que forma poros transmembranares nas células do hospedeiro, onde se incluem os eritrócitos, células constituintes dos tecidos e células de reacção inflamatória (Johnson, 1991). O seu papel na infecção está dependente da sua concentração.

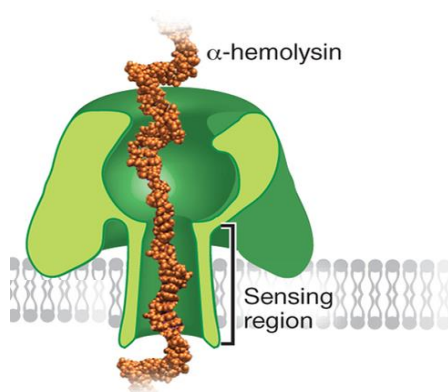


Figura 5: **Representação esquemática da α -hemolisina.** Adaptado de Deamer *et al.* (2016).

Em concentrações elevadas, esta toxina promove a lise de eritrócitos e células nucleadas do hospedeiro. Em concentrações sub-líticas bloqueia vias de sinalização no hospedeiro e afecta componentes do citoesqueleto (Wiles *et al.*, 2013). Apesar da sua importância como factor de virulência, existem poucos trabalhos dedicados ao estudo do papel da α -hemolisina na patogénese da piómetra canina. O gene *hlyA*, que codifica para a toxina α -hemolisina (HlyA), é um dos mais frequentemente detectados (50%) em estirpes de

E. coli isoladas de cadelas com piómetra (Chen *et al.*, Mateus *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014). Recentemente, o nosso grupo de investigação demonstrou que a infecção uterina por *E. coli* β -hemolítica está mais frequentemente associada a metrite, com a consequente maior destruição do tecido uterino, quando comparado com a infecção por *E. coli* não hemolítica (Henriques *et al.*, 2014). No que se refere à indução da resposta imunitária no hospedeiro, o nível de transcrição dos genes que codificam para a IL-1 β e IL-8 foi superior e do gene da IL-6 inferior no endométrio de cadela com piómetra por *E. coli* β -hemolítica. Nesse estudo, através da construção de um mutante isogénico de uma estirpe de *E. coli* para a HlyA, foi ainda possível destrinçar o papel da HlyA na modelação da resposta inflamatória das células epiteliais e do estroma do endométrio da cadela. Esta toxina parece subverter a resposta imunitária do hospedeiro, ao induzir uma redução do nível de transcrição dos genes da IL-1 β , IL-10 e TNF α pelas células do estroma, comparativamente ao mutante isogénico e a uma estirpe não hemolítica (HlyA-) (Henriques *et al.*, 2014). Esta menor transcrição, potencialmente associada também a uma menor expressão destas citocinas, deverá ocorrer numa fase inicial da infecção, favorecendo a criação e um *niche* bacteriano antes da possibilidade de activação de uma resposta imunitária efectiva do hospedeiro.

O factor citotóxico necrosante 1 (CNF1) é outra das toxinas que poderá ter um papel na patogenia da piómetra. De facto, o gene que codifica para esta toxina (*cnf1*) foi detectado nos isolados de *E. coli* associados a piómetra na mesma frequência (50%) que o gene *hlyA* (Mateus *et al.*, 2013, Henriques *et al.*, 2014). Neste caso, os genes que codificam para a HlyA e CNF-1, parecem estar associados na ilha de patogenicidade *PAI II_{J96}*, tal como se verifica para outras estirpes de *E. coli* patogénicas, (Mateus *et al.*, 2013). O CNF-1 é por definição uma toxina produzida por certas estirpes de *E. coli* patogénicas que activa de forma permanente as Rho, Rac e Cdc42 GTPases (Fabbri *et al.*, 2010). A activação de Rho pelo CNF-1 promove alterações na célula ao nível da organização e dinâmica do citoesqueleto de actina, bem como em outros processos celulares. De entre estes, destaca-se a indução da macropinocitose, contratilidade, transcrição, progressão do ciclo celular e a capacidade de manipular a diferenciação celular (Fabbri *et al.*, 2010). Por outro lado, poderá também dar origem a células multinucleadas devido ao efeito inibitório na citocinese (Fabbri *et al.*, 2010).

1.2.1.3 - Outros factores de virulência

Para além dos factores de virulência acima referidos, existem outros com potencial papel na infecção. As proteínas/mecanismos de *evasão* da resposta imunitária do hospedeiro (proteína C que contém o domínio TIR- proteína TcpC; resistência ao complemento-lipoproteína TraT; cápsula bacteriana), o flagelo, o LPS e os sistemas de captação de ferro são alguns dos exemplos de factores de virulência de *E. coli* que contribuem para o seu potencial de virulência e permitem a colonização de diferentes ambientes. De entre estes, pela sua importância na infecção, destacam-se o LPS e os sistemas de captação de ferro. O LPS ou endotoxina, componente estrutural da parede celular das bactérias gram-negativas, é um importante factor de virulência de *E. coli* constituído por 3 subunidades: lípidio A, a porção central constituída por oligossacarídeos e o antígeno O (figura 6). O lípidio A é responsável pela actividade de endotóxima do LPS e o antígeno O constitui a porção variável do LPS, permitindo a distinção de serotipos dentro de uma mesma espécie bacteriana. Para além da sua acção como toxina, o LPS é também um potente indutor da resposta inflamatória. De facto, nos animais e humanos, a estimulação do receptor tipo *Toll* 4 (TLR4) pelo LPS induz a produção de citocinas (pró e anti-inflamatórias) que poderá conduzir, numa situação extrema, à morte.

No que diz respeito à piómetra, o LPS induz a transcrição de mediadores da inflamação, podendo em alguns casos esta ser atribuída preferencialmente a um tipo celular (Karlsson *et al.*, 2015; Henriques *et al.*, 2016). Em células endometriais de cadela estimuladas (4 horas) com LPS, verificou-se um aumento significativo da transcrição do gene da CXCL10 pelas células epiteliais, quando comparado com as do estroma (Henriques *et al.*, 2016). Por outro lado, a transcrição do gene da IL-8 é preferencialmente detectada nas células do estroma do endométrio da cadela, pela estimulação com LPS (Karlsson *et al.*, 2015).

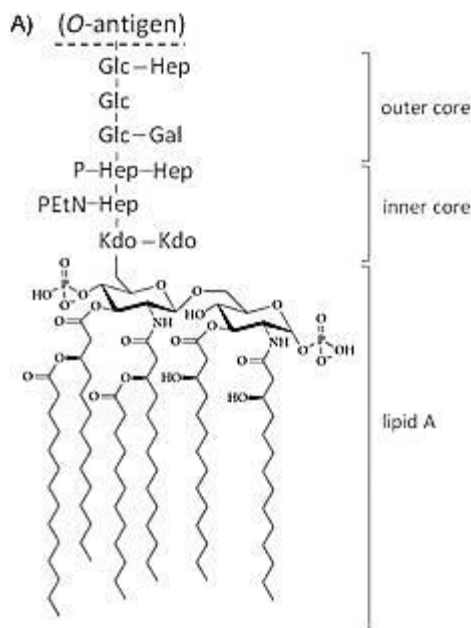


Figura 6: **Representação esquemática do LPS de *E. coli*** Adaptado de Sestito *et al.* (2014).

Os sistemas de captação de ferro são outro dos factores de virulência essenciais ao estabelecimento da infecção, na medida em que o ferro é um factor limitante à multiplicação bacteriana no hospedeiro. Este elemento é essencial em diversos processos celulares como transporte de electrões, síntese de ADN, transporte de oxigénio e metabolismo de peróxidos (Johnson, 1991; Brito *et al.*, 2004). A necessidade de mecanismos que permitam às bactérias captar ferro está associada ao facto deste elemento não se encontrar disponível na sua forma livre, mas sim ligado a proteínas (ferritina, transferrina, lactoferrina, grupo heme). *E. coli* possui vários sistemas de captação de ferro: sideróforos, moléculas com afinidade para o ferro que o remove das proteínas transportadoras; transportadores de metais (proteínas SitABCD); e o receptor ChuA (de ligação ao grupo heme) (Miethke & Marahiel, 2007). A maioria dos isolados de *E. coli* recolhidos de úteros de cadelas com piómetra ($\geq 80\%$) têm no seu genoma genes que codificam para vários sistemas de aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *sitA*, *fepA*, *iroN*, *iucD*) (Mateus *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014). Tal como a maioria dos órgãos, o útero tem uma quantidade de ferro livre disponível muito menor do que aquela que é requerida para as bactérias se multiplicarem e causarem doença (Skaar, 2010), o que justifica a necessidade de utilização de diferentes sistemas de aquisição de ferro. À semelhança do que se verifica para *E. coli* de outras origens (Subashchandrabose & Mobley, 2015), a presença de genes que codificam para vários sistemas de aquisição de ferro no

genoma de *E. coli* associada a piómetra é sugestivo de um mecanismo de redundância funcional, o que também confere uma vantagem na sobrevivência e persistência no útero (Mateus *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014).

1.2.1.4 - Mecanismos de imunidade inata do útero

A imunidade inata compreende respostas não específicas e constitui a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos (Kawai & Akira, 2006; Medzhitov, 2001; Werling & Jungi, 2003). Este mecanismo de defesa baseia-se no reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nas células do hospedeiro (Akira, Takeda, & Kaisho, 2001; Beutler, 2004; Kannaki, Shanmugam, & Verma, 2011). Os receptores do tipo *Toll* (TLRs) são os PRRs mais descritos no tracto reprodutivo da cadela. Estes receptores de imunidade inata são transcritos (TLR1-TLR7 e TLR9) no endométrio da cadela ao longo do ciclo éstrico (Silva *et al.*, 2009). Esta transcrição está dependente da fase do ciclo éstrico, uma vez que esta é regulada pelas hormonas ováricas (Sugiura *et al.*, 2004). De entre os vários membros da família dos receptores *Toll*, o TLR2 e TLR4 são os mais bem caracterizados no endométrio da cadela. O TLR2 está envolvido no reconhecimento de um espectro alargado de PAMPs, incluindo o ácido lipoteicóico de bactérias Gram-positivas e o peptidoglicano e lipoproteínas/lipopéptidos presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Aliprantis *et al.*, 1999). A activação do TLR2 por uma grande variedade de moléculas está relacionada com o facto de formar heterodímeros com os recetores TLR6 ou TLR1, o que dita a sua especificidade de reconhecimento de ligandos (Beutler, 2004; Zähringer *et al.*, 2008).

O TLR4, em cooperação com as proteínas CD14, MD-2 e a proteína de ligação ao LPS (LBP), reconhece o LPS (Poltorak *et al.*, 1998; Kawai & Akira, 2010). Os níveis de transcrição e expressão de TLR2 e TLR4 estão aumentados no endométrio de úteros de cadelas com piómetra, o que em parte reflecte a intensa infiltração por células de reacção

inflamatória no estroma e glândulas endometriais (Silva et al., 2010). Chotimanukul & Sirivaidyapong (2011) descrevem também um aumento da expressão de TLR4 no epitélio luminal e no estroma em úteros com piómetra, quando comparados com úteros de diestro sem afecção uterina.

Depois do reconhecimento e ligação dos PAMPs, os TLRs iniciam uma sinalização através da interação do seu domínio citoplasmático Toll/IL-1R (TIR) com moléculas adaptadoras. Dependendo da molécula adaptadora recrutada, podem ser despoletadas duas vias de sinalização (Kannaki et al., 2011; Medzhitov, 2001); a via dependente da proteína adaptadora factor de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e a via dependente da proteína adaptadora que contém o domínio TIR, indutora de interferão- β (TRIF). A via dependente de MyD88 é comum a todos os TLRs, à excepção do TLR3, e induz a transcrição de citocinas inflamatórias, após a activação do factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Broad et al., 2007). A via independente de MyD88, dependente de TRIF, é despoletada após a activação do TLR3 ou TLR4, com a consequente activação dos factores de transcrição NF- κ B (activação tardia) e factor de regulação do interferão 3 (IRF3). Esta via culmina na transcrição de interferão tipo I, quimiocinas e citocinas inflamatórias (Amjadi *et al.*, 2014).

As citocinas são proteínas de pequena dimensão produzidas e libertadas por uma grande variedade de células com o objectivo de promover a comunicação entre células (Cameron & Kelvin, 2003). Atuam sobre a própria célula, de forma autócrina, ou nas células vizinhas, por acção parácrina. No entanto, em determinadas situações podem também actuar à distância, por acção endócrina (O'Shea, Gadina, & Siegel, 2013). A produção e libertação de citocinas são críticas para uma resposta eficiente e bem orquestrada à inflamação e infecção, razão pela qual as citocinas são consideradas imunomoduladoras (Meide & Schellekens, 1996). Tendo em conta a função, célula de origem ou alvo de acção, as citocinas podem ser classificadas em interleucinas (ILs), interferões (IFNs), factores de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas. As ILs são produzidas primeiramente por leucócitos e actuam principalmente em outros leucócitos. Os TNF podem facilitar a apoptose e morte celular e as quimiocinas induzem quimiotaxia de leucócitos, controlando a sua migração até ao local da infecção (Borish & Steinke, 2003). Os interferões podem "interferir" com a replicação viral, activar células e aumentar a apresentação de antígenos (De Andrea *et al.*, 2002).

De acordo com a sua actividade, as citocinas podem ser subdivididas em dois grandes grupos, citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias (Zhang & An, 2007). As citocinas pró-inflamatórias promovem a inflamação, e incluem, entre outras, a interleucina-1 (IL-1), o factor de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6). Por sua vez, as citocinas anti-inflamatórias são moléculas imunoreguladoras que controlam a resposta das citocinas pró-inflamatórias. No grupo das citocinas anti-inflamatórias incluem-se a IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13. Dependendo do contexto, o interferão-alfa, IL-6 e TGF- β são incluídos em ambos os grupos, nas citocinas anti-inflamatórias e nas pró-inflamatórias. De entre as citocinas anti-inflamatórias, destaca-se a IL-10 pela sua potente propriedade anti-inflamatória, reprimindo a expressão das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 (Zhang & An, 2007).

Dentro do grupo das quimiocinas destacam-se as quimiocinas com grupo C-X-C 10 (CXCL10) e 8 (CXCL8 ou interleucina-8, IL-8) importantes no desenvolvimento da resposta inflamatória (Kayser *et al.*, 2005).

Numa infecção bacteriana, as primeiras células imunes a responder são os monócitos e os macrófagos, que após a activação por bactérias ou os seus produtos respondem produzindo citocinas de resposta precoce tais como TNF- α , IL-1 e IL-6. Estas citocinas activam e amplificam a resposta inflamatória e facilitam a produção de outras citocinas e quimiocinas, incluindo IL-8, IL-12, IL-15 e IL-18, com o objectivo principal de atrair e activar outras células imunes, como neutrófilos e células *natural killer* (Duque, 2014). Algumas destas citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-7, IL-8, IL-15, IL-18, TNF α e IL-10) foram detectadas no soro de cadelas com piómetra, podendo também estar associadas a doença sistémica (Karlsson *et al.*, 2012). Os níveis de transcrição dos genes da IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TGF β foram também significativamente superiores no endométrio de úteros de cadelas com piómetra, quando comparado com o endométrio de útero de cadelas sem afecção uterina (Henriques *et al.*, 2016). Contudo, a resposta inflamatória induzida parece estar dependente do potencial de virulência da estirpe de *E. coli*. No endométrio de cadelas com piómetra associada a *E. coli* hemolítica foram detectados níveis superiores de transcrição do gene da IL-1 β e IL-8 e níveis significativamente inferiores de transcrição do gene da IL-6, comparativamente ao endométrio de cadelas com piómetra por *E. coli* não hemolítica (Henriques *et al.*, 2016).

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1 - Variação de fase das fímbrias tipo 1 de *Escherichia coli*

A grande maioria das estirpes de *E. coli* possuem genes que codificam para fímbrias tipo 1 e são capazes de expressar essa adesina. Os genes *fim* codificam para proteínas que medeiam a adesão da bactéria às glicoproteínas com resíduos de manose que se encontram na superfície de muitas células eucariotas (Vejborg *et al* 2011). A expressão de fímbrias tipo 1 é de fase variável, dependente de um elemento de ADN interconvertível, que permite a mudança entre o estado fimbriado e não fimbriado. A posição deste elemento que contém o promotor é indicativa da transcrição dos genes *fim*.

Nesta primeira parte do trabalho foi testada a expressão das fímbrias tipo 1 em três condições de cultura. A orientação do elemento de ADN, que contém o promotor do gene *fimA*, foi determinada por PCR convencional seguido de clivagem por digestão enzimática com a enzima *HinfI* e determinação da posição *On* e *Off*.

2.1.1 - Isolados

Para a avaliação da variação de fase das fímbrias de tipo 1 foram utilizados 15 isolados (tabela 1) obtidos a partir do conteúdo uterino de cadelas com diagnóstico de piómetra. O diagnóstico de piómetra foi determinado com base no ciclo éstrico em que a cadela se encontrava (diestro), sinais clínicos apresentados, análise hematológica e bioquímica e sinais ecográficos. O conteúdo intra-uterino foi recolhido após procedimento cirúrgico (ovário-histerectomia – OVH), tendo sido *E. coli* a única bactéria isolada.

Tabela1: Identificação dos isolados de *E. coli*. recolhidos de cadelas com piómetra.

Isolados	ID amostra	Grupo filogenético
Pyo1	1	B2
Pyo2	2	B2
Pyo3	3	B2
Pyo4	4	B2
Pyo5	5	B2
Pyo6	6	B2
Pyo7	7	B2
Pyo8	8	B2
Pyo9	9	A
Pyo10	10	B2
Pyo11	11	B2
Pyo12	12	B2
Pyo13	13	B2
Pyo14	14	B2
Pyo15	15	B2

Do stock de bactérias armazenadas a -80 °C em meio BHI com 50% de glicerol foi feita a propagação em placas de Agar Columbia com 5% de sangue de carneiro (COS, Biomérieux, Marcy l'Étoile, França) e incubação a 37 °C aproximadamente 16 horas. Após incubação foi seleccionada uma colónia isolada para a inoculação/propagação nas diferentes condições de cultura.

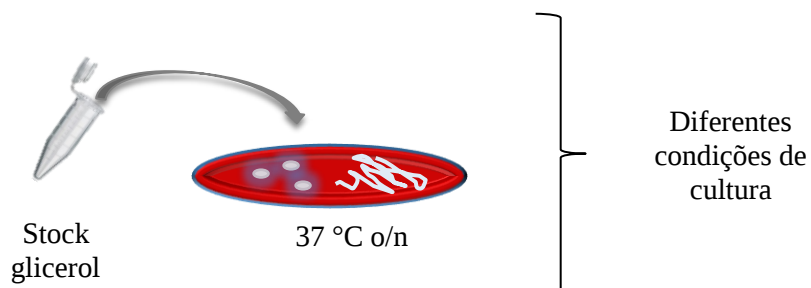


Figura 7: Propagação da cultura de *E. coli*.

2.1.2 - Condições de cultura

Para avaliar a capacidade dos isolados de *E. coli*, de passarem do estado não-fimbriado ao estado fimbriado, foram realizados três ensaios em diferentes condições de cultura: agar, arejada e estática de acordo com as condições descritas por Lim *et al.* (1998). Para a cultura estática (E), foram feitas três passagens em 3 mL de meio líquido LB (LB; Nzytech, Lisboa, Portugal). Cada passagem foi incubada 48 horas, a 37 ° C, sem agitação (condições ótimas para expressão de fimbrias tipo 1). Para a condição de cultura em agar (S18H), as estirpes foram cultivadas em placas de LB agar e incubadas 18 horas a 37 ° C (condição que favorece estado não-fimbriado). Para as condições arejamento (A18H), as estirpes foram cultivadas em meio líquido LB durante 18 horas a 37 ° C com agitação, de acordo com a representação esquemática do procedimento experimental (figura 8).

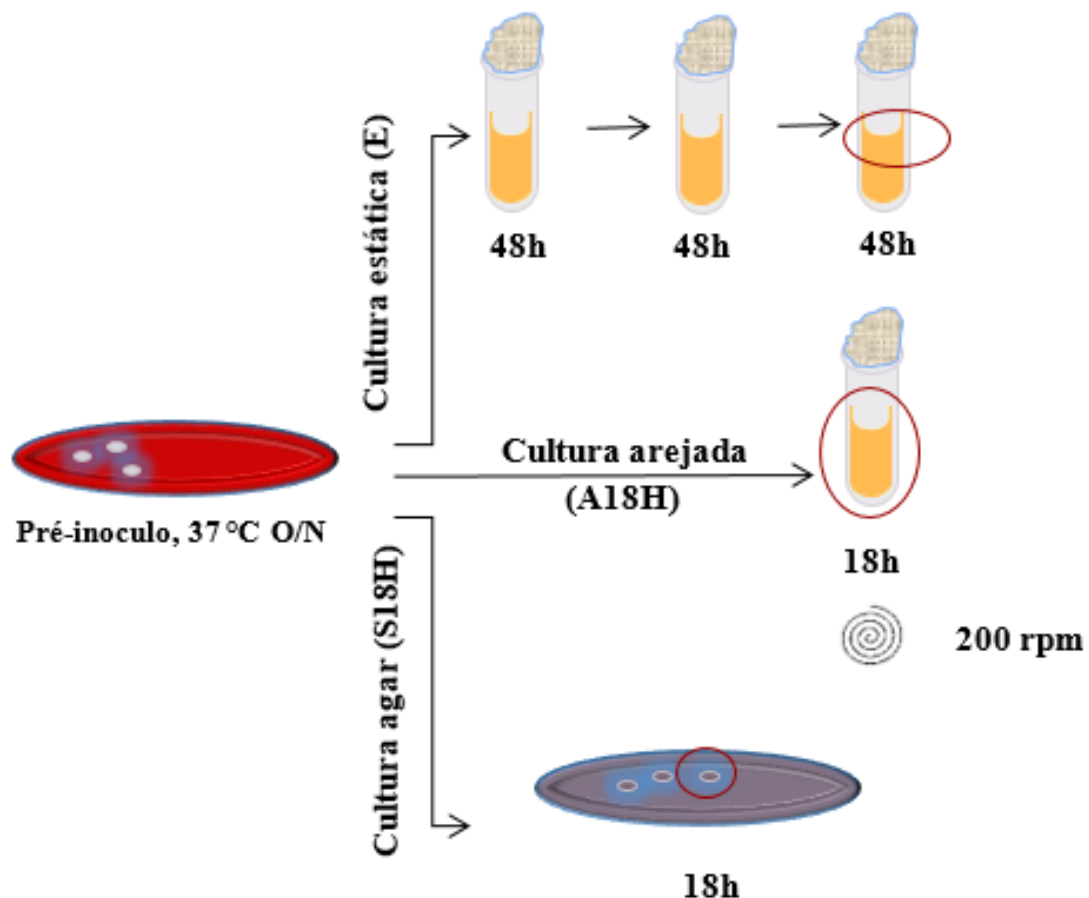


Figura 8 - Condições de cultura dos isolados de *E. coli* .

2.1.3 - Extracção de ADN total pelo método de *boiling*.

A extracção de ADN foi realizada pela técnica rápida de fervura, a qual permitiu a obtenção de ADN total (Féria, 2011). Para a extracção de ADN no final dos tempos de incubação, recolheu-se a parte superior do caldo na cultura estacionária; todo o caldo na

cultura arejada, e uma ança calibrada na cultura em agar. Na figura 9 está representado o procedimento experimental utilizado para extrair o ADN total.

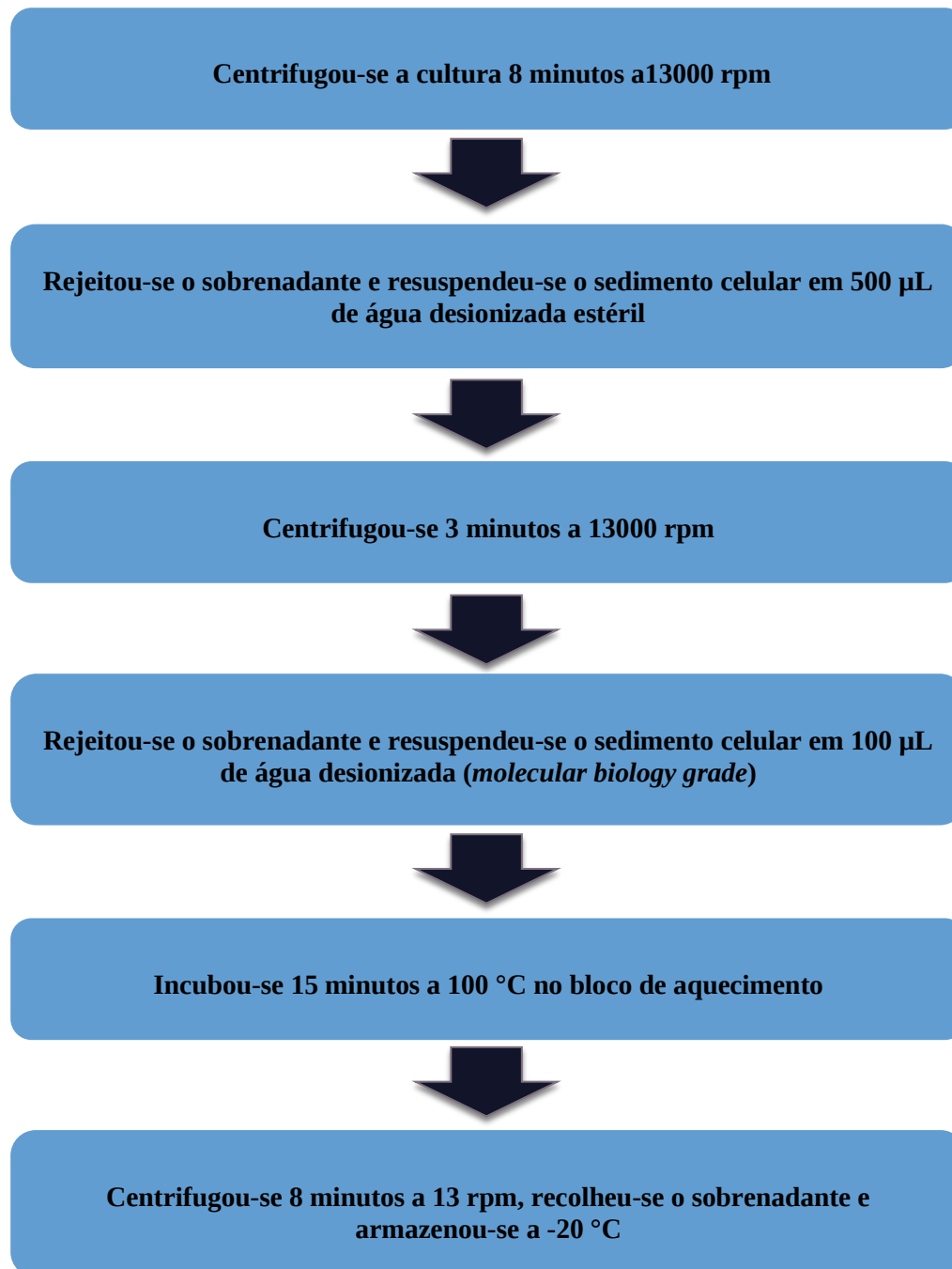


Figura 9 -Procedimento experimental utilizado na extracção de ADN total de *E. coli*

2.1.4 - Determinação da posição *On e Off* do *fim switch*

A amplificação do fragmento da região do promotor (elemento de ADN de 519 pb que cobre a região *fim* invertível) foi realizada por PCR, acordo com as condições descritas por Nowrouzian *et al* (2007), tabela2.

Tabela 2 - **Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação da região que inclui o promotor do gene *fimA*.**

Região alvo	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	Produto do PCR (pb)
Região do promotor (<i>fim switch</i>)	F- GAGAAGAGGTTTGATTTAAGTTG	559
	R-AGAGCCGCTGTAGAACTGAGG	

Na reacção de PCR foram utilizados 2,5 mM de MgCl₂, 1x tampão da enzima, 0,4 mM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 2 U de enzima *GoTaq®Flexi DNA Polymerase* (Promega) e um par de oligonucleotídeos (0,8 µM do par *fimA forward/ fimA reverse* cada). Para cada reacção foram utilizados 2 µL de ADN, num volume final de reacção de 25 µL. O programa de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 95 °C durante 15 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, hibridação a 61 °C, durante 70 segundos, extensão durante 70 segundos a 72 °C. Um passo final de 3 minutos a 72 °C (MJ Mini *Personal Thermal Cycler*, Biorad). Posteriormente foram corridos 5 µL de cada amostra num gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo a 1 % (5 µL/100 mL) e as imagens foram visualizadas e adquiridas num transiluminador UV (*Thermal Imaging System FTI-500*, Pharmacia Biotech). Foi utilizado um marcador 1Kb *plus ladder* (Invitrogen, 10787-018, EUA) de modo a determinar o peso molecular das bandas pretendidas.

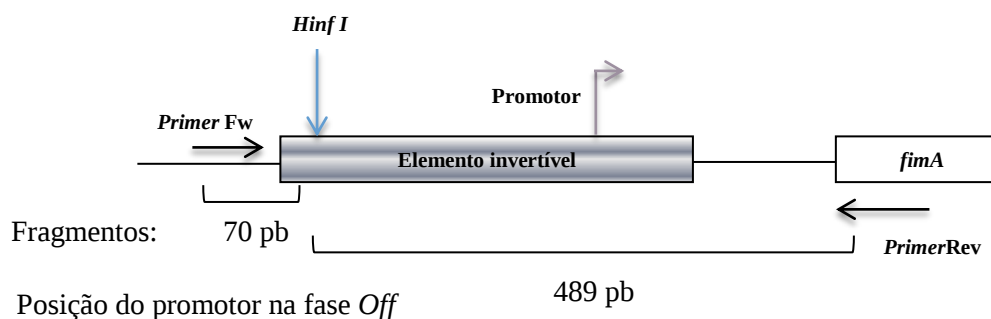
Antes da digestão enzimática, 20 µL do produto de PCR foram purificados com o kit comercial gel puro (NZYMiniprep, MB1001, NZYTech), de acordo com as especificações do fabricante. Após a purificação, a concentração do ADN foi determinada através da leitura da absorvância a 260 e 280 nm no equipamento *Nanodrop 200C Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, EUA).

Para a reacção de digestão, foram utilizados 10 mM de MgCl₂, 100 mM de NaCl, 50 mM do tampão tris-HCl a pH 8.0, 100 µg de BSA (albumina bovina sérica), 1 mM de DTT e 1 µL de *Hinf I* (mi-E0117S, Frilabo, Lisboa, Portugal). Para cada reacção foram utilizados 750 ng/µL de ADN num volume final de 30 µL de reacção. A reacção de digestão foi feita durante aproximadamente 15 horas a 37 °C em banho-maria.

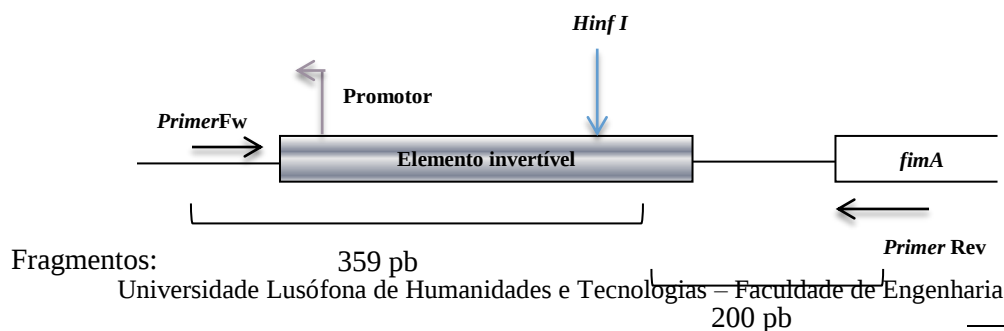
A separação dos produtos da digestão foi feita por electroforese em gel de agarose 2% e a visualização com brometo de etídio. Os fragmentos gerados por restrição com a enzima *Hinf I* (fragmentos específicos da posição- *On* (489 e 70 pb) ou posição- *Off* (359 e 200 pb) foram visualizadas e as imagens adquiridas sob transiluminação UV (*Thermal Imaging System* FTI-500, Pharmacia Biotech,). Foi utilizado um marcador 1Kb *plus ladder* (Invitrogen) de modo a determinar o peso molecular das bandas pretendidas (figura 10).

(a)

Posição do promotor na fase *On*



Posição do promotor na fase *Off* 489 pb



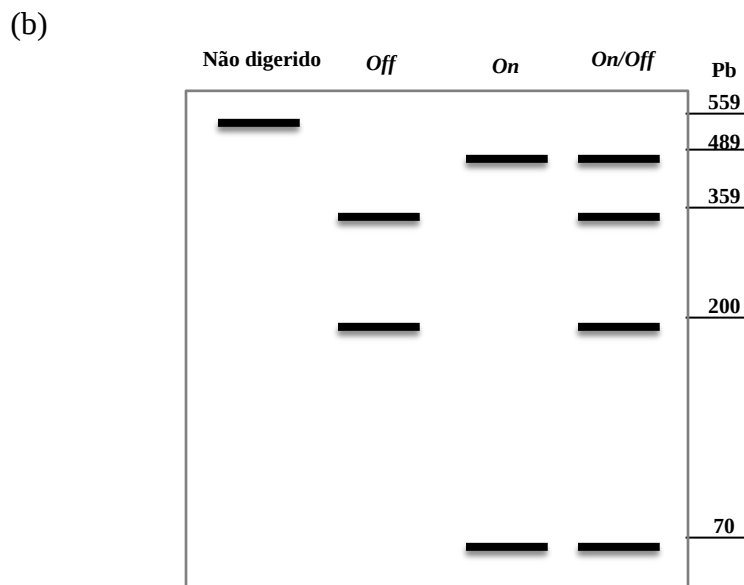


Figura 10- Representação esquemática da orientação do elemento de ADN que contem o promotor do gene *fimA* (a) e resultados esperados após digestão do produto de PCR, com a enzima *HinfI* (b). Adaptado de Struve *et al.* (1999).

2.2 - Análise fenotípica da expressão das fimbrias tipo 1 – estudos de aglutinação

A expressão de fimbrias funcionais é um factor importante para a colonização das células hospedeiras. As fimbrias do tipo 1 ligam-se especificamente a alvos de manose encontrados na superfície das células epiteliais. Deste modo, para avaliar a capacidade de expressar o fenótipo associado às fimbrias tipo 1 fomos testar a capacidade dos nossos isolados aglutinarem extracto de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A camada exterior da parede celular da levedura *S. cerevisiae* é composta maioritariamente por manoproteínas, covalentemente ligadas a β -1,6-glucano e resíduos de manose, tornando a levedura um alvo específico para as bactérias que expressem este tipo de adesinas (figura 11). A especificidade da reacção de aglutinação foi testada através da sua inibição pela D-manose (Vejborg *et al*,

2011). O perfil fenotípico de expressão foi avaliado de acordo com o seguinte procedimento experimental:

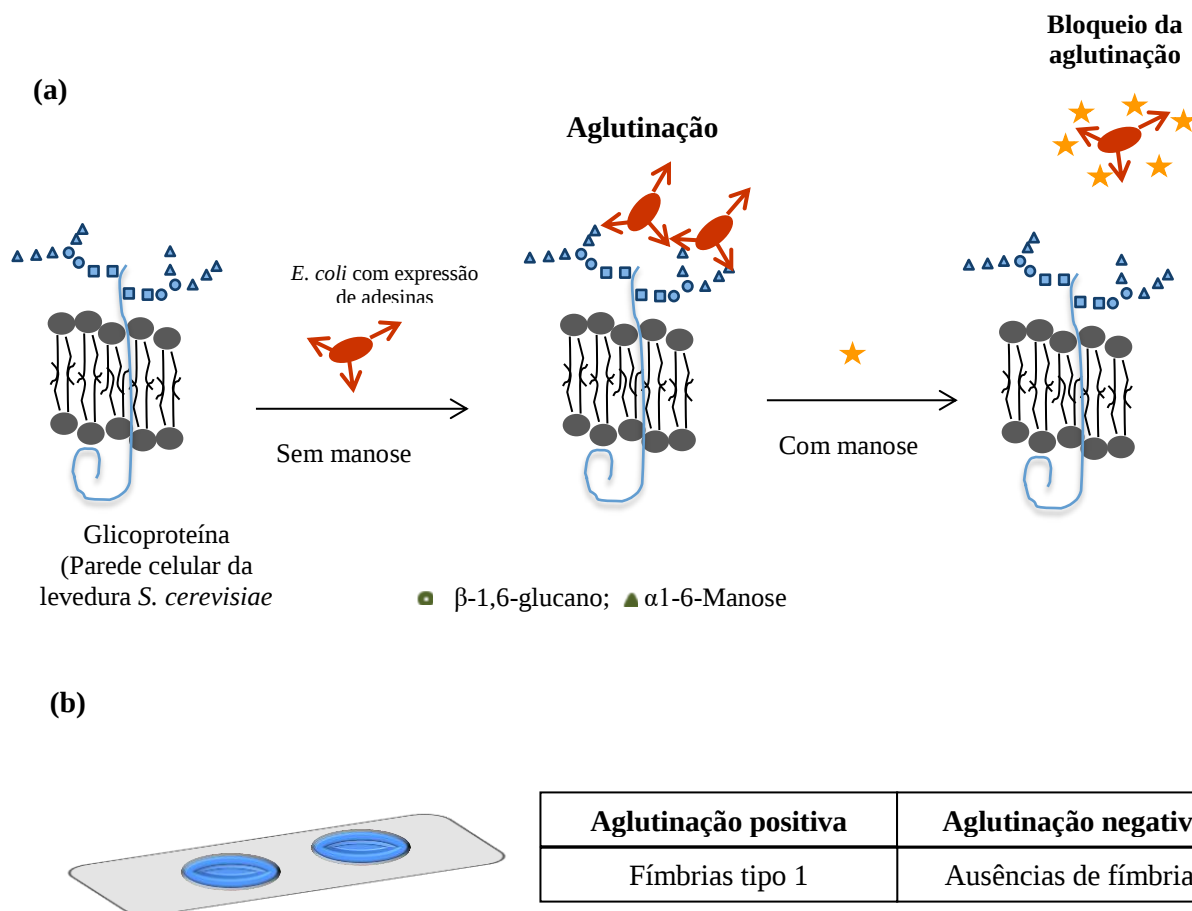


Figura 11 - (a) Representação esquemática da reacção da aglutinação da suspensão de células de *S. cerevisiae* e respectivo bloqueio com D-manose. (b) Resultado esperado após reacção de aglutinação.

2.2.1 - Cultura da *Saccharomyces cerevisiae*

As estirpes utilizadas foram PYCC3973 e PYCC2535. A partir dos *stocks* de glicerol armazenados a -80 °C foi feita a propagação em meio de crescimento YPD (peptona 10 g/L,

extracto de levedura 20 g/L, 20g/L de glucose e agar). A levedura foi crescida durante 48 horas a 30 °C.

2.2.2 - Reacção de Aglutinação e bloqueio com D-manose

Para a reacção de aglutinação adicionou-se 10 µL de suspensão bacteriana a 10 µL de suspensão de levedura a 5 % (1 colónia de levedura em 1 mL de PBS). A concentração da suspensão bacteriana foi avaliada em câmara de *Neubauer* e a reacção de aglutinação observada numa lâmina côncava ou em placa de 96 poços. A reacção de aglutinação (figura 11) foi observada à lupa estereoscópica (Olympos) ao fim de 5, 10 e 15 minutos. Para a reacção de bloqueio da aglutinação com D-manose (metil- α -D-mannopyranoside), lavaram-se e resuspenderam-se as células de levedura em PBS + 50 mM D-manose. De seguida, adicionou-se 10 µL de suspensão bacteriana a 10 µL de suspensão de levedura a 5 % em PBS + 50 mM D-manose. A reversão do fenótipo de aglutinação foi observada aos 5, 10 e 15 minutos de incubação e observada sob lupa estereoscópica.

2.3 - Cultura de explantes uterinos de cadelas

O endométrio oferece uma barreira contra infecções e uma oportunidade de detectar agentes patogénicos através de mecanismos de imunidade inata. Este reconhecimento é feito através de receptores que reconhecem sequências conservadas em agentes patogénicos, conhecidos como padrões moleculares associados a agentes patogénicos. Um grupo-chave de receptores que reconhecem estes padrões moleculares são os receptores do tipo *Toll* (*Toll Like receptors*; TLRs). Com o objectivo de estudar a transcrição dos componentes das vias de resposta imunitária inata numa fase inicial da infecção foi desenvolvido um modelo de

cultura *in vitro* de explantes de úteros de cadelas saudáveis. De forma a simular a resposta uterina à infecção bacteriana procedeu-se à estimulação com 2 estripes de *E. coli*.

2.3.1 - Cultura de *explantes*

Foram utilizados úteros de 3 cadelas saudáveis (1-3 anos de idade) submetidas a ovariectomia (OHE) para fins contraceptivos no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. As cadelas encontravam-se na primeira metade do diestro (determinado por citologia vaginal, concentração de progesterona e histologia), e o útero não apresentava evidência histológica de hiperplasia quística do endométrio (HCE) e com resultado bacteriológico negativo.

Após a remoção do útero, este foi lavado com meio de lavagem *Hank's balanced salt solution* (HBSS, GIBCO®, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA), gentamicina (50 µg/mL; Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) e anfotericina B (2,5µg/mL; Sigma-Aldrich). De seguida, com o auxílio de material cirúrgico estéril, foi feito um corte longitudinal nos cornos uterinos de modo a expor o endométrio. Foram retiradas pequenas biópsias do útero (*explantes*) com um *punch* de biópsia (Kai medical, BP-60F, Solingen, Alemanha) de 6 mm de diâmetro (figura 12). Estas foram passadas três vezes em meio de lavagem HBSS. Posteriormente os *explantes* (1 por poço) foram transferidos para uma placa de 6 poços (COSTAR®, Corning Incorporated, Nova Iorque, EUA) com 3 mL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute-1640* (RPMI-1640, GIBCO®) suplementado com 0,1% BSA (Sigma-Aldrich), gentamicina 50 µg/mL + anfotericina 250µg/mL. Procedeu-se então a uma pré- incubação de 1 hora numa estufa de CO₂ (HERAcell® 150, Heraeus, EUA) a 37°C, 5% de CO₂ com vista à estabilização dos *explantes*. Todas as incubações foram feitas com agitação suave (IKA®-VIBRAX-VXR, Werke GMBH & CO.KG, Staufen Alemanha).

Após a pré-incubação, o meio de cultura foi renovado e procedeu-se à estimulação dos *explantes* com diferentes estirpes *E. coli* em diferentes tempos de incubação entre as 2 e as 24 horas. Para cada hora, foram incluídos controlos negativos (não contaminados).

No fim do protocolo da cultura, removeu-se cuidadosamente com um bisturi, a camada de miométrio e serosa do explante total de útero, pesou-se o explante de endométrio

obtido e dividiu-se ao meio, metade foi armazenado em solução de *RNAlater* (Quiagen, D-40724, Hilden, Alemanha) e mantido a – 80 °C para extração de ARN e a outra metade embebida em formol para processamento de imunohistoquímica.

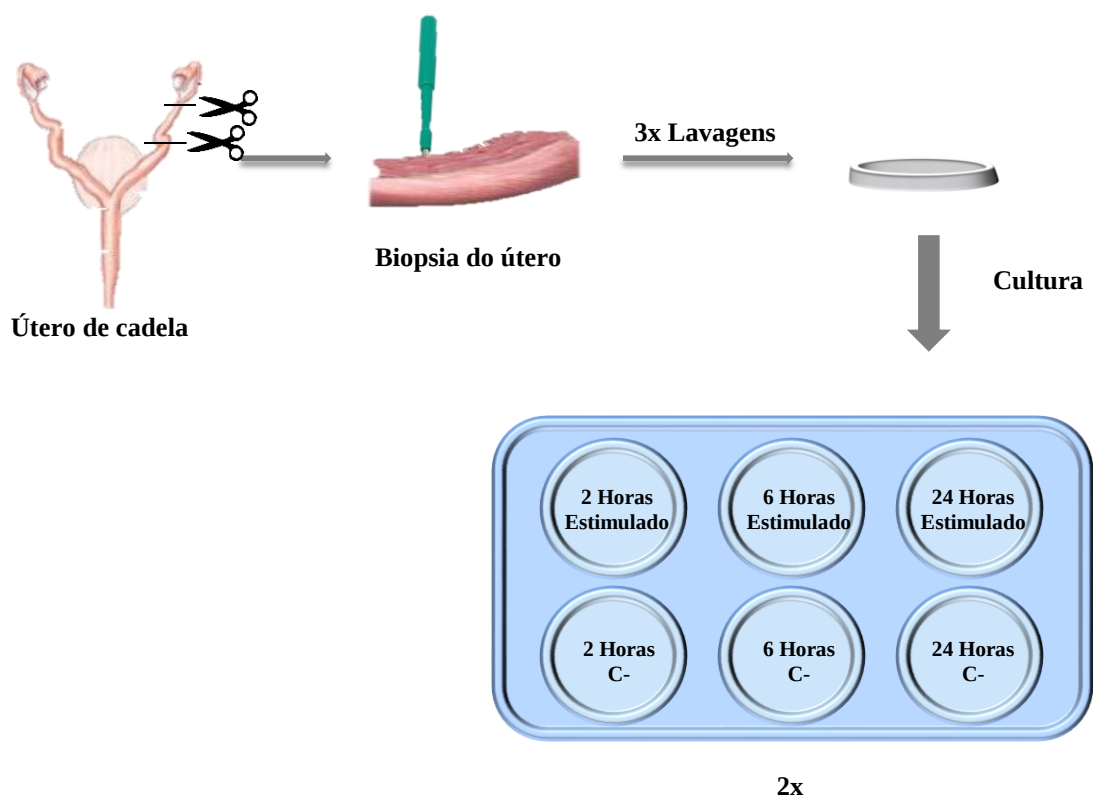


Figura 12 - Esquema experimental de cultura de explants do útero de cadela.

2.3.2 - Estirpes

As estirpes utilizadas nos ensaios de estimulação dos explantes, foram previamente isoladas do útero de uma cadela com piómetra e caracterizadas quanto ao seu potencial de virulência por Henriques *et al* (2014) (tabela 1, appendix). Estas estirpes, à exceção da *Pyo9* que pertence ao grupo filogenético A, pertencem todas ao grupo filogenético B2, associado a maior potencial de virulência. O mutante de deleção isogénico da estirpe *Pyo7* para o gene

hlyA (*Pyo7AhlyA*), foi construído utilizando o sistema de recombinase *Lambda-Red* por Henriques *et al* (2014), de acordo com o desenho por Datsenko e Wanner (2000).

Antes das experiências de estimulação, as bactérias foram plaqueadas em meio de ágar Columbia e incubadas a 37 ° C 16 horas. Para cada bactéria, uma colónia foi incubada em meio LB líquido a 37 ° C durante 48 horas sem agitação (figura 13), a suspensão foi lavada três vezes por centrifugação (4000 rpm durante 10 minutos) e ressuspensa em PBS estéril. Por último, a densidade óptica (600 nm) da suspensão foi ajustada de modo a obter uma densidade de 0,3 nm em 10 mL de meio de cultura, correspondente a uma concentração aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

Em cada poço com os explantes foi inoculado um volume correspondente a um determinado número de bactérias, definido pela multiplicidade de infecção (MOI) pretendida, que neste caso foi MOI 5.

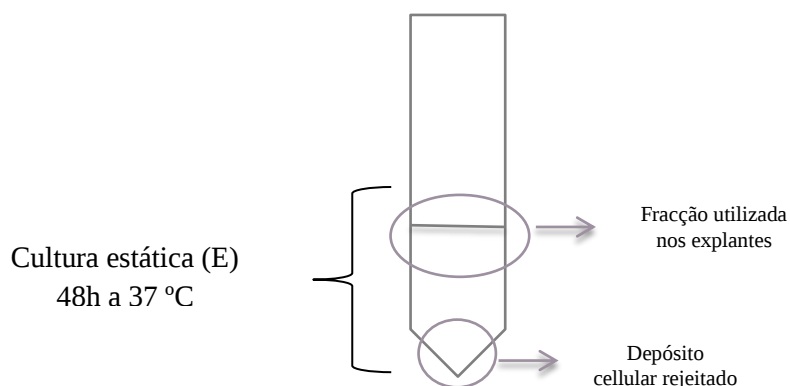


Figura 13: **Fracção da cultura de *E. coli* utilizada na estimulação dos explantes.**

2.4 - Imunohistoquímica

De modo a confirmar a presença de *E. coli* no tecido uterino e validar o procedimento experimental de estimulação dos explantes, foi efectuada a marcação de LPS

(lipopolisacarídeo) de *E. coli* por imunohistoquímica nos *explantes* de cadela saudáveis (tecido controlo) e em *explantes* contaminados com *E. coli*.

Após incubação com as bactérias, os *explantes* foram embebidos em parafina no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV com recurso a um processador de tecidos LEICA TP1020. Seguidamente realizaram-se cortes de 3 µm de espessura com um micrótomo, que foram montados em lâminas *Superfrost®* (Menzel Glaeser, D-38116 Braunschweig, Alemanha). Procedeu-se posteriormente à desparafinação do tecido em xilol, à reidratação gradual em concentrações decrescentes de álcoois e por fim à imersão em água destilada durante 5 minutos. O protocolo de imunohistoquímica foi efectuado pelo método da imunoperoxidase. Deste modo, após a desparafinização e hidratação, a peroxidase endógena foi neutralizada através da incubação das lâminas em peróxido de hidrogénio a 30 % em água destilada durante 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à recuperação antigénica com incubação das lâminas em tampão citrato (10mM, pH=6) durante 15 minutos em microondas (700W). De modo a bloquear os locais de ligação inespecíficos, as lâminas foram incubadas numa solução de bloqueio (PBS 1x + 0,1 % Tween + 2,5 % BSA), durante 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (anti-*E. coli* LPS *antibody*, Abcam, ab35654), 100 µL por corte numa concentração de 1:100, durante 2 horas, à temperatura ambiente em câmara húmida. Depois de terminada a incubação com o anticorpo primário, efectuaram-se 2 lavagens de 10 minutos em PBS 1X e procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário (produzido em ratinho contra IgG de coelho) conjugado com peroxidase (*peroxidase conjugated mouse anti-rabbit IgG polyclonal*; Dako, Dinamarca) na diluição de 1:100, durante 1 hora à temperatura ambiente. A reacção colorimétrica foi iniciada através da adição do substrato DAB (DAB kit, Zytomed Systems, Berlim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Por último, lavaram-se as lâminas em água corrente durante 5 minutos após os quais foram coradas com hematoxilina e montadas com *entelan* (Merck, Darmstadt, Alemanha). Como controlo negativo substituiu-se o anticorpo primário por PBS 1x.

2.5 - Avaliação da transcrição dos genes que codificam para mediadores de inflamação por RT-PCR

Neste estudo foi efectuada a análise, por RT-PCR, da transcrição dos genes que codificam para as citocinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF α em explantes de úteros de cadela não contaminados (controlo negativo) e contaminados com os isolados de *E. coli*. durante 2 a 24 horas.

2.5.1 - Extracção de ARN e síntese de ADNc

Para a extracção do ARN total foram processados 20 mg -30 mg de tecido com o *kit Rneasy Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha). A digestão do ADN genómico foi realizada com o *kit Rnase-free Dnase Set* (Qiagen). Após a extracção, a concentração e pureza do ARN foram determinadas através da leitura da absorvância a 260 e 280 nm no *NanoDrop 2000C Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). O grau de pureza das amostras foi avaliado através da relação das absorvâncias a 260 e 280 nm (A260/280). As amostras de ARN foram distribuídas por alíquotas e armazenadas a – 80 °C até posterior utilização.

A síntese de ADNc foi efectuada a partir de 500 ng do ARN total. Para a síntese de ADNc utilizou-se um *kit* comercial *Superscript® III First Strand Synthesis Supermix* para qRT-PCR (Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA), e a síntese foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante. O ADNc foi diluído (1:5) em água e as amostras armazenadas a – 20 °C.

2.5.2 - PCR

Os oligonucleotídeos iniciadores (tabela 3) utilizados nas reacções de PCR foram escolhidos inicialmente através do programa *Primer3 Software*, sendo posteriormente confirmados com o programa *Primer Express*® *Software* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os oligonucleotídeos foram desenhados em dois exões diferentes (adjacentes), sempre que possível, de modo a evitar a amplificação do ADN genómico. A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores seleccionados foi confirmada por BLAST.

As reacções individuais de PCR foram efectuadas num volume final de 25 µL, contendo 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,4 mM da mistura de dNTPs (Promega), 1X tampão da enzima *Taq DNA polimerase* (Promega), 2 mM MgCl₂, 2 µL de ADNc e 2,5 U da enzima *Taq DNA polimerase* (*Gotaq*®*flexi DNA Polymerase*, Promega). Em cada ensaio foi incluído um controlo negativo, ao qual se adicionou água em vez de ADNc. As condições do ciclo de amplificação foram idênticas para todos os pares de oligonucleotídeos iniciadores, excepto para a temperatura de hibridação (tabela 3). O ciclo de amplificação foi composto por um passo inicial de desnaturação de 3 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94 °C), hibridação (entre 52,5 e 60 °C, 1 minuto) e extensão (3 minutos a 62 °C). Por fim foi efectuado um passo de extensão ao fim dos 30 ciclos de 7 minutos a 72 °C (*MJ Mini Personal Thermal Cyclers*, Biorad). Posteriormente os produtos foram separados por electroforese em gel de agarose (1,5 %) corado com brometo de etídeo a 1 % (5 µL/100 mL) e as imagens foram visualizadas e adquiridas num transiluminador UV (Pharmacia Biotech, Thermal Imaging System FTI-500). Foi utilizado um marcador 1Kb plus ladder (Invitrogen,) de modo a determinar o peso molecular das bandas pretendidas.

Tabela 3 - **Oligonucleotídeos iniciadores usados nas reacções de RT-PCR**

GGen e	Oligonucleotídeos (5'-3')	Dimensã o produto PCR (pb)	Temperatu ra de hibridação (°C)	Número de acesso (Genebank)
IIL- 1β	FW- CACCAGTGAAATGATGGCTTAC RV- CTCATGTGGAACACCACTTGTT	453	56	NM_001037971
IIL-6	FW- GTACATCCTCGGCAAAATCTCT RV- GGATGAGGTGAATTGTTGTGTG	410	56	NM_001003301
IIL-8	FW-TTGGCAGCTTTTGTCTT RV-GGGCCACTGTCAATCACT	149	52,5	NM_001003200
IIL- 10	FW- AAGCTGGACAACATACTGCTGA RV- TGTCAAACTCACTCATGGCTTT	316	56	NM_001003077
TNF K-α	FW- TGACAAGCCAGTAGCTCATG TT RV- CGGCAAAGTCCAGATAGTTA GG	410	56,3	NM_001003244 .4

2.6 - Quantificação relativa da transcrição de componentes das vias dos TLRs por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para a quantificação relativa da transcrição de componentes das vias dos TLRs, utilizou-se explantes armazenados a -80°C em solução *RNAlater* (Quiagen). Após o descongelamento dos tecidos, pesou-se e utilizou-se uma amostra representativa com 20 mg - 30 mg. O tecido foi colocado com uma esfera de metálica estéril num *ependorf* com tampão RLT (fresco) e homogeneizado utilizando o *TissueLyserII* (Quiagen® GmbH, Hilden, Alemanha), a 25 Hertz durante 2 minutos. A extracção de ARN total foi efectuada com o *kit* comercial *Rneasy mini kit* (Quiagen), de acordo com as instruções do fabricante, tal como descrito no ponto 2.5.1. Após a extracção, a concentração e pureza do ARN foram determinadas através da leitura da absorvância a 260 e 280 nm no *NanoDrop 2000C Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). O grau de pureza das amostras foi avaliado através da relação das absorvâncias a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}). As amostras de ARN foram distribuídas por alíquotas e armazenadas a -80°C . Procedimento anteriormente descrito (ponto 2.5.1).

2.6.1 - Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (tabela 4) usados nas reacções de qRT-PCR foram escolhidos de acordo com o procedimento anteriormente descrito (ponto 2.5.2).

Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores usados nas reacções de qRT-PCR.

Gene	Oligonucleotídeos (5'-3')	Dimensão produto PCR (pb)	Número de acesso (Genebank)
IL-1β	FW-GAAGAAGCCCTGCCCACA RV-AATTATCCGCATCTGTTTTGCAG	104	NM_001037971
IL-6	FW-CTGGCAGGAGATTCCAAGGAT RV-TCTGCCAGTGCCTCTTTGC	167	NM_001003301
IL-8	FW-TTGCTCTCTTGGCAGCTTTTG RV-TTTGGGATGGAAAGGTGTGG	122	NM_001003200
IL-10	FW-ACATCAAGAACCACGTGAACTCC RV-ACTCACTCATGGCTTTGTAGACACC	177	NM_001003077
CXCL10	FW-TCCTGCAAGTCCATCGTGTC RV- ATTGCTTTCACTAAACTCTTGATGGTC	114	NM_001010949.1
TNF-α	FW-CTGCCTCAGCCTCTTCTCCTT RV-CTGGGCAAGAGGGCTGATTA	133	NM_001003244.4
RPL27	FW-TCGTCAACAAGGATGTCTTCAGAG RV-TCTTGCCAGTCTTGTACCTCTCCT	96	NM_001003102

2.6.2 - PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A reacção de PCR em tempo real foi realizada no equipamento *Step-One-Plus*TM (Applied Biosystems, Warrington, UK), usando ciclos de amplificação universal sugerido pelo fabricante, com aquisição de curvas de dissociação. A reacção foi realizada num volume total de 12,5 µL. Utilizou-se 2 ng de ADNc, 80 nM de oligonucleotídeo iniciador, 1x *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e água *RNase free (Water RNase-free DEPC treated)*, USB corporation, Cleveland, USA) de modo a perfazer o volume total. Todas as reacções foram realizadas em duplicado em placas de 96 poços (Applied Biosystems). Como controlo endógeno (gene *housekeeping*) utilizou-se o gene *rpl27*. A obtenção de um produto único de amplificação foi confirmada através da análise das curvas de dissociação.

Os dados da quantificação relativa do ARNm foram analisados com o algoritmo *real-time PCR Miner*.

2.7 - Análise estatística

Os dados de variação de fase e do qRT-PCR foram analisados recorrendo ao programa *Statistica* para o *Windows* (*Statistica* 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, EUA, 2005). A normalidade da distribuição dos dados foi confirmada pelo teste de *Cochran Hartley*. Os dados de qRT-PCR foram analisados pelo teste de ANOVA factorial 2X2 (variáveis fixas: tempo de incubação e estirpe e sua interacção). Os dados de variação de fase (variável categórica) foram analisados pelo teste exacto de *Fisher*. Em ambos os casos utilizou-se o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Capítulo 3 - Resultados

3.1 - Análise da expressão de fímbrias tipo 1 em diferentes condições de cultura

Numa primeira análise, foi avaliada a orientação do promotor do gene *fimA* em 15 isolados de piómetra. Foram testadas três condições de cultura, estática (LB líquido sem agitação), arejada (LB líquido com agitação) e agar (LB sólido). Os resultados desta análise estão representados na figura 14 e na tabela 5. Verificou-se que a maioria dos isolados, quando crescidos em diferentes condições de cultura, tem a capacidade de alternar entre a posição *Off* e a posição *On*. Apenas um dos isolados (*Pyo14*) não apresentou esta capacidade de transcrever o gene *fimA* (posição *Off* em todas as condições de cultura testadas). A posição totalmente *On* foi apenas detectada num isolado (*Pyo5*) crescido em LB líquido sem agitação. O crescimento em agar favorece significativamente ($p < 0,05$) a posição *Off* do promotor. Nestas condições, 60% dos isolados apresentaram somente células em posição *Off* e 40% dos isolados uma mistura de células na posição *On* e *Off*. O crescimento em condições de cultura arejada favorece significativamente ($p < 0,05$) a posição mista *On* e *Off*. Em 80% dos isolados observaram-se células em ambas as posições *On* e *Off* e em 20% dos isolados o promotor estava na posição *Off*. (figura 16). Na cultura estática, a maioria dos isolados (67%) continham células nas posições *On* e *Off* e 7% dos isolados permutaram completamente para a posição de *On* (tabela 5).

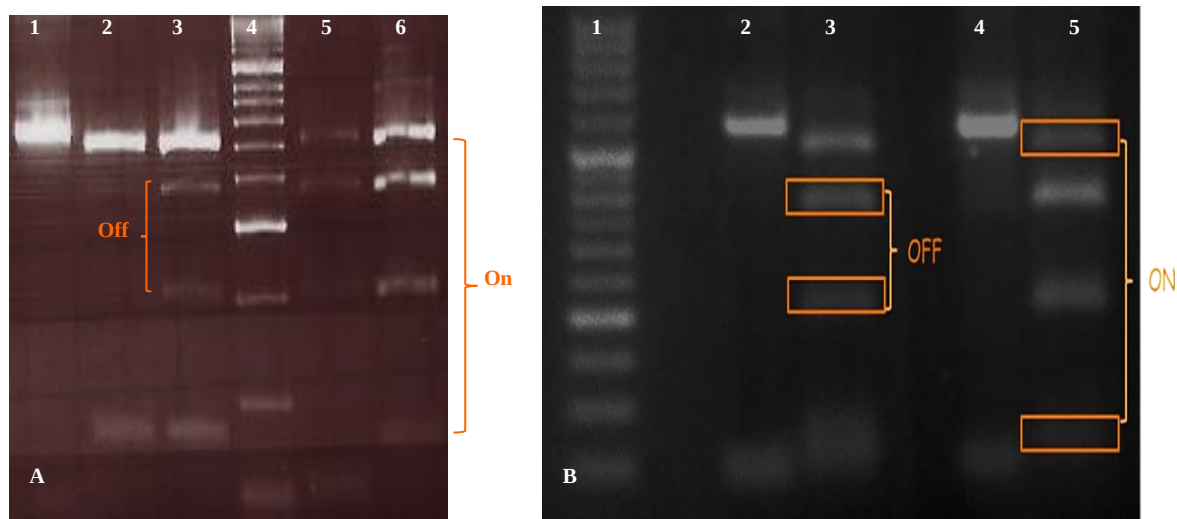


Figura 14 - **Resultados representativos da digestão do produto de PCR com a enzima *Hinf I***. (posição-**On**: fragmentos de 489 pb e 70 pb; posição-**Off**: fragmentos de 359 pb e 200 pb). **(A) (isolado Pyo5)**: 1- Produto de PCR não digerido; 2- condição estática- mistura da posição *On* e *Off*; 3- condição arejada- posição *On*; 4- Marcador de massas moleculares (*Hyperladder II*, *Bioline*) 5 e 6- crescimento em agar- mistura da posição *On* e *Off*; **(B) (isolado Pyo10)** : 1- Marcador de massas moleculares (*Ladder VI* Nzytech); 2 e 4- Produto de PCR não digerido; 3 – condição arejada- mistura da posição *On* e *Off*; 5 – condição arejada - mistura da posição *On* e *Off* (com predominância da posição *Off* -bandas mais intensas).

Tabela 5- **Análise dos resultados da digestão do produto de PCR com a enzima Hinf I**

Isolados de cadela	Cultura estática (E)	Cultura arejada (A18H)	Cultura em agar (S18H)
Pyo1	<i>Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>Off</i>
Pyo2	<i>On+Off</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>
Pyo3	<i>Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>Off</i>
Pyo4	<i>On+Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>On+Off</i>
Pyo5	<i>On</i>	<i>On+Off</i>	<i>On+Off</i>
Pyo6	<i>On+Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>On+Off (+)</i>
Pyo7	<i>On+Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>On+Off (+)</i>
Pyo8	<i>On+Off</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>
Pyo9	<i>(+)On+Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>Off</i>
Pyo10	<i>(+)On+Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>Off</i>
Pyo11	<i>(+)On+Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>On+Off</i>
Pyo12	<i>Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>Off</i>
Pyo13	<i>On+Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>On+Off</i>
Pyo14	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>
Pyo15	<i>(+)On+Off</i>	<i>On+Off</i>	<i>On+Off (+)</i>

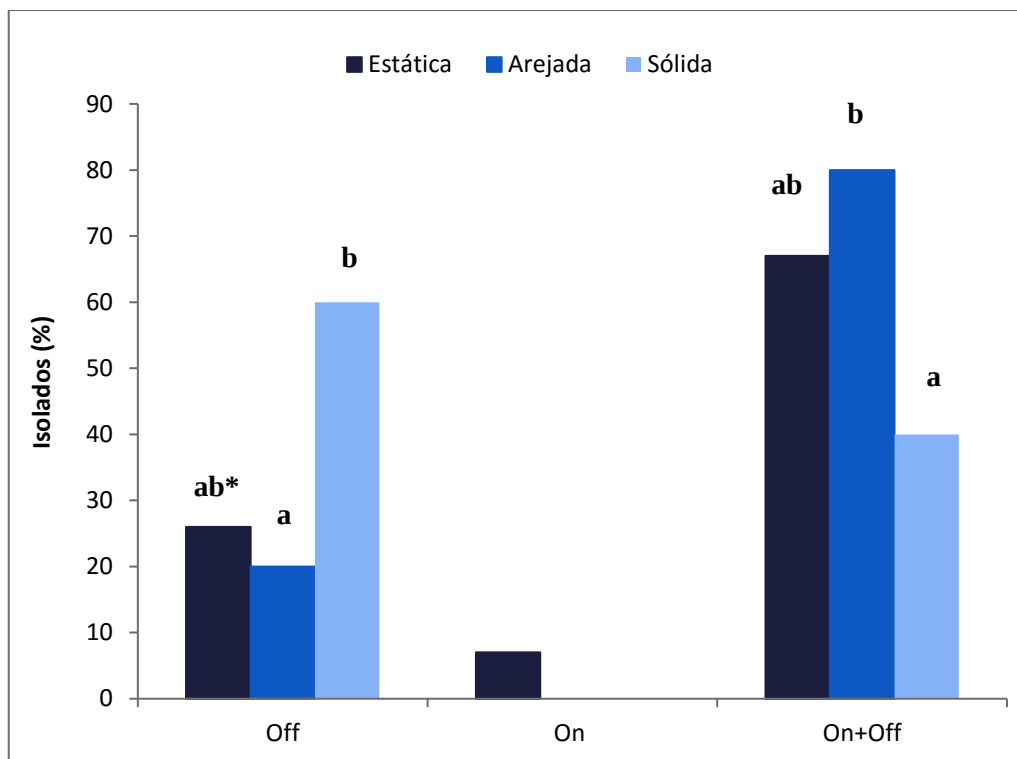


Figura 15 - Posição do promotor do gene *fimA* em isolados de *E. coli* de piómetra crescidos em meio LB líquido sem agitação (condição de crescimento estática), cultura arejada (LB líquido com agitação) e LB sólido. Letras diferentes representam diferenças significativas (posição **Off**: cultura sólida vs arejada $p < 0,05$; cultura sólida vs cultura estática- * tendência para a significância, $p = 0,066$), (posição **On+Off** : cultura sólida vs cultura arejada $p < 0,05$). As significâncias (a,b) são representadas dentro de cada grupo (independentemente para cada posição: *On*, *Off* ou *On+Off*).

3.1.1 - Análise fenotípica

A capacidade de expressar o fenótipo associado às fimbrias tipo 1 foi testada em dois isolados (*Pyo5* e *Pyo7*), após crescimento em condições de cultura estática, através da respectiva capacidade de aglutinarem extracto da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O potencial de virulência das estirpes *Pyo5* e *Pyo7* foi anteriormente caracterizado pela nossa equipa através do rastreio por PCR convencional de genes que codificam para factores de

virulência (Henriques *et al.*, 2014). Entre outros, foram pesquisados genes que codificam para factores envolvidos na adesão (fimbrias tipo 1, fimbrias P e S, F1C, *focG*), envolvidos na produção de toxinas (*hlyA*, *cnf1*) e na aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *sitA*, *fepA*, *inoN*) [**Pyo5**: *fimH*⁺, *fimA*⁺, *PapEF*⁻, *papC*⁻, *sfa/focDE*⁺, *sfaS*⁻, *focG*⁺, *hlyA*⁻, *cnf1*⁻, *chuA*⁺, *fyuA*⁺, *sitA*⁺, *fepA*⁺, *iroN*⁺, **Pyo7**: *fimH*⁺, *fimA*⁺, *PapEF*⁺, *papC*⁺, *sfa/focDE*⁺, *sfaS*⁻, *focG*⁻, *hlyA*⁺, *cnf1*⁺, *chuA*⁺, *fyuA*⁺, *sitA*⁺, *fepA*⁺, *iroN*⁺].

O isolado *Pyo5* foi o único que apresentou apenas a posição *On* em crescimento estático e o isolado *Pyo7* apresentou uma mistura de células em posição *On* e *Off* nas mesmas condições de cultura. A especificidade da reacção de aglutinação foi testada através da sua inibição pela D-manose (figura 16)

As suspensões dos isolados *Pyo5* e *Pyo7* apresentaram a capacidade para aglutinar extracto de *S. cerevisiae* (figura 16, C e E). Esta aglutinação foi totalmente (*Pyo5*- figura 17, D) ou parcialmente revertida (*Pyo7* – figura 16, F) pela adição de D-manose a 3%.

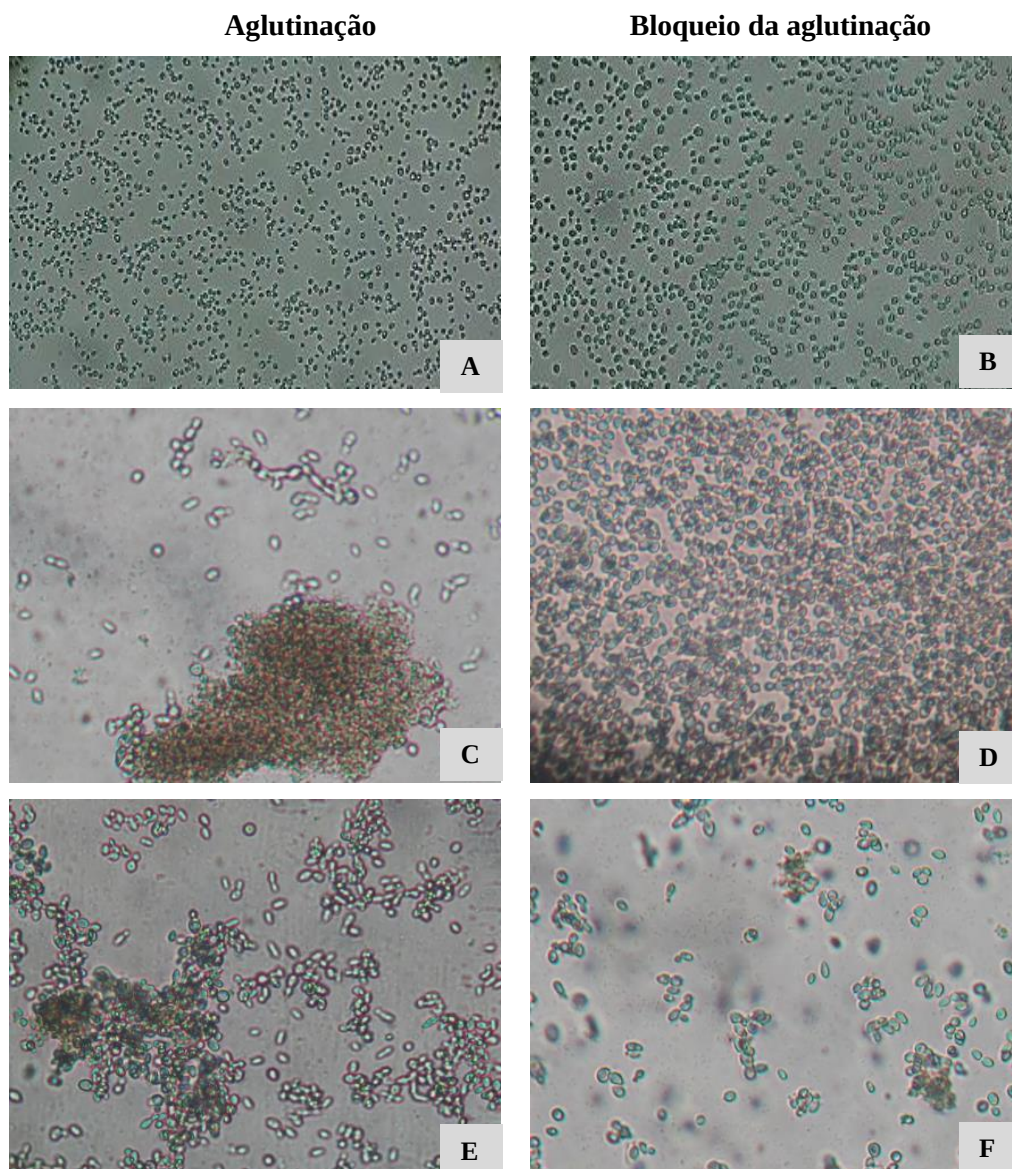


Figura 16 - Ensaio de aglutinação de células da levedura (fenótipo de aglutinação específico da expressão de fimbrias tipo 1 para os isolados *Pyo5* e *Pyo7*). (A) Controlo negativo- *S. cerevisiae* + PBS; (B) Controlo negativo do bloqueio da aglutinação- *S. cerevisiae* + PBS + 3% de manose; (C) *S. cerevisiae* + *Pyo5* aos 10 minutos; (D) *S. cerevisiae*+3% de manose + *Pyo5* aos 10 minutos; (E) *S. cerevisiae* + *Pyo7* aos 10 minutos; (F) *S. cerevisiae*+3% de manose + *Pyo7* aos 10 minutos.

3.2 - Cultura de explantes de útero

De forma a mimetizar a fase inicial de infecção uterina e avaliar os mecanismos de resposta imunitária inata do útero procedeu-se à contaminação de explantes de úteros de cadelas saudáveis com isolados de *E. coli*, obtidos de úteros de cadelas com piómetra (*Pyo10* e *Pyo11*). Apesar de ambas as estirpes pertencerem ao mesmo grupo filogenético (B2), o seu genótipo de virulência é distinto: ***Pyo10***: *fimH*⁺, *fimA*⁺, *PapEF*⁻, *papC*⁻, *sfa/focDE*⁻, *sfaS*⁻, *focG*⁻, *hlyA*⁻, *cnf1*⁻, *chuA*⁺, *fyuA*⁺, *sitA*⁺, *fepA*⁺, *iroN*⁻, ***Pyo11***: *fimH*⁺, *fimA*⁺, *PapEF*⁺, *papC*⁺, *sfa/focDE*⁺, *sfaS*⁻, *focG*⁺, *hlyA*⁺, *cnf1*⁺, *chuA*⁺, *fyuA*⁺, *sitA*⁺, *fepA*⁺, *iroN*⁺.

A localização de *E. coli* nos explantes uterinos foi avaliada pela marcação do LPS por imunohistoquímica. Foi possível detectar a presença da bactéria no endométrio (epitélio – C, E e F e estroma – D), tendo sido verificado também uma diminuição da integridade do tecido após as 6 horas de incubação (figura 17, imagem C e D). No controlo negativo (útero não contaminado) não foi detectada a presença de bactéria e o tecido não apresentou sinais exacerbados de destruição após as 6 horas de incubação (figura 17, imagem A e B).

3.2.1 - Imunohistoquímicas

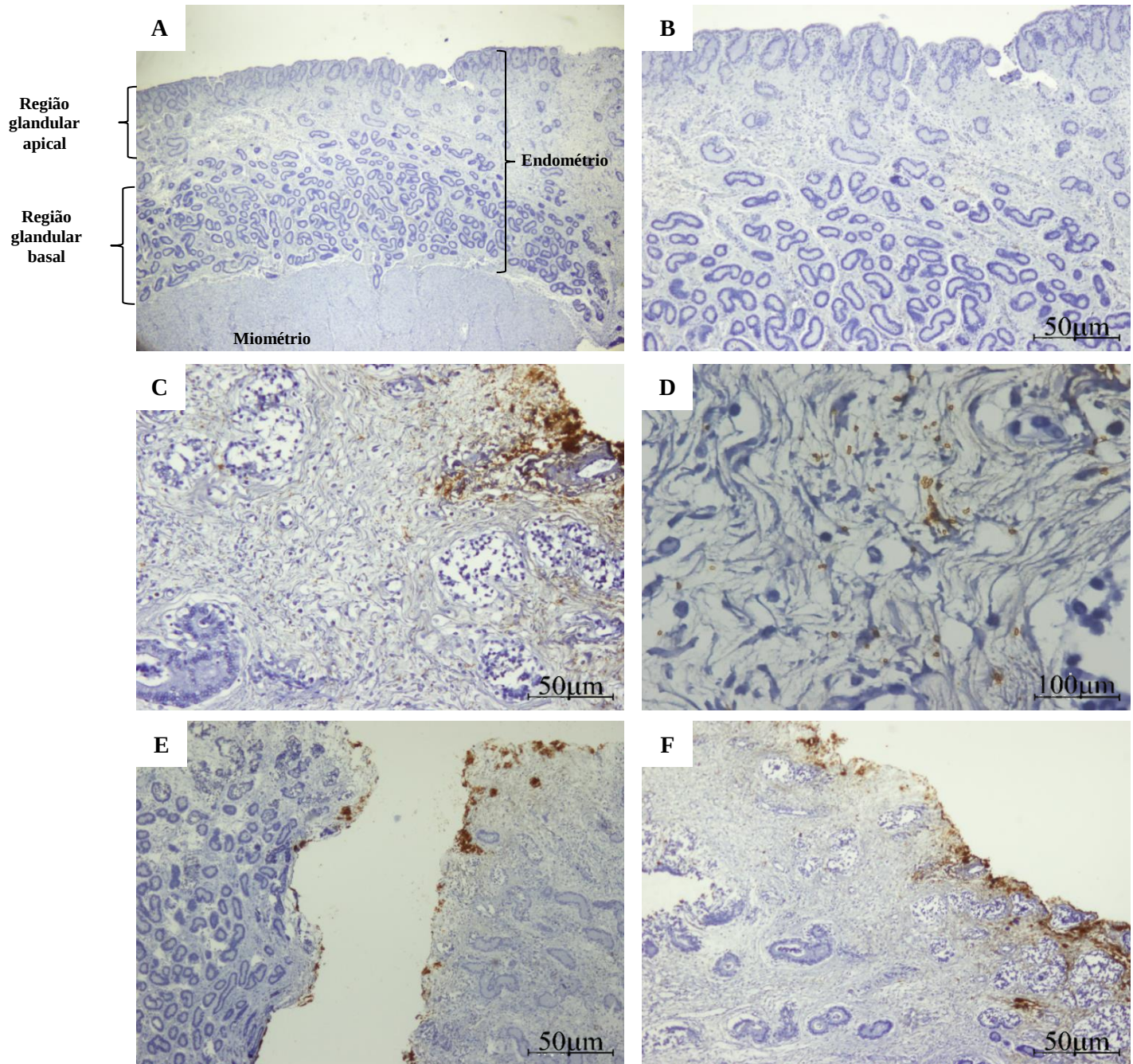


Figura 17: **Análise imunohistoquímica dos explantes de útero de cadelas contaminados com *E. coli*.** Controle negativo 6 horas (A, B). Explantes uterinos contaminados com a estirpe Pyo11 (C,D) e Pyo10 (E,F). A bactéria foi identificada no epitélio luminal e glandular (C, E, F), e no estroma (D).

3.2.2 - Transcrição de genes que codificam para mediadores de inflamação

Neste estudo foi efectuada a análise da transcrição dos genes que codificam para a IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α no endométrio removido dos explantes uterinos previamente contaminados com *Pyo4*, *Pyo10* ou *Pyo11*. A transcrição foi avaliada por RT-PCR em explantes de endométrio não contaminados (controlo negativo) e contaminados com os isolados de *E. coli* entre as 2 e as 24 horas de incubação.

A análise da transcrição do TNF α mostrou que esta citocina não foi transcrita em úteros saudáveis entre as 2 e as 6 horas de incubação (figura 18, A) Por outro lado, a transcrição do TNF α nos explantes contaminados com *E. coli* apresenta um aumento nas primeiras horas de incubação (2 e 3 horas), quando comparada com tempos mais tardios de incubação (figura 18, A). No que se refere à transcrição das interleucinas nos explantes não contaminados (controlo negativo), detectou-se transcrição de IL-1 β e IL-8 (figura 18, B) a partir das 2 h de incubação e de IL-6 logo às 0 horas. Nos explantes incubados com *E. coli* verificou-se transcrição de IL-1, IL-6 e IL-8 entre as 2 e 24 horas, (*Pyo10* e *Pyo11*) (figura 19, B).

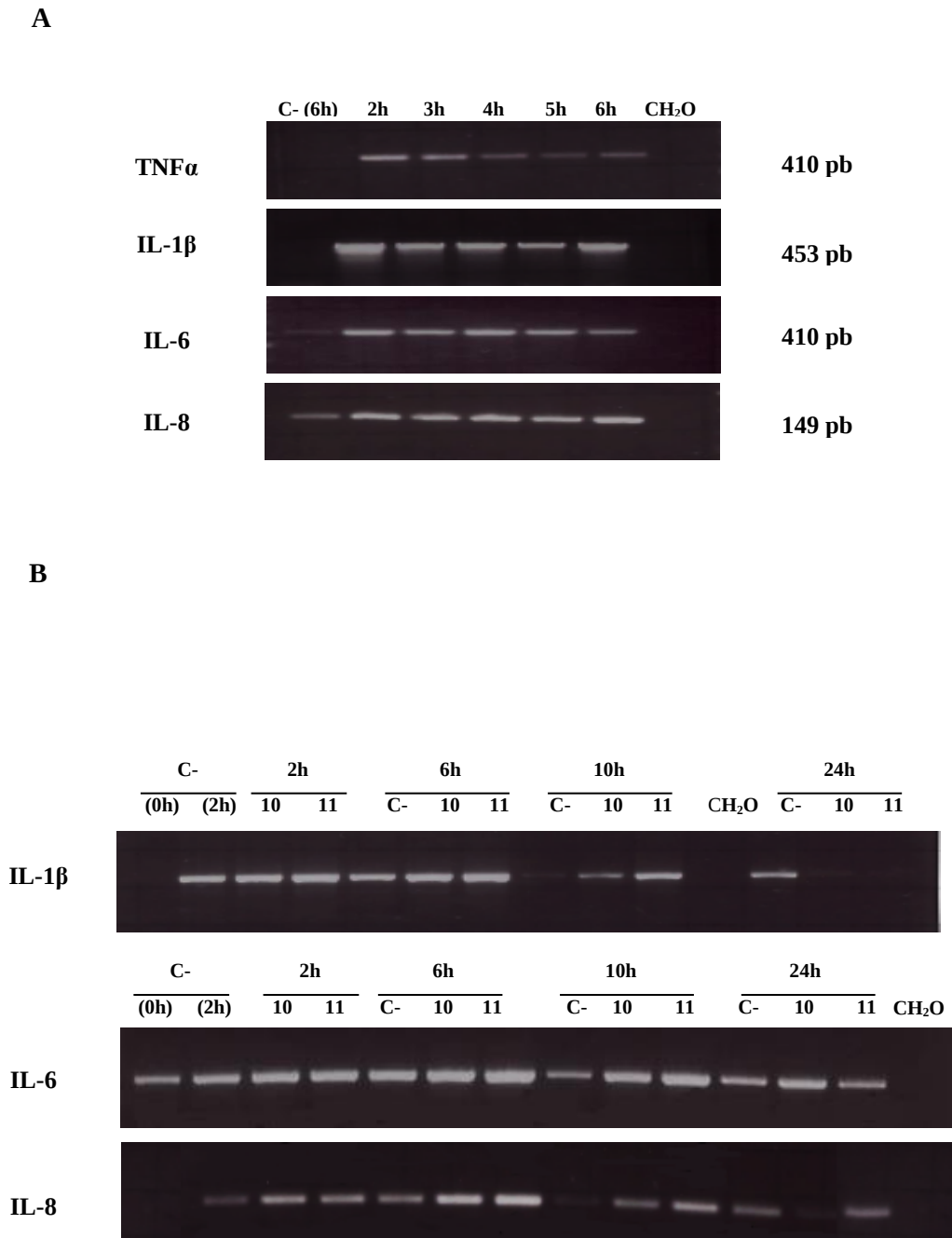


Figura 18 - Exemplo dos produtos de amplificação obtidos por RT-PCR para os transcritos de citocinas pró-inflamatórias em explantes de úteros de cadelas saudáveis. Explantes contaminados com *Pyo4* (A) ou com os isolados *Pyo10* e *Pyo11* (B).

Legenda: C- controlo negativo-explante não contaminado; CH₂O- Controlo negativo da reacção de PCR em que o cADN foi substituído por água; 10 – *Pyo10*; 11 – *Pyo11*.

3.2.3 - Quantificação da transcrição de citocinas pro e anti – inflamatórias em explantes de endométrio de cadelas

Após a detecção do mRNA dos mediadores de inflamação por RT-PCR, foi ainda efectuada a quantificação dos transcritos dos genes que codificam para o TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-8, IL-10 e CXCL10 por PCR em tempo real. De forma a avaliar o papel da α -hemolisina numa fase inicial da infecção, nesta análise foram utilizadas amostras de explantes de endométrio controlo (endométrio removido dos explantes de útero não contaminado) e explantes de endométrio previamente incubados com as estirpes *Pyo7* e o seu mutante isogénico para o gene da α -hemolisina (*Pyo7 Δ hlyA*). A escolha da análise do papel deste factor de virulência no desenvolvimento da infecção prendeu-se com o facto dos nossos resultados anteriores demonstrarem que o gene *hlyA* (que codifica para a α -hemolisina) estava presente em 50% de estirpes de *E. coli* isoladas de piómetra. A α -hemolisina contribui para a virulência da *E. coli* ao induzir a destruição do tecido uterino, formando poros que lisam os eritrócitos e células nucleadas, como por exemplo neutrófilos, células epiteliais (Wiles & Mulvey, 2013).

No que se refere ao TNF α , verificou-se que no explante controlo a transcrição aumentou significativamente ($p < 0,05$) das 2 para as 6 horas de incubação e diminuiu para o nível inicial (2h) às 24 horas de incubação. Após 2 horas de incubação, a transcrição deste gene foi alterada pela incubação com as duas estirpes bacterianas em estudo, quando comparada com o controlo. A transcrição do TNF α foi significativamente superior no endométrio contaminado com *Pyo7* ($p < 0,05$) ou *Pyo7 Δ hlyA* ($p < 0,05$), quando comparado com o respectivo controlo (figura ; tabela 7).

No endométrio não contaminado, o gene que codifica para a IL-1 β apresentou um aumento significativo da transcrição apenas às 24 horas de incubação, quando comparado com o tempo mais precoce (2h vs 24h; $p < 0,05$). A nossa análise mostrou também que ocorreu uma alteração da transcrição deste gene pela estimulação com *Pyo7* ou *Pyo7 Δ hlyA*. A transcrição da IL-1 β às 24 horas no controlo foi significativamente maior quando comparado

com a transcrição nos explantes de endométrio contaminados com *E. coli* (figura 19; tabela 7). Por outro lado, a transcrição do gene que codifica para a IL-6 e IL-8 não foi grandemente alterada após estimulação por *E. coli* (tabela 7). Verificou-se apenas um aumento significativo às 24h, em comparação com as 2 horas, dentro de cada grupo individualmente. No entanto, o endométrio contaminado com a estirpe *Pyo7ΔhlyA* apresentou uma transcrição do gene da IL-6 superior ($p < 0,05$) às 6h de incubação por comparação com o controlo não contaminado. A transcrição foi significativamente maior ($p < 0,05$) às 24 horas, quando comparado com as 2 e 6 horas.

A transcrição do gene que codifica para a citocina pro-inflamatória IL-10 não apresentou qualquer alteração, quer dentro de cada grupo em estudo, quer entre grupos. Por outro lado, a transcrição do gene *CXCL10* sofreu alterações da transcrição dentro de cada grupo e após a estimulação com *Pyo7*. A transcrição aumentou significativamente das 2h para as 24h no endométrio controlo e no endométrio contaminado com *Pyo7* ou *Pyo7ΔhlyA* (Figura 19, F). A estimulação com *Pyo7* aumentou também de forma significativa a transcrição do gene *CXCL10* no endométrio após 24 horas de incubação, quando comparado com o controlo (tabela 6).

Tabela 6 - Nível de significância dos resultados da transcrição no endométrio controlo versus endométrio estimulado com *Pyo7* ou *Pyo7ΔhlyA*.

Gene	Estatística entre grupos	Significância
TNFα	Controlo (-) às 2 horas vs <i>Pyo7</i> às 2 horas	$p < 0,05$
	Controlo (-) às 2 horas vs <i>Pyo7ΔhlyA</i> às 2 horas	$p < 0,05$
	Controlo (-) às 24 horas vs <i>Pyo7</i> às 24 horas	* $P=0,065$
IL-1β	Controlo (-) às 24 horas vs <i>Pyo7</i> às 24 horas	$p < 0,05$
	Controlo (-) às 24 horas vs <i>Pyo7ΔhlyA</i> às 24 horas	$p < 0,05$
IL-6	Controlo (-) às 6 horas vs <i>Pyo7</i> às 6 horas	* $p=0,055$
	Controlo (-) às 6 horas vs <i>Pyo7ΔhlyA</i> às 6 horas	$p < 0,05$
CXCL10	Controlo (-) às 24 horas vs <i>Pyo7</i> às 24 horas	$p < 0,05$

Teste estatístico usado: teste exacto de Fischer.

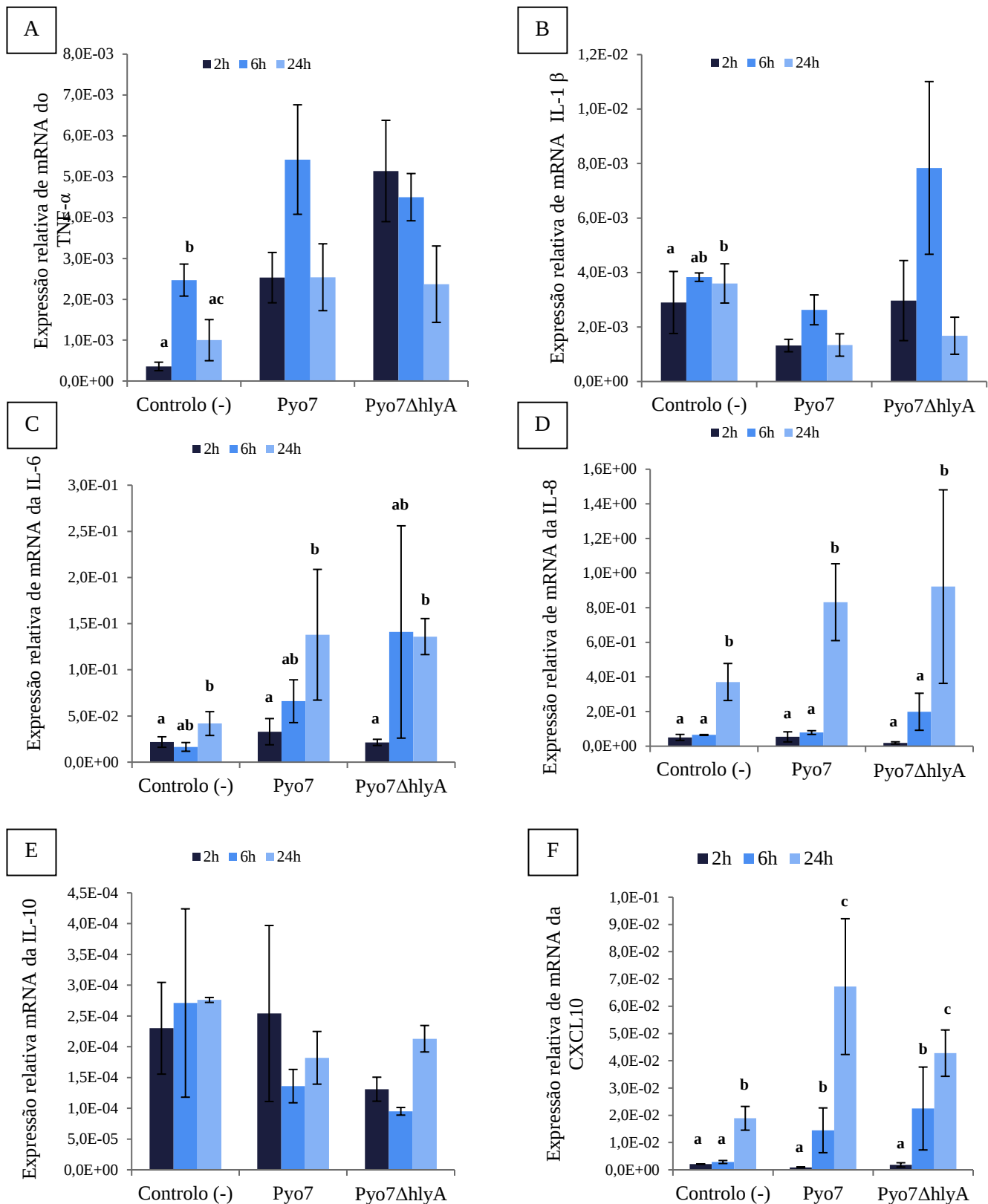


Figura 19 - Expressão relativa do ARNm do TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e CXCL10 após incubação de explantes com o isolado de *Pyo7* e o seu mutante isogénico *Pyo7 Δ hlyA* às 2, 6 e 24 horas. As significâncias são apresentadas dentro de cada grupo. Colunas com letras diferentes dentro do grupo diferem significativamente ($p < 0,05$; teste exacto de Fischer).

Capítulo 4 - Discussão

Este trabalho teve por objectivo a caracterização da transcrição/expressão das fímbrias tipo 1 em isolados de *E. coli* obtidos de úteros de com piómetra em cadela, Posteriormente foram também estudados os mecanismos de resposta imunitária do útero numa fase inicial da infecção através da utilização de um modelo *ex vivo* com *explantes*. Apesar dos genes que codificam para as fímbrias tipo 1 terem sido detectados em isolados de *E. coli* obtidos de casos de piómetra (Henriques *et al.*, 2016) a capacidade efectiva de expressar este tipo de fímbrias ainda não foi descrita. Da mesma forma, o estudo dos mecanismos de defesa do útero numa fase precoce da infecção, utilizando um modelo que mantém a arquitectura estrutural do tecido uterino, é uma das lacunas dos trabalhos dedicados ao estudo da fisiopatologia da piómetra na cadela.

As fímbrias do tipo 1 são um factor de virulência de extrema importância na adesão às células do hospedeiro, um passo crucial no estabelecimento da infecção bacteriana, como por exemplo caso das infecções do tracto urinário (Peterson, 1996). Recentemente demonstramos que em isolados de *E. coli* associados a piómetra que os genes envolvidos na síntese de fímbrias tipo 1 (*fimH* e *fimA*) estavam presentes em 100 % dos isolados (Henriques *et al.*, 2016). Este resultado sugere que este factor de virulência poderá ter um papel importante na patogenia da piómetra. No entanto, a caracterização/regulação da expressão desta adesina pelos isolados de *E. coli* de piómetra é ainda desconhecida. Apesar dos genes do operão *fim* serem dos mais prevalentes, quer em estirpes patogénicas quer em estirpes consideradas comensais (Hernandes *et al.*, 2008), algumas destas estirpes poderão não ter a capacidade de expressar estas adesinas.

A expressão das fímbrias tipo 1 de *E. coli* é regulada pelo fenómeno denominado de “variação de fase”, um mecanismo que permite a alteração reversível entre o estado fimbriado (promotor na orientação *On*-transcrição dos genes do operão *fim*) e afimbriado (promotor na orientação *Off*-transcrição dos genes silenciada) (Schwan *et al.*, 2011). Neste estudo foi analisada a orientação do promotor do gene *fimA* nos isolados de *E. coli* em três condições de crescimento *in vitro*. A análise da variação de fase do promotor do gene *fimA*

por amplificação por PCR seguida de digestão do produto do PCR, com a enzima *HinfI*, demonstrou que 14 dos 15 isolados de *E. coli* da nossa colecção apresentam capacidade para transcrever os genes *fim*. No entanto, a orientação do elemento de ADN que contem o promotor do gene *fimA* mostrou-se dependente das condições de cultura. No crescimento arejado e no estático prevaleceu uma população de células mista, células com o promotor na orientação *On* e células com o promotor na orientação *Off* (condição arejada: 80% dos isolados; condição estática: 67% dos isolados). Por outro lado, no crescimento em agar sólido a transcrição dos genes *fim* está maioritariamente silenciada (60% dos isolados). Este resultado está de acordo com o descrito para as estirpes de *E. coli* uropatogénica em que a posição *Off* é favorecida pelo crescimento em agar e no crescimento em cultura líquida (estática e arejada) verifica-se uma mistura de células em posição *On* e células em posição *Off* (Lim *et al.*, 1999; Schwan *et al.*, 2011).

Esta capacidade de alteração do estado fimbriado por um mecanismo de variação de fase *in vitro* poderá ser indicativa do papel das fimbrias tipo 1 na infecção *in vivo*. Lim *et al.*, (1999) demonstraram que as estirpes uropatogénicas associadas a pielonefrite apresentam uma maior resistência à passagem da orientação *Off* para *On* quando crescidas *in vitro* em condições que favorecem o estado fimbriado. De facto, um estudo de infecção experimental *in vivo* demonstrou que o padrão de orientação do promotor do gene *fimA* está correlacionado com o tipo de infecção do tracto urinário da qual a estirpe foi isolada (Gunther *et al.*, 2002). As estirpes de *E. coli* isoladas de cistites alteram a orientação do elemento para a posição *On* permanecendo nesta posição durante a infecção. No entanto, as estirpes isoladas de pielonefrite alteram a orientação do elemento invertível para *On* numa proporção mais baixa numa fase inicial da infecção e para *Off* numa fase posterior. Por sua vez, as estirpes isoladas de fezes passam rapidamente da posição *Off* para *On* quando crescidas em condições que favorecem esta transição (Lim *et al.*, 1999). Isto sugere que estas estirpes têm alguma versatilidade em expressar as fimbrias tipo 1, o que está de acordo com a sua capacidade em colonizar diferentes ambientes. Os nossos isolados de piómetra apresentaram uma capacidade de variação de fase em condições de cultura *in vitro* semelhante ao verificado para as estirpes de origem fecal. À excepção do isolado *Pyo14*, todos os isolados de piómetra apresentaram capacidade de reverter da posição *Off* (crescimento em agar) para *On* quando crescidas em condições arejadas. Estes resultados sugerem que os isolados de *E. coli*

recolhidos de úteros de cadelas com piómetra estão aptos a colonizar diferentes ambientes e a “ligar” e “desligar” a transcrição e consequentemente a expressão das fímbrias tipo 1 dependendo do ambiente a colonizar. De facto, a nossa análise anterior de comparação do genótipo de virulência de estirpes de *E. coli* de origem fecal, cistites e piómetra mostrou que as estirpes causadoras de piómetra têm origem fecal e podem também ser causadoras de cistites (Mateus *et al.*, 2013).

Neste trabalho foi ainda testada a capacidade dos isolados de *E. coli*, não só transcreverem, mas também expressarem as fímbria tipo 1 avaliada em ensaios de aglutinação de extractos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (estirpes PYCC3973 e PYCC2535). A especificidade de expressão destas fímbrias foi ainda confirmada através da inibição da aglutinação pela adição de D-manose. Os ensaios de aglutinação de extractos de levedura foram efectuados na condição de crescimento estática para dois isolados, *Pyo5* que apresenta todas as células na posição *On* e *Pyo7* que apresenta uma mistura de células na posição *On* e *Off*. Estes dois isolados demonstraram capacidade de aglutinar o extracto de levedura, o que indica que ocorreu expressão de fímbrias tipo 1. No entanto, fenotipicamente, o grau de aglutinação mostrou-se superior para o isolado que apresenta todas as células na posição *On*. Esta eficiência na aglutinação do extracto de levedura sugere uma maior capacidade efectiva de colonização/adesão *in vivo* de ambientes em que as fímbrias tipo 1 sejam as principais adesinas envolvidas.

Apesar dos nossos resultados demonstrarem que *E. coli* associada a piómetra transcreve os genes *fim* e expressa fímbrias tipo 1, é importante salientar que estes isolados possuem, embora numa prevalência mais baixa, genes que codificam para outras classes de adesinas, nomeadamente fímbrias P e fímbrias F1C (Silva *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014; Hagmen *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2003). Apesar da importância da adesão bacteriana no estabelecimento da infecção, não tem sido fácil provar o papel destas adesinas na patogenia da piómetra, uma vez que as mesmas apresentam redundância funcional (Krekeler, 2013). Contudo, a importância da expressão das adesinas tipo 1 pelos isolados de *E. coli* não se restringe apenas à adesão, mas também à indução da resposta imunitária inata no hospedeiro. Mossman *et al.*, (2008) demonstraram, em *E. coli* associada a infecções uropatógenicas, que a proteína FimH induz, de forma independente do LPS, a produção de TNF α por macrófagos pela via MyD88, através da sua ligação ao TLR4.

Numa segunda parte do trabalho, foi avaliada a presença de transcritos (RT-PCR) de mediadores de inflamação (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , CXCL10) no endométrio após estimulação *in vitro* com *E. coli* (*Pyo4*, *Pyo10* ou *Pyo11*). A utilização de explantes para avaliar a resposta imunitária inata à infecção permite que a arquitectura do tecido e a organização celular necessária para ao funcionamento mais aproximado do fisiológico seja mantida (Borges *et al.*, 2012). De forma a manter a viabilidade celular, a incubação dos explantes foi efectuada por um período de tempo curto ($\leq$ a 24 horas). O nosso modelo experimental foi validado pelo facto dos genes que codificam para os mediadores de inflamação apresentarem um baixo nível de transcrição no controlo não estimulado. Nos *explantes* estimulados com *E. coli*, a presença e localização da bactéria no tecido uterino foi avaliada por imunohistoquímica (anticorpo anti-LPS de *E. coli*). A bactéria foi detectada no endométrio (epitélio e estroma) indicando uma estimulação efectiva. O efeito da estimulação foi ainda evidenciado pela destruição do epitélio luminal e glandular. Por outro lado, no tecido não estimulado não foi detectada a presença de bactéria nem sinais exacerbados de destruição após as 6 horas de incubação.

Os nossos resultados demonstraram que o endométrio consegue montar uma resposta imunitária em resposta à estimulação com bactéria. A transcrição dos mediadores de inflamação (TNF α , IL1 β , IL8) nos explantes estimulados com bactéria após 6 horas de incubação foi superior quando comparado com o tecido controlo não estimulado. De facto, estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos pelo nosso grupo para úteros de cadelas com piómetra *versus* úteros sem afecção uterina (Henriques *et al.*, 2016). Também neste caso, verificámos que a transcrição (RT-PCR) do gene que codificam para a IL1 β , TNF α e IL-10 está aumentada no endométrio de úteros com piómetra por comparação com o endométrio de úteros sem afecção uterina na fase de diestro, onde não foi observada transcrição destes mediadores. Assim, estes resultados permitem-nos concluir que o nosso sistema de explantes mimetiza a fase inicial da infecção *in vivo*, sendo por isso um modelo adequado ao estudo da fisiopatologia da piómetra na cadela.

A quantificação dos níveis de transcrição dos genes que codificam para mediadores da inflamação por PCR em tempo real (qRT-PCR) foi também efectuada para *explantes* controlo (não estimulados) e estimulados com a estirpe *Pyo7* ou o seu mutante isogénico para o gene da α -hemolisina (*Pyo7* Δ *hlyA*). Neste estudo, verificámos que existe uma transcrição

basal dos genes que codificam para o TNF α , IL1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e CXCL10, nos explantes não estimulados. A transcrição do gene que codifica para o TNF α apresentou um pico de expressão às 6 horas de incubação, com posterior diminuição da transcrição até às 24 horas. Por outro lado, verificámos que a transcrição do gene que codifica para a IL1- β , IL-6, IL-8 e CXCL-10 atingiu um pico às 6 (IL1- β) ou às 24 horas (IL-6, IL-8, CXCL10). Esta transcrição basal poderá estar associada, por um lado às células de reacção inflamatória que estão naturalmente presentes no tecido uterino de diestro, por outro lado, à inflamação estéril associada ao procedimento experimental que apesar de residual, não é de excluir (Sheldon *et al.*, 2012).

A nossa análise mostrou uma alteração na transcrição do gene que codifica para o TNF α , IL1 β , IL-6 e CXCL10 no endométrio pela estimulação bacteriana. A expressão do ARNm do TNF α , IL-6, CXCL10 foi significativamente maior (às 2, 6 e 24 horas, respectivamente) nos *explantes* estimulados com *Pyo7* (TNF α , IL-6, CXCL10) ou *Pyo7 Δ hlyA* (TNF α , IL-6). O aumento na transcrição do TNF α pela estimulação com bactéria logo às 2 horas de incubação está de acordo com o facto de o TNF α ser uma citocina de resposta rápida e a IL-8 e CXCL-10 terem um papel mais tardio na infecção. O TNF α e IL-6 estão envolvidos na activação e amplificação da resposta inflamatória, induzindo a produção de outras citocinas mais tardias, nomeadamente a IL-8 (Scheller *et al.*, 2011). Da mesma forma, Swangchan-Uthai *et al.*, (2012) demonstraram que as células endometriais (células epiteliais+células do estroma) de bovino quando estimuladas com LPS transcrevem numa fase precoce TNF α . Mais concretamente, o ARNm do TNF α apresentou um pico de expressão 1 hora após a estimulação e diminuiu logo de seguida até atingir os níveis basais às 48 horas (Swangchan-Uthai *et al.*, 2012). A quimiocina CXCL10 tem actividade antimicrobiana contra *E. coli* (Henriques *et al.*, 2016) e encontra-se aumentada no útero de cadelas com infecção bacteriana (Hagman *et al.*, 2009). Recentemente, os nossos resultados mostraram que a transcrição do gene CXCL10 foi significativamente superior nas células epiteliais do endométrio, o que pode estar associado a um primeiro mecanismo de defesa aquando do contacto com a bactéria (Henriques *et al.*, 2016).

A transcrição do gene que codifica para a IL-1 β , por sua vez, foi significativamente inferior após 24 horas de incubação nos explantes contaminados com ambas as estipes de *E. coli*, quando comparado com o controlo não estimulado. A diminuição da transcrição do gene

da IL1 β nos *explantes* pela estimulação bacteriana num tempo tardio de incubação (24 horas) poderá constituir um mecanismo de regulação do processo inflamatório por *feedback* negativo, de forma a evitar uma inflamação e destruição excessiva do tecido (Richardson *et al.*, 1995, Herath *et al.*, 2009). Por outro lado, a expressão do ARNm da IL-10, uma citocina anti-inflamatória, não foi alterada nos *explantes* pela estimulação com *E. coli*. A IL-10 tem um papel numa fase mais tardia da infecção e está envolvida na regulação da resposta pró-inflamatória, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células de reacção inflamatória (Couper *et al.*, 2008), de forma a evitar uma destruição excessiva do tecido. Desta forma, a ausência de alteração da transcrição do gene que codifica para a IL-10 nos *explantes* estimulados com *E. coli* poderá estar associada ao facto de ainda não ter sido atingida a fase tardia de infecção onde deverá ocorrer um aumento da expressão da IL-10. Os mediadores de inflamação detectados nos *explantes* são provavelmente produzidos pelos dois tipos de células endometriais epiteliais e do estroma, bem como pelas células de reacção inflamatória (nomeadamente macrófagos residentes do tecido) (Henriques *et al.*, 2016, Silva *et al.*, 2010).

Neste estudo não foi possível detectar uma transcrição diferencial dos genes dos mediadores de inflamação que pudesse ser associada ao gene da α -hemolisina. Não se verificou uma diferença do nível de transcrição destes genes entre o endométrio estimulado com *Pyo7* e *Pyo7 Δ hlyA*. Por outro lado, Henriques *et. al.*, (2016) reportou uma expressão significativamente inferior do ARNm do TNF α , IL1 β e IL-10 pelas células do estroma do endométrio de cadela estimuladas com a estirpe hemolítica, quando comparado com o mutante isogénico não hemolítico. Esta discrepância nos resultados obtidos no nosso trabalho para *explantes* estimulados com a estirpe hemolítica, poderá ser explicado pelo facto da resposta avaliada estar associada não só às células do estroma como também às células epiteliais e de reacção inflamatória. De facto, as células epiteliais estimuladas com a estirpe hemolítica não apresentam uma transcrição diferencial dos genes que codificam para mediadores da inflamação, quando comparado com as epiteliais estimuladas com o mutante isogénico não hemolítico (Henriques *et. al.*, 2016).

Conclusão

A piómetra é uma infecção uterina de diestro comum em cadelas adultas, em que *Escherichia coli* é a bactéria mais frequentemente isolada. A adesão da bactéria às células endometriais é um dos passos cruciais no estabelecimento da infecção. Neste trabalho, a análise da orientação do promotor do gene *fimA* e os ensaios de aglutinação de extracto de levedura mostraram que os isolados de *E. coli* recolhidos de úteros de cadela com piómetra apresentam capacidade de transcrever os genes do operão *fim* e expressar fímbrias tipo 1. Verificámos também que a orientação do promotor do gene *fimA* (*On versus Off*) está dependente das condições de cultura, o que sugere uma regulação da expressão das fímbrias tipo 1 por estímulos ambientais. Em trabalhos futuros poderá ainda ser importante avaliar a transcrição dos genes do operão *fim in vivo* no tecido uterino recolhido de cadelas com piómetra, de forma a esclarecer o papel destas adesinas no estabelecimento da infecção.

O desenvolvimento e progressão da doença estão ainda dependentes da capacidade do hospedeiro montar uma resposta imunitária efectiva. Neste trabalho foi estabelecido um modelo *ex vivo* de explantes para avaliar a resposta do útero numa fase inicial da infecção. O endométrio removido de explantes uterinos estimulados com *E. coli* apresentou capacidade de transcrever (qRT-PCR) de forma diferencial genes que codificam para citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL1 β , IL-6) e para quimiocinas (CXCL10), quando comparado com o tecido não estimulado. Verificou-se que a transcrição destes mediadores está significativamente aumentada em tempos de incubação que reflectem, de uma maneira geral, o seu papel no orquestrar da resposta do hospedeiro à infecção (citocinas produzidas na fase inicial da infecção-TNF α - versus citocinas produzidas numa fase mais tardia-IL-6, CXCL10). Conclui-se desta forma que este modelo é adequado ao estudo da resposta imunitária inata do útero à infecção.

Referências Bibliográficas

- Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2 (8), 675-680. doi: 10.1038/90609.
- Aliprantis, A.O., Yang, R.-B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., & Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 285, 736-739.
- Amjadi, F., Salehi, E., Mehdizadeh, M., & Aflatoonian, R. (2014). Role of the innate immunity in female reproductive tract. *Advanced Biomedical Research*, 3, 1. doi: 10.4103/2277- 9175.124626.
- Antão, E.M., Wieler, L.H., & Ewers, C. (2009). Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 1, 22. <http://doi.org/10.1186/1757-4749-1-22>.
- Arnold, S., Hubler, M., & Reichler, I. (2006). Canine pyometra: new approaches to an old disease. *Proceedings of the 2006 World congress (WSAVA/FECAVA/CSAVA)*, Prague, 11-14th October, 691-692.
- Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J. & Harel, J. (2003). Rapid Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2113–2125. doi: 10.1128/JCM.41.5.2113–2125.2003
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*, 40 (12), 845-859.
- Bien, J., Sokolova, O. & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*, 2012:681473. doi: 10.1155/2012/681473.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Alonso, M.P., Mora, A., Balsalobre, C., Muñoa, F. & Blanco, J. (1997). Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic strains: relationship with expression of adhesions and production of toxins. *Research in Microbiology*, 148(9), 745-755.

- Duque, G.A., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, 5, 491. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- Borges, Á.M., Healey, G.D. & Sheldon, I.M. (2012). Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo. *American Journal of Reproductive Immunology*, 67, 526-539.
- Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). Cytokines and chemokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, 460-475.
- Braun, V., & Killmann, H. (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in Biochemical Sciences*, 24 (3), 104-109.
- Brito, B. G., Vidotto, M. C., Berbel, M. M., & Tagliari, K. C. (2004). Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. *Ciência Rural*, 34(2), 645-652.
- Broad, A., Kirby, J.A., Jones, D.E.J., & Applied Immunology and Transplantation Research Group. (2007). Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon- β production. *Immunology*, 120(1), 103–111. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02485.x>
- C. A. Richardson, K. L. Gordon, W. G. Couser, K. Bomsztyk. (1995). IL-1 beta increases laminin B2 chain mRNA levels and activates NF-kappa B in rat glomerular epithelial cells. *American Journal of Physiology*, 268 (2), 273-278.
- Cameron, MJ. & Kelvin, D.J. (2003). Cytokines and chemokines--their receptors and their genes: an overview. *Advanced Experimental Medical Biology*, 520, 8-32.
- Carvalho, S.I.C.V. (2014). Caracterização imunohistoquímica e molecular de amostras de endométrio de cadela com piômetra. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular em Saúde. Caparica: Escola Superior de Saúde Egas Moniz.
- Chakraborty, A., Saralaya, V., Adhikari, P., Shenoy, S., Baliga, S. & Hegde, A. (2015). Characterization of *Escherichia coli* Phylogenetic Groups Associated with Extraintestinal Infections in South Indian Population. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 5(4), 241-246. doi:10.4103/2141-9248.160192.

- Chen, Q., Jin, M., Yang, F., Zhu, J., Xiao, Q., & Zhang, L. (2013). Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators of inflammation*, 2013:928315.
- Chen, Y.M.M., Wright, P.J., Lee, C.S., Browning, G.F., (2003). Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Veterinary Microbiology*, 94, 57-69.
- Chotimanukul, S., & Sirivaidyapong, S. (2011). Differential expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in healthy and infected canine endometrium. *Theriogenology*, 76 (6), 1152- 1161. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.05.024.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Wilson, M.S., Hafalla, J.C., Belkaid, Y., Kamanaka, M., & Riley, E. M. (2008). IL-10 from CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻CD127⁻Adaptive Regulatory T Cells Modulates Parasite Clearance and Pathology during Malaria Infection. *PLoS Pathogens*, 4(2), e1000004. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000004>
- Datsenko, K.A., & Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings Natural Academy Science USA*, 97, 6640–6645. 10.1073/pnas.120163297.
- De Andrea, M., Ravera, R., Gioia, D, Gariglio, M. & Landolfo, S. (2002). The interferon system: an overview. *European Journal of Paediatrics Neurology*, 6 Suppl A:A41-6; discussion A55-8.
- Deamer, D., Akeson, M. & Branton, D. (2016). Three decades of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology*, 34, 518–524. doi:10.1038/nbt.3423
- Doumith, M., Day, M.J., Hope, R., Wain, J. & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of clinical Microbiology*, 50(9), p3108-3110.
- Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, B. N., Hedhammar, A., Olson, P., & Lagerstedt, A. S. (2001). Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15 (6), 530-538.

- Eisenstein, B.I. & Neidhardt, F.C. (1987). Fimbriae. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: celular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington DC, v.1, 84-90.
- Fabbri, A., Travaglione, S., & Fiorentini, C. (2010). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): toxin biology, in vivo applications and therapeutic potential. *Toxins*, 2(2), 283-296.
- Féria, M.C. (2001). Infecção do tracto urinário no cão por *Escherichia coli*: abordagem molecular ao diagnóstico, fisiopatologia e resistência às beta-lactaminas (Tese de doutoramento). Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Fischer, H., Yamamoto, M., Hoebe, K., Akira, S., Beutler, B. & Svanborg, C. (2006). Mechanism of pathogen specific TLR4 activation in the mucosa: Fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *European Journal of Immunology*, 36(2), 267-277. DOI 10.1002/eji.200535149
- Gunther, N.W., IV, Snyder, J.A., & Lockett, V. (2002). Assessment of virulence of uropathogenic *Escherichia coli* type 1 fimbrial mutants in which the invertible element is phase-locked on or off. *Infectious Immunology*, 70, 3344–54.
- Hagman R. (2004). New aspects of canine pyometra – studies on epidemiology and pathogenesis. Doctoral thesis, Veterinaria 182, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Hagman, R. & Kühn, I. (2002). *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis, *Veterinary Microbiology* 84 (1-2), 143-153.
- Hagman, R. (2012). Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (6), 323-325. doi: 10.1111/rda.12031.
- Hagman, R., Kindahl, H., & Lagerstedt, A.S. (2006). Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F2 α metabolite levels. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 47, 55- 67.

- Hagman, R., Lagerstedt, A. S., Hedhammar, A., & Egenvall, A. (2011). A breed-matched case control study of potential risk-factors for canine pyometra. *Theriogenology*, 75 (7), 1251- 1257. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.038.
- Hagman, R., Rönnberg, E., & Pejler, G. (2009). Canine uterine bacterial infection induces upregulation of proteolysis-related genes and downregulation of homeobox and zinc finger factors. *PLoS One*, 4 (11), e8039. doi:10.1371/journal.pone.0008039.
- Henriques, S., Silva, E., Lemsaddek, A., Lopes-da-Costa, L. & Mateus, L. (2014). Genotypic and phenotypic comparison of *Escherichia coli* from uterine infections with different outcomes: Clinical metritis in the cow and pyometra in the bitch. *Veterinary Microbiology*, 170 (1- 2), 109-116. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.021.
- Henriques, S., Silva, E., Silva, M.F., Carvalho, S., Diniz, P., Lopes-da-Costa, L. & Mateus, L. (2016). Immunomodulation in the canine endometrium by uteropathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Research*, 47(1), 114.
- Herath, S., Lilly, S.T., Santos, N.R., Gilbert, R.O., Goetze, L., Bryant, C.E., & Sheldon, I.M. (2009). Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 7, 55. <http://doi.org/10.1186/1477-7827-7-55>.
- Hernandes, R. T., Velsko, I., Sampaio, S. C. F., Elias, W. P., Robins-Browne, R. M., Gomes, T. A. T., & Girón, J. A. (2011). Fimbrial Adhesins Produced by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(23), 8391–8399. <http://doi.org/10.1128/AEM.05376-11>
- Ishiguro, K., Baba, E., Torii, R., Tamada, H., Kawate, N., Hatoya, S. & Inaba, T. (2007). Reduction of mucin-1 gene expression associated with increased *Escherichia coli* adherence in the canine uterus in the early stage of dioestrus. *Veterinary Journal*, 173 (2), 325-332.
- Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4 (1), 80-128.
- Jones, C. H., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Nicholes, A. V., Abraham, S. N., & Hultgren, S. J. (1995). FimH adhesion of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(6), 2081-2085.

- Kamada, N., Chen, G. & Núñez, G. (2012). A complex microworld in the gut: Harnessing pathogen-commensal relations. *Nature Medicine*, 18, 1190–1191. doi:10.1038/nm.2900
- Kannaki, T. R., Shanmugam, M., & Verma, P.C. (2011). Toll-like receptors and their role in animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, 125, 1-12. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.03.008.
- Karlsson, I., Hagman, R., Johannisson, A., Wang, L., Karlstam, E., & Wernersson, S. (2012). Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(Suppl 6), 337-341.
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11 (5), 373-384. doi: 10.1038/ni.1863.
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13 (5), 816-825.
- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., & Zinkernagel, R.M. (2005). Medical Microbiology (10^a ed). New York, NY: Thieme
- Khan, A.S., Kniep, B., Oelschlaeger, T.A., Van Die, I., Korhonen, T., & Hacker, J. (2000). Receptor Structure for F1C Fimbriae of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 68(6), 3541–3547.
- Kida, K., Baba, E., Torii, R., Kawate, N., Hatoya, S., Wijewardana, V., Inaba, T. (2006). Lactoferrin expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra. *Theriogenology*, 66(5), 1325-1333.
- Klemm, P., Jørgensen, B.J., van Die, I., de Ree, H., & H. Bergmans. (1985). The fim genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*. 199, 410–414.
- Klemm, P., Ørskov, I., & Ørskov, F. (1982). F7 and type 1-like fimbriae from three *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections: protein chemical and immunological aspects. *Infection and Immunity*, 36(2), 462-468.
- Kline, K. A., Iker, S. F., Dahlberg, S., Normark, S. & Henriques-Normark, B.. (2009). Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*, 5(6), 580-592. DOI 10.1016/j.chom.2009.05.011

- Krekeler, N., Marends, M.S., Browning, G.F., Holden, K.M., Charles, J.A. & Wright, P.J. (2013). The role of type 1, P and S fimbriae in binding of *Escherichia coli* to the canine endometrium. *Veterinary Microbiology*, 164 (3-4), 399-404. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.02.028.
- Krekeler, N., Marends, M.S., Browning, G.F., Holden, K.M., Charles, J.A. & Wright, P.J. (2012). Uropathogenic virulence factor FimH facilitates binding of uteropathogenic *Escherichia coli* to canine endometrium. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35 (5), 461-467. doi: 10.1016/j.cimid.2012.04.001.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30 (1), 16-34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976.
- Kunin, C.M., Hua, T.H., Krishnan, C., Van Arsdale, W.L. & Hacker, J. (1993). Isolation of a Nicotinamide-Requiring Clone of *Escherichia coli* 018:K1:H7 from Women with Acute Cystitis: Resemblance to Strains Found in Neonatal Meningitis. *Clinical Infectious Diseases*, 16 (3), 412-416. doi:10.1093/clind/16.3.412
- Lloyd, A.L., Henderson, T.A., Vigil, P.D. & Mobley, H.L.T. (2009). Genomic Islands of Uropathogenic *Escherichia coli* Contribute to Virulence. *Journal of Bacteriology*. 191(11), 3469. doi: 10.1128/JB.01717-08
- Mateus, L., Henriques, S., Merino, C., Pomba, C., Lopes da Costa, L. & Silva, E. (2013). Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. *Veterinary Microbiology*, 166 (3-4), 590-594. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.07.018
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1 (2), 135-145.
- Miethke, M., & Marahiel, M.A. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 71(3), 413-451. doi: 10.1128/MMBR.00012-07
- Miyazaki, J., Ba-Thein, W., Kumao, T., Yasuoka, M. O., Akaza, H., & Hayashi, H. (2002). Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesion I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 33(1), 23-26.

- Mossman, K.L., Mian, M.F., Lauzon, N.M. (2008). Cutting edge: FimH adhesin of type 1 fimbriae is a novel TLR4 ligand. *Journal Immunology*, 181, 6702–6.
- Nishikawa, Y. (1985). Adherence of *Escherichia coli* in pathogenesis of endometritis and effects of estradiol examined by scanning electron microscopy. *Infection and immunity*, 47(1), 318-321.
- Nishikawa, Y., & Baba, T. (1985). In vitro adherence of *Escherichia coli* to endometrial epithelial cells of rats and influence of estradiol. *Infection and immunity*, 50(2), 506-509.
- Nowrouzian, F.L., Friman, V., Adlerberth, I. & Wold E.A. (2007). Reduced Phase Switch Capacity and Functional Adhesin Expression of Type 1-Fimbriated *Escherichia coli* from Immunoglobulin A-Deficient Individuals. *Infection and Immunity*, 75, 932–940. doi:10.1128/IAI.00736-06
- Nowrouzian, F.L., Wold, A.E. & Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* Strains Belonging to Phylogenetic Group B2 Have Superior Capacity to Persist in the Intestinal Microflora of Infants. *Journal of Infectious Diseases*, 191 (7), 1078-1083. doi: 10.1086/427996
- O'Shea, J. J., Gadina, M., & Siegel, R. (2013). Cytokines and cytokine receptors. In R. R. Rich (Ed.), *Clinical Immunology: Principles and Practice* (4^a ed, 108-135). St Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Olsen, P.B., Schembri, M.A., Gally, D.L. & Klemm, P. (1998). Differential temperature modulation by H-NS of the *fimB* and *fimE* recombinase genes which control the orientation of the type 1 fimbrial phase switch. *FEMS Microbiology, Lett.*162, 17-23.
- Payan-Carreira, R., & Pires, M. A. (2005). Hiperplasia Quística do Endométrio em Cadelas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 5-16.
- Peterson, J.W. (1996). Bacterial Pathogenesis. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8526/>
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C., V., Du, X. & Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-2088.

- Pretzer S.D. (2008). Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. *Theriogenology*, 70, 359–363. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.028.
- Ratledge, C., & Dover, L.G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 881-941.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1813(5), 878-88. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
- Schilling, J.D., Mulvey, M.A., & Hultgren, S.J. (2001). Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(Suppl 1), S36-S40.
- Schlafer, D.H. & Gifford, A.T. (2008). Cystic endometrial hyperplasia, pseudoplacental endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. *Theriogenology*, 70 (3), 349-358. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.041.
- Schlafer, D.H. (2012). Diseases of the canine uterus. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (6), 318-322. doi: 10.1111/rda.12064.
- Sestito, S.E., Sperandio, P., Santambrogio, C., & Peri, F. (2014). Functional Characterization of *E. coli* LptC: Interaction with LPS and a Synthetic Ligand. *ChemBioChem*, 15(5).
- Sheldon, I.M., Rycroft, A.N., Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J.J., Chandler, A. & Simpson, K.W. (2010). Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS One*, 5 (2), e9192. doi:10.1371/journal.pone.0009192
- Silva, E., Henriques, S., Brito, S., Ferreira-Dias, G., Lopes-da-Costa, L., & Mateus, L. (2012). Oestrous cycle-related changes in production of Toll-like receptors and prostaglandins in the canine endometrium. *Journal of Reproductive Immunology*, 96 (1-2), 45-57. doi: 10.1016/j.jri.2012.07.003.
- Skaar, E.P. (2010). The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathogens*, 6 (8), e1000949. doi: 10.1371/journal.ppat.1000949
- Sousa, C.P. (2006). The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: A mini review. *Journal of Venomous Tropical Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12 (3), 363-373.

- Struve, C. & Krogfelt, K.A. (1999). In vivo detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. *Microbiology*, 145, 2683–2690.
- Subashchandrabose, S., & Mobley, H.L.T. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 3(4), 10.1128/microbiolspec.UTI-0015–2012.
- Sugiura, K., Nishikawa, M., Ishiguro, K., Tajima, T., Inaba, M. & Inaba, T. (2004). Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*, 209(8), p619-627.
- Swangchan-Uthai, T., Lavender, C.R.M., Cheng, Z., Fouladi-Nashta, A.A., & Wathes, D.C. (2012). Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. *Biology of Reproduction*, 87 (6), 135. doi: 10.1095/biolreprod.112.102376.
- Teng, C.T., Beard, C., & Gladwell, W. (2002). Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat and hamster. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1439-1449.
- van der Bosch, J.F., Verboom-Sohmer, U., Postma, P., de Graaff, J. & MacLaren, D.M. (1980). Mannose-sensitive and mannose-resistant adherence to human uroepithelial cells and urinary virulence of Escherichia coli. *Infection and Immunity*, 29(1), 226-33.
- Van der Meide, P.H., & Schellekens, H. (1996). Cytokines and the immune response. *Biotherapy*, 8(4), 243–9.
- Vejborg, R.M., Hancock, V., Schembri, M.A. & Klemm, P. (2011) Comparative Genomics of *Escherichia coli* Strains Causing Urinary Tract Infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3268–3278. doi:10.1128/AEM.02970-1
- Voorwald, F.A., Marchi, F.A., Villacis, R.A., Alves, C.E., Toniollo, G.H., Amorim, R.L., Drigo, S.A., Rogatto S.R. (2015). Molecular Expression Profile Reveals Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Canine Endometrial Lesions. *PLoS One*, 29, 10(7):e0133894. doi: 10.1371/journal.pone.0133894.
- Werling, D., & Jungi, T. W. (2003). Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91 (1), 1-12.

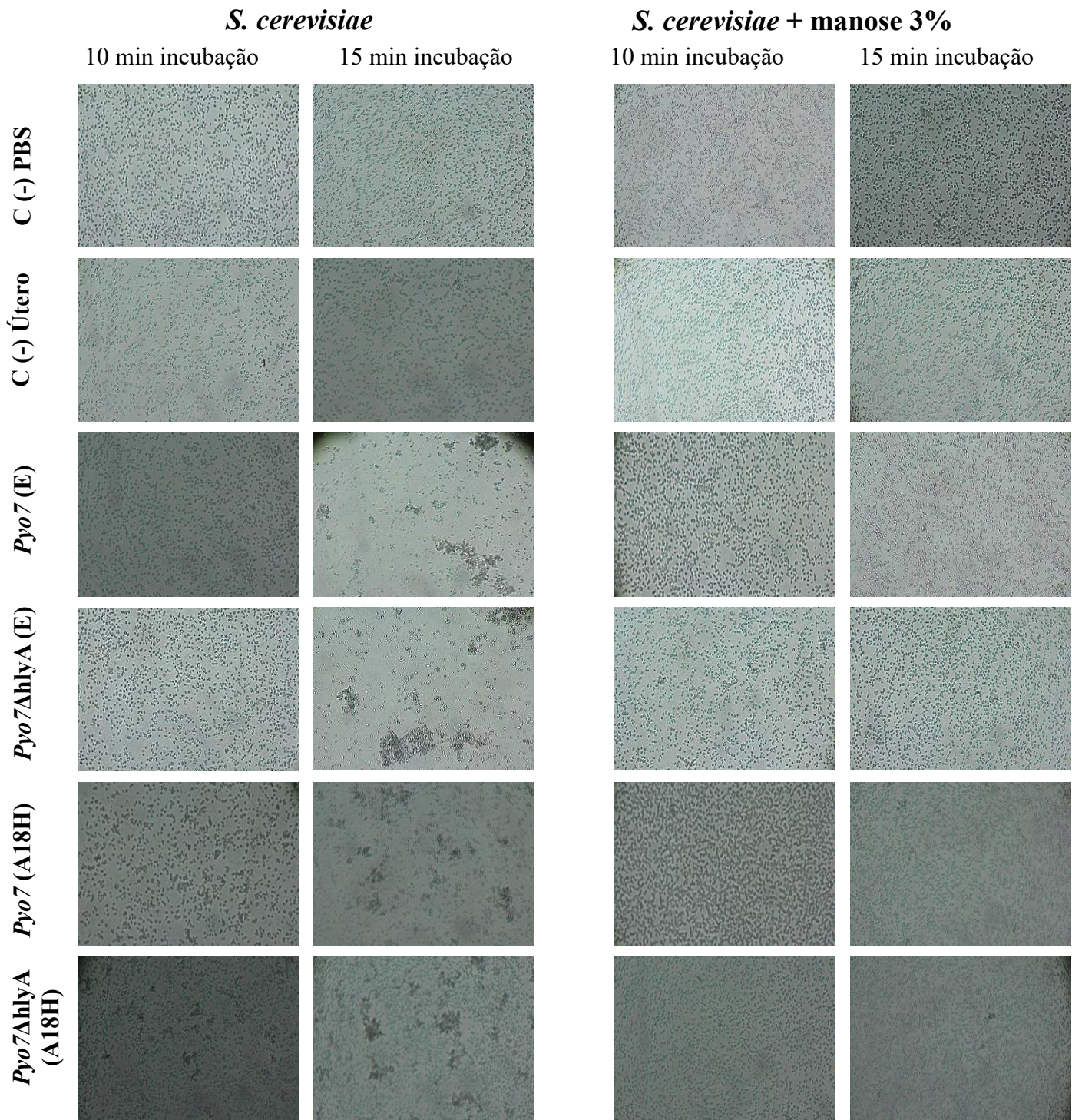
- Wiles, T.J. & Mulvey, M.A. (2013). The RTX pore-forming toxin alpha-hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives. *Future Microbiology*, 8, p73–84.
- William R Schwan, W.R. (2011). Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World Journal of Clinical Infectious Disease*, 30(1), 17–25. doi:10.5495/wjcid.v1.i1.17.
- Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H., & Alexander, C. (2008). TLR2 – promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*, 213, 205-224. doi: 10.1016/j.imbio.2008.02.005.
- Zhang, J.M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37.

Appendix

A- Factores de virulência

	fimH	fimA	papEF	papC	sfa/focDE	sfaS	focG	f41	f5	f17	afa/draBC	eaeA	hlyE	hlyA	cnf 1	astA	cdtABC	stx1	stx2	sta	usp	ibe 10	tcpC	traT	cvaC	kps II	kps III	chuA	fyuA	sitA	fepA	iroN	iucD	Filogenias
Pyo 1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	B2
Pyo 2	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	B2
Pyo 3	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	B2
Pyo 4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	B2
Pyo 5	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	B2
Pyo 6	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	B2
Pyo 7	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	B2
Pyo 8	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	B2
Pyo 9	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	A
Pyo 10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	B2
Pyo 11	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	B2
Pyo 12	1		0			1	0				0			0	0						1							1	1	1	0	1	0	B2
Pyo 13	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	B2
Pyo 14	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	B2
Pyo 15	1		0			1	0				0			0	0						1							1	1	1	1	1	0	B2

B-Resultados de aglutinação de células de levedura



C- Apresentação em painel (Congresso de Ciências Veterinárias-SPCV)



Avaliação da variação de fase das fímbrias tipo 1 em isolados de *Escherichia coli* de piómetra de cadela

Diniz P., Mateus L., Henriques S., Lopes-da-Costa L. & Silva E.

CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal



Introdução

A fímbria tipo 1 é a adesina mais frequente em *Escherichia coli* e medeia a adesão aos receptores de manose presentes na superfície de células hospedeiras. A expressão destas fímbrias é regulada por um processo conhecido por variação de fase, que permite a reversão do estado fimbriado (fase-ON) para o estado não-fimbriado (fase-OFF). Esta variação de fase é mediada por um elemento de DNA (314 pb) invertível (*phase switch*) que contém o promotor do gene *fimA* (gene que codifica a subunidade principal da fímbria). Nas células em fase-ON, o promotor conduz à transcrição do *fimA* e à produção de fímbrias enquanto que na fase-OFF não-fimbriada a transcrição do gene é silenciada. O gene *fimH* foi detectado numa elevada prevalência em isolados de *E. coli* obtidos de casos de piómetra de cadela (Mateus et al., 2013). Neste estudo foi avaliada a capacidade destes isolados para transcrever fímbrias tipo 1 por PCR seguido de digestão dos produtos de amplificação.

Material e métodos

Para avaliar a capacidade dos isolados de *E. coli* de passar do estado não-fimbriado ao estado fimbriado, as culturas foram crescidas em diferentes condições (agar, arejada, estática) e de acordo com o seguinte procedimento experimental (Figura 1):

1. Propagação dos isolados (n=15) em meio LB agar (crescimento a 37°C, O/N).
2. Inoculação/propagação de uma colónia isolada em meio LB (3 mL para a cultura estática e arejada e em placa de LB agar para a cultura em meio sólido).
3. Extração de DNA total pelo método de *boiling*.
4. Amplificação do fragmento da região interconvertível por PCR (elemento de DNA de 519 pb que cobre a região *fim* invertível): cultura estática (E, n = 15); cultura agitada (A18H, n = 15) e meio sólido (S18H, n = 15) utilizando primers que flanqueiam o elemento de DNA invertível (1: GAGAAGAGGTTTGTATTAAGTTG; 2: AGAGCCGCTGTAGAAGTGAAGG).
5. Digestão dos fragmentos por restrição com a enzima *Hinf I* (resultando em fragmentos específicos da fase-ON (489 e 70 pb) ou OFF (359 e 200 pb).
6. Separação dos produtos da digestão por electroforese em gel de agarose (2%) e visualização com brometo de etídio.

A capacidade de expressar o fenótipo associado às fímbrias tipo 1 foi testada através da capacidade dos isolados aglutinarem extracto de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A especificidade da reacção de aglutinação é testada através da sua inibição pela D-manose (Vejborg et al., 2011). O perfil fenotípico de expressão foi avaliado de acordo com o seguinte procedimento experimental:

1. Adicionou-se 10 µL de uma suspensão de bactéria fresca + 10 µL de uma suspensão de 5 % de levedura (aglutinação positiva indica expressão de fímbrias tipo 1).
2. Bloqueio com D-manose para confirmação do fenótipo característico deste tipo de fímbrias (células de levedura em solução de manose 3%).

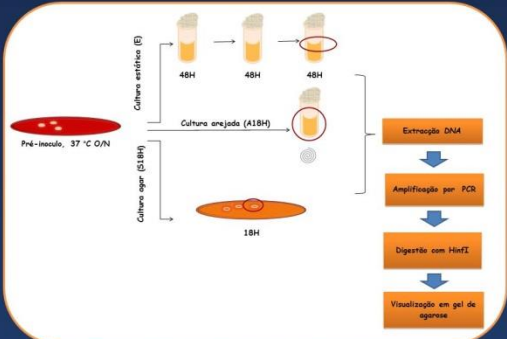


Figura 1: Esquema experimental para a avaliação da capacidade de transcrição de fímbrias tipo 1.

Resultados

Os resultados mostram que a maioria dos isolados têm a capacidade de reverter da posição OFF para a posição ON. Em agar, a posição OFF foi a mais prevalente (60% dos isolados) e 40% dos isolados possuíam uma mistura de células na posição ON e OFF. Na cultura arejada 80% dos isolados apresentaram uma mistura de células nas posições ON e OFF e 20% dos isolados na posição OFF. Na cultura estática a maioria dos isolados apresentaram células em ambas as posições ON e OFF e 7% dos isolados reverteram completamente para a posição ON.

Bibliografia

- Mateus L., Henriques S., Marino C., Pomba C., Lopes da Costa L. & Silva E. (2013) Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. *Vet Microbiol* 166, 590-594.
- Newnham F. L., Friman V., Adlerberth L. & Wold A. E. (2006) Reduced phase switch capacity and functional adhesin expression in type 1-fimbriated *Escherichia coli* from immunoglobulin A-deficient individuals. *Infection and Immunity* 75 (2), 932-940.
- Vejborg R. M., Hancock V., Petersen A. M., Krogfelt K. A. & Klemm P. (2011) Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics* 12, 316. [doi:10.1186/1471-2164-12-316](https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-316).

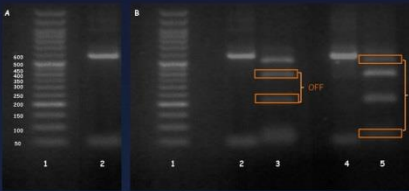


Figura 1: (A) 1- Marcador de massa molecular (Ladder VI Nzytech). 2- Produto de PCR (B): 1- Marcador de massa molecular (Ladder VI Nzytech). 2 e 4- Produto de PCR não digerido; 3 - Digestão do produto de PCR com a enzima *Hinf I* (isolado 10 E - mistura da posição ON e OFF); 5 - Digestão do produto de PCR com a enzima *Hinf I* (isolado 10 A18H - mistura da posição ON/OFF mas com predominância da posição OFF - bandas mais intensas).

Tabela 1: Análise dos resultados da digestão do produto de PCR com a enzima *Hinf I*

Isolados de cadela	Cultura estática (E)	Cultura arejada (A18H)	Cultura em agar (S18H)
1	OFF	ON/OFF	OFF
2	ON/OFF	OFF	OFF
3	OFF	ON/OFF	OFF
4	ON/OFF	ON/OFF	OFF
5	ON	ON/OFF	ON/OFF
6	ON/OFF	ON/OFF	ON/OFF(+)
7	ON/OFF	ON/OFF	ON/OFF(+)
8	ON/OFF	OFF	OFF
9	ON/OFF	ON/OFF	OFF
10	(+)ON/OFF	ON/OFF	ON/OFF
11	(+)ON/OFF	ON/OFF	ON/OFF
12	OFF	ON/OFF	ON/OFF
13	ON/OFF	ON/OFF	ON/OFF
14	OFF	OFF	OFF
15	(+)ON/OFF	ON/OFF	ON/OFF(+)

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos para a análise do estado fimbriado

Tipo de cultura	n	OFF - n (%)	ON/OFF - n (%)	ON - n (%)
Agar (S18H)	15	9(60)	6(40)	0(0)
Cultura arejada (A18H)	15	3(20)	12(80)	0(0)
Cultura estática (E)	15	4 (27)	10(67)	1(7)

Análise fenotípica de expressão de fímbrias tipo I: Os resultados preliminares mostram que o isolado 7 tem a capacidade de aglutinar células de levedura (aglutinação positiva), que é significativamente reduzida pelo bloqueio com manose (inibidor natural).

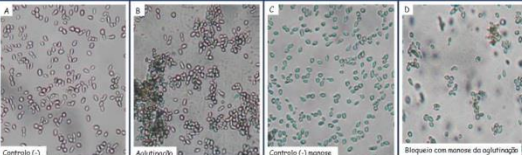


Figura 2: Exemplo de ensaio de aglutinação de células de levedura (fenótipo de aglutinação específico de fímbrias tipo 1). (A) *S. cerevisiae* + PBS (controlo negativo). (B) *S. cerevisiae* + isolado 7 aos 10 minutos. (C) *S. cerevisiae* + PBS com 3% de manose (controlo negativo de manose). (D) *S. cerevisiae* com 3% de manose + isolado 7 aos 10 minutos.

Conclusão

Neste estudo a maioria dos isolados de *E. coli* obtidos de casos de piómetra possui a capacidade de transcrever o gene *fimA*. Ensaio preliminar de expressão do fenótipo de aglutinação específico para as fímbrias tipo 1 confirmam ainda a expressão deste tipo de fímbrias.

Financiamento: PEst-OE/AGR/UI0276/2014

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias – Faculdade de Engenharia

II