



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Caracterização funcional de um sistema de
bombas de efluxo na virulência e resistência de
*Arcobacter butzleri***

Cristiana Lopes Mateus

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira
Coorientadores: Professora Fernanda da Conceição Domingues
Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro

Covilhã, junho de 2019

Agradecimentos

Ao longo desta etapa da minha vida, diversas foram as pessoas que cruzaram o meu caminho e é a elas que tenho de agradecer por compartilharem esta experiência comigo.

Um especial agradecimento à Doutora Susana Ferreira, pela oportunidade que me deu ao me aceitar no seu grupo de trabalho. Muito obrigada pelo apoio dado, pelo conhecido que me transmitiu neste ano e, principalmente, pela paciência e conselhos que me deu para sempre melhorar o meu trabalho. Agradeço também às minhas coorientadoras, à Professora Fernanda Domingues e à Doutora Mónica Oleastro pelo apoio e disponibilidade que tiveram comigo, sempre que necessitei.

Obrigada à Universidade da Beira Interior, que me acolheu ao longo destes seis anos académicos, ao Centro de Investigação de Ciências da Saúde (CICS-UBI) onde passei este último ano na realizar deste trabalho e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Um agradecimento às minhas colegas de trabalho do laboratório de Microbiologia, Ana Rita Alves, Marina, Rita, Carolina, Ana Nunes e Alexandra pelo apoio, pelos momentos de diversão, pela entreaajuda que me prestaram ao longo deste período e pelas tardes bem passadas para levantar os ânimos. Também agradeço ao Doutor Ângelo Luís pelos conselhos e risadas que proporcionou em momentos de desânimo.

Obrigado à minha família, avós, tias e tios, primos e primas, por todo o apoio e força que me tem dado nesta jornada nunca me deixando desistir e animando-me sempre pelo caminho.

Por último, e o mais importante para mim, um agradecimento muito, mas mesmo muito especial aos meus pais, Fernanda e José, por todos os sacrifícios que fizeram e continuam a fazer para eu poder ter a oportunidade de continuar nesta minha jornada. Vocês são e sempre serão os pilares da minha vida e sem o vosso apoio e amor incondicional, bem como os vossos conselhos, eu não teria conseguido atingir as metas que tinha estipulado para o meu futuro. Por todos estes motivos sou-vos eternamente grata por estares ao meu lado em cada passo que dou na minha vida.

Um muito obrigado a todos!

Resumo

O género *Arcobacter* foi proposto pela primeira vez em 1991 por Vandamme e, até à data, compreende 29 espécies reconhecidas, incluindo *Arcobacter butzleri*. Esta espécie é considerada o quarto organismo *Campylobacter-like* mais frequentemente encontrado em amostras de fezes diarreicas no homem, sendo responsável por causar cólicas abdominais, náusea e diarreia. De facto, foi incluída na lista de microrganismos considerados um sério risco para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas de Alimentos. *Arcobacter* spp. tem demonstrado um aumento da resistência a vários antimicrobianos, que podem estar associados a diversos mecanismos, um dos quais através das bombas de efluxo. As bombas de efluxo são estruturas proteicas que representam importantes elementos pertencentes ao repertório microbiano das bactérias e são consideradas responsáveis pela resistência a muitas substâncias. Em bactérias de Gram-negativo, as bombas de efluxo da família *resistance-nodulation-division cell* (RND) têm um papel relevante na resistência a múltiplos fármacos. Vários genes que codificam para este tipo de sistema foram identificados no genoma de *A. butzleri*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de mutantes para a bomba de efluxo do tipo RND (AreDEF) na resistência e virulência de *A. butzleri*. Como tal, foram construídos mutantes, usando duas estirpes diferentes de *A. butzleri*, DQ40A1 e AB28/11, por deleção do gene *areE* do operão da bomba de efluxo. Em seguida, foram testados os efeitos desta deleção na resistência a antimicrobianos, crescimento, robustez bacteriana, motilidade, hidrofobicidade e sobrevivência sob condições adversas, como stress oxidativo, osmótico, biliar e resistência na presença de clorexidina. Quando comparados os mutantes com as estirpes parentais correspondentes, o mutante AB28/11 Δ areE apresentou um aumento na suscetibilidade a cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrólidos, levofloxacina, colato de sódio e cloreto de benzalcónio; no entanto, este fenótipo não foi observado para o mutante DQ40A1 Δ areE. Não foram observadas diferenças no crescimento bacteriano entre as estirpes parentais e mutantes; contudo, *A. butzleri* AB28/11 Δ areE apresentou uma redução na robustez quando comparada com a estirpe parental. Ambas os mutantes mostraram alterações no valor da hidrofobicidade, porém apenas AB28/11 Δ areE apresentou uma motilidade diminuída. Além disso, *A. butzleri* AB28/11 Δ areE exibiu um aumento na suscetibilidade às condições de stress testadas quando comparada com a correspondente estirpe parental, mas *A. butzleri* DQ40A1 Δ areE mostrou alteração apenas em relação ao stress biliar. No ensaio de sobrevivência à clorexidina, verificou-se uma tendência para o aumento da suscetibilidade para ambos os mutantes em estudo. Em conclusão, este trabalho mostrou um potencial papel da bomba de efluxo AreDEF na resistência e virulência de *Arcobacter butzleri*, no entanto mais estudos serão necessários.

Palavras-chave:

Arcobacter butzleri, Bombas de efluxo RND, Virulência, Resistência

Abstract

The *Arcobacter* genus was first proposed in 1991 by Vandamme, and to date comprises 29 recognized species, including *Arcobacter butzleri*. This species is considered the fourth most frequent *Campylobacter-like* organism found in human diarrheic stool samples, being responsible for causing abdominal cramps, nausea and diarrhea. In fact, it was included on the list of microorganisms considered a serious hazard to human health by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Arcobacter* spp. is showing an increased resistance to various antimicrobials, which can be associated with several mechanisms, such as efflux pumps. Efflux pumps are protein structures representing important elements belonging to the microbial repertoire of bacteria and are considered responsible for the resistance to many substances. In Gram negative bacteria, efflux pumps from the resistance nodulation cell division (RND) family have a relevant role for multidrug resistance. Various genes coding for this type of systems were identified in the genome of *A. butzleri*, among them the complete operon AreDEF. The aim of this study was to examine the effect of *areE* mutants in resistance and virulence of *A. butzleri*. So, to evaluate the role of AreDEF, we constructed mutants, using two different *A. butzleri* strains, DQ40A1 and AB28/11, by deletion of the gene *areE* from the efflux pump operon. Next, the effect on resistance to antimicrobials, growth, strain fitness, motility, hydrophobicity, and survival under adverse conditions, such as oxidative stress, osmotic, bile and survival to chlorhexidine were tested. When we compared mutants with the correspondent wild-type strains, AB28/11 Δ *areE* displayed an increase in the susceptibility to cephalosporins, aminoglycosides, tetracycline, macrolides, levofloxacin, sodium cholate and benzalkonium chloride; nonetheless the same profile was not observed for *A. butzleri*DQ40A1 Δ *areE*. No differences in growth kinetics were recorded between parental and mutant strains; however, the mutant *A. butzleri* AB28/11 Δ *areE* showed a reduction in the fitness cost when compared with the parental wild-type strain. Both mutants had modification in the value of hydrophobicity, however only AB28/11 Δ *areE* had a decreased motility. In addition, *A. butzleri* AB28/11 Δ *areE* exhibited higher susceptibility to all stresses when compared to its correspondent parental strain, but *A. butzleri* DQ40A1 Δ *areE* showed alteration only concerning bile stress. In the chlorhexidine assay, a tendency for increased susceptibility was observed for both strains, although more studies are needed. In conclusion, the results obtained point to a potential role of the efflux pump AreDEF in the resistance and virulence of *Arcobacter butzleri*.

Keywords:

Arcobacter butzleri, RND Efflux pump, Virulence, Resistance.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Género <i>Arcobacter</i>	1
1.1.1. Classificação taxonómica	1
1.1.2. Classificação morfológica de <i>Arcobacter</i> spp.....	3
1.2. Fontes do género <i>Arcobacter</i>	4
1.2.1. Presença de <i>Arcobacter</i> spp. em alimentos	4
1.2.2. Presença de <i>Arcobacter</i> spp. em água.....	5
1.2.3. Presença de <i>Arcobacter</i> spp. em humanos.....	5
1.2.4. Presença de <i>Arcobacter</i> spp. em animais	6
1.3. Vias de transmissão de espécies do género <i>Arcobacter</i>	6
1.3.1. Consumo de alimentos contaminados.....	6
1.3.2. Consumo de água contaminadas	7
1.3.3. Contacto com animais domésticos	8
1.3.4. Contacto pessoa-pessoa	8
1.4. Virulência de <i>Arcobacter butzleri</i>	9
1.5. Resistência de <i>Arcobacter butzleri</i> a antibióticos	11
1.5.1. Mecanismo de resistência a antibióticos	13
1.5.1.1. Inativação do antibiótico.....	16
1.5.1.2. Modificação do alvo do antibiótico.....	17
1.5.1.3. Influxo e efluxo do antibiótico	17
1.5.2. Bombas de Efluxo.....	18
Capítulo 2 - Objetivos.....	25
Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	27
3.1. Estirpes usadas no estudo	27
3.2. Condições gerais de armazenamento	27

3.3.	Construção do fragmento de DNA transformante	27
3.3.1.	Extração do plasmídeo pUC18-K2 de <i>Escherichia coli</i>	27
3.3.2.	Digestão do plasmídeo pUC18-K2 e purificação da cassette <i>aphA-3</i>	28
3.3.3.	Extração de DNA genómico de <i>A. butzleri</i>	29
3.3.4.	Construção dos fragmentos hibridizantes com a cassette <i>aphA-3</i>	29
3.3.5.	Junção dos fragmentos hibridizantes com a cassette <i>aphA-3</i>	30
3.4.	Transformação Natural	31
3.5.	Confirmação da mutagénesis	32
3.5.1.	Verificação da inserção do fragmento de DNA transformante	32
3.5.2.	Verificação da expressão do gene	33
3.5.2.1.	Extração de RNA total	33
3.5.2.2.	Tratamento das amostras de RNA total com DNase I	34
3.5.2.3.	Síntese de DNA complementar (cDNA)	34
3.5.2.4.	Determinação da expressão genética de <i>areE</i>	34
3.6.	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de agentes antimicrobianos	35
3.6.1.	Agentes antimicrobianos	35
3.6.2.	Determinação das concentrações mínimas inibitórias	37
3.7.	Determinação das curvas de crescimento	37
3.8.	Ensaio de competição entre estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i>	38
3.9.	Avaliação da influência da bomba de efluxo na virulência de <i>Arcobacter butzleri</i> ..	38
3.9.1.	Condições de crescimento	38
3.9.2.	Ensaio de motilidade.....	39
3.9.3.	Ensaio de hidrofobicidade celular	39
3.9.4.	Ensaio de crescimento em condições de stress	39
3.9.4.1.	Ensaio de stress oxidativo	40
3.9.4.1.1.	Stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogénio	40
3.9.4.1.2.	Stress oxidativo induzido por menadiona	40

3.9.4.2. Ensaio de stress osmótico.....	40
3.9.4.3. Ensaio de stress com sais biliares e com cloroexidina	41
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	43
4.1. Análise bioinformática da bomba de efluxo AreDEF.....	43
4.2. Construção dos mutantes.....	44
4.3. Efeito da deleção do gene <i>areE</i> no crescimento bacteriano	49
4.4. Avaliação da competição entre as estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> parental e mutante.....	51
4.5. Efeito da deleção do gene <i>areE</i> na tolerância ou resistência a agentes antimicrobianos	52
4.6. Efeito da deleção do gene <i>areE</i> nas características de virulência de <i>Arcobacter butzleri</i>	55
4.6.1. Determinação do efeito da deleção do gene <i>areE</i> de <i>Arcobacter butzleri</i> na motilidade e hidrofobicidade	55
4.6.1.1. Avaliação da motilidade.....	55
4.6.1.2. Avaliação da hidrofobicidade celular	56
4.7. Determinação do efeito da deleção do gene <i>areE</i> em <i>Arcobacter butzleri</i> na sobrevivência a condições adversas	58
4.7.1. Stress oxidativo	58
4.7.2. Stress osmótico	60
4.7.3. Stress biliar	61
4.7.4. Efeito da cloroexidina	62
Capítulo 5 - Conclusões	65
Capítulo 6 - Perspetivas Futuras	67
Referências bibliográficas	69
Anexos	81

Lista de Figuras

Figura 1: Representação dos diversos mecanismos de virulência de <i>Arcobacter</i> spp.. Retirado de Collado and Figueras, 2011.....	10
Figura 2: Representação dos alvos das diferentes classes de antibióticos. Adaptado de Petchiappan and Chatterji, 2017.	12
Figura 3: Representação dos mecanismos de resistência aos antibióticos. Adaptado de Petchiappan and Chatterji, 2017.	15
Figura 4: Representação de cinco das seis classes de bombas de efluxo. Adaptado de Murakami, 2016.	19
Figura 5: Representação esquemática da digestão do plasmídeo pUC18-K2 de <i>E. coli</i>	28
Figura 6: Representação esquemática da construção dos fragmentos hibridizantes com a cassette (Fragmentos A e B).	29
Figura 7: Representação esquemática da construção do fragmento de DNA transformante (Fragmento C).	31
Figura 8: Representação esquemática da interrupção do gene <i>areE</i> pelo fragmento de DNA transformante.	32
Figura 9: Estrutura prevista para a proteína AreE, pelo programa TMHMM, demonstrando a presença 12 domínios transmembranares e dois <i>loops</i> entre os domínios 1-2 e 7-8.....	44
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose na qual se encontra representado o resultado da extração do plasmídeo pUC18-K2 de <i>E. coli</i> . (MM: Marcador molecular; pUC18-K2: plasmídeo contendo a cassette <i>aphA-3</i>).	45
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose dos produtos resultantes da digestão enzimática do plasmídeo pUC18-K2 com as enzimas BamHI e KpnI. (MM: Marcador molecular; 1-5: Produtos da digestão enzimática do plasmídeo pUC18-K2; Círculo verde: representa o produto de interesse, a cassette <i>aphA-3</i>).	46
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes à amplificação dos fragmentos hibridizantes (fragmentos A e B) com a cassette <i>aphA-3</i> e dos produtos de PCR de junção dos fragmentos hibridizantes com a cassette (fragmento C). (MM: Marcador molecular; 1: Fragmento A; 2: Fragmento B; 3: Cassete <i>aphA-3</i> ; 4: Fragmento C).....	47

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes à amplificação do gene *areE* nas estirpes parentais e do fragmento de DNA transformante nos mutantes. (A: Estirpe DQ40A1; B: Estirpe AB28/11; MM: Marcador molecular; 1A, 3A, 1B-3B: Fragmento amplificado do gDNA dos mutantes com DNA concentrado; 2A e 4A: Fragmento amplificado do gDNA dos mutantes com DNA 10 vezes diluído; 5: Fragmento amplificado do gDNA das estirpes parentais, controlo positivo; 6: Controlo negativo da reação de PCR). 48

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR das estirpes parentais dos mutantes. (A: Estirpe DQ40A1; B: Estirpe AB28/11; MM: Marcador molecular; 1: cDNA amplificado das estirpes parentais, controlo positivo; 2: cDNA amplificado dos mutantes; 3: Controlo negativo da reação de PCR). 49

Figura 15: Curvas de crescimento das estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respetivos mutante. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1 Δ areE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11 Δ areE). 50

Figura 16: Representação gráfica do custo relativo para as estirpes *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11. Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três ensaios independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação a um custo relativo fixo de um (linha horizontal); ** $p < 0,01$ 51

Figura 17: Representação gráfica das percentagens de hidrofobicidade para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respetivos mutantes. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1 Δ areE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11 Δ areE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de três experiências independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ 57

Figura 18: Representação gráfica das zonas de inibição para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respetivos mutantes, na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, 3, 10 e 30 %. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1 Δ areE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11 Δ areE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três experiências independentes. 58

Figura 19: Representação gráfica das percentagens de sobrevivência para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respetivos mutantes, na presença de diferentes concentrações de menadiona, 0, 10, 20 e 30 μ g/mL. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1 Δ areE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11 Δ areE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três experiências

independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ 60

Figura 20: Representação gráfica das percentagens de sobrevivência para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respectivos mutantes, na presença de diferentes concentrações de cloreto de sódio, 0,075 e 0,15 M. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1 Δ areE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11 Δ areE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três experiências independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; *** $p < 0,001$ 60

Figura 21: Representação gráfica das percentagens de sobrevivência para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 e respectivos mutantes, na presença de diferentes concentrações de extrato biliar, 0,25, 0,5 e 1 %. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1 Δ areE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11 Δ areE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três experiências independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ 62

Figura 22: Representação gráfica das percentagens de sobrevivência para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 e respectivos mutantes, na presença de diferentes concentrações de cloroexidina, $\frac{1}{4}x$ e $\frac{1}{2}x$ da CMI. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1 Δ areE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11 Δ areE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três experiências independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; * $p < 0,05$ 63

Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies incluídas no género <i>Arcobacter</i> , com o ano e origem do seu reconhecimento.	2
Tabela 1: Espécies incluídas no género <i>Arcobacter</i> , com o ano e origem do seu reconhecimento (continuação).	3
Tabela 2: Diferentes tipos de enzimas produzidas pelas células e os seus alvos. Adaptado de Wright, 2005.	16
Tabela 3: Lista dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR, com a indicação da sua sequência e tamanho.	30
Tabela 4: Lista dos <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR, com a indicação da sua sequência e tamanho.	34
Tabela 5: Identificação dos diferentes agentes antimicrobianos a usar na determinação das concentrações mínimas inibitórias.	36
Tabela 6: Resultados apresentados pelo programa SOSUI para a localização e tamanho de cada proteína que constitui a bomba de efluxo AreDEF.	44
Tabela 7: Concentrações mínimas inibitórias dos agentes antimicrobianos para as estirpes de <i>A. butzleri</i> DQ40A1 e AB28/11 nativas e respetivos mutantes.	53
Tabela 8: Diâmetro da motilidade (em mm) das estirpes parentais de <i>A. butzleri</i> DQ40A1 e AB28/11 e respetivos mutantes, às 24 e 48 horas de incubação (média \pm desvio padrão).	56

Lista de Acrónimos

ABC	<i>“Adenosine triphosphate (ATP)-Binding Cassette”</i>
ATP	<i>“Adenosine Triphosphate”</i>
BA	<i>“Blood Agar”</i>
BHI	<i>“Brain Heart Infusion”</i>
bp	Pares de bases
cDNA	DNA complementar
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DO _{620nm}	Densidade ótica num comprimento de onda de 620 nm
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotidos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
gDNA	DNA genómico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
ICMSF	<i>“International Commission on Microbiological Specifications for Foods”</i>
LB	<i>“Luria-Bertani”</i>
MATE	<i>“Multidrug And Toxic compound Extrusion”</i>
MDR	<i>“Multidrug Resistance”</i>
MFS	<i>“Major Facilitator Superfamily”</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PaBN	<i>“Phenylalanine-arginine B-naphthylamide”</i>
PACE	<i>“Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux”</i>
PBS	<i>“Phosphate Buffered Saline”</i>
PCR	<i>“Polimerase Chain reaction”</i>
PQS	<i>“Pseudomonas Quinolone Signal”</i>
QRDR	<i>“Quinolone resistance determining region”</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RND	<i>“Resistance-Nodulation-Division cell”</i>
RT-PCR	<i>“Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction”</i>
SMR	<i>“Small Multidrug Resistance”</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TB	<i>“Terrific Broth”</i>
TF	Tampão fosfato
TSA	<i>“Tryptic Soy Agar”</i>
TSB	<i>“Tryptic Soy Broth”</i>
UFC	Unidades formadoras de colónias

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Género *Arcobacter*

O género *Arcobacter* encontra-se inserido na família *Campylobacteraceae*, juntamente com os géneros *Campylobacter* e *Sulfurospirillum* e na classe das *Epsilonproteobacteria* (Ferreira *et al.*, 2014). Este género compreende 29 espécies reconhecidas que foram isoladas de uma vasta gama de fontes como, por exemplo, meio ambiente e seres vivos (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2019), sendo que todos os anos novas espécies são reconhecidas e adicionadas ao género.

1.1.1. Classificação taxonómica

O primeiro isolamento descrito do género *Arcobacter* foi efetuado em 1977 por Ellis e seus colaboradores, que o descreveu como sendo um organismo espiralado isolado de fetos de bovinos e suínos. Este microrganismo foi classificado como *Campylobacter* aerotolerante, com capacidade de crescer a baixas temperaturas, sendo incluído no género *Campylobacter* (Ferreira *et al.*, 2016).

Em 1983 foi descoberta uma nova espécie isolada de raízes de *Spartina alterniflora* Loisel e de raízes associadas a sedimentos de pântanos de sal e tendo a capacidade de fixar azoto, denominada *Campylobacter nitrofigilis* (McClung, Patriquin and David, 1983). Passados anos, uma nova espécie foi associada a abortos animais, designada de *Campylobacter cryaerophila* (Neill *et al.*, 1985), sendo isolada em 1988 em amostras humanas pela primeira vez. Em 1991, foi proposta uma nova espécie que iria abranger todos os isolados de amostras de humanos e animais, *Campylobacter butzleri* (Kiehlbauch *et al.*, 1991).

O género *Arcobacter* foi criado em 1991 por Vandamme e colaboradores, depois de numa análise às espécies pertencentes ao género *Campylobacter* verificarem que certos perfis não se enquadravam. Sendo assim, as espécies nomeadas de *C. nitrofigilis* e *C. cryaerophila* passam a designar-se, respetivamente, *Arcobacter nitrofigilis* e *Arcobacter cryaerophilus*, ficando o género *Arcobacter* a possuir duas espécies (Vandamme *et al.*, 1991). Passado um ano, este género foi aumentado em mais duas espécies: *Arcobacter butzleri* e *Arcobacter skirrowii*, tendo sido esta última isolada de fluídos prepuciais de touros, de fetos abortados de bovinos, suínos e ovinos e, também, de fezes diarreicas (Vandamme, Vancanneyt, *et al.*, 1992).

Desde de 2005 até à atualidade, o número de espécies em *Arcobacter* spp. foi aumentado com a adição de 25 espécies reconhecidas (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies incluídas no género *Arcobacter*, com o ano e origem do seu reconhecimento.

Estirpe	Ano	Origem	Referência
<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	1983	Raizes de <i>Spartina alterniflora</i> Loisel	(McClung, Patriquin and David, 1983)
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	1985	Abortos bovinos	(Neill <i>et al.</i> , 1985)
<i>Arcobacter butzleri</i>	1991	Humanos e animais com doença diarreica	(Kiehlbauch <i>et al.</i> , 1991)
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1992	Fluido prepucial de touros	(Vandamme, Vancanneyt, <i>et al.</i> , 1992)
<i>Arcobacter cibarius</i>	2005	Carcaças de frango	(Houf <i>et al.</i> , 2005)
<i>Arcobacter halophilus</i>	2005	Lagoa hipersalina	(Donachie <i>et al.</i> , 2005)
<i>Arcobacter mytili</i>	2009	Mexilhões e água salobra	(Collado <i>et al.</i> , 2009)
<i>Arcobacter thereius</i>	2009	Rins e fígados de fetos abortados de suínos e de cloaca de patos	(Houf <i>et al.</i> , 2009)
<i>Arcobacter defluvii</i>	2011	Esgotos	(Collado <i>et al.</i> , 2011)
<i>Arcobacter ellisii</i>	2011	Mexilhões	(Figueras, Levican, <i>et al.</i> , 2011)
<i>Arcobacter marinus</i>	2011	Água do mar	(Kim, Hwang and Cho, 2009)
<i>Arcobacter molluscorum</i>	2011	Mexilhões e ostras	(Figueras, Collado, <i>et al.</i> , 2011)
<i>Arcobacter trophiarum</i>	2011	Fezes de suínos	(De Smet <i>et al.</i> , 2011)
<i>Arcobacter bivalviorum</i>	2012	Moluscos	(Levican <i>et al.</i> , 2012)
<i>Arcobacter venerupis</i>	2012	Ameijoas	(Levican <i>et al.</i> , 2012)
<i>Arcobacter anaerophilus</i>	2013	Sedimentos de estuários	(Sasi Jyothsna <i>et al.</i> , 2013)
<i>Arcobacter cloacae</i>	2013	Moluscos	(Levican, Collado and Figueras, 2013)
<i>Arcobacter suis</i>	2013	Carne de suínos	(Levican, Collado and Figueras, 2013)
<i>Arcobacter aquinarinus</i>	2014	Mexilhões e de água do mar	(Levican <i>et al.</i> , 2015)
<i>Arcobacter ebronensis</i>	2014	Mexilhões e de água do mar	(Levican <i>et al.</i> , 2015)
<i>Arcobacter lanthieri</i>	2015	Suínos e de estrume de gado leiteiro	(Whiteduck-Léveillé <i>et al.</i> , 2015)
<i>Arcobacter pacificus</i>	2016	Água do mar	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)
<i>Arcobacter faecis</i>	2016	Poço séptico de resíduos humanos	(Whiteduck-léveillé <i>et al.</i> , 2015)
<i>Arcobacter acticola</i>	2016	Água do mar	(Park <i>et al.</i> , 2016)
<i>Arcobacter lekithochrous</i>	2017	Larvas de vieira e água do mar	(Diéguez <i>et al.</i> , 2017)

Tabela 1: Espécies incluídas no género *Arcobacter*, com o ano e origem do seu reconhecimento (continuação).

<i>Arcobacter porcinus</i>	2017	Suínos	(Figueras, Levican and Collado, 2017)
<i>Arcobacter canalis</i>	2018	Água de um canal de esgoto urbano	(Pérez-Cataluña, Salas-Massó and Figueras, 2018a)
<i>Arcobacter lacus</i>	2018	Água tratada dum sistema tratamento de águas	(Pérez-Cataluña, Salas-Massó and Figueras, 2018b)
<i>Arcobacter caeni</i>	2018	Água tratada dum sistema tratamento de águas	(Pérez-Cataluña, Salas-Massó and Figueras, 2018b)

Em 2018, Tanaka e seus colaboradores demonstraram que *Arcobacter haliotis* é um organismo heterotípico posterior a *Arcobacter lekithochrous*, podendo as diferenças apresentadas entre as espécies ser explicadas através da variabilidade intraespecífica e levando à conclusão de serem o mesmo organismo (Diéguez *et al.*, 2018).

Recentemente, Pérez-Cataluña e seus colaboradores propuseram uma nova revisão taxonómica relativamente ao género *Arcobacter*. Nesta revisão, foi comprovado que, com a existência de variabilidade genómica e as combinações de características fenotípicas diferenciadoras, é possível sugerir a divisão do género agora conhecido como *Arcobacter* em pelo menos sete géneros: *Arcobacter*, *Aliarcobacter*, *Pseudarcobacter*, *Halarcobacter*, *Malaciobacter*, *Poseidonibacter* e *Arcomarinus* (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018). De entre estes géneros, só os géneros *Pseudarcobacter*, *Halarcobacter*, *Malaciobacter* e *Poseidonibacter* foram aceites e reconhecidos (Oren and Garrity, 2019). Segundo esta nova classificação, *Arcobacter butzleri* será incluído no género *Aliarcobacter* (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018).

1.1.2. Classificação morfológica de *Arcobacter* spp.

As bactérias presentes ao género *Arcobacter* têm como característica serem bacilos Gram-negativos, incluindo células helicoidais ou em forma de S, com um comprimento de 0,5 a 3 µm e uma largura de 0,2 a 0,9 µm. Todas as espécies apresentam mobilidade por um único flagelo polar e têm a capacidade de crescer em condições de microaerobiose, com a exceção de *A. anaerophilus* que não possui flagelo e é uma bactéria anaeróbia obrigatória. *Arcobacter* spp. é diferenciado de *Campylobacter* spp. pela capacidade de crescerem em condições de aerobiose e a temperaturas entre os 15 °C e 30 °C (Ferreira *et al.*, 2016).

As bactérias deste género são quimiorganotróficas, oxidase e catalase positiva, no entanto para a enzima urease são variáveis. Estas espécies são negativas para a hidrólise do acetato de indoxil e não são capazes de produzir pigmentos fluorescentes. No seu metabolismo, não são

capazes de utilizar carboidratos como fonte de energia, mas são capazes de reduzir nitrato a nitrito. Algumas espécies podem crescer na presença de glicina (1% p/vol), cloreto de sódio, cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio (0,04% p/vol), oxgall (1% p/vol) e de safranina (0,05% p/vol). O conteúdo de G+C no DNA pode variar desde 26,4% a 29,4% (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018).

1.2. Fontes do género *Arcobacter*

Arcobacter spp. tem diversas origens, como alimentos, animais e humanos. Estas bactérias também podem ser encontradas no meio ambiente, como na água, pelo que a sua utilização na preparação de refeições e alimentos pode torná-los numa fonte deste género, tal como a produção de alimentos de origem animal (Collado and Figueras, 2011).

1.2.1. Presença de *Arcobacter* spp. em alimentos

A presença de *Arcobacter* spp. tem sido demonstrada em diversos alimentos, como alimentos crus (ex.: leite), alimentos prontos a comer (ex.: vegetais embalados), alimentos em fase de processamento e na linha de produção fabril associada à sua produção (ex.: queijos), entre outros (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017a).

Num estudo realizado em Portugal em diversas categorias de alimentos adquiridos no sector de comércio a retalho foi observada uma frequência de espécies de *Arcobacter* de 60,5%, sendo a prevalência de 92% em carnes frescas de aves de capoeira, seguida de 68% em peixe fresco, 47,6% em legumes embalados, seguida de carne suína fresca com 45,8% e por fim carne bovina com 42,1%. Relacionando a distribuição das espécies nestas amostras positivas para *Arcobacter* spp., foi observado que a espécie mais frequente foi *A. butzleri*, com 58,5%, sucedida por *A. cryaerophilus*, com 35,8% e por fim *A. skirrowii*, com 5,7%. Também foi possível comprovar que *A. butzleri* foi a espécie mais frequentemente encontrada em vegetais embalados, aves e suínos, enquanto que a *A. cryaerophilus* se encontrava mais presente em amostras de carne bovina e peixe. Para além disto, foi observado que *A. skirrowii* foi encontrado apenas em amostras de peixe, sendo que foi nesta categoria de alimentos que foi possível identificar uma maior variedade de espécies (Vicente-Martins *et al.*, 2018), o que pode ser explicado pela poluição da água do mar por fezes e esgotos que posteriormente poderão entrar em contacto com alimentos que poderão ser consumidos. Num outro estudo também realizado em Portugal, foi observado que a maioria das amostras de lacticínios testadas foram positivas para *A. butzleri* (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017b).

Arcobacter spp. foram igualmente encontradas em animais marinhos como foi comprovado por Levican *et al.* (2014) que demonstraram a sua presença em marisco, com uma prevalência de 23,8-100% em ameijoas e 33,3-50% em mexilhões, no entanto não foram encontradas em

camarão congelado (Ferreira *et al.*, 2016), podendo ser sugerido que o processo de congelação de marisco possa ser um tratamento para a eliminação destas espécies.

Numa investigação realizada na Catalunha, para além das três espécies referidas anteriormente, também foram encontradas as espécies *A. nitrofigilis* e *A. mytili* em amostras de mexilhões e *A. thereius* em amostras de carne suína (Collado, Guarro and Figueras, 2016).

Em estudos realizados em países por todo o mundo, também foram detetadas espécies de *Arcobacter* nos mais diversos tipos de amostras como em aves de capoeira, suínos, bovinos, gado de pequeno porte, lacticínios, marisco, vegetais, tal como em ambientes de processamento alimentar (Hsu and Lee, 2015).

1.2.2. Presença de *Arcobacter* spp. em água

Arcobacter spp. tem sido isolado de diversos tipos de águas, como águas residuais, águas do mar, lagos, rios, água potável e água subterrânea por todo o mundo. Resumidamente, a prevalência global de *Arcobacter* spp. encontrada em águas tem a seguinte ordem: 91% em águas residuais, 87,1% em águas de lagos e rios, 75,2 % em águas de praias, 43,8% em águas subterrâneas, 17,6% em água do mar e 3,2% em água potável (Hsu and Lee, 2015).

Num estudo efetuado na Espanha a amostras de águas do rio Llobregat antes de qualquer tratamento, foi comprovado uma prevalência de 80,2% de *A. butzleri*, seguido de *A. cryaerophilus* com 19,4% e por fim de *A. skirrowii* com 0,3%. No entanto, após o tratamento destas águas, novas análises foram realizadas e observou-se que não foram detetados quaisquer isolados acima referidos. Conclui-se, assim, que os processos de tratamento utilizados para a produção de água potável foram adequados para a eliminação das espécies de *Arcobacter* (Collado *et al.*, 2010).

1.2.3. Presença de *Arcobacter* spp. em humanos

O primeiro organismo isolado em humanos do género *Arcobacter* foi *A. cryaerophilus*, no entanto, é *A. butzleri* que se descreve como mais prevalente. Em análises realizadas em diversos países (ex.: Itália, França, Bélgica, Sul de África, Tailândia, entre outros) foi demonstrada a presença de *A. butzleri* em amostras de paciente com sintomas de diarreia e num estudo na Suíça, *A. cryaerophilus* foi encontrado em amostras de fezes de trabalhadores assintomáticos de um matadouro (Collado and Figueras, 2011).

Num estudo efetuado em Portugal com amostras de fezes diarreicas, *Arcobacter* spp. foi detetado em 1,7% das amostras analisadas, sendo que 1,3% corresponde à *A. butzleri* e 0,3% a *A. cryaerophilus*. Além disso, observou-se que existia uma diferença relativamente às faixas etárias, sendo que se verificou uma maior incidência em crianças (2,2%), comparativamente aos adultos (0,9%) (Ferreira, Júlio, *et al.*, 2013).

Entre as espécies do género *Arcobacter* e, devido à sua maior prevalência em amostras provenientes de humanos, *A. butzleri* é considerado o quarto organismo *Campylobacter-like* mais frequente (Vandenberg *et al.*, 2004; Prouzet-Mauléon *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 2013; Ferreira, Júlio, *et al.*, 2013).

1.2.4. Presença de *Arcobacter* spp. em animais

Arcobacter spp. é frequentemente isolado a partir de tratos intestinais e amostras de fezes de diferentes animais de quinta e cujo objetivo final será a sua utilização como alimentos, no entanto, aparentemente, só tem capacidade de provocar doenças em apenas alguns deles, pois a sua presença também é verificada em animais saudáveis (Collado and Figueras, 2011). Existem, ainda, evidências de que estas espécies também possam ser encontradas em répteis (Ferreira *et al.*, 2016), bem como em animais exóticos/selvagens, tais como rinocerontes, zebras entre outros (Collado and Figueras, 2011; Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017a), e também em animais domésticos como cães e gatos (Pejchalova *et al.*, 2016).

1.3. Vias de transmissão de espécies do género *Arcobacter*

A. butzleri, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* estão associados a doenças em humanos e animais, sendo *A. butzleri* a espécie mais encontrada em casos de enterites, tendo como sintoma mais descrito diarreia aquosa ou persistente (Ferreira, Fraqueza, *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2014). Recentemente, *Arcobacter thereius* também foi encontrado em amostras de fezes de pacientes com enterite (Rovetto *et al.*, 2017). Para além de enterites, *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* também foram associados a cólicas, bacteremias e septicemias em humanos (Sousa *et al.*, 2019) e a abortos e mastites em animais (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017b). A sua frequência em diversos ambientes e o facto de serem considerados patógenos alimentares e aquáticos, aponta estas duas espécies como um sério risco para a saúde pública, e por sua vez para a saúde humana. De facto, *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* são considerados enteropatógenos emergentes e potenciais agentes zoonóticos (Collado and Figueras, 2011), encontrando-se na lista de microrganismos considerados um perigo grave para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002). Devido a este facto, as suas vias de transmissão tornaram-se alvo de estudo ao longo dos tempos, de modo a compreender e tentar prevenir de casos de surtos.

1.3.1. Consumo de alimentos contaminados

O consumo de alimentos contaminados tem sido apontado como uma das principais vias de transmissão de *Arcobacter* spp., sendo que este se encontra ao longo de toda a cadeia alimentar e em todos os tipos de alimentos (Collado and Figueras, 2011; Ferreira *et al.*, 2016).

Arcobacter spp. foi encontrado em vegetais e, como a maioria destes alimentos são consumidos crus, sem qualquer tipo de tratamento, tornam-se um risco para a saúde do consumidor (Ferreira *et al.*, 2016). Para além da sua existência em vegetais, também é encontrado em alimentos processados (ex.: queijos) que, quando consumidos pelos compradores, tornam-se um risco de possível contaminação (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017b).

A transmissão de *Arcobacter* spp. ao consumidor pode ocorrer através de alimentos de origem animal, como carnes e peixe. A contaminação das carnes está sugerida devido ao contacto das carcaças dos animais com as fezes de animais contaminados durante o seu abate (Aydin *et al.*, 2007). No entanto, o peixe e marisco muitas vezes consumido cru ou mal cozinhado pode ser outra fonte de contaminação por *Arcobacter* spp.. Num estudo foi demonstrado que 100% das amostras de ameijoas e 41,1% das amostras de mexilhão analisadas continham uma larga diversidade e alta prevalência de espécies de *Arcobacter* (Collado, Guarro and Figueras, 2016).

Numa investigação realizada a um surto provocado por *Arcobacter* spp. ocorrido numa receção de casamento nos Estados Unidos, os resultados sugerem que o consumo de frango contaminado com *A. butzleri* pode ser a sua causa. Assim, este estudo vem apoiar que o consumo de alimentos contaminados com *Arcobacter* spp. é uma potencial via de transmissão destas bactérias (Lappi *et al.*, 2013).

Também nos alimentos prontos a consumo, se verifica a presença destas bactérias, de facto, num estudo realizado em restaurantes na Tailândia, foi estimado, estatisticamente, que a exposição a *A. butzleri* por refeição pode ser cerca de 13%, sendo que este risco aumenta para 75% com 10 ou mais refeições (Teague *et al.*, 2010), tornando-se um risco para os consumidores.

A. butzleri é a espécie mais frequentemente encontrada em alimentos contaminados, seguida de *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (Lehner, Tasara and Stephan, 2005).

1.3.2. Consumo de água contaminadas

Outra fonte de transmissão de *Arcobacter* spp. é através do consumo de água contaminada (Ho, Lipman and Gastra, 2006), quer para animais, quer para humanos.

Diversos estudos demonstram a presença de espécies de *Arcobacter* em diferentes amostras de água, como de rios, de lagos e do mar. Uma das possíveis causas apontada para a contaminação de água é o seu possível contacto com fezes contaminadas, sendo que em estudos onde as amostras de água contactaram com fezes a prevalência de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* aumenta comparativamente a amostras não contaminadas (Collado *et al.*, 2008).

O primeiro caso de surto relatado associado ao consumo de águas contaminadas com *Arcobacter*, ocorreu em julho de 1996, num acampamento de escuteiras nos Estados Unidos da América, onde se estima que 81% das campistas foram afetadas, tendo como sintomas náuseas,

vômitos, cólicas abdominais e diarreia. A presença de *A. butzleri* na água potável foi identificada como a causa deste surto, devido à falha no sistema automatizado de cloração da água utilizada no campo (Rice *et al.*, 1999). O segundo surto ocorrido foi em Ohio em 2004, também nos Estados Unidos da América, onde os pacientes apresentavam cólicas e diarreia, sendo que os resultados foram positivos para espécies do género *Arcobacter* (Fong *et al.*, 2007). Um outro surto descrito foi na Eslovénia em 2008, causado pela contaminação do sistema de água potável, depois de ter sido conectado a um novo edifício. Os pacientes apresentavam como sintomas gastroenterites, e os resultados efetuados às fezes destes pacientes deram positivo para *A. cryaerophilus* e outras espécies de *Arcobacter* spp. (Kopilović *et al.*, 2008).

Assim, a ocorrência destes surtos aponta para o consumo de águas contaminadas como uma possível via de transmissão de *Arcobacter* (Collado and Figueras, 2011).

1.3.3. Contacto com animais domésticos

A deteção de *A. butzleri* em cães e gatos de estimação, confirma que a interação entre estes animais e os humanos possa ser uma possível via de transmissão (Ferreira *et al.*, 2014).

Em estudos efetuados na Itália em amostras provenientes de animais domésticos, como esfregaços orais, foi demonstrado a frequência de *A. butzleri* em 77,6% e de *A. cryaerophilus* em 34,1% das amostras de gatos (Malara *et al.*, 2009). Posteriormente, em outro estudo realizado na Bélgica os isolados de esfregaços orais e fezes de gatos demonstraram ser negativos para estas espécies (Houf *et al.*, 2008). No caso de cães, os estudos também foram controversos, pois, no Chile, a frequência foi de 3,3% em amostras de fezes (Fernandez, Vera and Villanueva, 2007), enquanto que na Turquia não foram encontrados isolados positivos para *Arcobacter* spp. nessas amostras (Aydin *et al.*, 2007). Para além de animais domésticos, existem estudos que comprovam a existência destas espécies em animais exóticos, como rinocerontes e gazelas (Collado and Figueras, 2011).

Apesar de serem necessários mais estudos relativamente a este tipo de contacto, é de sublinhar a presença do género *Arcobacter* spp. em diversos animais, o que sugere a necessidade de alguns cuidados aquando do contacto com estes animais, pois constituem uma possível via de transmissão.

1.3.4. Contacto pessoa-pessoa

Uma outra via de transmissão sugerida foi o contacto pessoa-pessoa. A sugestão desta via advém de um estudo efetuado a um surto ocorrido em 1983 numa escola em Itália, onde várias crianças de diferentes anos escolares e uma professora apresentaram sintomas e resultados positivos nas amostras recolhidas compatíveis com o diagnóstico de infeção pelo género *Arcobacter*. Analisando a sintomatologia das vítimas, estas apresentavam cólicas abdominais, ausência de resposta a antibióticos, ataques súbitos, alguns casos de vômitos e ausência de febre e diarreia (Vandamme, Pugina, *et al.*, 1992). A análise às amostras fecais verificou que todos os isolados

demonstravam o mesmo fenótipo e genótipo de *A. butzleri* (Kerstens *et al.*, 1993) e, como o surto sucedeu no mesmo período de tempo, conduziu a que os cientistas propusessem a hipótese de que tenha ocorrido uma transmissão pessoa-a-pessoa, resultando, assim, numa nova via de transmissão deste género (Vandamme, Pugina, *et al.*, 1992).

Um outro caso que vem suportar esta hipótese ocorreu em 1995, quando uma mãe de 34 anos deu à luz por parto natural o seu quinto filho às 29 semanas de gestação, sendo que não apresentava qualquer tipo de doença. Aquando do nascimento, o neonato foi diagnosticado com bacteremia, sendo comprovado que esta foi provocada por *A. butzleri*. Este relato veio adicionar a transmissão vertical, através da placenta, como uma possível via de transmissão pessoa-a-pessoa de *Arcobacter* spp. (On, Stacey and Smyth, 1995).

1.4. Virulência de *Arcobacter butzleri*

Das espécies de *Arcobacter* spp., *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são consideradas as mais patogénicas para os humanos e animais, devido à sua presença em alimentos, água e meio ambiente. Como tal, tornou-se importante o estudo dos mecanismos de virulência para melhor compreender a sua ação e, assim, ser possível a prevenção da sua virulência em seres vivos.

Apesar da existência de vários estudos sobre a virulência do género *Arcobacter*, os mecanismos ainda são pouco conhecidos. Os estudos para avaliar a virulência incidem em capacidade de adesão, capacidade de invasão, citotoxicidade, presença de genes putativos de virulência e capacidade de formação de biofilmes (Collado and Figueras, 2011; Ferreira *et al.*, 2016).

Collado e seus colaboradores (2011) reuniram informação de diversos estudos acerca da potencial patogenicidade de *A. butzleri* efetuados até à data, em diversas linhas celulares, e concluíram que 13% dos isolados tinham a capacidade de invasão, 50% tinha a capacidade de adesão e 83% tinha efeito citotóxico (Collado and Figueras, 2011).

Num estudo realizado em linhas celulares (células intestinais HT-29/B6) infetadas com *A. butzleri*, foi demonstrada uma expressão reduzida de proteínas de claudina-1, -5, e -8 de junção estreita das células epiteliais, o que gerou uma disfunção da barreira epitelial e apoptose dessas células. A conjugação destes eventos poderão estar associados ao desenvolvimento de diarreia e que poderão explicar que este seja um dos potenciais sintomas associados a infeção por espécies de *Arcobacter* (Bücker *et al.*, 2009) (Figura 1).

Os mecanismos de virulência relatados de adesão, invasão e aumento de transporte paracelular, encontram-se esquematizados na Figura 1.

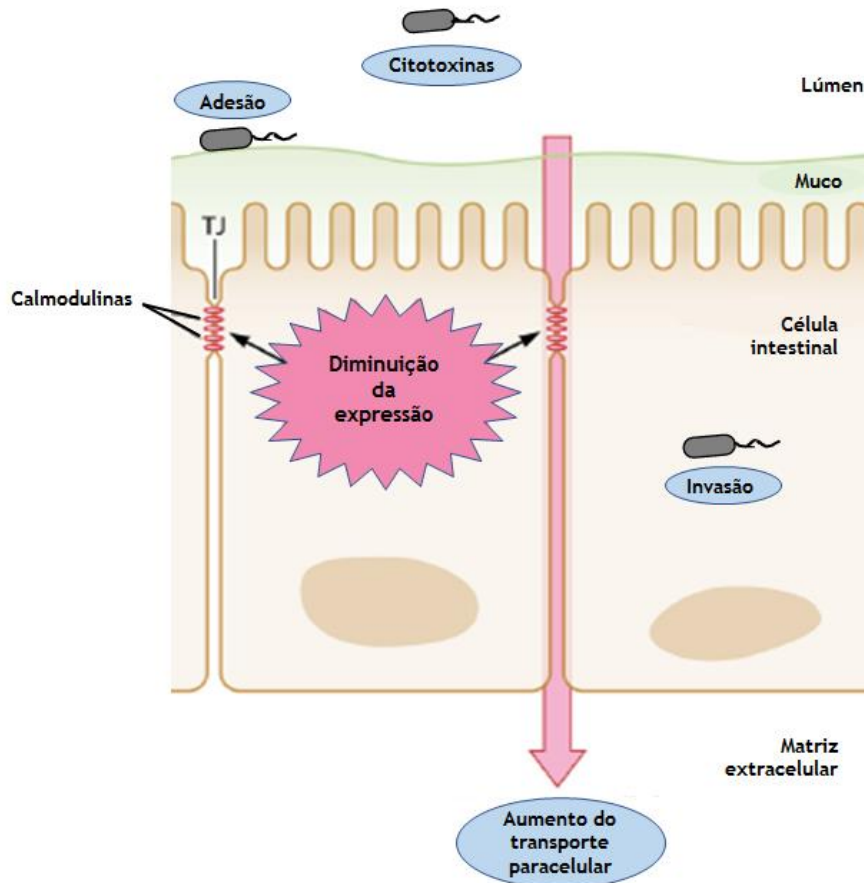


Figura 1: Representação dos diversos mecanismos de virulência de *Arcobacter* spp.. Retirado de Collado and Figueras, 2011.

Para além destes quatro mecanismos, a existência de genes putativos de virulência no genoma de *A. butzleri* também tem sido relatada ao longo dos tempos, como possivelmente associado a patogenicidade. Na sequenciação total do genoma de *A. butzleri* foi possível identificar diversos genes putativos de virulência, como *cadF*, *cj1349*, *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*, *hecA*, *hecB* e *irgA*, de entre os quais alguns apresentam similaridade com os genes de virulência de *Campylobacter jejuni* (Miller *et al.*, 2007). Num estudo realizado em amostras de origem animal e humana em Portugal, foram estudados os nove genes putativos mencionados anteriormente e verificou-se que em dois dos seis isolados de *A. butzleri* analisados foram encontrados todos os nove genes putativos de virulência, sendo estas amostras de origem animal. Em todas as amostras de origem humana verificou-se a existência de 6 dos genes putativos, *cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *mviN*, *pldA* e *tlyA* (Ferreira *et al.*, 2014). Estes estudos comprovam a existência de variados genes putativos, o que torna a espécie *A. butzleri* um potencial organismo patogénico.

A formação de biofilmes por parte desta bactéria também tem sido objetivo de estudo, pois estas matrizes representam um impedimento para a ação de diversos substratos, como

antibióticos, e também são um importante reservatório para estas bactérias. *A. butzleri* tem sido isolado de biofilmes de diversas origens, como de carapaças de animais, superfícies de instalações, tubagens de água e matadouros. Ferreira e seus colaboradores (2013) verificaram que 26 dos 36 isolados de amostras de matadouro eram capazes de formar biofilmes (72,2%), sendo que 21 (58,3%) foram classificados com pouco aderentes e cinco (13,9%) como moderadamente aderentes (Ferreira, Fraqueza, *et al.*, 2013). Numa investigação em 6 isolados de *A. butzleri*, 3 de origem animal e 3 de origem humana, observou-se que um isolado de origem animal mostrou alta capacidade e que um isolado de cada grupo demonstrou fraca capacidade de formação de biofilmes, apresentando-se os restantes isolados com capacidade moderada de formar biofilmes (Ferreira *et al.*, 2014).

1.5. Resistência de *Arcobacter butzleri* a antibióticos

A maioria dos casos de enterite e bacteremia que têm como fonte de infeção por espécies de *Arcobacter* parecem ser autolimitantes. No entanto, em alguns casos, é necessário recorrer ao uso de tratamentos, como a administração de antibióticos (Collado and Figueras, 2011).

A palavra antibiótico deriva de “anti”, que significa “contra”, e de “biotikus”, que significa “para a vida”, significando, literalmente, “matar a vida” (Petchiappan and Chatterji, 2017). “Um antibiótico é uma substância química, produzida por microrganismos, que tem a capacidade de inibir o crescimento e até destruir bactérias e outros microrganismos” (Bentley and Bennett, 2003). Idealmente, estes devem ser eficazes, independentemente do local da infeção, não devem afetar a flora saprófita normal ou causar toxicidade indevida ao hospedeiro, assim como deve possuir baixo potencial de resistência (Singh, Young and Silver, 2017). O primeiro antibiótico descoberto foi a penicilina em 1928 por Alexandre Fleming (Bentley and Bennett, 2003).

Os antibióticos têm diversos alvos celulares, como os processos de tradução, transcrição, replicação do DNA e síntese da parede celular (Figura 2). Cada classe de antibióticos tem o seu alvo específico como, por exemplo, as quinolonas que tem como alvo o DNA, os macrólidos que têm alvos relacionados com a síntese proteica, os β -lactâmicos que intervêm na síntese da parede celular, entre outros (Petchiappan and Chatterji, 2017).

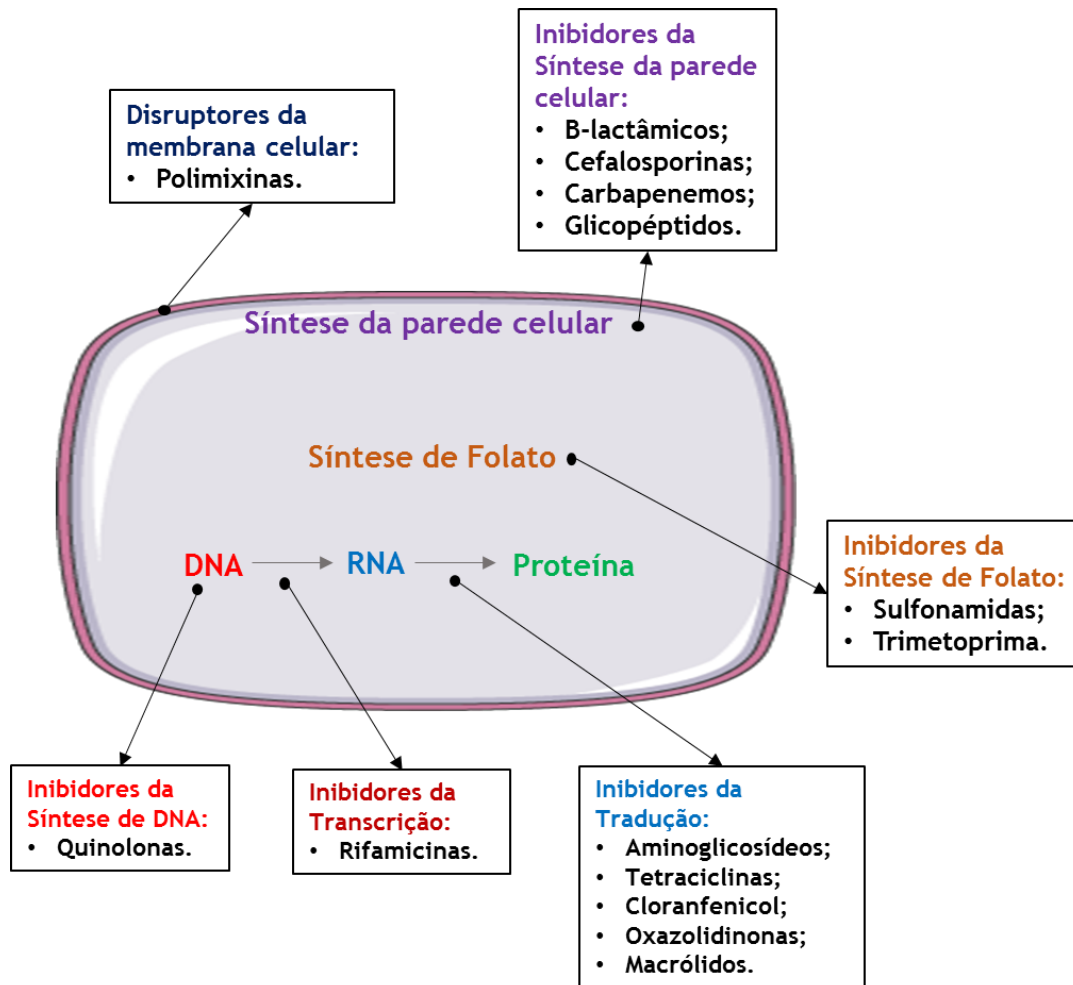


Figura 2: Representação dos alvos das diferentes classes de antibióticos. Adaptado de Petchiappan and Chatterji, 2017.

Num estudo realizado em laticínios em Portugal, os isolados de *A. butzleri* foram testados quanto à sua suscetibilidade a sete antibióticos diferentes. Dos 48 isolados de *A. butzleri*, relativamente à classe das quinolonas, foi comprovado que todos os isolados eram resistentes ao ácido nalidíxico, mas apenas um isolado era resistente quer à ciprofloxacina quer à levofloxacina. Relativamente aos β -lactâmicos, a maior parte dos isolados foi resistente à ampicilina (27/48) e apenas um isolado foi suscetível à cefotaxima. Também foi demonstrado que todos os isolados eram suscetíveis à eritromicina e à gentamicina, sendo possível sugerir estes antibióticos para o tratamento de infeções (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017b).

Num estudo recente realizado em amostras de diversos alimentos a retalho em Portugal verificou-se que os isolados de *A. butzleri* foram suscetíveis à gentamicina e que tinham elevada resistência ao ácido nalidíxico (91,4%), à cefotaxima (91,4%), à tetraciclina (90,5%), ao cloranfenicol (64,8%) e à ampicilina (39,0%). Ainda foi observada resistência a fluoroquinolonas em isolados de carne de porco, carne de aves e peixe, sendo que, em isolados de carne de aves,

a taxa de resistência para a ciprofloxacina (44,7%) e levofloxacina (39,5%) foi superior à observada em isolados de carne de porco, com 14,3% para a ciprofloxacina e 7,1% para levofloxacina e de peixes, com 9,7% para ambos os antibióticos (Vicente-Martins *et al.*, 2018).

Em Portugal foi ainda realizado um estudo em isolados de aves e de ambiente de matadouro, sendo posteriormente analisados 43 isolados de *A. butzleri* para a resistência a nove antibióticos. Comprovou-se que todos os isolados com a exceção de um mostraram resistência a pelo menos seis antibióticos, nomeadamente, ampicilina, vancomicina, trimetoprima, piperaciclina, cefoperazona e amoxicilina. Apenas um isolado foi resistente ao cloranfenicol, e 24 dos 43 isolados foram resistentes à ciprofloxacina, apresentando os valores mais elevados de resistência a fluoroquinolonas alguma vez reportado. Todos os isolados foram suscetíveis à gentamicina (Ferreira, Fraqueza, *et al.*, 2013).

Num outro trabalho, em seis isolados de *A. butzleri* recolhidos de diversas fontes (três isolados recolhidos de aves ou matadouro e três de origem humana), observou-se que todos os isolados eram resistentes à vancomicina, à trimetoprima e ao ácido nalidíxico e nenhum isolado era resistente ao cloranfenicol, gentamicina, eritromicina, doxiciclina e tetraciclina. Verificou-se, também, que os isolados de origem humana eram suscetíveis à ciprofloxacina, enquanto que as de origem animal eram resistentes (Ferreira *et al.*, 2014).

Um estudo realizado no Japão a carnes de diversos animais, os isolados de *A. butzleri* demonstraram ser resistentes ao ácido nalidíxico (63,5%) e cloranfenicol (30,2%), estando de acordo com os estudos acima referidos. No entanto, todos os isolados foram suscetíveis à ampicilina, resultados que não é concordante com os efetuados em Portugal. Os autores comprovaram ainda que *A. butzleri* foi considerada a espécie com maior frequência de multirresistência (72,9%), seguida de *A. skirrowii* (13,3%) e por último *A. cryaerophilus* (9,1%) (Ohsuga *et al.*, 2003).

Assim, pelos estudos anteriores, é possível verificar que *A. butzleri* apresenta uma taxa elevada de resistência ao ácido nalidíxico, à cefotaxima e ampicilina e suscetibilidade à gentamicina e à eritromicina, sendo que estes antibióticos podem ser usados num tratamento mais adequado em infeções por *A. butzleri* (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017b).

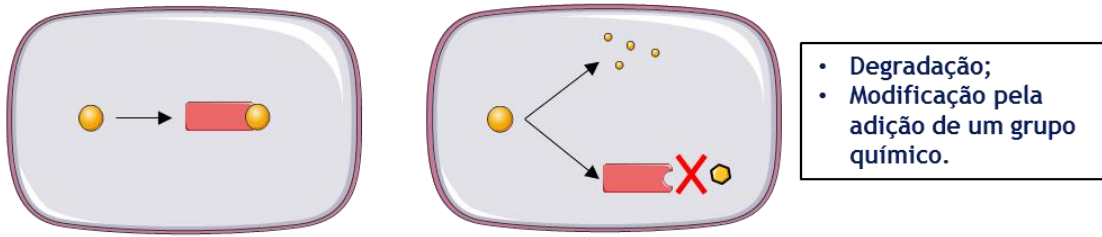
1.5.1. Mecanismo de resistência a antibióticos

Durante os últimos anos, o aumento da prevalência de resistência antimicrobiana tem vindo a ser atribuída à pressão seletiva criada pela administração de antibióticos aos animais em simultâneo com o consumo excessivo pela população humana (Ferreira *et al.*, 2016), sendo, assim, relevante o estudo dos diversos mecanismos que contribuem para o aumento dessa resistência.

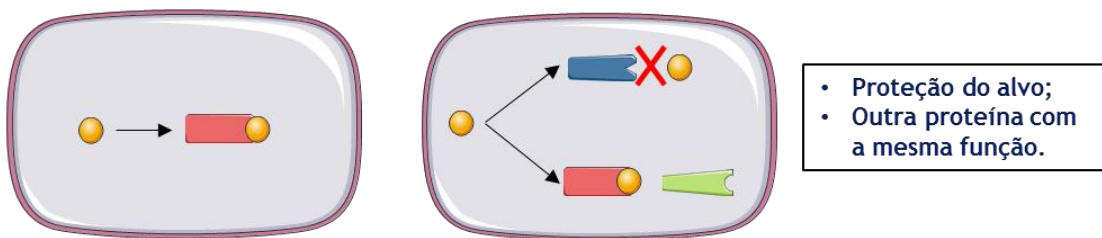
A resistência a antibióticos nas bactérias pode ser intrínseca, por exemplo, associada à presença de múltiplos genes responsáveis pela resistência no genoma das bactérias, ou pode ser adquirida, por mutações cromossômicas e/ou através da transferência horizontal de genes de outras bactérias, garantido a sua sobrevivência na presença destes agentes. Para além dos genes presentes no genoma que vão conferir diferentes capacidades de resistência às bactérias, as diferenças estruturais na parede celular como, por exemplo, serem bactérias de Gram-negativo ou de Gram-positivo podem influenciar a eficácia dos antibióticos (Petchiappan and Chatterji, 2017).

Uma outra forma de sobrevivência das bactérias aos antibióticos é o desenvolvimento de resistência a estes agentes antimicrobianos através de três vias: inativação do antibiótico por hidrólise ou modificação do mesmo, alteração do alvo dos antibióticos por mutação ou modificação e alteração da concentração do agente microbiano intracelular (Figura 3). Um dos mecanismos mais estudados recentemente é o aumento do efluxo do antibiótico através das bombas de efluxo, visto estas estruturas serem muito associadas ao desenvolvimento de resistência aos agentes microbianos e, como tal, tornaram-se um alvo em estudos para o combate contra infeções (Blair *et al.*, 2015).

a) Inativação dos antibióticos



b) Modificação dos alvos



c) Influxo e efluxo de antibióticos

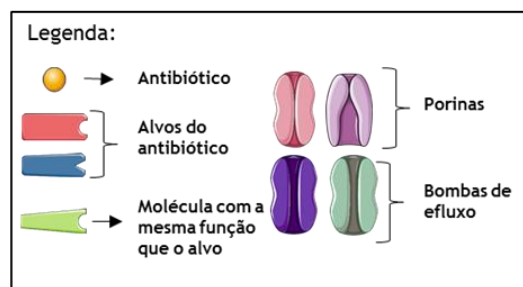
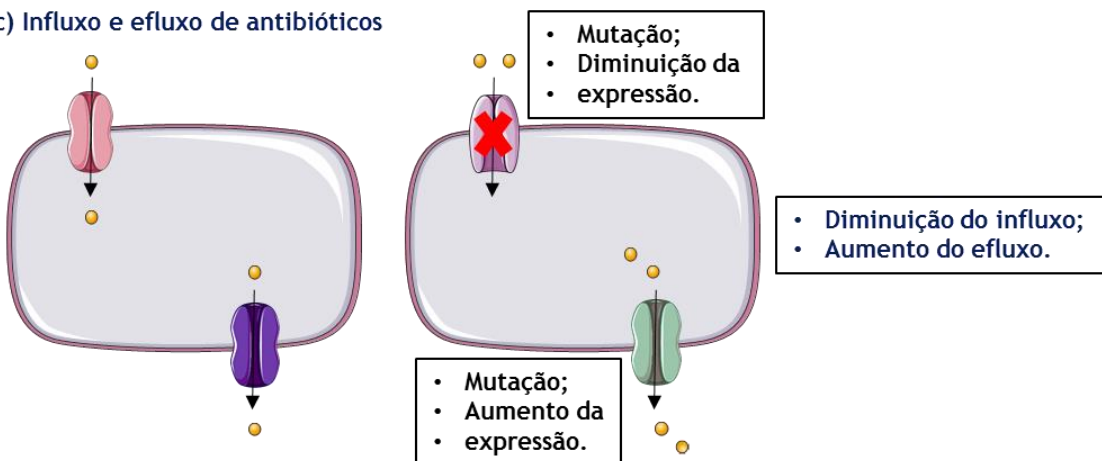


Figura 3: Representação dos mecanismos de resistência aos antibióticos. Adaptado de Petchiappan and Chatterji, 2017.

1.5.1.1. Inativação do antibiótico

Um dos mecanismos de defesa da célula contra agentes antimicrobianos é a sua inativação, quer por hidrólise através da expressão de enzimas de degradação, quer por modificação através de enzimas que irão adicionar grupos funcionais ao antibiótico, modificando-o ou inativando-o e, assim sendo, limitando a possibilidade da molécula de se ligar ao seu alvo (Figura 3a) (Petchiappan and Chatterji, 2017).

As bactérias contêm genes que codificam para diversas enzimas que irão atuar no antibiótico de diversas maneiras (Tabela 2). Um tipo de enzima sintetizada pelas bactérias são as enzimas de hidrólise que degradam diferentes classes de antibióticos, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fenicóis e macrólidos. Um exemplo destas enzimas são as β -lactamases que degradam β -lactâmicos. Para além de enzimas de hidrólise, podem ainda produzir enzimas que irão transferir grupos químicos, como grupos fosfato ou acilo para os antibióticos. Os antibióticos da classe dos aminoglicosídeos podem ser modificados quer por fosfotransferases que transferem grupos fosfatos, quer por acetiltransferases, quer por nucleotidiltransferases devendo-se isto ao facto de as moléculas de antibiótico desta classe terem muitos grupos hidroxilo e amida expostos. Esta modificação altera a sua afinidade ao alvo, reduzindo a sua eficácia (Blair *et al.*, 2015).

Em *A. butzleri* foi encontrado no seu genoma genes associados a β -lactamases, podendo a sua resistência à classe de antibióticos dos β -lactâmicos ser explicada por este mecanismo de ação (Miller *et al.*, 2007).

Tabela 2: Diferentes tipos de enzimas produzidas pelas células e os seus alvos. Adaptado de Wright, 2005.

Estratégia enzimática	Tipos	Antibiótico afetado
Hidrólise	-	β -lactâmicos
	-	Macrólidos
Transferência de grupos funcionais	Acilo	Aminoglicosídeos
	Acilo	Cloranfenicol
	Fosforil	Aminoglicosídeos
	Fosforil	Macrólidos
Outras	Nucleotidil	Aminoglicosídeos
	Glicosil	Macrólidos
Outras	Redox	Tetraciclina

1.5.1.2. Modificação do alvo do antibiótico

Outro mecanismo de defesa contra a ação dos antibióticos é a alteração dos seus alvos celulares. Esta alteração pode dever-se a mutações, modificações ou impedimento físico, sendo que o antibiótico não consegue acesso ao seu alvo (Petchiappan and Chatterji, 2017).

As mutações espontâneas em componentes celulares podem ter diversas consequências, como alteração da sua função ou inativação do componente. As mutações que ocorrem nos alvos dos antibióticos serão apenas favoráveis caso não afetem a sua atividade, mas consigam inibir a ligação do antibiótico, como por alteração da sua estrutura (Figura 3b). Este mecanismo de resistência é aplicado, por exemplo, à classe das fluoroquinolonas. Em *Arcobacter* spp., a resistência a fluoroquinolonas foi associada a uma mutação no gene da *gyrA* na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR), que codifica para uma subunidade da DNA gyrase, resultando na transição de uma citosina em timina (Ferreira *et al.*, 2016). Nas espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*, foi descoberta uma modificação de treonina para isoleucina na posição 85 da proteína, provocando resistência à ciprofloxacina (Abdelbaqi *et al.*, 2007). Para além de mutações, as bactérias podem sintetizar moléculas imitadoras do alvo, ligando-se ao antibiótico e assim reduzindo a concentração do mesmo que se liga aos alvos originais e impedindo a sua atividade. Outro processo de resistência será o impedimento físico, onde a célula liga grupos funcionais aos alvos tornando-se uma barreira para a ligação dos antibióticos, como, por exemplo, a metilação. Este é um exemplo de mecanismo de ação de resistência de bactérias à classe de antibióticos dos macrólidos (Blair *et al.*, 2015).

1.5.1.3. Influxo e efluxo do antibiótico

As bactérias de Gram-negativo são menos permeáveis aos antibióticos que as de Gram-positivo, devido ao facto de possuírem uma membrana externa, que se torna uma barreira para os agentes antimicrobianos atingirem o seu alvo. Dependendo do tamanho das moléculas de antibióticos hidrofílicos, estes podem atravessar facilmente a membrana externa através da sua difusão por proteínas membranares denominadas porinas, conseguindo, assim, entrar na célula (Figura 3c) (Blair *et al.*, 2015). Se ocorre uma redução na expressão de porinas ou mutações nos genes destas, leva a um decréscimo na entrada do antibiótico na bactéria, tornando-o ineficaz no seu papel (Petchiappan and Chatterji, 2017), como no caso das cefalosporinas (Blair *et al.*, 2015).

Caso o antibiótico entre na bactéria, esta não se encontra desprotegida. As bombas de efluxo são responsáveis pela exportação de compostos tóxicos da bactéria para o meio extracelular. Se ocorrerem mutações nos genes das bombas de efluxo, estas poderão provocar uma diminuição da sua expressão e posteriormente uma diminuição da eliminação do antibiótico da bactéria. No entanto, algumas condições de stress, como a exposição da bactéria a um determinado antibiótico, poderá provocar uma sobreexpressão destas bombas de efluxo e,

assim, aumentar o efluxo deste antibiótico (Petchiappan and Chatterji, 2017), tornando a bactéria mais tolerante ou resistente a este (Figura 3c).

1.5.2. Bombas de Efluxo

Como referido anteriormente como um mecanismo de resistência a agentes antimicrobianos, como antibióticos (ex.: cloranfenicol, tetraciclina), biocidas (ex.: cloroexidina, acriflavina), sais biliares e outras moléculas, as bombas de efluxo de resistência a múltiplos fármacos (MDR - do inglês *multidrug resistance*) representam elementos importantes que pertencem ao repertório microbiano das bactérias (Alcalde-Rico *et al.*, 2016). Estas são estruturas proteicas que se encontram na membrana e têm como função manter a concentração intracelular de compostos indesejáveis em níveis que não sejam prejudiciais à bactéria, contribuindo assim para a resistência bacteriana e possível evolução de resistência a múltiplos antimicrobianos (Sousa *et al.*, 2019).

As bombas de efluxo MDR são omnipresentes, ou seja, estão presentes em todas as células vivas. Os genes que as codificam pertencem ao genoma do núcleo bacteriano, no sentido de que quase todos os membros de uma determinada espécie abrigam as mesmas bombas de efluxo, e estes genes são redundantes (uma única célula bacteriana geralmente contém mais de dez bombas de efluxo diferentes). As bombas são bastante inespecíficas, ou seja, cada bomba de efluxo é capaz de extrudar uma grande variedade de substratos. Uma forma de regulação destas bombas é por reguladores locais geralmente codificados a montante dos genes estruturais do operão. No entanto, altos níveis de expressão das bombas de efluxo podem ser obtidos por mutações nos elementos que regulam a sua expressão ou desencadeada pela presença de condições específicas de crescimento. Assim, as bombas de efluxo podem contribuir para a resistência a antibióticos de três diferentes formas: pela resistência intrínseca ao apresentar um nível basal de expressão sob qualquer condição; pela resistência adquirida quando mutantes atingem alto nível de expressão das bombas de efluxo; e, também, podem contribuir para a resistência fenotípica temporária e não hereditária quando as bactérias crescem na presença de um efector das bomba de efluxo ou sob condições de crescimento que desencadeiam sua sobreexpressão (Alcalde-Rico *et al.*, 2016).

As bombas de efluxo são encontradas em bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo e a análise genómica demonstrou que estas constituem 6% a 18% de todos os transportadores encontrados na bactéria (Kumar and Schweizer, 2005). As bactérias de Gram-negativo terão um mecanismo de resistência mais complexo que as bactérias de Gram-positivo devido à estrutura do seu revestimento celular (Kumar and Schweizer, 2005; Petchiappan and Chatterji, 2017).

As bombas de efluxo estão integradas em seis classes de família: superfamília *adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC)*; *major facilitator superfamily (MFS)*; família *multidrug and toxic compound extrusion (MATE)*; família *small multidrug resistance (SMR)*,

superfamília *resistance-nodulation-cell division* (RND) e a recentemente descoberta família *proteobacterial antimicrobial compound efflux* (PACE) (Hassan *et al.*, 2018) (Figura 4).

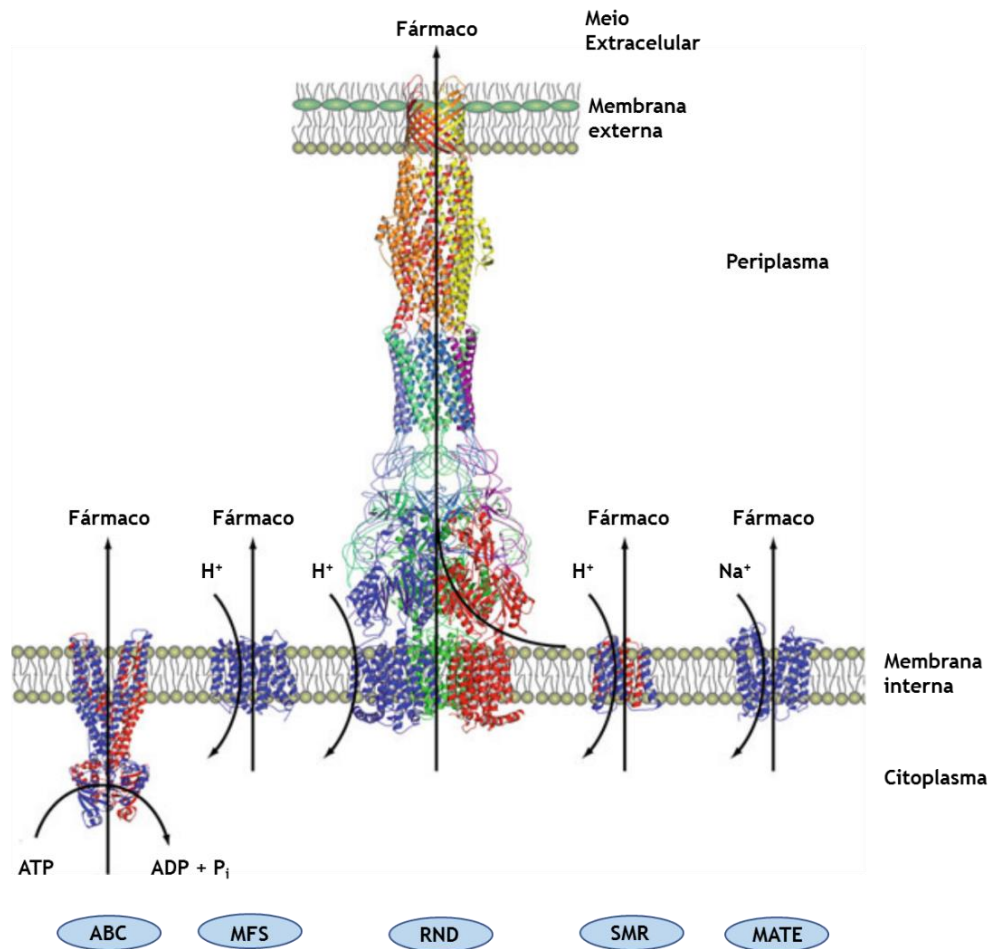


Figura 4: Representação de cinco das seis classes de bombas de efluxo. Adaptado de Murakami, 2016.

A superfamília ABC tem como mecanismo de transporte a captação e efluxo, sendo a única classe da família que necessita de energia para realizar o efluxo de antibiótico. As bombas usam a energia derivada da hidrólise de ATP para realizar o transporte de diversos compostos (Figura 4), como açúcares, aminoácidos, íões, polissacáridos, proteínas e fármacos (Kumar and Schweizer, 2005).

Os membros da superfamília MFS exportam os compostos para o meio extracelular através de quatro tipos de transporte: “uniporte”, “simporte” de soluto/catião (H⁺ ou Na⁺), “antiporte” de soluto/H⁺ (Figura 4) e “antiporte” de soluto/soluto. Podem transportar açúcares, metabolitos, aniões e fármacos (Kumar and Schweizer, 2005).

Anteriormente a família MATE estava incluída na superfamília MFS, no entanto recentemente, devido à nova classificação, esta foi separada, passando a constituir uma das seis famílias de

bombas de efluxo. Os membros desta família utilizam o gradiente de Na⁺ como energia para transportar compostos (Figura 4), como corantes catiónicos ou antibióticos como as fluoroquinolonas (Kumar and Schweizer, 2005).

Os membros da família SMR são considerados os de tamanho mais reduzido pensando-se que funcionavam como trímeros, no entanto também existem como tetrâmeros. Utilizam a força motriz proteômica para realizar a extrusão de compostos (Figura 4) como corantes, catiões e fármacos (Kumar and Schweizer, 2005).

A família RND contém os seus genes principalmente no cromossoma, no entanto foi descoberto que também é possível identificá-los em plasmídeos. Estas bombas de efluxo estão presentes apenas em bactérias de Gram-negativo (Kumar and Schweizer, 2005) e utilizam a energia de gradiente eletroquímico de prótons para o efluxo de substratos, ou seja, o transporte por antiporte de substrato/H⁺ (Puvanendran, Cece and Picard, 2017) de biocidas, corantes, detergentes, solventes orgânicos, remoção de toxinas, de subprodutos metabólicos e de antibióticos. Todas as bombas desta família já estudadas estão relacionadas com o transporte de múltiplos compostos, conferindo-lhes múltiplas resistências e, assim, desempenhando um papel importante na resistência adquirida e intrínseca para células de Gram-negativo (Kumar and Schweizer, 2005).

Uma bomba de efluxo da família RND é constituída por um complexo formado por três proteínas que estão interligadas: proteína transportadora de membrana com 12 segmentos transmembranares; uma proteína de fusão de membrana que, apesar de não ser conhecido ainda o seu papel, é indispensável ao funcionamento da bomba de efluxo; e uma proteína de membrana externa (Figura 4). A proteína de membrana interna apresenta dois *loops* periplasmáticos, entre os segmentos transmembranares 1 e 2 e os segmentos transmembranares 7 e 8, que contêm resíduos de aminoácidos que serão responsáveis pelo reconhecimento do substrato (Kumar and Schweizer, 2005; Puvanendran, Cece and Picard, 2017).

Assim, as bombas de efluxo RND são tripartidas e abrangem todo o invólucro das células de Gram-negativas, sendo que esta característica, conjuntamente com a permeabilidade reduzida apresentada pela membrana externa, atuam sinergicamente para conferir resistência aos fármacos (Kumar and Schweizer, 2005).

Os dois exemplos mais estudados desta família são as bombas AcrAB-TolC de *Escherichia coli* e MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa*. A bomba de efluxo AcrAB-TolC foi demonstrada pela sua afinidade de efluxo de sais biliares, visto que aquando da sua inibição, as estirpes se tornavam hipersensíveis a estas substâncias. No entanto, tem sido descrita por conferir resistência à acriflavina, brometo de etídio, macrólidos, ampicilinas (Blair and Piddock, 2009), quinolonas, cloranfenicol e tetraciclina (Baucheron *et al.*, 2004).

As estirpes da maioria das bactérias de Gram-negativo são resistentes à maioria dos antibióticos lipofílicos (para *E. coli* incluem penicilina, oxacilina, cloxacilina, macrólidos, ácido fusídico, entre outros). Essa resistência intrínseca é muitas vezes associada à exclusão de fármacos pela barreira criada pela membrana externa. Aliás, a quebra desta barreira sensibiliza as células de *E. coli* aos fármacos acima mencionados. No entanto, a inativação do gene *acrB*, que codifica para um dos componentes da bomba de efluxo do tipo RND, AcrAB-TolC, torna a bactéria muito mais suscetível a estes fármacos, mesmo quando da presença da barreira externa intacta. Assim, a resistência intrínseca característica das bactérias de Gram-negativo deve-se principalmente às bombas RND, mas também à barreira de membrana externa (Nikaido and Takatsuka, 2009).

Em *E. coli*, o gene *acrA* da bomba AcrAB-TolC, era conhecido por estar envolvido na resistência à acriflavina. A acriflavina penetra através da membrana externa, tanto na estirpe nativa, quer na estirpe mutante (com a inativação o gene *acrAB*), sendo a acumulação mais elevada na última estirpe mencionada, demonstrando que esta bomba de efluxo está envolvida na extrusão desta substância. O papel desta bomba como MDR foi salientado, dado que a inativação dos genes *acrAB* tornou as células hipersensíveis a diversos compostos, como detergentes (ex.: sais biliares) e antibióticos (macrólidos, β -lactâmicos, tetraciclinas, cloranfenicol, mas não aminoglicosídeos). Uma hipersensibilidade ao cloranfenicol, tetraciclina, ciprofloxacina e estreptonigrina também foi verificada quando da inativação dos genes *mexAB* da bomba de efluxo MexAB-OprM em *Pseudomonas aeruginosa* (Nikaido, 2011). A bomba de efluxo MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa* exporta β -lactâmicos, sendo este um mecanismo intrigante, uma vez que a resistência mediada por efluxo a este grupo de antibióticos é pouco comum. Para além desta bomba, *Pseudomonas aeruginosa* também expressa a bomba MexEF-OprN. Esta bactéria secreta uma quinolona, a PQS (sinal quinolona das *Pseudomonas*) que atua como um sinal de “quorum-sensing” (sistema de sinalização celular baseada na produção de um composto de baixo peso molecular compartilhado por recetores moleculares de outras células, promovendo uma resposta específica no organismo-alvo). A sobreexpressão desta bomba de efluxo mostrou afetar esta sinalização, levando à hipótese que esta bomba possa estar envolvida no efluxo da PQS. Como esta bomba de efluxo também é responsável pelo efluxo de fluoroquinolonas, chegou-se à conclusão de que certos antibióticos são extrudidos das células devido à sua semelhança estrutural com as moléculas sinalizadoras (Kumar and Schweizer, 2005). Apontando assim para um papel das bombas de efluxo na célula para processos para além da resistência a antimicrobianos.

Quando se consideram os vários estudos existentes relativos a bombas de efluxo do tipo RND verifica-se que cada componente da bomba de efluxo tripartida é essencial para o efluxo de substâncias, sendo que a ausência de um destes componentes torna o complexo não funcional (Nikaido and Takatsuka, 2009). Assim, a superfamília das bombas de efluxo RND é dos transportadores de efluxo de resistência a múltiplos fármacos clinicamente mais relevante visto

que, aquando da sua sobreexpressão, as bactérias apresentam níveis de resistência significativos e, além disso, exportam uma gama extremamente diversificada de substratos, devido à sua capacidade de reconhecer substratos de tamanhos e propriedades diferentes (Blair *et al.*, 2015).

Dentro da família RND, também em *Campylobacter*, uma bactéria com proximidade a *Arcobacter*, foi descoberta a bomba de efluxo denominada CmeABC, a qual confere resistência a diversas substâncias como fluoroquinolonas, sais biliares, brometo de etídio e metais pesados. A CmeABC compartilha sequências semelhantes e uma homologia estrutural com bombas de efluxo de múltiplas drogas tripartidas conhecidas em outras bactérias de Gram-negativo. Assim, consiste numa proteína de fusão periplasmática (*cmeA*), um transportador de efluxo de membrana interna (*cmeB*) e uma proteína de membrana externa (*cmeC*) (Lin, Michel and Zhang, 2002). Estas três proteínas são codificadas por um operão de três genes (*cmeABC*) que extrudem substratos, contribuindo significativamente para a sua resistência a agentes antimicrobianos, sendo este operão regulado pelo gene *cmeR* que codifica uma proteína que tem a função de repressor de transcrição. O *cmeR* pode ser induzido pelos substratos naturais desta bomba de efluxo, como sais biliares, que podem interagir diretamente com a proteína de repressão, levando a redução da sua ligação ao promotor e, conseqüentemente, aumento a transcrição dos genes de efluxo (Mavri and Možina, 2013). Para avaliar o papel da bomba de efluxo CmeABC, foi realizado um estudo onde foi inativado o gene *cmeB* de *C. jejuni*, e verificou-se um aumento da suscetibilidade da estirpe mutada a antibióticos, como os β -lactâmicos, fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclina, ao brometo de etídio e detergentes (Pumbwe and Piddock, 2002), ficando comprovado o seu papel na resistência a agentes antimicrobianos.

No entanto, para além das bombas de efluxo estarem envolvidas na resistência bacteriana a antibióticos e outros antimicrobianos, também se encontram relacionadas com diversos mecanismos de virulência (Blair and Piddock, 2009). Um mecanismo direto na virulência é apresentado em *Mycobacterium tuberculosis* através das proteínas RND designadas como MmpL. O genoma de *M. tuberculosis* codifica para 13 destas proteínas, cujo papel parece estar no transporte de lipídios para serem incorporados na parede celular, fornecendo proteção contra agentes externos. Outro mecanismo está associado com a resposta ao stress oxidativo. Esse papel ficou estabelecido pelo estudo da bomba de efluxo MacAB que se mostrou ser necessária para a sobrevivência de *Salmonella enterica*, quando esta bactéria é exposta a espécies reativas de oxigénios. Este facto foi comprovado num ensaio realizado em que os mutantes com a deleção de MacAB, apresentaram uma diminuição do seu crescimento num ambiente com espécies reativas de oxigénio quando comparadas com a estirpe nativa, sendo assim esta estrutura necessária para a sobrevivência em condições de stress oxidativo (Alcalde-Rico *et al.*, 2016). Outros mecanismos onde as bombas de efluxo podem ter relevância são a capacidade de formação de biofilmes e a motilidade. Os biofilmes são associações microbianas complexas ligadas a uma variedade de superfícies, sendo que as bactérias que crescem formando biofilmes

tornam-se mais resistentes do que as células isoladas. A expressão da bomba de efluxo pode afetar a motilidade, que desempenha um papel relevante na formação de biofilme e aumenta a patogenicidade. Este facto foi comprovado em *Escherichia coli* pela bomba de efluxo AcrAB-TolC, onde se construíram mutantes com a deleção de AcrAB e estes apresentaram uma incapacidade de crescimento em ambiente anaeróbico bem como uma motilidade reduzida (Nikaido and Takatsuka, 2009; Alcalde-Rico *et al.*, 2016). Também em *Stenotrophomonas maltophilia* se verificou um papel de sistemas do tipo RND na virulência, sendo que aquando da deleção da bomba de efluxo SmeYZ, os mutantes diminuíam a sua capacidade formar biofilmes e levava a supressão da formação de flagelos. Para além disto, ainda se verificou uma suscetibilidade a compostos redox, comprovando-se que também se encontra envolvida na proteção contra o stress oxidativo (Lin *et al.*, 2015).

Contudo, a sobreexpressão de bombas de efluxo em mutantes pode comprometer a aptidão bacteriana e a virulência, indicando que a expressão destes elementos abaixo ou acima dos níveis fisiológicos, pode ser prejudicial para a bactéria (Alcalde-Rico *et al.*, 2016). A sobreexpressão de bombas de efluxo pode diminuir a aptidão pelo consumo de energia, bem como pela constante extrusão de metabólitos necessários para o seu crescimento, mas o contrário foi observado em ensaios nas *Pseudomonas aeruginosa* em que a sobreexpressão da bomba MexEF-OprN não apresenta uma diminuição na aptidão. No entanto, a expressão de genes que estão envolvidos na cadeia respiratória de nitrato foi aumentada, o que sugere que as células mutantes adaptaram as suas vias metabólicas para compensar uma possível perda na robustez. Estas células mutantes ainda consumiram mais oxigénio do que as nativas, o que sugere que tanto a respiração anaeróbica quanto aeróbica aumentada são necessárias para compensar os custos de condicionamento (Du Toit, 2017). Com base nas evidências aqui referidas sobre bombas de efluxo, propõe-se que estas possam estar envolvidas quer na resistência, quer na virulência bacteriana (Alcalde-Rico *et al.*, 2016).

Com base em trabalho anterior realizado pelo grupo, em que foram sequenciados e analisados bioinformaticamente 22 genomas de *A. butzleri*, verificou-se a existência de vários genes de bombas de efluxo nomeadamente pertencentes à família RND. Desta análise observou-se a existência de diversos operões, potencialmente codificantes para estas estruturas, como o caso das bombas de efluxo designadas por AreABC e AreDEF, no entanto não se conhece o papel destas bombas na resistência e virulência em *A. butzleri* (resultados do grupo não publicados). A bomba de efluxo AreABC encontra-se já estudada, tendo-se verificado que tem uma relevância na resistência à ciprofloxacina, à eritromicina e a β -lactâmicos em *A. butzleri*. Para além deste facto, o ensaio com inibidor de bombas de efluxo do tipo RND (PaBN - do inglês *phenylalanine-arginine β -naphthylamide*) demonstrou um papel evidente no aumento da suscetibilidade à eritromicina, a um desinfetante e sais biliares. Assim, conclui-se que este sistema de efluxo não será o único envolvido na resistência a antimicrobianos, podendo ser sugerido o sinergismo com outras bombas de efluxo do tipo RND (Silva, 2017).

Capítulo 2 - Objetivos

A espécie *Arcobacter butzleri* tem sido referida como uma bactéria patogénica, largamente distribuída em diversos ambientes, sendo associada a enterites e bacteremias, e estando incluída na lista de microrganismos que constituem um grave risco para a saúde humana. O aumento da sua resistência a agentes antimicrobianos tem mostrado ser um problema no possível tratamento de infeções por esta espécie, o que torna necessário aprofundar os mecanismos envolvidos neste aumento de resistência. Apesar da investigação acerca dos mecanismos de resistência e virulência desta bactéria serem pouco conhecidos, as bombas de efluxo têm-se tornado um alvo de estudo, devido ao seu papel no aumento da resistência a diversos agentes antimicrobianos em diferentes organismos. Assim, o objetivo deste trabalho de investigação foi a avaliação do papel de uma bomba de efluxo do tipo RND, codificada pelo operão AreDEF, na resistência e virulência de *A. butzleri*.

Os objetivos específicos para a realização deste trabalho foram:

- Construir estirpes mutantes através da interrupção do gene codificante do transportador de membrana interna do operão AreDEF, o gene *areE*, por uma cassette de resistência a um antibiótico;
- Estudar a influência da interrupção do gene *areE* no crescimento bacteriano e na competição entre estirpes;
- Avaliar a deleção do gene *areE* na resistência a diversos agentes antimicrobianos;
- Avaliar o efeito da deleção do gene *areE* na motilidade, hidrofobicidade e na sobrevivência em ambientes adversos.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Estirpes usadas no estudo

No decorrer desta investigação, foram utilizadas duas estirpes de *A. butzleri* para avaliação do papel da bomba de efluxo AreDEF na virulência, a estirpe DQ40A1 e a estirpe AB28/11. As estirpes foram selecionadas pela presença de uma única cópia do operão completo que contém os genes para a expressão da bomba de efluxo do tipo RND de interesse, bem como pelo facto de serem naturalmente transformáveis.

3.2. Condições gerais de armazenamento

As estirpes foram preservadas em tubos criogénicos em meio Brain Heart Infusion (BHI) com 20% (v/v) de glicerol a uma temperatura de -80 °C. Para posterior utilização as estirpes foram inoculadas em placas de Blood Agar (BA) suplementadas com 5% (v/v) de sangue de cavalo desfibrinado e incubadas a 30 °C. Após incubação, as placas inoculadas foram guardadas a 4 °C até utilização, por um período máximo de duas semanas.

3.3. Construção do fragmento de DNA transformante

Para avaliar a função da bomba de efluxo em estudo, procedeu-se à construção de mutantes de duas estirpes de *A. butzleri* por mutagénese insercional, ou seja, o gene *areE* foi interrompido por um fragmento contendo uma cassette de resistência a um determinado antibiótico (Jeon *et al.*, 2011).

Para tal, foi necessário a construção de um fragmento contendo regiões homólogas às regiões a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene *areE*, flanqueando uma cassette *aphA-3*, que confere resistência à canamicina.

3.3.1. Extração do plasmídeo pUC18-K2 de *Escherichia coli*

Primeiramente foi efetuada a extração do plasmídeo pUC18-K2 de *Escherichia coli*, pois este plasmídeo contém a cassette *aphA-3* que confere resistência a um antibiótico aminoglicosídeo, a canamicina.

Assim, inicialmente realizou-se a inoculação da estirpe *Escherichia coli*, numa placa com meio sólido de Luria-Bertani (LB) contendo 30 µg/mL de canamicina, a qual foi incubada 24 horas a 37 °C em aerobiose. Seguidamente, preparou-se uma pré-cultura em 62,5 mL de meio líquido

Terrific-Broth (TB) constituído por 5 g/L de glicerol, 12 g/L de triptona, 24 g/L de extrato de levedura, 0,17 M de fosfato monopotássico, 0,72 M de fosfato dipotássico e 30 µg/mL de canamicina, seguindo-se incubação num agitador orbital a 37 °C e agitação de 250 rpm, até ser atingida uma densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}) de 2,6. Esta pré-cultura foi usada para iniciar uma cultura com uma DO_{600nm} de 0,2 em 125 mL do mesmo meio durante 16 horas, nas condições anteriores. De seguida, as células foram recuperadas através de centrifugação a 5500 xg, durante 20 minutos a 4 °C, sendo desprezado o sobrenadante e o depósito celular usado para a extração do plasmídeo de interesse. Para extrair o plasmídeo, foi utilizado o kit NZYMaxiprep (NZYtech, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente determinada a sua concentração e pureza através de um nanoespectrofotómetro (IMPLEN, Alemanha).

3.3.2. Digestão do plasmídeo pUC18-K2 e purificação da cassete *aphA-3*

A obtenção da cassete *aphA-3* foi realizada por digestão do plasmídeo pUC18-K2 usando as enzimas restrição de BamHI e KpnI (Figura 5).

Assim, digestão foi efetuada através de uma mistura reacional composta por 10 U da enzima BamHI (Bioron, Alemanha), 10 U da enzima KpnI (Bioron, Alemanha), 2 µL de buffer K, 0,5 µg de plasmídeo purificado num volume final de 20 µL. A mistura reacional foi incubada durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, procedeu-se à verificação da digestão, através da realização de uma eletroforese em gel de agarose de 0,8% (p/v) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 1x, corado com Midori Green. A digestão enzimática foi aplicada no gel, bem como um marcador de peso molecular, tendo como tempo de corrida 30 minutos a 120V. Finalmente o gel foi revelado sob luz ultravioleta num transiluminador (UVITEC, Reino Unido).

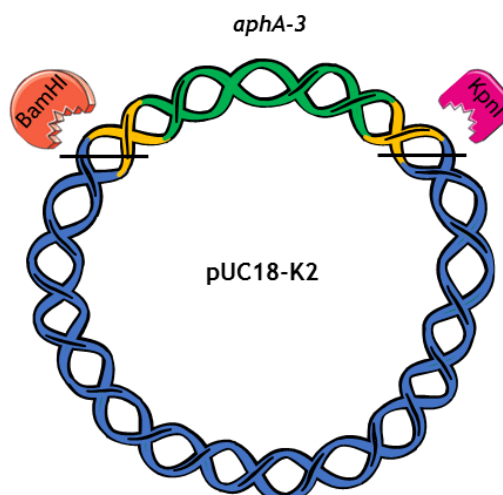


Figura 5: Representação esquemática da digestão do plasmídeo pUC18-K2 de *E. coli*.

A banda de tamanho correspondente à cassette *aphA-3* foi excisada, seguida da sua purificação utilizando o kit GRS PCR & Gel Band Purification (Grisp, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante e posterior determinação da sua concentração e pureza num nanoespectrofotómetro.

3.3.3. Extração de DNA genómico de *A. butzleri*

Para a obtenção dos fragmentos de hibridização com a cassette *aphA-3* foi necessário proceder à extração do DNA genómico (gDNA) da estirpe em estudo para amplificação das regiões a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene em estudo.

Assim, as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 foram inoculadas em meio BA suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado e incubadas a 30 °C, durante 24 horas. Posteriormente, a extração e purificação do gDNA foi realizada utilizando o kit Nucleic Acid Extraction (Vivants, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, e determinada a sua concentração e pureza num nanoespectrofotómetro. Ainda foi realizada um eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v), durante 30 minutos a 120V para a verificação da integridade do gDNA.

3.3.4. Construção dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*

Após extração do gDNA, procedeu-se à amplificação de regiões a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene em estudo. Este passo é necessário para que a cassette fique flanqueada por regiões homólogas às do gene favorecendo assim a sua recombinação homóloga de forma eficaz.

A amplificação dos fragmentos do gene *areE* foi efetuada por uma reação em cadeia da polimerase (PCR - do inglês *polymerase chain reaction*) em que se utilizaram dois conjuntos de *primers* para a amplificação de dois fragmentos com 345 e 335 pares de bases (bp) cada: um fragmento a jusante do codão de iniciação (Fragmento A) e um fragmento a montante do codão de Stop (Fragmento B) (Figura 6).

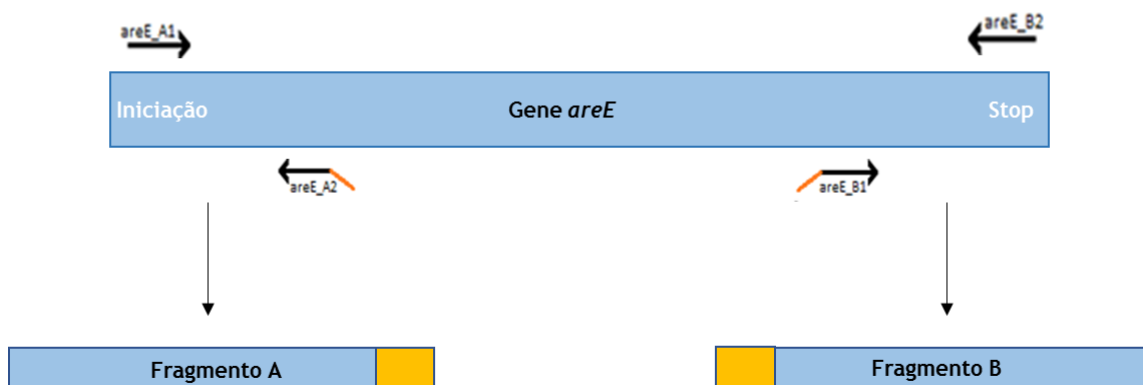


Figura 6: Representação esquemática da construção dos fragmentos hibridizantes com a cassette (Fragmentos A e B).

Para amplificar os fragmentos foi necessário a realização de uma mistura reacional, que consistiu em 1 µL de Dream Taq buffer (10x), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), 0,5 µM de *primer forward*, 0,5 µM de *primer reverse*, 1 µL de amostra de gDNA de cada estirpe, 0,5 U da enzima Dream Taq DNA Polimerase (Thermo Scientific, Estados Unidos da América) e perfazendo com água ultrapura até um volume de 10 µL. A amplificação do fragmento A foi realizada com os primers areE_A1 e areE_A2 e o fragmento B com os *primers* areE_B1 e areE_B2 (Tabela 3). Efetuou-se um controlo negativo, que continha todos os componentes da mistura reacional com a exceção do gDNA da estirpe.

Tabela 3: Lista dos *primers* utilizados nas reações de PCR, com a indicação da sua sequência e tamanho.

Designação do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho (pb)
areE_A1	tccatcaacaggaaatgcaag	21
areE_A2	<i>ttattcctcctagttagtcacaaatacgc</i> atagcatattgacc	43
areE_B1	<i>Tacctggagggaataaatgagctgcact</i> ttatgaaagttggtc	42
areE_B2	attgctcctgctcctgttg	20

Nota: Nucleotídeos a itálico correspondem a adaptadores para ligação à cassette de resistência *aphA-3*.

Realizadas as misturas reacionais, estas foram incubadas num termociclador, com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos; 30 ciclos constituídos por desnaturação a 95°C durante 30 segundos, posterior hibridização a 54°C para o fragmento A e 58 °C para o fragmento B durante 30 segundos e seguida da extensão a 72°C durante 1 minuto; por último, a extensão final a 72 °C durante 10 minutos.

Após a amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v), correndo durante 30 minutos a 120 V. O gel foi visualizado num transiluminador.

Seguidamente, foi realizada a purificação dos fragmentos, A e B, com o kit GRS PCR & Gel Band Purification (Grisp, Portugal) e posterior determinação da concentração e pureza num nanoespectrofotómetro.

3.3.5. Junção dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*

A última etapa da construção do fragmento de DNA transformante (Fragmento C) é a ligação dos fragmentos A e B com a cassette *aphA-3*. Aquando da amplificação dos fragmentos A e B, os *primers* areE_A2 e areE_B2 continham uma cauda de aproximadamente 20 pb homóloga as extremidades da cassette, que irá permitir a junção dos fragmentos com a cassette e, assim, obter o fragmento para a transformação da estirpe (Figura 7).

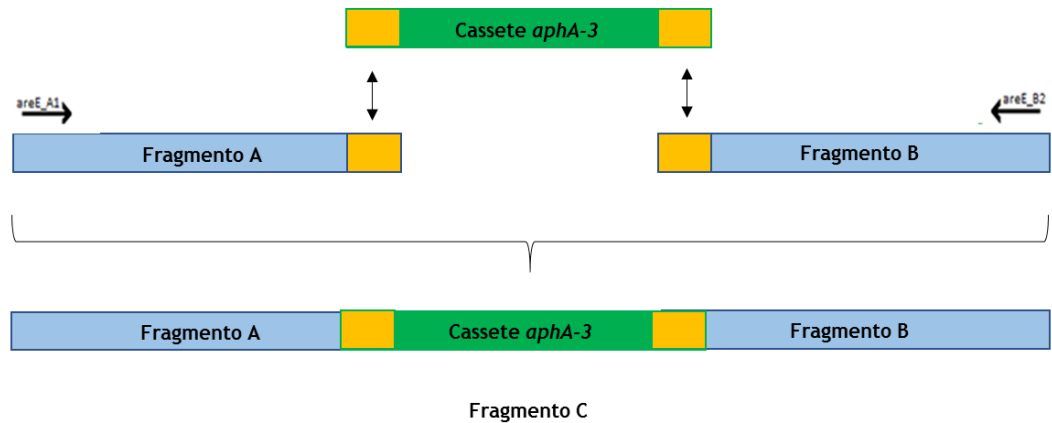


Figura 7: Representação esquemática da construção do fragmento de DNA transformante (Fragmento C).

O DNA transformante foi construído usando uma mistura reacional que continha 4 μ L de Phusion HF Buffer (5x), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ M de areE_A1 e de areE_B2, 30 ng de cada um dos produtos A e B purificados, 30 ng da cassete purificada, 0,4 U da enzima Phusion DNA Polymerase (Thermo Scientific, Estados Unidos da América) e perpez-se com água ultrapura até um volume final de 20 μ L. Um controlo negativo também foi realizado, onde não se adicionou os fragmentos A e B, nem a cassete.

Efetuada as misturas reacionais, estas foram incubadas num termociclador, onde se realizou o seguinte programa: desnaturação inicial a 98°C durante 3 minutos; 35 ciclos constituídos por desnaturação a 98°C durante 10 segundos, posterior hibridização a 56 °C durante 20 segundos e seguida de uma extensão a 72°C durante 1 minuto; por fim, a extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Após reação, a construção do fragmento C foi confirmada usando eletroforese em gel de agarose. O gel foi observado num transiluminador, de modo a observar a completa junção dos fragmentos A e B com a cassete.

De seguida, procedeu-se à purificação do produto de PCR, o fragmento C, com o kit GRS PCR & Gel Band Purification (Grisp, Portugal) e posterior determinação da concentração e pureza num nanoespectrofotómetro.

3.4. Transformação Natural

De modo a avaliar a função de uma bomba de efluxo numa estirpe, pode proceder-se à construção de um mutante onde exista interrupção do gene dessa bomba em estudo ou de uma subunidade da mesma através de mutagénesis insercional, onde o fragmento de DNA transformante irá ser recombinado no genoma (Jeon *et al.*, 2011) (Figura 8).

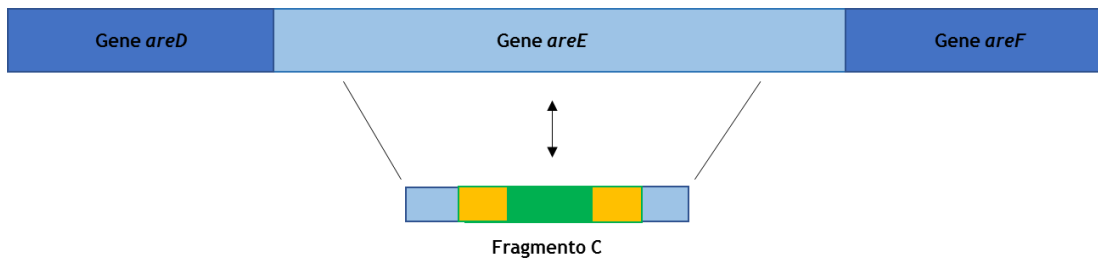


Figura 8: Representação esquemática da interrupção do gene *areE* pelo fragmento de DNA transformante.

O processo de incorporação de DNA exógeno foi realizado através da transformação natural, tal como foi previamente descrito, com modificações (Bonifácio, 2018). Primeiramente, realizou-se a inoculação da estirpe em meio BA e incubou-se durante 24 h a 30 °C em atmosfera de microaerofilia (6% de O₂, +/- 7,1% de CO₂ e 3,6% de H₂). Posteriormente, realizou-se a sua suspensão em meio Tryptic Soy Broth (TSB) e da qual se retirou um volume equivalente a 5x10⁸ células para a estirpe DQ40A1 e 5x10⁹ células para a estirpe AB28/11, e per fez-se até 200 µL. Esta alíquota foi transferida para um tubo com 1,5 mL de meio BA e incubada sob condições de microaerofilia, durante 6 h a 30 °C. De seguida procedeu-se à adição de 1 µg e 2,12 µg do fragmento de DNA transformante construído anteriormente para a estirpe DQ40A1 e AB28/11, respetivamente, diluído em tampão fosfato salino (PBS - do inglês *Phosphate buffer saline*) num volume final de 40 µL. Como controlo, adicionou-se 40 µL de PBS. Após adição do DNA exógeno ou PBS, as células foram incubadas durante 5 h a 30 °C, sob condições de microaerofilia. Após incubação, transferiu-se 100 µL da suspensão para uma placa de BA suplementada com 50 µg/mL de canamicina, onde se realizou o seu espalhamento, seguida de incubação nas mesmas condições de atmosfera e temperatura do ensaio, durante 5 dias. Decorridos os cinco dias, a placa de meio seletivo foi observada para a presença de colónias de mutantes.

3.5. Confirmação da mutagenese

Após realizada a transformação natural foi necessário proceder a testes de confirmação da interrupção do gene da bomba de efluxo em estudo, *areE*. Assim primeiramente, verificou-se a interrupção do gene e posteriormente a inibição da sua expressão na célula (Bachman, 2013).

3.5.1. Verificação da inserção do fragmento de DNA transformante

Depois de selecionadas as colónias do meio seletivo, realizou um aumento de biomassa da cada colónia, através da sua cultura em meio BA suplementado com canamicina, durante 24 h a 30 °C, sob condições de microaerofilia. De seguida, as células foram ressuspensas em 500 µL de água Mili Q estéril, e procedeu-se à extração de DNA por fervura incubando a 100 °C durante 10 minutos e seguindo-se centrifugação a 8000 xg, durante 3 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi então recuperado e usado como molde num PCR para amplificação do gene em estudo. A mistura reacional foi constituída por 1 µL de Dream Taq buffer (10x), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de areE_A1 e de areE_B2, 1 µL de DNA do clone em análise, 0,5 U da enzima Dream Taq DNA Polimerase e perpez-se com água ultrapura até um volume final de 10 µL. Como controlo positivo da reação usou-se gDNA da estirpe parental em estudo, como controlo negativo incluiu-se uma reação onde não se adicionou DNA molde.

As reações foram então incubadas num termociclador, com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos; 30 ciclos constituídos por desnaturação a 95°C durante 30 segundos, posterior hibridização a 56 °C durante 30 segundos e seguida de uma extensão a 72°C durante 2 minutos; por fim, a extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Seguidamente realizou-se uma eletroforese em gel de agarose de 0,8 % (p/v), durante 30 minutos a 120 V e procedeu-se à sua posterior observação num transiluminador, de modo a verificar o tamanho do fragmento amplificado e, assim, verificar se as bactérias inseriram o fragmento C no seu genoma por transformação natural.

Após análise do gel, os mutantes foram suspensos em 200 µL de meio BHI com 20 % de glicerol e armazenadas a -80 °C, para futuros ensaios.

3.5.2. Verificação da expressão do gene

Posteriormente para confirmar que a interrupção do gene *areE* leva a que este deixe de ser expresso, realizou-se uma *Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction* (RT-PCR), que utiliza o RNA total proveniente das células para esta análise.

3.5.2.1. Extração de RNA total

As estirpes parentais e mutantes foram inoculadas em placas de TSA e incubadas a 30 °C durante 24 h, em aerobiose. Uma pré-cultura foi preparada com uma densidade ótica inicial a 620 nm (DO_{620nm}) de 0,02 em 10 mL de meio TSB e incubada a 30 °C durante 16 h, num agitador orbital a 100 rpm. Posteriormente, partindo desta pré-cultura foi iniciada uma cultura com uma DO_{620nm} de 0,02 em 20 mL de meio TSB, nas condições anteriores. A partir do meio da fase exponencial (6 horas) foi recuperado 1 mL de células, as quais foram centrifugadas a 11000 xg durante 5 minutos a 4 °C, sendo descartado o sobrenadante. Realizou-se uma lavagem com uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85% (p/v) e posterior centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e adicionou-se 500 µL de TRIzol. As células foram armazenadas a -80 °C até a sua utilização.

A extração de RNA foi executada usando TripleXtractor (Grisp, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante, sendo por fim determinada a concentração e pureza num nanoespetrofotómetro. Por fim, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1%, durante 30 minutos a 100V, para avaliar a integridade do RNA e a presença de contaminantes.

3.5.2.2. Tratamento das amostras de RNA total com DNase I

De forma a eliminar possíveis contaminações de DNA das amostras de RNA, procedeu-se a uma digestão com DNase I (Thermo Scientific, Estados Unidos da América). Assim, preparou-se uma mistura reacional contendo 1 µL de Tampão de reação (10x) com cloreto de magnésio, 1 µL de DNase I, 1 µg de RNA e água ultrapura até perfazer um volume de 10 µL, foi incubada durante 30 minutos a 37 °C. De seguida foi adicionado 1 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 50 mM e novamente incubado a 65 °C durante 10 minutos. A alíquota foi armazenada a -80 °C, até sua utilização.

3.5.2.3. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA a partir do RNA isolado das estirpes parentais e mutantes, usou-se o kit Xpert cDNA Synthesis Mastermix (Grisp, Portugal). Realizou-se uma mistura reacional com 9 µL de RNA tratado com DNase I e 10µL de Master Mix a qual foi incubada durante 5 minutos a 65 °C. Posteriormente, adicionou-se 1 µL de RTases. Novamente foi incubada com o seguinte programa: 10 minutos a 25 °C, 15 minutos a 50 °C e por fim 5 minutos a 85 °C. Depois da síntese de cDNA, este foi armazenado a -20 °C.

3.5.2.4. Determinação da expressão genética de *areE*

O cDNA sintetizado anteriormente foi então utilizado para a realização de PCR. Assim, preparou-se uma mistura reacional contendo: 1 µL de Dream Taq Green Buffer (10x), 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM dos *primer* *areE_RT-PCR_F1* e *areE_RT-PCR_R1* (Tabela 4), 2 µL de cDNA, 0,25 U da enzima Dream Taq DNA Polimerase e perfez-se o volume com água ultra-pura até 10 µL. Como controlo negativo usou-se a mistura anterior na ausência de cDNA.

Efetuada as misturas reacionais, estas foram incubadas num termociclador, com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos; 30 ciclos constituídos por desnaturação a 95°C durante 30 segundos, posterior hibridização a 56 °C durante 30 segundos e seguida de uma extensão a 72°C durante 1 minuto; por fim, a extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Tabela 4: Lista dos *primers* utilizados nas reações de RT-PCR, com a indicação da sua sequência e tamanho.

Designação do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho (pb)
<i>areE_rtpcr_F</i>	tcaattcgttctgatgattctga	23
<i>areE_rtpcr_R</i>	tctataaggagcttcaccttgga	23

Seguidamente à reação de PCR foi necessária a realização de uma eletroforese em gel de agarose de 0,8 % (p/v), durante 30 minutos a 120 V e a sua posterior observação num transiluminador, para observação da presença da banda correspondente à expressão de RNA.

3.6. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de agentes antimicrobianos

Para avaliar a suscetibilidade de uma bactéria a um agente antimicrobiano é necessário a determinação da concentração mínima inibitória. A CMI é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo e é um parâmetro usada em laboratório para confirmação da resistência de uma estirpe a estes agentes (Andrews, 2001).

3.6.1. Agentes antimicrobianos

Para a determinação das concentrações mínimas inibitórias foram usados diferentes tipos de agentes antimicrobianos como antibióticos, sais biliares, desinfetantes e um substrato das bombas de efluxo, para verificar o papel da bomba de efluxo (Tabela 5).

Tabela 5: Identificação dos diferentes agentes antimicrobianos a usar na determinação das concentrações mínimas inibitórias.

		AGENTE ANTIMICROBIANO	MARCA	SOLVENTE /DILUENTE	% PUREZA
ANTIBIÓTICOS	B-lactâmicos	Ampicilina (sal de sódio)	NZYTech	TF pH 8/ TF pH 6	100
		Cefalexina	Sigma-Aldrich	TF pH 6/ H ₂ O	100
		Cefotaxima	Acros Organics	H ₂ O	95
		Amoxicilina	Sigma-Aldrich	TF pH 6/ TF pH 6	100
	Aminoglicosídeos	Gentamicina	Sigma-Aldrich	H ₂ O	100
		Sulfato de canamicina	Fisher Chemical	H ₂ O	100
		Estreptomicina	Sigma-Aldrich	H ₂ O	100
	Quinolonas	Ácido Nalidíxico	Fisher Chemical	Água basificada com NaOH	100
		Ciprofloxacina	Sigma-Aldrich	Água basificada com NaOH	98
		Levofloxacina	Sigma-Aldrich	Água basificada com NaOH	98
		Moxifloxacina	Sigma-Aldrich	Água basificada com NaOH	100
	Tetraciclina	Tetraciclina	Sigma-Aldrich	Etanol 95%	98
		Doxiciclina	Alfa Aesar	H ₂ O	100
	Macrólidos	Eritromicina	Sigma-Aldrich	Etanol 95%	100
		Claritromicina	Sigma-Aldrich	Etanol 95%	95
Fenicóis	Cloranfenicol	Fluka	Etanol 95%	99	
SAIS BILIARES	Colato de Sódio	Tokyo Chemical Industry	TSB	98	
	Desoxicolato de Sódio	Tokyo Chemical Industry	TSB	98	
DESINFETANTE	Clorexidina	Sigma-Aldrich	H ₂ O	20	
	Cloreto de benzalcônio	Sigma	H ₂ O	100	
GERMICIDA	Acriflavina	Sigma-Aldrich	H ₂ O	100	
SUBSTRATO DAS BOMBAS DE EFLUXO	Brometo de Etídio	Fisher Scientific	Meio		

TF: Tampão Fosfato a 0,1 M; H₂O: Água MiliQ estéril; NaOH: hidróxido de sódio a 1M.

3.6.2. Determinação das concentrações mínimas inibitórias

De modo a comparar o efeito dos agentes antimicrobianos, foram realizados ensaios em paralelo das estirpes parentais e respetivos mutantes. Como tal, as estirpes parentais DQ40A1 e AB28/11 e respetivos mutantes foram inoculadas em placas de meio TSA e incubadas a 30 °C durante 24 horas, numa atmosfera de aerobiose.

A determinação da CMI foi realizada pelo ensaio de diluições sucessivas em microplacas de 96 poços. Primeiramente, foi adicionado um volume de 50 µL de solução do agente microbiano em TSB com o dobro da concentração pretendida obtida por diluições sucessivas de 1:2. Por último, adiciona-se 50 µL da suspensão de inóculo para a obtenção de 5×10^5 unidades formadoras de colónias (UFC)/mL em cada poço. Para tal, as estirpes foram ressuspensas em NaCl a 0,85% e ajustadas a uma turbidez de aproximadamente 0,5 unidades de McFarland, o equivalente a cerca de 10^8 UFC/mL. De seguida, foi realizada uma diluição de 1:100 do inóculo em meio TSB, seguido da sua adição a cada poço e obtendo um volume final de 100 µL. Um controlo negativo e um controlo positivo foram adicionados ao ensaio, consistindo em 100 µL de meio TSB, e 50 µL de meio TSB com 50 µL de inóculo, respetivamente. Posteriormente, as placas foram incubadas numa atmosfera de aerobiose, a 30°C durante 48 horas. A CMI foi determinada pelo primeiro poço que não apresentava turbidez a olho nu, ou seja, sem crescimento, sendo posteriormente confirmado o resultado num leitor de microplacas a um comprimento de onda de 620nm, através da medição da densidade ótica em cada poço e tendo como referência o controlo negativo. Este ensaio foi realizado pelo menos três vezes de forma independente.

3.7. Determinação das curvas de crescimento

Vários ensaios são necessários para avaliar o papel de uma bomba de efluxo, no entanto, é preciso garantir que a interrupção do gene não irá afetar o funcionamento normal da bactéria. Para tal, foi necessário comparar o comportamento de crescimento da estirpe mutante em relação à estirpe parental. Este ensaio foi realizado segundo o protocolo previamente descrito por Ferreira *et al.*, 2018.

Assim, as estirpes parentais DQ40A1 e AB28/11 e respetivos mutantes foram inoculados em placas de TSA e incubados a 30 °C, durante 24 horas em aerobiose. Uma pré-cultura foi realizada para cada estirpe em 10 mL de meio TSB com uma DO_{620nm} de 0,02, incubando-se a 30 °C durante aproximadamente 16 horas num agitador orbital a 100 rpm. De seguida, as culturas foram iniciadas a partir das pré-culturas, em 20 mL de meio TSB com uma DO_{620nm} de 0,02 e incubadas nas mesmas condições que as pré-culturas anteriores. Amostras de cada cultura foram recolhidas aos tempos, 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas e efetuada a leitura da sua DO_{620nm} . Estes ensaios foram realizados, pelo menos, três vezes e de forma independente.

3.8. Ensaios de competição entre estirpes de *Arcobacter butzleri*

Um outro teste realizado para a avaliação do comportamento das estirpes, foi a competição entre a estirpe parental e respetivo mutante, que tem como objetivo a avaliação da capacidade de as bactérias sobreviverem no meio ambiente em competição com outras bactérias (Morgan and Steiglitz, 2003). Para este estudo, foi utilizado o protocolo descrito por Ferreira *et al.*, 2018, com algumas modificações.

Inicialmente, cultivaram-se as estirpes parentais DQ40A1 e AB28/11 e respetivos mutantes independentemente em placas de TSA, sendo incubadas em aerobiose a 30 °C durante 24 horas. Após incubação, realizaram-se as respetivas pré-culturas em 10 mL de meio TSB iniciando com uma DO_{620nm} de 0,2, sendo estas incubadas num orbital a 100 rpm, numa atmosfera de aerobiose a 30 °C durante aproximadamente 16 horas. Posteriormente, foi realizada uma cultura em 20 mL de TSB, no qual se adicionou 200 µL da pré-cultura da estirpe nativa e mutada correspondente, sendo incubada nas mesmas condições. De seguida, foram recolhidas amostras às 0 e 24 horas para a determinação das UFC/mL. Para tal foram realizadas diluições sucessivas, das quais se transferiram, em triplicado, 10 µL das diluições correspondentes de 10^{-1} a 10^{-5} nas 0 horas e de 10^{-3} a 10^{-8} nas 24 horas, para placas de TSA para determinar as UFC/mL totais e para placas de TSA suplementadas com 30 µg/mL de canamicina para determinar as UFC/mL da estirpe mutada, sendo estas placa incubadas nas mesmas condições de atmosfera e temperatura durante 48 horas. Este ensaio foi realizado de forma independente, pelo menos três vezes. O resultado foi apresentado sob a forma de custo relativo, pela seguinte fórmula:

$$Custo\ relativo = \frac{\ln((UFC/mL_{24h})/(UFC/mL_{0h}))\ Resistentes}{\ln((UFC/mL_{24h})/(UFC/mL_{0h}))\ Suscetíveis} \quad (\text{Equação 1}).$$

3.9. Avaliação da influência da bomba de efluxo na virulência de *Arcobacter butzleri*

3.9.1. Condições de crescimento

Para a realização dos ensaios de virulência foi necessário que as células se encontrassem a meio da fase exponencial de crescimento e de seguida acertada a DO_{620nm} a 0,2.

As estirpes foram inoculadas em meio TSA durante 24 horas a 30 °C, numa atmosfera de aerobiose. Pré-culturas foram realizadas em 10 mL de meio TSB, com uma DO_{620nm} inicial de 0,02 e incubadas num orbital a 100 rpm, durante aproximadamente 16 horas a 30 °C. As culturas das estirpes foram efetuadas a partir das pré-culturas, onde se ajustou a DO_{620nm} inicial para 0,02 em 20 mL de meio TSB, seguindo-se de incubação até as bactérias atingirem o meio da fase exponencial (de 5 a 6 h).

3.9.2. Ensaio de motilidade

Como referido anteriormente, *A. butzleri* apresenta mobilidade por um único flagelo polar (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018). De modo a avaliar se a interrupção do gene *areE* afeta a expressão de genes que codificam para o flagelo e, conseqüentemente, influenciam a motilidade de cada estirpe, foi realizado um ensaio onde se observa a migração das bactérias, segundo o protocolo descrito por Ferreira *et al.*, 2018.

Inicialmente procedeu-se à cultura das estirpes parentais DQ40A1 e AB28/11 e respetivos mutantes de acordo com o ponto 3.9.1. Posteriormente, 5 µL de cada estirpe foram inoculados no centro de uma placa de TSA com uma percentagem de 0,4 % de agar, e as placas incubadas a 30 °C durante 48 horas. A avaliação da motilidade foi realizada pela medição da motilidade das estirpes às 24 e 48 horas. Os ensaios foram realizados de forma independente, pelo menos três vezes.

3.9.3. Ensaio de hidrofobicidade celular

Com a interrupção do gene *areE* da bomba de efluxo da classe RND, uma das características que poderá ser afetada é hidrofobicidade da bactéria, visto que a constituição das membranas celulares é alterada. Para este efeito foi realizado um ensaio conforme descrito por Lin *et al.*, 2015, com algumas modificações.

As estirpes parentais DQ40A1 e AB28/11 e respetivos mutantes foram obtidas como descrito na seção 3.9.1.. Após 5 horas de incubação, 3,5 mL da cultura foram recolhidos e as células recuperadas por centrifugação a 12000 xg durante 3 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o depósito celular foi lavado com PBS duas vezes, e finalmente ressuspenso em 3,5 mL de PBS. A DO_{620nm} foi lida num espectrofotómetro e registada como correspondendo ao valor de A_0 (Equação 2). Seguidamente, adicionou-se 500 µL de hexadecano com 2,5 mL de suspensão celular, e agitou-se no vortex por 2 minutos, seguindo-se de 3 minutos de repouso à temperatura ambiente. Por último, foi recolhida a fase aquosa inferior e lida a sua DO_{620nm} , correspondendo ao valor de A_1 (Equação 2). Os ensaios foram realizados de forma independente, pelo menos três vezes. Para determinar o valor da percentagem de hidrofobicidade aplicou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Hidrofobicidade} = 1 - \frac{A_1}{A_0} \times 100 \quad (\text{Equação 2}).$$

3.9.4. Ensaio de crescimento em condições de stress

Como referido anteriormente, as bombas de efluxo da superfamília RND tem a capacidade de transportar diversos compostos do interior da célula para o meio extracelular (Kumar and Schweizer, 2005), permitindo assim a sua sobrevivência em diversos ambientes, como, por

exemplo, em condições de stress oxidativo, osmótico, entre outros (Blair *et al.*, 2015). Como tal, foi estudado o efeito de compostos indutores de diversos tipos de stress no crescimento das estirpes parentais e mutantes.

3.9.4.1. Ensaio de stress oxidativo

Um dos stresses mais estudados relativamente à influência das bombas de efluxo na sobrevivência de uma bactéria é o stress oxidativo, visto este mecanismo estar presente em todos os tipos de células.

3.9.4.1.1. Stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogénio

O ensaio de stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogénio foi realizado através de difusão em disco, descrito no protocolo de Srinivasan *et al.*, 2012, com algumas modificações.

Assim, as estirpes parentais DQ40A1 e AB28/11 e respetivos mutantes, obtidas como descrito na seção 3.9.1., foram recolhidas por centrifugação a 12000 xg durante 3 min à temperatura ambiente e ressuspendidas em meio TSB a uma DO_{620nm} de 0,2. Realizada a suspensão celular, as células foram inoculadas numa placa de TSA por espalhamento através de uma zaragatoa e posteriormente colocado um disco de difusão de 6 mm no centro da placa, ao qual foi adicionado previamente 10 μ L de peróxido de hidrogénio a diferentes concentrações, 3, 10 e 30 % (v/v). Após adição do disco, as placas foram incubadas a 30 °C, durante 24 horas, tempo ao fim do qual se mediu o halo de inibição do crescimento bacteriano. Os ensaios foram realizados pelo menos três vezes e de forma independente.

3.9.4.1.2. Stress oxidativo induzido por menadiona

O ensaio de stress oxidativo induzido por menadiona foi realizado de acordo como protocolo o descrito por Lin *et al.*, 2015, com algumas alterações.

Após obtenção das células como descrito na seção 3.9.1., estas foram lavadas e ressuspendidas a uma DO_{620nm} de 0,2, como descrito no ponto 3.9.4.1.1. e de seguida diluídas sucessivamente de 1:10 em NaCl a 0,85% (p/v). Posteriormente, 10 μ L das diluições de 10^{-3} a 10^{-8} foram transferidas para placas de TSA com diferentes concentrações de menadiona (0, 10, 20 e 30 mg/mL) e para uma placa de TSA, que serviu como referência, realizando o ensaio em triplicado. Após adição das diluições nas placas, estas foram incubadas a 30 °C, durante 48 horas, tempo ao fim do qual se efetuou a contagem das UFC/mL de cada placa. Realizadas as contagens, procedeu-se ao cálculo da percentagem de sobrevivência para cada concentração. Os ensaios foram realizados pelo menos três vezes de forma independente.

3.9.4.2. Ensaio de stress osmótico

Para além do stress oxidativo, o stress osmótico também tem um papel relevante na avaliação do comportamento bacteriano. O ensaio de stress osmótico induzido por cloreto de sódio teve como protocolo o descrito por Srinivasan, Vaidyanathan, *et al.*, 2012, com algumas alterações.

Obtidas as estipes parentais DQ40A1 e AB28/11 e respectivos mutantes como descrito na seção 3.9.4.1.1., foram realizadas diversas diluições sucessivas em NaCl a 0,85% (p/v). Posteriormente, 10 µL das diluições de 10^{-2} a 10^7 foram transferidas para placas de TSA com diferentes concentrações de NaCl (0,075 e 0,15M) e as diluições de 10^{-3} a 10^{-8} para uma placa de TSA, que serviu como controle, realizando o ensaio em triplicado. Após adição das diluições nas placas, estas foram incubadas a 30 °C, durante 48 horas, tempo ao fim do qual se procedeu à contagem das UFC/mL de cada placa. Realizadas as contagens, efetuou-se o cálculo da percentagem de sobrevivência para cada concentração. Foram realizados pelo menos três replicados biológicos.

3.9.4.3. Ensaio de stress com sais biliares e com cloroexidina

Ainda outros stresses estudados foram o stress provocado por sais biliares e o stress provocado pela cloroexidina. Estes compostos são classificados como um detergente e um desinfetante, respetivamente. O ensaio de stress biliar e com cloroexidina seguiram o protocolo descrito por Srinivasan, Vaidyanathan, *et al.*, 2012, com algumas alterações.

Obtidas as estipes parentais DQ40A1 e AB28/11 e respectivos mutantes como descrito na seção 3.8.4.1., foram realizadas diversas diluições sucessivas em NaCl a 0,85% (p/v). De seguida, 10 µL das diluições de 10^{-3} a 10^{-8} foram transferidas para placas de TSA com diferentes concentrações de sais biliares (0,25, 0,5 e 1%), as diluições de 10^{-1} a 10^{-6} em placas com cloroexidina contendo 1/4x e 1/2x do valor da CMI. Como controle transferiram-se as diluições de 10^{-3} a 10^{-8} para uma placa de TSA, realizando o ensaio em triplicado. Após adição das diluições nas placas, estas foram incubadas a 30 °C, durante 48 horas, tempo ao fim do qual se efetuou a contagem das UFC/mL, e o cálculo da percentagem de sobrevivência para cada concentração. Os ensaios foram realizados de forma independente e pelo menos três vezes.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

O aumento da resistência bacteriana a antibióticos das diversas classes tornou-se um problema de saúde pública, bem como a falta de conhecimento acerca dos mecanismos que lhe conferem essa resistência. Relativamente a *A. butzleri* ainda se sabe muito pouco acerca dos mecanismos de resistência por trás dos fenótipos de resistência que têm vindo a ser descritos. Assim, considerando os possíveis mecanismos de resistência, este estudo focou-se numa das bombas de efluxo do tipo *resistance-nodulation-cell division* que são potencialmente expressas por esta bactéria.

4.1. Análise bioinformática da bomba de efluxo AreDEF

A superfamília RND é uma das seis famílias de bombas de efluxo, sendo que estão presentes apenas em bactérias de Gram-negativo. Estas bombas correspondem a um complexo proteico constituído por três proteínas codificadas de um operão com três genes: uma proteína de fusão, uma proteína de membrana interna e uma proteína de membrana externa (Kumar and Schweizer, 2005).

Pela análise de 22 genomas de *A. butzleri*, verificou-se a existência de 58 genes que codificam para bombas de efluxos, sendo que alguns codificam para proteínas com semelhança às da superfamília RND. Estes genes foram analisados e observou-se que alguns destes genes estão organizados em operões com homologia para transportadores de efluxo tipo RND (resultados do grupo não publicados). Um dos operões em questão foi selecionado, sendo este constituído por três genes que codificam para três proteínas da bomba de efluxo, o qual foi denominado de AreDEF com cerca de 5670pb. Este operão contém o gene *areD* com 1137 pb, o gene *areE* com 3126pb e o gene *areF* com 1401pb.

Nesta análise foram usados dois softwares, SOSUI e TMHMM, para proceder a uma avaliação da localização e estrutura das proteínas que constituem esta potencial bomba de efluxo (Anexo I). O programa SOSUI foi desenvolvido de modo a avaliar a localização subcelular das proteínas em bactérias de Gram-negativo (Link: http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuigramn/sosuigramn_submit.html) (Imai *et al.*, 2012). O programa TMHMM foi desenvolvido para prever os elementos constitutivos das proteínas, como domínios transmembranares (Link: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh *et al.*, 2001).

Assim, pela análise através do programa informático SOSUI, foi possível prever a localização das diversas subunidades que constituem a bomba de efluxo. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados apresentados pelo programa SOSUI para a localização e tamanho de cada proteína que constitui a bomba de efluxo AreDEF.

Proteínas	Localização	Tamanho (aminoácidos)
AreD	Membrana Externa	378
AreE	Membrana Interna	1041
AreF	Membrana Externa	466

Pelo programa TMHMM, foi possível realizar uma previsão da estrutura da proteína de interesse, AreE (Figura 9).

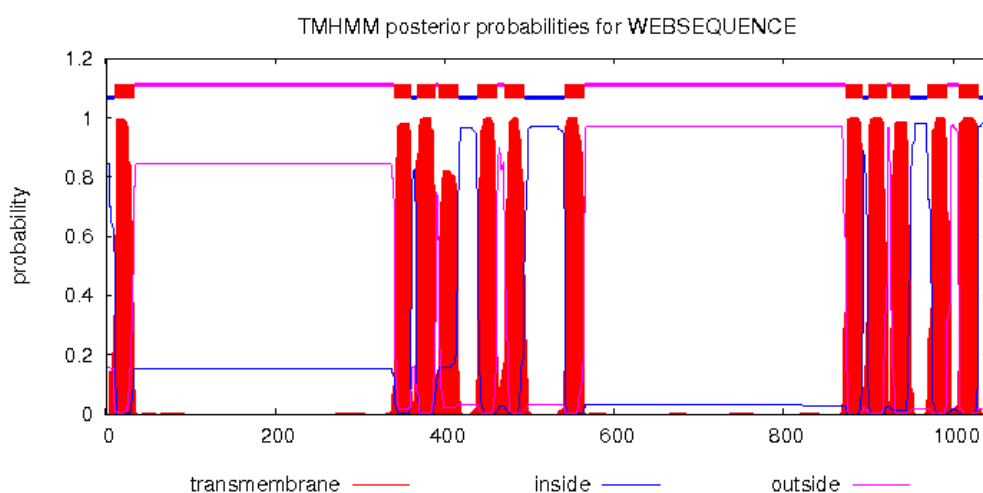


Figura 9: Estrutura prevista para a proteína AreE, pelo programa TMHMM, demonstrando a presença 12 domínios transmembranares e dois *loops* entre os domínios 1-2 e 7-8.

Prevê-se assim que a proteína AreE contenha 12 domínios transmembranares e dois *loops* entre os domínios 1-2 e 7-8, sendo que estes dois *loops* se encontraram à partida no espaço periplasmático, dado que o software não prevê a existência de duas membranas celulares. Esta estrutura é característica das bombas de efluxo do tipo RND (Kumar and Schweizer, 2005).

Os dados fornecidos pelos programas permitiram identificar a bomba de efluxo AreDEF de *A. butzleri* como um potencial transportador da superfamília RND.

4.2. Construção dos mutantes

A construção dos mutantes foi realizada através da mutagénese insercional, como foi referido na secção 3.4.. Como tal, foi necessário a construção do fragmento que irá interromper o gene *areE* e conferir resistência a um antibiótico, canamicina, para posterior seleção dos mutantes

(Jeon *et al.*, 2011). O gene *areE* é o gene codificante para a proteína transmembranar responsável pela seleção dos diferentes substratos a serem extrudidos da bactéria, tal como o gene *cmeB* de *Campylobacter*.

A primeira etapa consistiu na recuperação da cassete *aphA-3* presente no plasmídeo pUC18-K2 de *E. coli*. Assim, realizou-se a extração do respectivo plasmídeo através de um kit comercial, sendo possível verificar na Figura 10 a presença da banda correspondente ao plasmídeo situado a aproximadamente 3500 pb, o que indicou que a extração tinha sido bem sucedida.

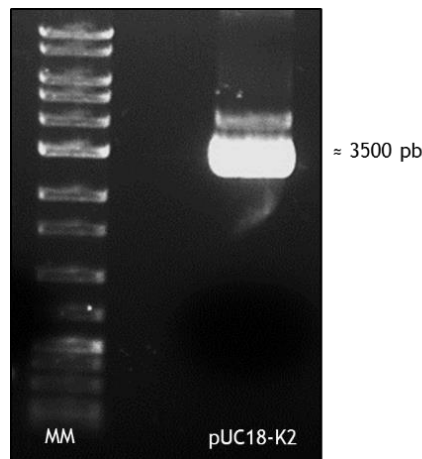


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose na qual se encontra representado o resultado da extração do plasmídeo pUC18-K2 de *E. coli*. (MM: Marcador molecular; pUC18-K2: plasmídeo contendo a cassete *aphA-3*).

De seguida, procedeu-se à digestão enzimática do plasmídeo com as enzimas de restrição BamHI e KpnI. O resultado foi comprovado numa eletroforese em gel de agarose (Figura 11), onde se observou a presença de três bandas: uma primeira banda, mais fraca, correspondente ao plasmídeo não digerido, a segunda banda ao plasmídeo digerido e uma terceira banda correspondente ao nosso produto de digestão de interesse, à cassete *aphA-3*. Posteriormente, realizou-se a purificação da banda correspondente à cassete de resistência à canamicina, situada a cerca de 850 pb.

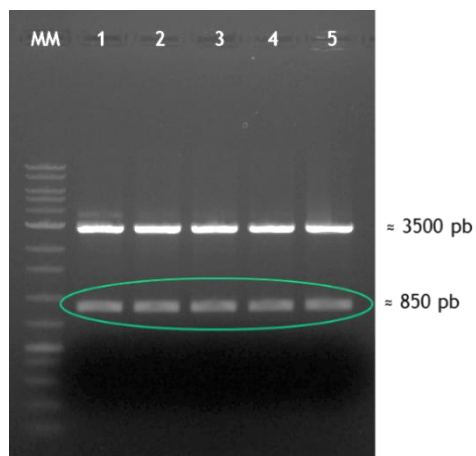


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose dos produtos resultantes da digestão enzimática do plasmídeo pUC18-K2 com as enzimas BamHI e KpnI. (MM: Marcador molecular; 1-5: Produtos da digestão enzimática do plasmídeo pUC18-K2; Círculo verde: representa o produto de interesse, a cassette *aphA-3*).

A segunda etapa consistiu na extração do DNA genómico da estirpe parental, a construção dos fragmentos homólogos e ligação destes fragmentos com a cassette, obtendo assim o fragmento de DNA transformante.

Com a técnica de PCR e tendo o DNA genómico das estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 como molde, foram amplificados fragmentos a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene *areE*, com 335 e 345pb, respetivamente. Por último, e ainda através do PCR, procedeu-se à junção dos fragmentos com a cassette, formando o fragmento de DNA transformante, que corresponde à cassette *aphA-3* flanqueada pelos fragmentos homólogos ao gene *areE*, tendo aproximadamente 1500 pb. Na Figura 12 encontra-se representado, através de uma eletroforese em gel de agarose, os produtos de PCR correspondentes ao fragmento A (fragmento a jusante do codão de iniciação), ao fragmento B (fragmento a montante do codão de stop), a cassette *aphA-3* e fragmento C (fragmento de DNA transformante), respetivamente.

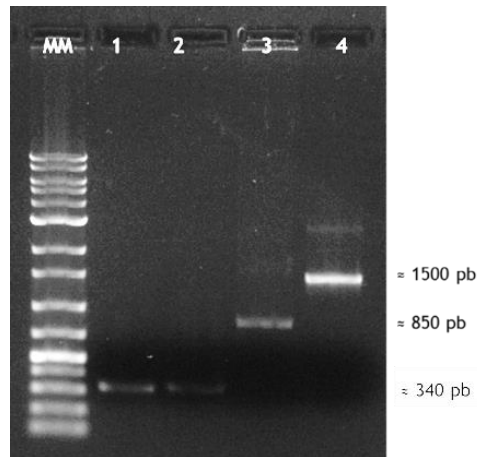


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes à amplificação dos fragmentos hibridizantes (fragmentos A e B) com a cassette *aphA-3* e dos produtos de PCR de junção dos fragmentos hibridizantes com a cassette (fragmento C). (MM: Marcador molecular; 1: Fragmento A; 2: Fragmento B; 3: Cassete *aphA-3*; 4: Fragmento C).

A terceira etapa correspondeu à transformação natural. A transformação natural caracteriza-se pela incorporação espontânea de material genético exógeno no genoma de células competentes, podendo conferir-lhe vantagens, como resistência a múltiplos antibióticos (Sun, 2018). As estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 foram sujeitas a esta transformação através do fragmento de DNA transformante, como descrito na secção 3.3. e 3.4.. Ao visualizar a placa de meio seletivo ao fim de 5 dias de incubação, observou-se o surgimento de diversas colónias transformadas, duas colónias da estirpe DQ40A1 e >100 colónias da estirpe AB28/11 provando, assim, que estas estirpes são naturalmente transformáveis.

A quarta etapa consistiu na verificação da incorporação do fragmento no genoma dos mutantes e na inativação do gene *areE* nestes. Para comprovar a incorporação do fragmento no genoma, procedeu-se à amplificação da região do genoma onde se situava o gene *areE*, a partir do gDNA das colónias presentes nas placas de meio seletivo (BA suplementado com canamicina). Decorrido o PCR, os produtos foram sujeitos a uma eletroforese em gel de agarose, onde foi possível confirmar a substituição do gene *areE* pelo fragmento de DNA transformante (Figura 13).

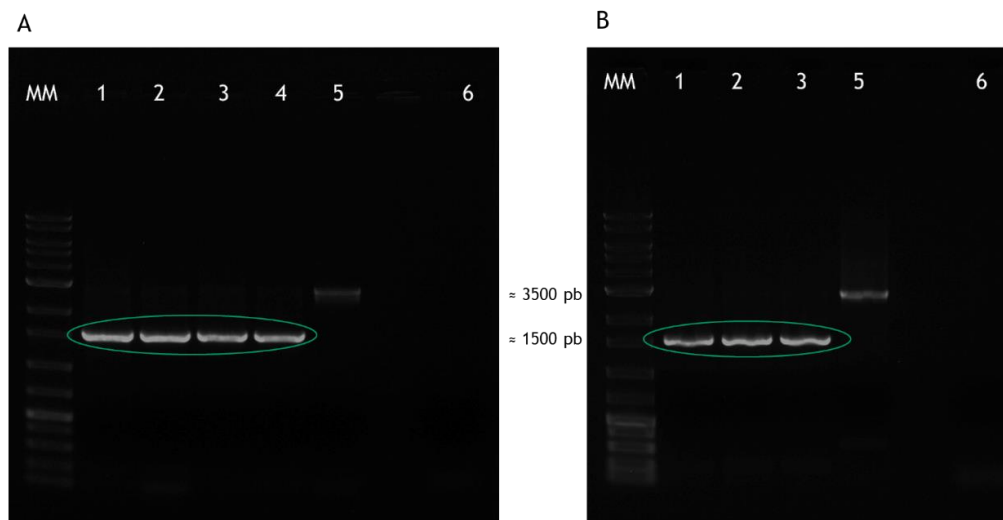


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes à amplificação do gene *areE* nas estirpes parentais e do fragmento de DNA transformante nos mutantes. (A: Estirpe DQ40A1; B: Estirpe AB28/11; MM: Marcador molecular; 1A, 3A, 1B-3B: Fragmento amplificado do gDNA dos mutantes com DNA concentrado; 2A e 4A: Fragmento amplificado do gDNA dos mutantes com DNA 10 vezes diluído; 5: Fragmento amplificado do gDNA das estirpes parentais, controlo positivo; 6: Controlo negativo da reação de PCR).

Na Figura 13 encontra-se representado o resultado da eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR, onde se verifica que as duas colónias mutadas da estirpe *A. butzleri* DQ40A1 e as três colónias mutadas da estirpe AB28/11 incorporaram o fragmento com a cassete de resistência à canamicina, visto o tamanho do fragmento amplificado ser de aproximadamente 1500 pb, o que corresponde ao tamanho do fragmento de DNA transformante.

Finalmente, foi verificado se o gene *areE* deixou de ser expresso através da técnica de RT-PCR, onde se utiliza o RNA mensageiro para sintetizar cDNA e posteriormente, realizar o PCR para comprovar a inativação do gene e conseqüente falta de expressão. Assim, realizado o RT-PCR, os produtos foram sujeitos a eletroforese em gel de agarose (Figura 14), onde se comprovou a não expressão do gene *areE*.

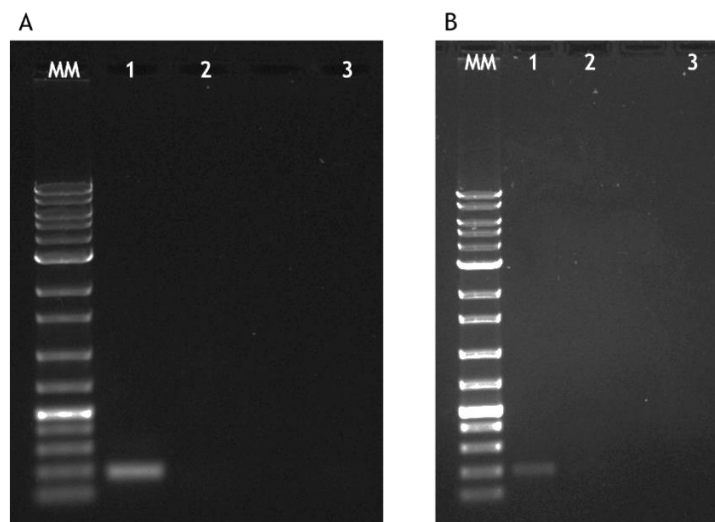


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR das estirpes parentais dos mutantes. (A: Estirpe DQ40A1; B: Estirpe AB28/11; MM: Marcador molecular; 1: cDNA amplificado das estirpes parentais, controlo positivo; 2: cDNA amplificado dos mutantes; 3: Controlo negativo da reação de PCR).

Conclui-se, assim, que os mutantes obtidos contêm a interrupção do gene *areE*, sendo denominados de DQ40A1 Δ *areE* e AB28/11 Δ *areE*.

4.3. Efeito da deleção do gene *areE* no crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano pode ser afetado por diversos fatores, como a deleção de um gene responsável pela expressão de uma bomba de efluxo (Srinivasan *et al.*, 2015). Como tal, de modo a avaliar o efeito da interrupção do gene *areE* no crescimento bacteriano, foram realizadas as curvas de crescimento para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respetivos mutantes, que estão representadas na Figura 15.

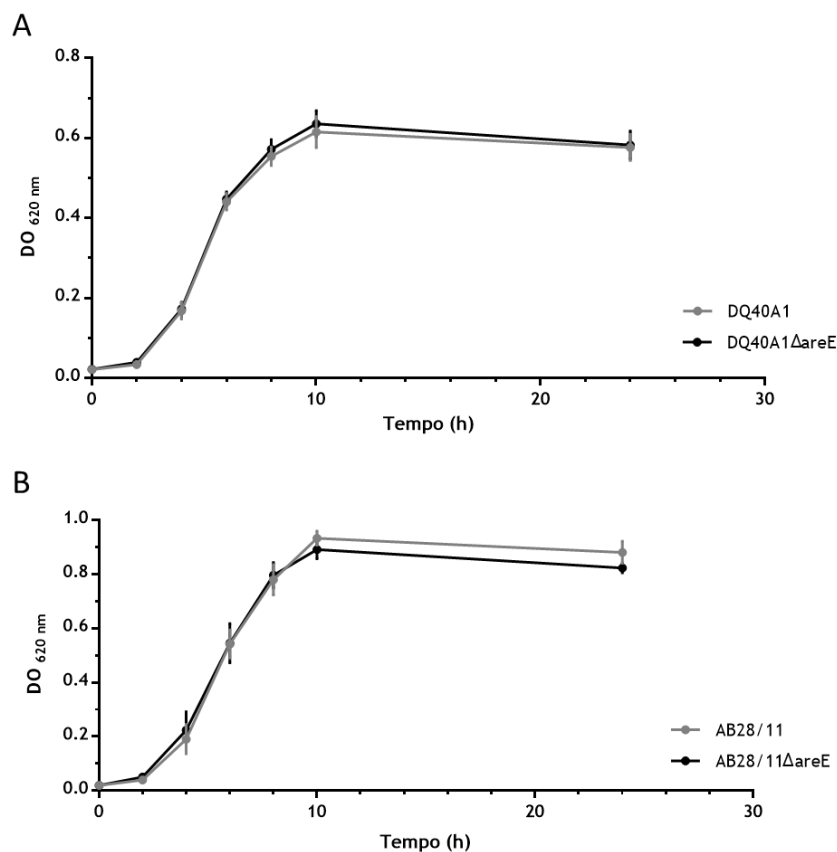


Figura 15: Curvas de crescimento das estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respectivos mutante. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1ΔareE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11ΔareE).

Pela interpretação dos gráficos A e B (Figura 15) e pela comparação das curvas de crescimento, verifica-se que os perfis de crescimento de ambas as estirpes, nativa e mutada, se encontram praticamente sobreponíveis até aproximadamente às oito horas, observando-se depois pequenas diferenças até às 24 horas, sendo que na estirpe AB28/11ΔareE verifica-se uma diminuição do crescimento das oito às 24 horas em comparação à nativa, sem diferença significativa.

O comportamento da estirpe *A. butzleri* DQ40A1 e do mutante DQ40A1ΔareE é concordante com o descrito para *Stenotrophomonas maltophilia*. Num estudo realizado a esta bactéria foi possível verificar que a estirpe que possuíam uma mutação no gene *smeH* que codifica a proteína transportadora da bomba de efluxo SmeGH do tipo RND, não demonstrou comprometimento no seu crescimento (Blanco, Corona and Martínez, 2019).

Estes perfis de crescimento bacteriano similares entre estirpe parental e mutante comprovaram que a deleção do gene *areE* não afeta o crescimento bacteriano. Assim, os resultados que vieram a ser observados posteriormente dever-se-ão unicamente a um efeito da mutação e não a uma modificação do perfil de crescimento da estirpe.

4.4. Avaliação da competição entre as estirpes de *Arcobacter butzleri* parental e mutante

O ensaio de competição entre os pares de estirpes parentais e mutantes tem como finalidade descrever o que ocorre no meio ambiente, onde existem uma diversidade de células que competem entre si pelos nutrientes necessários à sua sobrevivência (Morgan and Steiglitz, 2003). Este ensaio tem como objetivo perceber se a deleção do gene *areE* irá influenciar na sobrevivência dos mutantes aquando da sua competição com a estirpe nativa, interferindo na capacidade de adquirir nutrientes e outras substâncias do meio extracelular para o bom funcionamento e crescimento das bactérias.

O custo relativo é calculado pela razão do parâmetro Malthusian da estirpe mutante pelo da estirpe parental. Esta fórmula consiste na razão entre o logaritmo neperiano das UFC/mL resistentes às 24 horas sobre as UFC/mL resistentes às zero horas e o logaritmo neperiano das UFC/mL suscetíveis às 24 horas sobre as UFC/mL suscetíveis às zero horas. Um custo relativo de um indica nenhum custo de robustez, enquanto que um valor superior ou inferior a um indica robustez aumentada ou diminuída, respetivamente (Ferreira *et al.*, 2018).

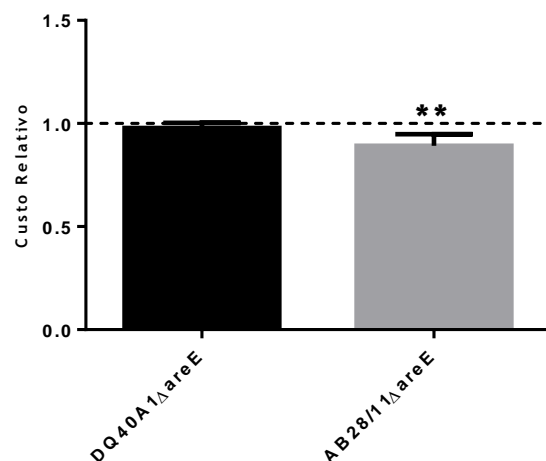


Figura 16: Representação gráfica do custo relativo para as estirpes *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11. Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três ensaios independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação a um custo relativo fixo de um (linha horizontal); ** $p < 0,01$.

O custo relativo dos mutantes em função da respetiva estirpe parental para *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 foi comparado com o valor fixo de um (Figura 16). Sendo que se observou que a DQ40A1ΔareE não apresentou um custo relativo à estirpe DQ40A1. Contudo, para a estirpe AB28/11ΔareE verificou-se que foi significativamente superada pela AB28/11, visto ter um custo relativo inferior a um, ou seja, a sua robustez foi diminuída. Este resultado vai ao encontro dos perfis observados nas curvas de crescimento da estirpe mutada e parental.

O comportamento da estirpe *A. butzleri* AB28/11 Δ areE é concordante com os resultados de um estudo, onde se descreve que a disrupção do sistema de efluxo AcrAB-TolC em *Enterobacter cloacae* reduz tanto a aptidão bacteriana como a virulência no hospedeiro (Pérez *et al.*, 2012).

4.5. Efeito da deleção do gene *areE* na tolerância ou resistência a agentes antimicrobianos

A resistência a vários agentes antimicrobianos tem sido relacionada com bombas de efluxo presentes nas membranas das bactérias, que serão responsáveis pela extrusão desses agentes e impedindo, assim, que estes atuem na bactéria (Blair *et al.*, 2015). Para avaliar a função da bomba de efluxo AreDEF na multirresistência, foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias de diversos agentes antimicrobianos (Tabela 5) para as estirpes parentais de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 e dos respectivos mutantes. Esta avaliação permite averiguar, por comparação dos valores obtidos de CMI, se a deleção do gene *areE* apresenta influência sobre a resistência das estirpes em estudo.

Tabela 7: Concentrações mínimas inibitórias dos agentes antimicrobianos para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 nativas e respectivos mutantes.

	Agente Antimicrobiano	Estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i>			
		DQ40A1	DQ40A1 Δ areE	AB28/11	AB28/11 Δ areE
CMI (μ g/mL)	Ampicilina	4	4	256	256
	Cefalexina	64	64	256	128
	Cefotaxima	8	8	32	16
	Amoxicilina	4	4	64	64
	Gentamicina	1	1	2	1
	Canamicina	2	256	4	256
	Estreptomicina	2	2	8	4
	Ácido nalidíxico	16	16	>256	>256
	Ciprofloxacina	0,03	0,03	16	16
	Levofloxacina	0,06	0,06	64	32
	Moxifloxacina	0,06	0,06	64	64
	Tetraciclina	1	1	8	2
	Doxiciclina	0,25	0,25	4	2
	Eritromicina	2	2	16	8
	Claritromicina	2	2	16	8
	Cloranfenicol	8	8	32	32
	Colato de sódio	4	4	>32	32
	Desoxicolato de sódio	16	16	32	32
	Clorexidina	1	1	2	2
	Cloreto de benzalcônio	8	8	32	16
Acriflavina	8	8	32	32	
Brometo de etídio	8	8	64	64	

Nota: Resultados apresentados a negrito e sombreado indicam um aumento ou diminuição do valor das CMI entre a estirpe parental e nativa.

Analisando os valores obtidos para CMI dos diferentes agentes em estudo (Tabela 7), observa-se um aumento acentuado desta para a o antibiótico aminoglicosídeo, a canamicina, em ambas as estirpes, DQ40A1 e AB28/11, com a CMI da mutada a aumentar 128 e 64 vezes em relação à parental, respectivamente. Este aumento teve como origem a inserção da cassete *aphA-3*, aquando da construção dos mutantes.

Relativamente à estirpe de *A. butzleri* DQ40A1, verificou-se que não ocorreu alteração do perfil fenotípico de resistência aos antibióticos quando se inativa o gene *areE*, visto não se verificarem alterações dos valores das CMIs entre estirpe nativa e mutada. Esta observação pode levar à sugestão de que a bomba de efluxo estudada não será a única envolvida no efluxo destas substâncias para o meio extracelular.

Em relação à estirpe AB28/11 é possível observar alterações para valores inferiores nas CMI de alguns agentes antimicrobianos. Quanto aos antibióticos, pode observar-se uma diminuição na tolerância/resistência à cefalexina (duas vezes), cefotaxima (duas vezes), à gentamicina (duas vezes), à estreptomicina (duas vezes), à levofloxacina (duas vezes), à tetraciclina (quatro vezes), à doxiciclina (duas vezes), à eritromicina (duas vezes) e à claritromicina (duas vezes) para a estirpe mutada quando comparada à estirpe nativa. Quanto aos sais biliar, observa-se apenas a diminuição da CMI do colato de sódio, e para os desinfetantes a estirpe mutada tornou-se mais suscetível ao cloreto de benzalcônio. Nos restantes agentes testados, o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos não sofreu alteração.

O papel das bombas de efluxo do tipo RND, destaca-se como um sistema de resistência a múltiplos antimicrobianos em bactérias Gram-negativo, estando associadas a resistência intrínseca ou adquirida. Assim, está descrito que as bombas de efluxo desta família transportam uma diversos substratos, incluindo antibióticos, corantes, detergentes (Blair and Piddock, 2009). De facto, as alterações observadas nos valores de CMI e a diversidade de possíveis substratos para *A. butzleri* AB28/11 quando comparada com o seu mutante, encontra-se dentro do descrito para outras bactérias de Gram-negativo. Por exemplo, o transportador AbeD encontra-se associado a uma bomba de efluxo da superfamília RND em *Acinetobacter baumannii* e apresenta homologia com outros transportadores de bombas de efluxo, como AcrD de *E. coli* e *Salmonella enterica*. Num estudo relativamente à deleção do gene *abeD* em *A. baumannii*, comparando os antibióticos testados em comum com o presente trabalho, verificou-se a diminuição da CMI para os antibióticos eritromicina e gentamicina (Srinivasan *et al.*, 2015). No entanto, no estudo da deleção ao gene *abuO*, observou-se uma diminuição da CMI para a amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, ácido nalidíxico e estreptomicina, sendo que não se verificou alteração na CMI para os antibióticos gentamicina, canamicina e tetraciclina (Srinivasan, Vaidyanathan and Rajamohan, 2015), sendo apenas a diminuição observada para a estreptomicina em AB28/11 Δ areE concordante com este estudo.

A bomba CmeABC pertence à classe da superfamília RND e encontra-se expressa em *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, entre outras, estando envolvida no transporte de efluxo de diversas substâncias. Num teste realizado à bomba de efluxo CmeABC de *C. jejuni*, onde se construíram mutantes no gene *cmeB* foi verificado um aumento da suscetibilidade à ciprofloxacina, ácido nalidíxico, cefotaxima, ampicilina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, brometo de etídio e sais biliares, comprovando o papel desta bomba na resistência intrínseca a vários agentes antimicrobianos (Lin, Michel and Zhang, 2002). Comparando este estudo em *C. jejuni* com os resultados neste trabalho com *A. butzleri*, verifica-se uma concordância com os dados que dizem respeito à estirpe *A. butzleri* AB28/11 relativamente à cefotaxima, gentamicina, tetraciclina, eritromicina e sais biliares, visto verificar-se diminuição da CMI, sugerindo que a bomba de efluxo AreDEF desempenha um papel na resistência a estes agentes antimicrobianos. No entanto, quando se analisam os resultados

para a estirpe *A. butzleri* DQ40A1 não parece haver uma intervenção da bomba de efluxo AreDEF na resistência aos agentes antimicrobianos testados.

Assim, apesar de se poder relacionar a bomba de efluxo AreDEF com o efluxo de alguns antibióticos, do colato de sódio e do cloreto de benzalcônio no que diz respeito à estirpe de *A. butzleri* AB28/11, o mesmo não foi verificado em *A. butzleri* DQ40A1. A variação observada pode estar associada ao facto da resistência intrínseca ou expressão basal de AreDEF em *A. butzleri* AB28/11 ser superior a *A. butzleri* DQ40A1. Assim, foi verificando neste estudo que o sistema de efluxo através da bomba AreDEF é mais eficaz no caso da estirpe *A. butzleri* AB28/11.

4.6. Efeito da deleção do gene *areE* nas características de virulência de *Arcobacter butzleri*

A presença de bombas de efluxo confere resistência a agentes antimicrobianos, mas também pode estar relacionada com outros mecanismos de ação que poderão afetar a sobrevivência da bactéria. Foi descrito que a deleção ou a sobreexpressão de bombas de efluxo pode levar ao comprometimento do crescimento bacteriano e robustez das estirpes (Alcalde-Rico *et al.*, 2016). A alteração da constituição da membrana celular das bactérias, pode influenciar a hidrofobicidade e motilidade, os quais podem influenciar a virulência e capacidade de formação de biofilmes (Lin *et al.*, 2015). A sobrevivência das bactérias em ambiente com substâncias tóxicas (como peróxido de hidrogénio) e em ambiente com elevadas concentrações de sais (como cloreto de sódio), levou ao estudo de mecanismo que possam estar envolvidos na resistência, surgindo as bombas de efluxo como transportador dessas substâncias (Lin *et al.*, 2015; Alcalde-Rico *et al.*, 2016).

4.6.1. Determinação do efeito da deleção do gene *areE* de *Arcobacter butzleri* na motilidade e hidrofobicidade

A deleção do gene relativo à bomba de efluxo areDEF poderá levar à alteração de certas características, como a constituição da membrana celular e, conseqüente, alteração da sua motilidade no meio ambiente e hospedeiros (Webber *et al.*, 2009). A fim de avaliar estas características, as estirpes parentais e respetivas mutantes foram sujeitas a testes de motilidade e de hidrofobicidade.

4.6.1.1. Avaliação da motilidade

A motilidade encontra-se frequentemente associada à sobrevivência e disseminação no ambiente (Ferreira *et al.*, 2018). Por este motivo, a motilidade foi avaliada nas estirpes parentais e mutadas de forma a verificar se a sua migração foi ou não afetada pela alteração de um gene no seu genoma, o gene *areE*.

Tabela 8: Diâmetro da motilidade (em mm) das estirpes parentais de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 e respectivos mutantes, às 24 e 48 horas de incubação (média \pm desvio padrão).

Motilidade (mm)	Estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i>			
	DQ40A1	DQ40A1 Δ areE	AB28/11	AB28/11 Δ areE
24 horas	17,15 \pm 3,16	18,11 \pm 3,96	22,51 \pm 0,88	20,85 \pm 2,65
48 horas	32,63 \pm 3,38	33,72 \pm 2,54	34,74 \pm 1,70	28,27 \pm 3,11

Comprova-se que para a estirpe *A. butzleri* DQ40A1 Δ areE não ocorreu uma alteração significativa na motilidade em comparação com a sua estirpe nativa (Tabela 8). O mesmo não se verificou na estirpe *A. butzleri* AB28/11 Δ areE, visto o diâmetro da sua migração ter sofrido uma diminuição em relação à parental. No entanto, através do teste *t-student*, estas variações nos diâmetros de migração não representam diferenças estatísticas significativas quando comparando entre as estirpes mutadas e nativas ($p > 0,05$), com a exceção da estirpe AB28/11 Δ areE em comparação à sua estirpe nativa correspondente para o tempo 48 horas ($p = 0,0341$).

O comportamento observado para a estirpe *A. butzleri* AB28/11 mostrou ser semelhante ao descrito em *Acinetobacter baumannii*, onde se verificou que a migração da estirpe com a deleção do gene *abeD* era inferior à migração da estirpe nativa (Srinivasan *et al.*, 2015). Este comportamento também foi relatado em *Salmonella enterica* que, na ausência do componente AcrB pertencente à bomba de efluxo da classe RND, levou a uma diminuição da motilidade, devido à diminuição da expressão de genes que codificam para o flagelo (Webber *et al.*, 2009). Em *Pseudomonas aeruginosa* verificou-se da mesma forma que a deleção do sistema MexAB-OprM levou a uma consequente diminuição da motilidade e neste caso também devido à diminuição da produção de flagelo (Alcalde-Rico *et al.*, 2016).

Contudo, esta tendência de redução da motilidade não se verifica em todas as situações. Num outro estudo em *Acinetobacter baumannii*, demonstrou-se que aquando da deleção de um gene correspondente a um componente de fusão de membrana periplasmática, *arpa*, do sistema de efluxo do tipo RND, ou a deleção de um gene que codifica um transportador de membrana, *arpB*, para o mesmo sistema, os resultados comprovaram um aumento de motilidade de ambos os mutantes (Tipton, Farokhyfar and Rather, 2017).

4.6.1.2. Avaliação da hidrofobicidade celular

Como a deleção de um gene correspondente à bomba de efluxo leva à alteração da composição da membrana celular, o que pode afetar a hidrofobicidade celular e, conseqüentemente, a capacidade de adesão/virulência da bactéria, procedeu-se neste trabalho à avaliação da hidrofobicidade celular das estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 e respectivos mutantes, cujos resultados são apresentados na Figura 17.

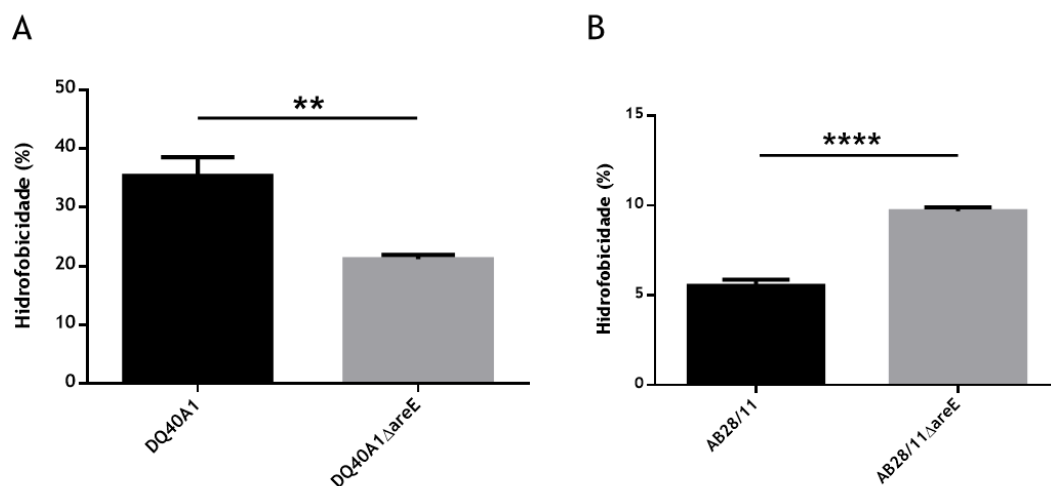


Figura 17: Representação gráfica das percentagens de hidrofobicidade para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respetivos mutantes. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1ΔareE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11ΔareE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de três experiências independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

Interpretando os resultados obtidos pela avaliação da hidrofobicidade das células de *A. butzleri* correspondente à estirpe DQ40A1, verifica-se que a estirpe mutada ($\approx 20\%$) apresentou uma percentagem de hidrofobicidade inferior em comparação à estirpe nativa ($\approx 35\%$) (Figura 17A). No entanto, o contrário foi observado para *A. butzleri* AB28/11, onde a estirpe mutada ($\approx 10\%$) apresentou percentagens de hidrofobicidade superiores à estirpe nativa ($\approx 6\%$) (Figura 17B). Analisando estatisticamente os valores obtidos pelo teste *t-student*, os resultados obtidos para ambos os mutantes demonstram diferença estatística significativa em relação à estirpe parental correspondente. Esta diferença de resultados pode estar associada ao perfil fenotípico de cada estirpe, ou mesmo ter por base as diferenças de hidrofobicidade encontradas nas estirpes parentais e por sua vez a mutação podendo influenciar este parâmetro de forma diferente.

Os resultados da hidrofobicidade das estirpes são concordantes com a tendência obtida para os ensaios de motilidade. A estirpe *A. butzleri* DQ40A1ΔareE sofreu uma diminuição da percentagem de hidrofobicidade, levando ao aumento da hidrofobicidade celular, tornando-se estas mais difusas no meio e, conseqüentemente, levando a uma maior migração destas. Contudo, o contrário foi observado na estirpe AB28/11ΔareE. Neste par de estirpes verificou-se um aumento da hidrofobicidade quando comparando a estirpe mutante com a parental e, assim, uma diminuição do diâmetro da migração das bactérias no meio.

Num estudo realizado envolvendo a bomba SmeYZ de *Stenotrophomonas maltophilia*, onde os investigadores deletaram esta bomba, foi observado um aumento de hidrofobicidade nos mutantes. Os autores especulam que a causa pode dever-se a uma substância não identificada,

que é um substrato fisiológico da bomba SmeYZ, que atua como matriz extracelular afetando a hidrofobicidade da superfície bacteriana (Lin *et al.*, 2015).

4.7. Determinação do efeito da deleção do gene *areE* em *Arcobacter butzleri* na sobrevivência a condições adversas

De forma a avaliar se a interrupção do gene *areE* irá afetar a sobrevivência da estirpe quando da sua presença em ambiente adversos, foram realizados diversos testes considerando diferentes tipos de stress, como oxidativo, osmótico, biliar e na presença dum desinfetante.

4.7.1. Stress oxidativo

Aquando do contacto entre as bactérias e espécies reativas de oxigénio, estes irão causar danos a nível do DNA, RNA, às proteínas, lípidos e membranas celulares. O radical livre poderá interagir com aminoácidos e proteínas, reagindo na cadeia lateral, onde tem como alvo preferencialmente a cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, levando consequentemente à perda de atividade enzimática, alterações no transporte ativo através das membranas celulares e morte celular (Barreiros, David and David, 2006). Um dos compostos mais utilizados para a avaliação do efeito do stress oxidativo é o peróxido de hidrogénio, que dará origem ao radical hidroxilo e, recentemente, a menadiona que dará origem ao radical superóxido (Kim, Sohn and Jin, 2011). Assim, devido à existência de diferentes espécies reativas de oxigénio realizou-se o estudo para avaliar qual destas espécies será mais prejudicial para as bactérias, sendo os resultados apresentados na Figura 18.

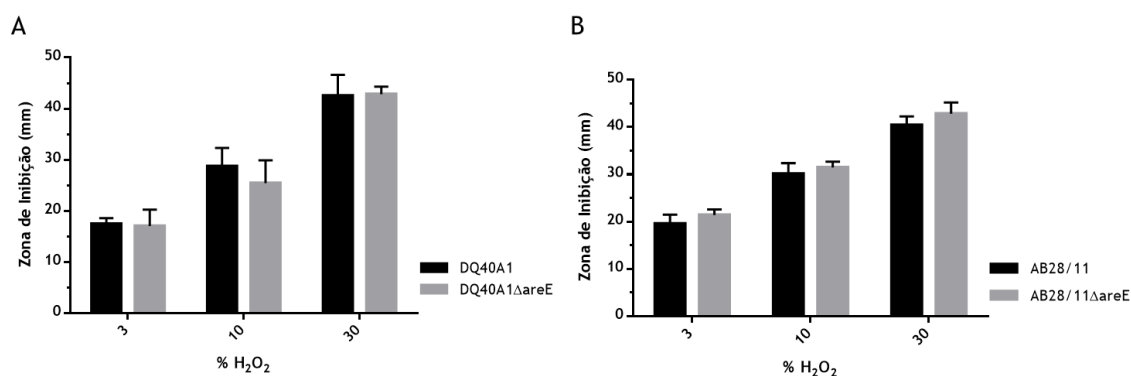


Figura 18: Representação gráfica das zonas de inibição para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respetivos mutantes, na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, 3, 10 e 30 %. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1ΔareE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11ΔareE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três experiências independentes.

Pela observação dos gráficos representados na Figura 18, é possível verificar que na estirpe *A. butzleri* DQ40A1 Δ areE não se verificou alteração da zona de inibição em comparação com a estirpe parental (Figura 18A). Na estirpe *A. butzleri* AB28/11 Δ areE também não foi verificada uma diferença significativa na zona de inibição, quando comparada à estirpe nativa (Figura 18B).

Em *Acinetobacter baumannii*, foi comprovado a importância do transportador AbeD no stress oxidativo devido ao aumento da suscetibilidade dos mutantes (deleção do gene *abeD*) a este stress, quando comparado com a estirpe nativa (Srinivasan *et al.*, 2015). Também num estudo efetuado em *C. jejuni* foi possível observar que aquando da deleção do gene *cmeG*, a estirpe demonstrou um aumento da zona de inibição, compatível com um aumento da suscetibilidade ao peróxido de hidrogénio. O mecanismo implícito pelo gene *cmeG* na contribuição para a resistência ao stress oxidativo em *Campylobacter* ainda não é conhecido, mas postula-se que contribua para o processo de desintoxicação por extrusão de metabolitos tóxicos. No entanto, com a deleção do gene *cmeH*, pertencente à família MFS, foi comprovado que a resistência ao stress oxidativo não foi afetada (Jeon *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 estão de acordo com os resultados obtidos para a deleção do gene *cmeH*, levando à conclusão de que a bomba de efluxo AreDEF não tem um papel na resistência ao stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogénio.

Como referido anteriormente, o stress oxidativo também pode ser induzido por menadiona. Assim, foi importante a realização deste ensaio de modo a comprovar ou excluir o possível papel da bomba de efluxo em estudo na sobrevivência das bactérias a diferentes espécies reativas de oxigénio. Observando o gráfico correspondente à estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 (Figura 19A), conclui-se que não houve alteração na suscetibilidade da estirpe mutante na presença de diversas concentrações de menadiona. Contudo, é possível verificar que para a estirpe AB28/11 a bomba de efluxo tem um papel significativo na resistência das bactérias ao stress causado por menadiona (Figura 19B), devido ao aumento da suscetibilidade observada no ensaio, resultado este que vai de encontro ao observado em *Stenotrophomonas maltophilia*, aquando da deleção do transportador SmeH (Blanco, Corona and Martínez, 2019).

Este aumento de suscetibilidade pode levar à hipótese de que a bomba de efluxo AreDEF possa ter uma maior afinidade para a espécie reativa de oxigénio produzida pela menadiona, o radical anião superóxido, do que para o radical hidroxilo produzido a partir do peróxido de hidrogénio, podendo estar associado ao facto de que os radicais apresentam diferenças nas cargas, ou seja, o radical anião superóxido tem carga negativa e o radical hidroxilo não apresentar carga.

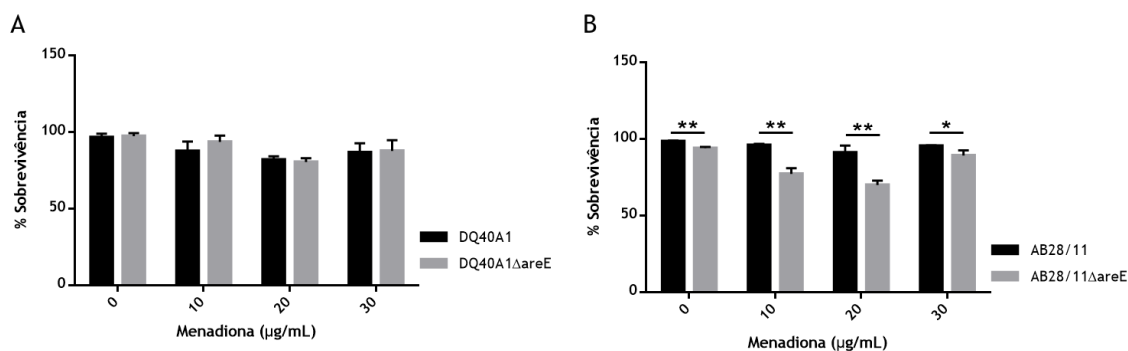


Figura 19: Representação gráfica das percentagens de sobrevivência para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respetivos mutantes, na presença de diferentes concentrações de menadiona, 0, 10, 20 e 30 μg/mL. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1ΔareE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11ΔareE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três experiências independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.7.2. Stress osmótico

O stress osmótico ocorre quando a concentração de solutos no meio é superior à concentração no interior da célula bacteriana, provocando a desidratação desta e a redução do volume citoplasmático e celular (Santos Junior and B. Gomes, Albério, 2012). Assim, neste estudo, utilizaram-se diferentes concentrações de NaCl (0,075 e 0,15 M) para avaliar o crescimento das estirpes e respetivos mutantes, tendo-se obtido os resultados apresentados na Figura 20.

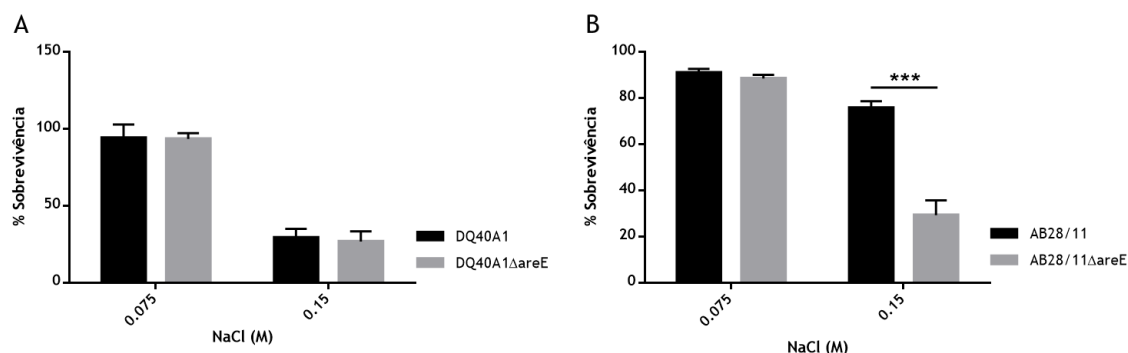


Figura 20: Representação gráfica das percentagens de sobrevivência para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 parentais e respetivos mutantes, na presença de diferentes concentrações de cloreto de sódio, 0,075 e 0,15 M. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1ΔareE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11ΔareE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três experiências independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; *** $p < 0,001$.

Pela representação gráfica do efeito das diferentes concentrações cloreto de sódio na estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 (Figura 20A), não se verificam alterações significativas quando comparada a estirpe mutada e a estirpe nativa. Na estirpe de *A. butzleri* AB28/11 (Figura 20B),

verificou-se que a suscetibilidade da estirpe mutada aumentou para a concentração de 0,15 M quando comparada com a estirpe nativa.

Um estudo efetuado em *Acinetobacter baumannii*, comprovou que a deleção do gene *abeD* provoca um aumento da suscetibilidade na presença de condições de stress osmótico, levando a concluir que AbeD apresenta um papel importante na tolerância a este stress (Srinivasan *et al.*, 2015). Também o gene *abuO* de *A. baumannii* foi relacionado com a proteção das bactérias contra o stress osmótico (Srinivasan, Vaidyanathan and Rajamohan, 2015).

O resultado observado neste trabalho em *A. butzleri* AB28/11 foi concordante com o do estudo em *A. baumannii*, levando a concluir um possível papel da bomba de efluxo AreDEF na proteção das bactérias contra o stress osmótico.

4.7.3. Stress biliar

Devido à vasta distribuição de *Arcobacter* spp., uma das suas possíveis vias de transmissão é a ingestão de alimentos e águas contaminados (Ferreira *et al.*, 2016), podendo colonizar o trato intestinal, como *C. jejuni* que coloniza e prolifera no intestino bovino. No entanto, estes microrganismos encontram-se expostos a vários fatores tóxicos, como os sais biliares. Assim, para a sua sobrevivência nesse ambiente, as bactérias necessitam de tolerar os efeitos provocados por este agente antimicrobiano (Fox *et al.*, 2007).

A bÍlis é uma secreção digestiva, com uma constituição complexa, rica em lípidos (colesterol, fosfolípidos e ácidos biliares) e pobre em proteínas (imunoglobulinas), produzida no fígado e armazenada na vesícula biliar, para posterior libertação no intestino, pelo ducto biliar. Os ácidos biliares são moléculas de natureza anfipática, sendo considerados detergentes, possuindo uma atividade antimicrobiana (Gunn, 2000). Estas moléculas podem destabilizar as membranas celulares e representam um stress ao qual as bactérias que infetam o trato intestinal têm de enfrentar (Fox *et al.*, 2007).

Como referido anteriormente, as bombas de efluxo do tipo RND foram descritas como tendo um papel no transporte de sais biliares (Kumar and Schweizer, 2005) e, considerando isto, procedeu-se ao estudo do papel da bomba em estudo, AreDEF, no stress causado pelo extrato biliar, que tem como objetivo representar o stress a que *A. butzleri* pode estar sujeito no caso de infeção intestinal. Assim, para avaliar o papel da bomba de efluxo AreDEF neste stress utilizaram-se diferentes concentrações de extrato biliar (0,25, 0,5 e 1 %) para avaliar o crescimento das estirpes e respetivos mutantes, cujo os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 21.

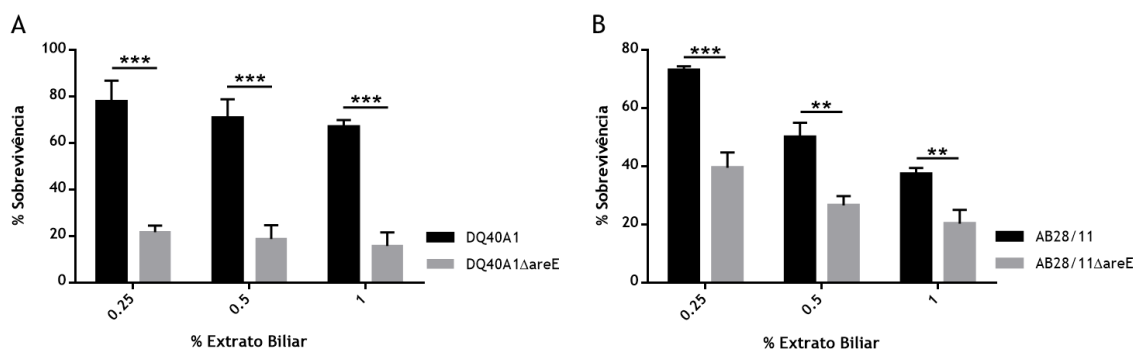


Figura 21: Representação gráfica das percentagens de sobrevivência para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 e respetivos mutantes, na presença de diferentes concentrações de extrato biliar, 0,25, 0,5 e 1 %. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1ΔareE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11ΔareE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três experiências independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Ambos os mutantes demonstraram ser suscetíveis ao extrato biliar (Figura 21 A e B), apresentando uma diferença significativa nas três diferentes concentrações testadas, quando comparados mutantes com as estirpes parentais.

Em *C. jejuni* observou-se um aumento da expressão da bomba CmeABC em resposta à presença de sais biliare, pela inativação de CmeR, como referido anteriormente (Fox *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 2014). Como tal, o contrário foi observado neste teste, visto o operão de AreDEF ter sido interrompido no gene *areE*, e assim, não ser possível a expressão de uma das três subunidades da bomba de efluxo, diminuindo a resistência a sais biliare.

Como verificado anteriormente no ensaio da determinação das concentrações mínimas inibitórias (Tabela 7), apenas se verificou uma diminuição da tolerância ao colato de sódio. No entanto, o extrato biliar não contém apenas os dois sais biliare estudados, mas um conjunto, o que leva a uma representação mais correta da realidade. Assim, a utilização neste estudo, de extrato biliar confere-lhe um maior grau de semelhança ao ambiente a que a bactéria está sujeita aquando da infeção no hospedeiro do que o observado na utilização isolada de cada sal biliar, como foi realizado na determinação da CMI. Os resultados indicam que a bomba de efluxo AreDEF pode ser relevante para a colonização e proliferação de *A. butzleri* no sistema gastrointestinal do hospedeiro, visto a bílis ser uma linha de defesa do hospedeiro.

4.7.4. Efeito da cloroexidina

Os desinfetantes são usados extensivamente em hospitais, instalações de processamento alimentar, pelo público em geral, entre uma variedade de outras aplicações. De facto, o aumento da preocupação sobre o potencial de contaminação microbiana e riscos de infeção,

levaram ao aumento do uso de desinfetantes pelo público em geral, e por sua vez a um aumento de resistência a biocidas (McDonnell and Russell, 2001).

A resistência bacteriana de *A. butzleri* a desinfetantes foi relatada num trabalho em matadouros. *A. butzleri* mostrou ser capaz de sobreviver a 5% de etanol em cultura e quando ligado a superfícies de aço inoxidável (Ferreira *et al.*, 2016). Num outro estudo, 31 de 32 isolados de *A. butzleri* de matadouro apresentaram uma CMI de 0,5% de hipoclorito de sódio correspondente a 500 ppm de cloro ativo, que é a solução de trabalho máxima recomendada para este biocida e que a menor concentração de trabalho de cloreto de sódio (0,2%) não teve efeito letal sobre *A. butzleri*, mesmo após 20 h de exposição (Rasmussen *et al.*, 2013). Os resultados destes trabalhos vêm comprovar a resistência de *Arcobacter butzleri* a desinfetantes. Como as bombas de efluxo podem também ter um papel na extrusão de biocidas, pretendeu-se avaliar neste trabalho o papel do sistema AreDEF na sobrevivência de estipes de *A. butzleri* parentais e mutantes à cloroexidina, um desinfetante vulgarmente usado como um produto de limpeza em matadouros e queijarias (Rasmussen *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2016) e como antissépticos a nível cutâneo (Li, Nijhawan and Srivastava, 2019).

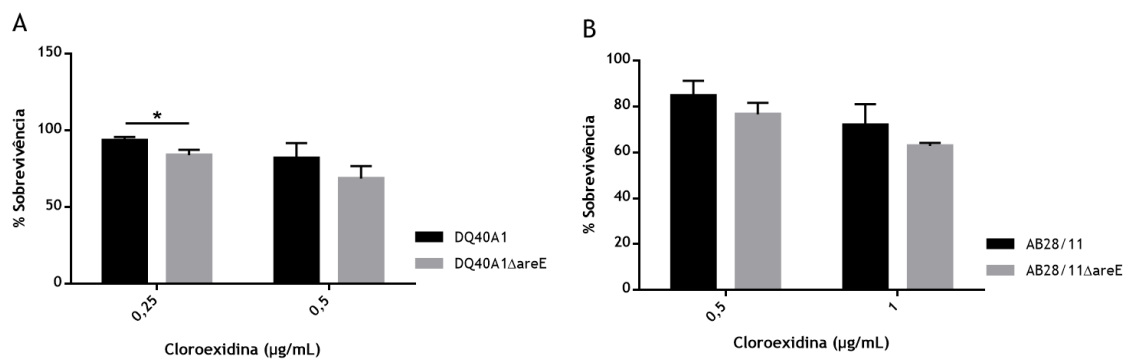


Figura 22: Representação gráfica das percentagens de sobrevivência para as estirpes de *A. butzleri* DQ40A1 e AB28/11 e respetivos mutantes, na presença de diferentes concentrações de cloroexidina, $\frac{1}{4}x$ e $\frac{1}{2}x$ da CMI. (A: Estirpes DQ40A1 e DQ40A1ΔareE; B: Estirpes AB28/11 e AB28/11ΔareE). Análise estatística realizada pelo teste *t-student*. Os dados apresentados correspondem à média e aos desvios padrões de pelo menos três experiências independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; * $p < 0,05$.

Pela análise dos gráficos (Figura 22) é possível verificar uma tendência de aumento de suscetibilidade por deleção do gene *areE*, no entanto só se observou uma diferença significativa para a estirpe *A. butzleri* DQ40A1 e seu mutante, para a concentração de 0,25 µg/mL de cloroexidina (Figura 22B). Ainda que possam existir indícios acerca do papel da bomba de efluxo areDEF na resistência à cloroexidina, os resultados não são conclusivos. Sistemas de efluxo da família RND foram já descritos como tendo um papel na extrusão e sobrevivência a este desinfetante, sendo que em *A. baumannii* a deleção da bomba AbuO leva a uma aumento da suscetibilidade (Srinivasan, Vaidyanathan and Rajamohan, 2015).

Assim, estes resultados sugerem que a bomba de efluxo AreDEF não apresenta um papel significativo na resistência ao desinfetante cloroexidina.

Capítulo 5 - Conclusões

Arcobacter butzleri é uma das espécies pertencentes ao género *Arcobacter*, género esse que se encontra inserido na família *Campylobacteraceae*. Esta é uma bactéria vastamente distribuída em diversos ambientes, estando o consumo de alimentos e águas contaminadas descrito como uma das potenciais vias de transmissão e está associada a enterites, bacteremias e septicemias. Ao longo dos anos, tem-se comprovado que a resistência a agentes antimicrobianos tem vindo a aumentar, o que pode levar a que a administração de antibióticos seja inadequada ou ineficaz em tratamentos de infeções, onde *A. butzleri* não se apresenta como exceção. A resistência aos agentes antimicrobianos pode ser associada a diversos mecanismos sendo a presença de bombas de efluxo um deles, tornando-se um alvo de estudo. Desta forma, o trabalho apresentado teve como objetivo avaliar o papel da bomba de efluxo AreDEF na resistência e virulência bacteriana em *A. butzleri*.

Este trabalho começou pela realização de uma análise bioinformática para a seleção do gene da bomba de efluxo AreDEF. A análise bioinformática indicou que o operão que codifica essa bomba apresenta três genes que codificam para três subunidades: o gene *areD* e o gene *areF* que foram identificados para a expressão de proteínas de membranas externa e o gene *areE* que codifica a proteína de membrana interna. Esta análise confirmou ainda que a bomba de efluxo AreDEF de *A. butzleri* como sendo um potencial transportador da superfamília *resistance-nodulation-cell division*. De seguida, procedeu-se a uma avaliação do comportamento de estirpes de *A. butzleri* aquando da deleção do gene *areE*, perante o seu perfil de resistência e virulência.

O primeiro objetivo consistiu na construção de mutantes na qual o gene codificante para a proteína de membrana interna, *areE*, foi interrompido. Esta deleção foi realizada em duas estirpes de *A. butzleri*, DQ40A1 e AB28/11, pela transformação natural através da mutagénesis insercional, verificando-se que ambas as estirpes são naturalmente transformáveis, e que o gene foi interrompido com sucesso. Os mutantes da bomba de efluxo foram depois utilizados para testar a influência da interrupção no crescimento bacteriano e na competição entre estirpes. Comprovou-se que a interrupção do gene *areE* não demonstrou influenciar o perfil de crescimento de ambas as estirpes de *A. butzleri* estudadas, sendo que aquando do ensaio de competição entre a estirpe parental e mutante foi verificado que o mutante *A. butzleri* AB28/11 Δ *areE* sofre uma diminuição na robustez, mas tal facto não se verificou em DQ40A1 Δ *areE*.

Outro objetivo consistiu na avaliação das concentrações mínimas inibitórias de antimicrobianos contra as estirpes parentais e mutantes de *A. butzleri*, onde se pretendeu avaliar a influência da bomba de efluxo AreDEF na resistência/tolerância a estes agentes, tal como definir quais

seriam os potenciais substratos para essa bomba. Verificou-se que, para a estirpe *A. butzleri* AB28/11, esta bomba desempenha um papel na tolerância ou resistência, levando a uma redução da CMI para a cefalexina, a cefotaxima, a gentamicina, a estreptomicina, a tetraciclina, a doxiciclina, a eritromicina, a claritromicina, o colato de sódio e o cloreto de benzalcônio. No entanto, não se verificou o mesmo para a estirpe *A. butzleri* DQ40A1, onde não ocorreram alterações das CMI.

O último objetivo, consistiu na avaliação da interrupção do gene *areE* na virulência das estirpes em estudo. Das estirpes de *A. butzleri* estudadas, apenas o mutante *A. butzleri* AB28/11 Δ *areE* apresentou uma diminuição da motilidade. No entanto, relativamente à hidrofobicidade ambas sofreram alterações, onde *A. butzleri* DQ40A1 Δ *areE* teve uma diminuição enquanto que a AB28/11 Δ *areE* sofreu um aumento da hidrofobicidade celular. Relativamente ao estudo do efeito da interrupção do gene quando as células são sujeitas a condições adversas, o mutante AB28/11 Δ *areE* demonstrou uma diminuição da tolerância em todos os stresses estudados, enquanto que a estirpe DQ40A1 demonstrou-a apenas no stress biliar. Quanto à cloroexidina, foi observado uma tendência de aumento de suscetibilidade para ambos os mutantes.

Em suma, com este trabalho verificou-se que para ambas as estirpes de *A. butzleri*, DQ40A1 e AB28/11, a bomba de efluxo AreDEF desempenha um papel tanto na resistência como na virulência bacteriana, sendo este papel mais visível na estirpe *A. butzleri* AB28/11, podendo este resultado estar associado ao facto da resistência intrínseca ou expressão basal da bomba de efluxo desta estirpe ser superior à estirpe DQ40A1. Contudo, apesar de este estudo trazer novos conhecimento acerca da potencial importância da bomba de efluxo AreDEF em *A. butzleri* são resultados muito preliminares que necessitam de ser confirmados com mais estirpes e estudos de expressão.

Capítulo 6 - Perspetivas Futuras

Devido à importância demonstrada pelas bombas de efluxo em *Arcobacter butzleri*, nomeadamente a bomba AreDEF, é possível que estas estruturas proteicas se tornem num alvo terapêutico na medicina, para o tratamento de infeções provocadas por esta bactéria. No entanto, para melhor compreensão dos mecanismos de resistência e virulência associados ao sistema AreDEF mais estudos serão necessários, tais como:

- Alargar o número de estirpes a utilizar para avaliar o efeito dessa bomba de efluxo;
- Analisar a expressão dos genes do operão AreDEF na estirpe parental e respetivo mutante, para validar que a inserção da cassete afetou exclusivamente o gene alvo;
- Avaliar a expressão basal da bomba de efluxo AreDEF em estirpe de *A. butzleri*, tal como a expressão deste sistema na presença dos seus substratos;
- Determinar o efeito da inibição e/ou sobreexpressão da bomba de efluxo noutros mecanismos de virulência, como a formação de biofilmes e a acumulação de brometo de etídio;
- Determinar que outros mecanismos possam estar envolvidos em sinergismo com as bombas de efluxo na resistência e virulência.

Referências bibliográficas

- Abdelbaqi, K., Ménard, A., Prouzet-Mauleon, V., Bringaud, F., Lehours, P. and Mégraud, F. (2007) “Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates”, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49, pp. 337-345.
- Alcalde-Rico, M., Hernando-Amado, S., Blanco, P. and Martínez, J. L. (2016) “Multidrug efflux pumps at the crossroad between antibiotic resistance and bacterial virulence”, *Frontiers in Microbiology*, 7, pp. 1-14.
- Andrews, J. M. and Hughes, D. (2001) “Determination of minimum inhibitory concentrations”, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48, pp. 5-16.
- Aydin, F., Gümüşsoy, K. S., Atabay, H. I., Iça, T. and Abay, S. (2006) “Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR”, *Journal of Applied Microbiology*, 103, pp. 27-35.
- Bachman, J. (2013) “Reverse-Transcription PCR (RT-PCR)”, *Methods in Enzymology*, 530, pp.67-74.
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M. and David, J. P. (2005) “Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo”, *Quimica Nova*, 29, pp. 113-123.
- Baucheron, S., Tyler, S., Boyd, D., Mulvey, M. R., Chalus-Dancla, E. and Cloeckeaert, A. (2004) “AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104”, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 48, pp. 3729-3735.
- Bentley, R. and Bennett, J. W. (2003) “What is an antibiotic? Revisited”, *Advances in Applied Microbiology*, 52, pp. 303-331.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. and Piddock, L. J. V (2015) “Molecular mechanisms of antibiotic resistance”, *Nature Reviews Microbiology*, 13, pp. 42-51.
- Blair, J. M. A. and Piddock, L. J. V. (2009) “Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update”, *Current Opinion in Microbiology*, 12, pp. 512-519.

Blanco, P., Corona, F. and Martínez, J. L. (2019) "Involvement of the RND efflux pump transporter SmeH in the acquisition of resistance to ceftazidime in *Stenotrophomonas maltophilia*", *Scientific Reports*, 9, pp. 1-14.

Bonifácio, M. (2018) "Transformação Natural em *Arcobacter butzleri*", Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior.

Bücker, R., Troeger, H., Kleeer, J., Fromm, M. and Schulzke, J. (2009) "*Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells", *The Journal of Infectious Diseases*, 200, pp. 756-764.

Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P. and Figueras, M. J. (2009) "*Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, pp. 1391-1396.

Collado, L. and Figueras, M. J. (2011) "Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*", *Clinical Microbiology Reviews*, 24, pp. 174-192.

Collado, L., Guarro, J. and Figueras, M. J. (2009) "Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish," *Journal of Food Protection*, 72, pp. 1102-1106.

Collado, L., Gutiérrez, M., González, M. and Fernández, H. (2013) "Assessment of the prevalence and diversity of emergent campylobacteria in human stool samples using a combination of traditional and molecular methods", *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75, pp. 434-436.

Collado, L., Inza, I., Guarro, J. and Figueras, M. J. (2008) "Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution", *Environmental Microbiology*, 10, pp. 1635-1640.

Collado, L., Kasimir, G., Perez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huguet, J. M. and Figueras, M. J. (2010) "Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat River catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant", *Water Research*, 44, pp. 3696-3702.

Collado, L., Levican, A., Perez, J. and Figueras, M. J. (2011) "*Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, pp. 2155-2161.

Diéguez, A. L., Balboa, S., Magnesen, T. and Romalde, J. L. (2017) "*Arcobacter lekithochrous* sp. nov., isolated from a molluscan hatchery", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, pp. 1327-1332.

- Diéguez, A. L., Pérez-Cataluña, A., Figueras, M. J. and Romalde, J. L. (2018) “*Arcobacter haliotis* Tanaka et al. 2017 is a later heterotypic synonym of *Arcobacter lekithochrous* Diéguez et al. 2017”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, pp. 5-8.
- Donachie, S. P., Bowman, J. P., On, S. L. W. and Alam, M. (2005) “*Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, pp. 1271-1277.
- Fernández, H., Vera, F. and Villanueva, M. P. (2007) “*Arcobacter* and *Campylobacter* species in birds and mammals from Southern Chile”, *Archivos De Medicina Veterinaria*, 39, pp. 163-165.
- Ferreira, S., Correia, D. R., Oleastro, M. and Domingues, F. C. (2018) “*Arcobacter butzleri* ciprofloxacin resistance: point mutations in DNA Gyrase A and role on fitness cost”, *Microbial Drug Resistance*, 24, pp. 915-922.
- Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C. and Oleastro, M. (2013) “Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse”, *International Journal of Food Microbiology*, 162, pp. 82-88.
- Ferreira, S., Júlio, C., Queiroz, J. A., Domingues, F. C. and Oleastro, M. (2014) “Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients”, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78, pp. 220-225.
- Ferreira, S., Oleastro, M. and Domingues, F. (2017a) “*Arcobacter* spp . in food chain – from culture to omics”, in *Food borne Pathogens and Antibiotic Resistance*, pp. 73-117.
- Ferreira, S., Oleastro, M. and Domingues, F. (2017b) “Occurrence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Arcobacter* sp. in a dairy plant”, *Journal of Applied Microbiology*, 123, pp. 1019-1026.
- Ferreira, S., Oleastro, M. and Domingues, F. (2019) “Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain”, *Current Opinion in Food Science*, 26, pp. 9-17.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M. and Domingues, F. C. (2014) “Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity”, *Microbial Pathogenesis*, 76, pp. 19-25.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M. and Domingues, F. C. (2016) “Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review”, *Critical Reviews in Microbiology*, 42, pp. 364-383.

Figueras, M. J., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Solsona, M. J. and Yustes, C. (2011) “*Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish”, *Systematic and Applied Microbiology*, 34, pp. 105-109.

Figueras, M. J., Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Levican, A. and Collado, L. (2016) “*Arcobacter porcinius* sp. nov., a novel *Arcobacter* species uncovered by *Arcobacter thereius*”, *New Microbes and New Infections*, 15, pp. 104-106.

Figueras, M. J., Levican, A., Collado, L., Inza, M. I. and Yustes, C. (2011) “*Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels”, *Systematic and Applied Microbiology*, 34, pp. 414-418.

Fong, T. T., Mansfield, L. S., Wilson, D. L., Schwab, D. J., Molloy, S. L. and Rose, J. B. (2007) “Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio”, *Environmental Health Perspectives*, 115, pp. 856-864.

Fox, E. M., Raftery, M., Goodchild, A. and Mendz, G. L. (2007) “*Campylobacter jejuni* response to ox-bile stress”, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49, pp. 165-172.

Gunn, J. S. (2000) “Mechanisms of bacterial resistance and response to bile”, *Microbes and Infection*, 2, pp. 907-913.

Hassan, K. A., Liu, Q., Elbourne, L. D. H., Ahmad, I., Sharples, D., Naidu, V., Chan, C. L., Li, L., Harborne, S. P. D., Pokhrel, A., Postis, V. L. G., Goldman, A., Henderson, P. J. F. and Paulsen, I. T. (2018) “Pacing across the membrane : the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens”, *Research in Microbiology*, 169, pp. 450-454.

Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A. and Gastra, W. (2006) “*Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent !”, *Veterinary Microbiology*, 115, pp. 1-13.

Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S. and Vandamme, P. (2009) “*Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, pp. 2599-2604.

Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Mast, J., Van Hoof, J. and Vandamme, P. (2005) “*Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, pp. 713-717.

Houf, K., De Smet, S., Baré, J. and Daminet, S. (2008) “Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*”, *Veterinary Microbiology*, 130, pp. 208-213.

Hsu, T. T. D. and Lee, J. (2015) “Global distribution and prevalence of *Arcobacter* in food and water”, *Zoonoses and Public Health*, 62, pp. 579-589.

ICMSF (2002) "Microorganism in Food 7 - Microbiological Testing in Food Safety Management", *Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods*, Springer Science and Business Media.

Imai, K., Asakawa, N., Tsuji, T., Akazawa, F., Ino, A., Sonoyama, M. and Mitaku, S. (2018) "SOSUI-GramN: high performance prediction for sub-cellular localization of proteins in Gram-negative bacteria", *Bioinformatics*, 2, pp. 417-421.

Jeon, B., Wang, Y., Hao, H., Barton, Y. and Zhang, Q. (2010) "Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, pp. 79-85.

Kabeya, H., Marumiyama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., Abe, M., Katsube, Y., Maruyama, S., Mikami, T., Kabeya, H., Morita, Y. and Kobayashi, Y. (2004) "Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan", *International Journal of Food Microbiology*, 90, pp. 303-308.

Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G. and Wachsmuth, I. K. (1991) "*Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness", *Journal of Clinical Microbiology*, 29, pp. 376-385.

Kim, H. M., Hwang, C. Y. and Cho, B. C. (2010) "*Arcobacter marinus* sp. nov.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, pp. 531-536.

Kim, I. S., Sohn, H. Y. and Jin, I. (2011) "Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377", *Journal of Microbiology*, 49, pp. 816-823.

Kopilović, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M. and Kraigher, A. (2008) "Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008", *Euro surveillance*, 13, pp. 7-9.

Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L. L. (2001) "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes", *Journal of Molecular Biology*, 305, pp. 567-580.

Kumar, A. and Schweizer, H. P. (2005) "Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, pp. 1486-1513.

Lappi, V., Archer, J. R., Cebelinski, E., Leano, F., Besser, J. M., Klos, R. F., Medus, C., Smith, K. E., Fitzgerald, C. and Davis, J. P. (2013) "An outbreak of foodborne illness among attendees of a wedding reception in Wisconsin likely caused by *Arcobacter butzleri*", *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, pp. 250-255.

Lehner, A., Tasara, T. and Stephan, R. (2005) "Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen", *International Journal of Food Microbiology*, 102, pp. 127-135.

Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L. and Figueras, M. J. (2012) "*Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish", *Systematic and Applied Microbiology*, 35, pp. 133-138.

Levican, A., Collado, L. and Figueras, M. J. (2013) "*Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage", *Systematic and Applied Microbiology*, 36, pp. 22-27.

Levican, A., Rubio-arcos, S., Martinez-murcia, A., Collado, L. and José, M. (2015) "*Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment", *Systematic and Applied Microbiology*, 38, pp. 30-35.

Li, J. N., Nijhawan, R. I. and Srivastava, D. (2019) "Cutaneous surgery in patients who are pregnant or breastfeeding", *Dermatologic Clinics*, 37, pp. 307-317.

Lin, J., Michel, L. O. and Zhang, Q. (2002) "CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, pp. 2124-2131.

Lin, Y., Huang, Y., Chen, S., Chang, C. and Yang, T. (2015) "The SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics and virulence in mice", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, pp. 4067-4073.

Fera, M. T., La Camera, E., Carbone, M., Malara, D. and Pennisi, M. G. (2009) "Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in Southern Italy", *Journal of Applied Microbiology*, 106, pp. 1661-1666.

Matsuo, T., Ogawa, W., Tsuchiya, T. and Kuroda, T. (2014) "Overexpression of vmeTUV encoding a multidrug efflux transporter of *Vibrio parahaemolyticus* causes bile acid resistance", *Gene*, 541, pp. 19-25.

Mavri, A. and Možina, S. S. (2013) "Effects of efflux-pump inducers and genetic variation of the multidrug transporter CmeB in biocide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*", *Journal of Medical Microbiology*, 62, pp. 400-411.

- McClung, C. R., Patriquin, D. G. and David, R. E. (1983) "*Campylobacter nitrofigilis* sp. nov. , a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33, pp. 605-612.
- McDonnell, G. and Russell, A. D. (2001) "Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance", *Clinical Microbiology Reviews*, 12, pp. 147-179.
- Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wöstem, M. M. S., Ussery, D. W., Stolz, J. F., Binnewies, T. T., Hallin, P. F., Wang, G., Malek, J. A., Rogosin, A., Stanker, L. H. and Mandrell, R. E. (2007) "The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*", *PLoS ONE*, 2, pp. 1-21.
- Morgan, J. and Steiglitz, K. (2003) "Pairwise competition and the replicator equation", *Bulletin of Mathematical Biology*, 65, pp. 1163-1172.
- Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J. O., Weatherup, S. T. C. and Ellis, W. A. (1985) "Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophilus* sp. nov.", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35, pp. 342-356.
- Nikaido, H. (2011) "Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps", *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 77, pp. 1-60.
- Nikaido, H. and Takatsuka, Y. (2009) "Mechanisms of RND Multidrug efflux pumps", *Biochimica Biophysica Acta*, 1794, pp. 769-781.
- On, S. L. W., Stacey, A. and Smyth, J. (1995) "Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia", *Journal of Infection*, 31, pp. 225-227.
- Oren, A. and Garrity, G. M. (2019) "List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, pp. 5-9.
- Park, S., Jung, Y. T., Kim, S. and Yoon, J. H. (2016) "*Arcobacter acticola* sp. nov., isolated from seawater on the East Sea in South Korea", *Journal of Microbiology*, 54, pp. 655-659.
- Pejchalova, M., Zabcikova, S., Silhova, L., Silha, D., Brozkova, I. and Haslova, M. (2016) "Presence of *Arcobacter* species in pet cats and dogs in the Czech Republic", *Veterinary Medicina*, 61, pp. 449-455.
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Romalde, J. L., Lema, A., Balboa, S. and Figueras, M. J. (2018) "Revisiting the taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting order from the chaos", *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1-19.

- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N. and Figueras, M. J. (2018a) “*Arcobacter canalis* sp. nov., isolated from a water canal contaminated with urban sewage”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, pp. 1258-1264.
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N. and Figueras, M. J. (2018b) “*Arcobacter lacus* sp. nov. and *Arcobacter caeni* sp. nov., two novel species isolated from reclaimed water”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, pp. 1-6.
- Pérez, A., Poza, M., Fernández, A., del Carmen Fernández, M., Mallo, S., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Cabral, M. P. and Bou, G. (2012) “Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, pp. 2084-2090.
- Petchiappan, A. and Chatterji, D. (2017) “Antibiotic resistance: Current perspectives”, *American Chemical Society Omega*, 2, pp. 7400-7409.
- Prouzet-Mauléon, V., Labadi, L., Bouges, N., Ménard, A. and Mégraud, F. (2006) “*Arcobacter butzleri*: Underestimated enteropathogen”, *Emerging Infectious Diseases*, 12, pp. 307-309.
- Pumbwe, L. and Piddock, L. J. V (2002) “Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump”, *FEMS Microbiology Letters*, 206, pp. 185-189.
- Puvanendran, D., Cece, Q. and Picard, M. (2017) “Reconstitution of the activity of RND efflux pumps: a ‘bottom-up’ approach”, *Research in Microbiology*, 33342, pp. 1-8.
- Rasmussen, L. H., Kjeldgaard, J., Christensen, J. P. and Ingmer, H. (2013) “Multilocus sequence typing and biocide tolerance of *Arcobacter butzleri* from Danish broiler carcasses”, *BioMed Central Research Notes*, 6, pp. 1-7.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H. and Tanner, S. A. (1999) “Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water”, *Letters in Applied Microbiology*, 28, pp. 31-35.
- Rovetto, F., Carlier, A., Van Den Abeele, A. M., Illegghems, K., Nieuwerburgh, F. Van, Cocolin, L. and Houf, K. (2017) “Characterization of the emerging zoonotic pathogen *Arcobacter thereius* by whole genome sequencing and comparative genomics”, *PLoS ONE*, 12, pp. 1-27.
- Santos Junior, M. L. and B. Gomes, Albério, A. (2012) “Determinação do estresse osmótico do *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da Linfadenite Caseosa”, *Revista Científica Produção Animal*, 14, pp. 5-8.

- Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V., Sasikala, C. and Ramana, C. V (2013) “*Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, pp. 4619-4625.
- Silva, A. L. (2017) “Contribuição de Bombas de Efluxo para a resistência em *Arcobacter butzleri*”, Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior.
- De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L. W., Doudah, L. and Houf, K. (2011) “*Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, pp. 356-361.
- Sousa, V., Luís, Â., Oleastro, M., Domingues, F. and Ferreira, S. (2019) “Polyphenols as resistance modulators in *Arcobacter butzleri*”, *Folia Microbiologica*, pp. 1-8.
- Srinivasan, V. B., Vaidyanathan, V., Mondal, A. and Rajamohan, G. (2012) “Role of the two component signal transduction system CpxAR in conferring cefepime and chloramphenicol resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044”, *PLoS ONE*, 7, pp. 1-15.
- Srinivasan, V. B., Vaidyanathan, V. and Rajamohan, G. (2015) “AbuO, a TolC-Like outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*, is involved in antimicrobial and oxidative stress resistance”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, pp. 1236-1245.
- Srinivasan, V. B., Venkataramaiah, M., Mondal, A. and Rajamohan, G. (2015) “Functional characterization of AbeD, an RND-type membrane transporter in antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*”, *PLoS ONE*, 10, pp. 1-17.
- Srinivasan, V. B., Venkataramaiah, M., Mondal, A. and Vaidyanathan, V. (2012) “Functional characterization of a novel outer membrane porin KpnO, regulated by PhoBR two-component system in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044”, *PLoS ONE*, 7, pp. 1-18.
- Sun, D. (2018) “Pull in and push out: Mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria”, *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1-8.
- Teague, N. S., Srijan, A., Wongstitwilairoong, B., Poramathikul, K., Champathai, T., Ruksasiri, S., Pavlin, J., Mason, C. J. (2010) “Enteric pathogen sampling of tourist restaurants in Bangkok, Thailand”, *Journal of Travel Medicine*, 17, pp. 118-123.
- Tipton, K. A., Farokhyfar, M. and Rather, P. N. (2017) “Multiple roles for a novel RND-type efflux system in *Acinetobacter baumannii* AB5075”, *MicrobiologyOpen*, 6, pp. 1-10.

Du Toit, A. (2017) "Efflux pumps, fitness and virulence", *Nature Reviews Microbiology*, 15, pp. 512-513.

Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and Ley, J. De (1991) "Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov.", *International journal of Systematic bacteriology*, 41, pp. 88-103.

Vandamme, P., Giesendorf, B. A. J., Van Belkum, A., Pierard, D. Lauwers, S., Kersters, K., Butzler, J. P., Goossens, H. and Quint, W. G. V (1993) "Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Arcobacter butzleri* by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting", *Journal of Clinical Microbiology*, 31, pp. 3317-3319.

Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H. and Lauwers, S. (1992) "Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school", *Journal of Clinical Microbiology*, 30, pp. 2335-2337.

Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van den Borre, C., Higgins, R. and Hommez, J. (1992) "Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens", *International Journal of systematic bacteriology*, 42, pp. 344-356.

Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibeqwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zisis, G. and Butzler, J. (2004) "*Arcobacter* species in humans", *Emerging Infectious Diseases*, 10, pp. 1863-1867.

Vicente-Martins, S., Domingues, F. C., Oleastro, M. and Ferreira, S. (2018) "*Arcobacter* spp. at retail food from Portugal: Prevalence, genotyping and antibiotics resistance", *Food Control*, 85, pp. 107-112.

Webber, M. A., Bailey, A. M., Blair, J. M. A., Morgan, E., Stevens, M. P., Hinton, J. C. D., Ivens, A., Wain, J. and Piddock, L. J. V. (2009) "The global consequence of disruption of the AcrAB-TolC efflux pump in *Salmonella enterica* includes reduced expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host", *Journal of Bacteriology*, 191, pp. 4276-4285.

Whiteduck-léveillé, K., Whiteduck-léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Arts, M. T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C. A., Lapen, D. R., Villemur, R. and Khan, I. U. H. (2016) "Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank", *Systematic and Applied Microbiology*, 39, pp. 93-99.

Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Arts, M. T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C. A. , Lapen, D. R., Villemur, R., Talbot, G. and Khan, I. U. H. (2015) “*Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, pp. 2709-2716.

Zhang, Z., Yu, S., Wang, X., Yu, S. and Zhang, X. H. (2016) “*Arcobacter pacificus* sp. nov., isolated from seawater of the South Pacific Gyre”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, pp. 542-547.

Anexos

Sequência das proteínas da bomba de efluxo AreDEF avaliada nas duas estirpes de *A. butzleri* parentais estudadas.

Estirpe de <i>A. butzleri</i>	Identificação	Sequência da proteína
DQ40A1	<i>areD</i>	MLKQSKLLIITLLSLLFLGCENKSNDFKAQQIEVGTITLKEQTVLQQN LSGRVKAKLVSEVRPQJSGIHKDRLFVEGSFVKQGDILYKIDEATYKATF NQAKASLESAKANLQTAQLKSQRYEELLKVDGISQQUETDDAKANYLQ AKALVEEKIAALESAKIDLERTDIKAPISGYIGISSVTKGALVSANQTD LTTIRDNSNVYVDLNSQNEALLKLLSKENIKKGNAEVTLTSDNSI YPYKGILQLQEINVDENTGTVTLRAEFNNEGLLSGMFVRATIOQSAV DSKAFLLPQQAVSRDSKANPIITIVNEDNSTKKQQIIDRAIENYWLVT GITSNDKIIIEGLNKNPKSIVKPIDVTSKYIKED
	<i>areE</i>	MIAKFFVNRPIFAWVISLVIMIAGTVSLYTLTPVEQYQDIAPPQINISTTY TGASAETVENSVTQIIIEQQLTGLDGMIFSSSSSSTGNARISVTFQQGT DPDTAQVQVQNKVSAILSRLPEDVQRQGVVVKSQTDLFLASVYDE TRKAQKIDIADYLVSNLQDSIARIDGVEVQYVGGQYAMRIWLDPIKL ESYNLMPSDIQSAINAQNSQASAGSLGALPTLENQQLSVIVTARSKFK VVQEFENIIVKSNTDGSFVKIKDVAKVEIGSQSYNVVTSLNGYPSGGIAI QLASGANAVKTANAIDFLAKAEASLPEGYKIDYPRDSTLFIKASIKEV VKTLFEAILLVIAMVYIFLKNYRATLIPAIAPVVILGTFGILNIGYSINT LTMFGMVLSIGLLVDDAIVVENVERNSENNSPKEATILSMHEITSA LIGVATVLSVVFLPMAFFSGSTGVYIRQFSITISSMVLVVALTLTPA LCATILKPHKEQESNKKGFYIWFTKKFEELTKRYKNRLHKVLESPKK YMFYIILIIIGILTVFFMKLPTSFLPKEDQGSLIVRYTLVPGAVTSRTVDIA ENIKNYFLTEEKNNVNSVFTISGNSSQNSGMAYISLKSVDLRSQYENT SEVIAQRASKTFSNPNSPYFIRDAKIFTMSPVQGLGATDGFQFLQ ADAGTAREKLAQVKDKILEEVQNEKISSIRSDDSEDTPQLKIVYDMEK AFSLGLSIKDIDSTLSAAWGGIYVNDFIDRSRVKRVYIQGEAPYRSKPE DLTYWVKVNSNGTMTSFREFATTSWEYGPTELTRYNGFASYELEGS AALGVSSGVAMDEMDKIADSQASGTMHAWGASQYERLSSGQAGIL YTISILVIFLCLAALYESWSVPFSILMVIPLGVVAVLAVYFRGLDNDVY FQVALLTTIGLVAKNAILIVEFVDLYKKGVPLEAAIKGATLRLRPVIM TSLAFIAGIPLAISTGAGANSRISIGTGIIGGTLTATILAIFFVPLFFVLIK NIFSKKENTHE
	<i>areF</i>	MNKINISIIITLIFSGCTLAPNLEPLDSNVIPQTFKNNSEIENSSDDL KPNWENFVQDETLKVVSLALENNKDLKIALLNIESARATYRIARADN FPTFDAGSATHSKSMNSNSTSISHNYSANISASYEIDLFKQVRSLSQ SALDSFLSTQYAANATKISLISETITAWITLAIHQEQKLKATETVKNLEK VYELTQKRYLAGVVSKTDVFDKASLNEAQISVISYSNSVEQDKNALE LIVAQPLNDDLLPKNLEHTSWLMLVKPAISSNILLARPDIMQAEYNL SKNANIGAARAAFFPTISLTANSIARNSDLFNGNAQNVVWFSFNPIS IPIFSGGENMANLDYTYAQRDIALQEYEKSIQTAFKEVNDALIIKKTINE QIQKQKELVEAVSKSYDISLNSYKIGIGSFLNVLTSQRTLINAQQT YLSELTNRVNLVSVFVGGNEKAVVIH

Estirpe de
A. butzleri

Identificação

Sequência da proteína

AB28/11	<i>areD</i>	<p>MLKQSKLLIFTLFSLLFLGCDNKSNDFKTQQIEVGTITLKEQTVALQQ NLSGRVKAKLVSEVRPQISGIIKDRLFVEGSFVKQGDILYKIDEATYKA TFNQAKASLESAKANLQTAQLKSQRYEELLKVDGISQQETDDAKANY LQAKALVEEKIAALES AKIDLERTNIKAPISGYIGISSVTKGALVSANQA DALTTIRDNSNVYVDLNQSQNELLALKKLLSKENIKKGNAEVTLTSLD NSIYPYKGIQLQEQINVDENTGTVTLRAEFPNNEGLLLSGMFVRATIQ SAVDSKAFLLPQQAVSRDSKANPIITIVNEDNSTKKQQIIDRAIENYWL VTSGITSNDKIIIIEGLNKINPKSIVKPVVDTNKYIKKD</p>
	<i>areE</i>	<p>MIAKFFVNRPIFAWVISLVIMIAGTVSLYTLPEQYDPDIAPPQINISTTY TGASAETVENSVTQIIHQQLTGLDGMIFSSSSSTGNARISVTFQQGT DPDTAQVQVQNKVSSILSRLEPEDVQRQGVVVKVQDFLLASVYDE TSKAQKIDIADYLVSNLQDSIARIDGVGEVQVYGGQYAMRIWLDPIKL ESYNLMPSDVQSAITAQNSQASAGSLGALPTLENQQLSVTVTARSKF KVVQEFENIIKSNTDGSFVKIKDIAKVEIGSQSYNVVTSLNGFPSSGIAI QLASGANAVKTANAVKDFLAKSEASLPEGYKIDYPRDSTLFIKASIKEV VKTLFEAILLVIAMVIFLKNYRATLIPAIAPVVILGTFGILNILGYSINT LTMFGMVL SIGLLVDDAIVVENVERNMSENNLSPEATILSMQEITSA LIGVATVLSVFLPMAFFSGSTGVYIRQFSITIISSMVLSVVVALTLTPA LCATILKPHKEQESNKKGFYWFKKFEELTKRYKNRHLHKVLESPKK HMFYILIIIGILTIFFMKLPSTFLPKEDQGSLMVRYTLPVGA VSSRTVDIA ENIKNYFLTEKNVNSVFTISGNSSQNSGMAYISLKSVDLRSYENT SEVIGQRASKTFSNPNSPYFIRDAKIFTMSPVQGLGATDGFQFLQ ADAGTAREKLAQVKDILEEASKSEKISSIRSDSDETPQLKIVYDMEK AFSLGSLKIDIDSTLSAAWGGIYVNDFIDRSRVKRVYIQGEAPYRSKPE DLYTWVKVNSNGTMTSREFATTSWEYGPTQLTRYNGFASYLEGS AALGVSSGVAMDEMCKIADSQAAGTMHAWSGASYQERLSSGQAGIL YAISILVIFLCLAALYESWSVPFSILMVIPLGVVAVLAVYFRGLDNDVY FQVALLTTIGLVAKNAILVEFVDTLYKKGVPLIEAAIKGATLRLRPVIM TSLAFIAGIPLAISTGAGANSRISIGTGIIIGGTLTATILAIFVPLFFVLIK NIFPKKENTHE</p>
	<i>areF</i>	<p>MNKINISIILTTLFSGCTLAPNLEPLDSNVIPQTFKNNSVENSSDDLVLV KPNWENFVQDERLKKVVSLALENNKDLKIALLNIESARATYRIARN FPTFDAGKSATHSKSMNSEDSTSISHNYSANISASYEIDLF GKVRSLSQS ALDSFLSTQYAANATKISLISETITAWITLAIHQEQKLKATETVKNLEKV YELTQKRYLAGVVSKTDVFDKASLNEAQISVISYSNSVEQDKNALELI VAQPLNDDLLPKNLETHSSWMLVVKPAISSNILLARPDMKAEYNLKS NANIGAARAAFFPTISLTANSGLASRSLDFNGNAQNVWSFSPNISPI FSGGENMANLDYTYAQRDIALQEYEKSIQTAKEVNDALIIRKTINEQI QKQKELVEAVSKSYEISLNSYKIGIGSFLNLVLSQRTLINAQQTLINYS LELTNRVNLVSVFVGGNEKIN</p>