

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Caroline Costa

**Identificação de cepas *Escherichia coli* patogênicas com potencial
de secreção da toxina autotransportadora de *Enterobacteriaceae Vat*
(Vacuolating autotransporter toxin)**

São Paulo
2020

Caroline Costa

Identificação de cepas *Escherichia coli* patogênicas com potencial de secreção da toxina autotransportadora de *Enterobacteriaceae Vat* (Vacuolating autotransporter toxin)

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Toxinas de Interesse em Saúde.

Orientador (a): Dr^a Rita de Cássia Ruiz

São Paulo

2020

Dados internacionais de catalogação na publicação

Costa, Carolaine

Identificação de cepas *Escherichia coli* patogênicas com potencial de secreção da toxina autotransportadora de *Enterobacteriaceae Vat* (Vacuolating autotransporter toxin) / Carolaine Costa; orientador (a) Rita de Cássia Ruiz. – São Paulo, 2020.

41 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde.

1. Toxina Vat. 2. Serino-protease autotransportada de *Enterobacteriaceae* (SPATE). 3. *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) 4. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). I. Ruiz, Rita de Cássia. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Identificação de cepas *Escherichia coli* patogênicas com potencial de secreção da toxina autotransportadora de *Enterobacteriaceae Vat* (Vacuolating autotransporter toxin).

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Carolaine Costa, aluna do curso Toxinas de interesse em saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 13 de fevereiro de 2020


.....
aluno(a): Carolaine Costa


De acordo:.....
Orientador(a): Rita de Cássia Ruiz

Erros são, no final das contas, fundamentos da verdade.

Se um homem não sabe o que uma coisa é,
já é um avanço do conhecimento saber o que ela não é.

Carl Jung

AGRADECIMENTOS

À Dra. Rita de Cássia Ruiz, pela orientação e pelos diversos aprendizados durante esse percurso;

Agradeço ao Paulo Cezar Gomes Vieira, por todos os ensinamentos e auxílio nos experimentos;

À Juliana Rodrigues pelo carinho e pelos bons conselhos;

À Laís Gomes pelas risadas e companhia nas aulas teóricas;

Aos meus colegas do curso e do laboratório por me permitirem fazer parte de suas histórias e por compartilharem comigo um pouco da história de cada um;

À Carolaine de sete anos atrás por nunca ter desistido dos seus sonhos, os quais são as minhas realizações de hoje;

Aos meus queridos e excepcionais filósofos da música Bangtan Sonyeondan mais conhecidos como BTS (방탄소년단) pela companhia nos dias mais difíceis e por ter me acompanhado nessa jornada de conhecimento pessoal;

A todos os funcionários, alunos e colaboradores do laboratório de bacteriologia pelos conhecimentos, exemplos e valores transmitidos;

Aos meus pais e irmãos, que pela escolha da vida são minha família;

À Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo – CEFOR/SUS-SP pela bolsa;

A todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram a percorrer o caminho certo.

Muito obrigada!

RESUMO

COSTA, Carolaine. **Identificação de cepas *Escherichia coli* patogênicas com potencial de secreção da toxina autotransportadora de Enterobacteriaceae Vat (vacuolating autotransporter toxin)**. 2020. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

As serino-proteases autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATE) constituem uma família de proteases secretadas pelo sistema de secreção do tipo V, cujos genes foram estudados em *Escherichia coli* intestinal e extraintestinal. Vat é uma SPATE citotóxica de 140 kDa, a qual o gene foi identificado pela primeira vez em APEC (Avian Pathogenic *Escherichia coli*) isolado de colibacilose em frangos de corte ocasionando lesões em órgãos internos associados a septicemia. Estudos recentes analisam a relação desta citotoxina em cepas isoladas de infecção extraintestinais (ExPEC), principalmente *E. coli* isoladas de infecção urinária (UPEC) e septicemia. Além disso, o nosso grupo identificou o gene *vat* em cepas de *E. coli* enteropatogênica (EPEC). O objetivo deste trabalho foi contribuir para um projeto amplo sobre a expressão e função de Vat em *E. coli* patogênica humana, não APEC, identificando cepas de *Escherichia coli* patogênica (UPEC e EPEC) secretoras de Vat. Na confirmação da presença do gene *vat* em duas cepas de EPEC (BA 1250 e BA 1244) e uma UPEC (DV 33) constatou-se que a cepa BA 1244 não apresentava mais o gene e por isso esta cepa foi excluída do estudo. A presença de outras SPATEs como Pet e Pic que poderiam se presentes, interferir na identificação de Vat, também foram investigadas nas cepas DV 33 e BA 1250. Em nenhuma das duas cepas a expressão de Pet foi demonstrada. No entanto, a cepa DV 33 secretou Pic sendo está também excluída do estudo. As condições de cultivo da cepa BA 1250 para a obtenção do sobrenadante do cultivo, rico em proteínas, para a identificação de Vat foram padronizadas. Uma banda de massa molecular de 111 kDa que corresponde a massa molecular (sem a porção do β barril e peptídeo sinal) de Vat foi identificada. Uma nova corrida eletroforética será realizada a fim de se obter uma banda mais forte, bem delimitada que possibilite o envio para a identificação.

Palavras-chave: Toxina Vat. Serino-protease autotransportada de Enterobacteriaceae (SPATE). *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Aquisição de fatores de virulência.....	10
1.2 <i>E. coli</i> patogênica.....	11
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> Extraintestinal (ExPEC).....	11
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> diarreinogênica (DEC).....	13
1.2.2.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	13
1.3 Toxinas Bacterianas.....	14
1.3.1 Endotoxinas	14
1.3.2 Exotoxinas	14
1.3.3 Serino-Proteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs).....	15
1.3.3.1 Vat (Vacuolating autotransporter toxin)	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Cepas Bacterinas.....	20
3.2 Lisado bacteriano.....	20
3.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	21
3.4 Eletroforese em Gel de Agarose	21
3.5 Cinética de Bactérias	22
3.6 Precipitação das proteínas do sobrenadante do cultivo bacteriano	22
3.7 Dosagem de proteínas.....	22
3.8 Gel de poliacrilamida SDS-PAGE	23
3.9 Coloração do gel.....	23
3.10 <i>Western blotting</i>	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Caracterização das cepas bacterianas	25
4.1.1 Pesquisa do gene <i>vat</i>	25
4.1.2 Pesquisa de Pic.....	26
4.1.3 Investigação da presença de Pet.....	28

4.2	Padronização das condições para obtenção do sobrenadante de cultivo bacteriano para identificação de Vat.....	30
4.2.1	Estabelecimento do tempo de cultivo bacteriano.....	30
4.2.2	Dosagem de proteínas.....	31
4.3	Obtenção do material para análise por espectrometria de massa	32
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
6.	OUTRAS ATIVIDADES INCLUSAS NO TREINAMENTO DURANTE O PERÍODO DA ESPECIALIZAÇÃO	35
6.1	Treinamento geral.....	35
6.2	Treinamento específico.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli pertence à família das *Enterobacteriaceae*, podendo ser encontrada no meio ambiente, alimentos e em animais homeotérmicos (PATERSON *et al*, 2012; KUHNERT *et al*, 2000). Esta bactéria apresenta formato bacilar e está inserida dentro do grupo das Gram-negativas anaeróbica facultativa. *E coli* é considerada uma bactéria comensal por fazer parte da microbiota de humanos desde o primeiro dia de vida (NATARO; KAPER, 1998). No entanto, esta espécie pode vir a adquirir fatores de virulência e tornar-se um agente de importância médica para a saúde pública.

1.1 Aquisição de fatores de virulência

A alteração do fenótipo bacteriano pode ocorrer de forma geral por uma mutação ou de um determinado gene. Eventos mutacionais podem levar à aquisição de fatores de virulência. Nos novos fenótipos decorrentes de eventos mutacionais sequências genéticas modificadas ou inseridas podem conferir vantagens ao microrganismo receptor, podendo torná-lo patogênico. Essas características são normalmente perpetuadas na progênie (FERREIRA; LIMA, 2015).

Existem diferentes maneiras pelas quais as bactérias podem transferir seu material genético. Na transferência gênica vertical, os genes são passados para os descendentes. Na transferência gênica horizontal, os genes podem ser adquiridos de outros microrganismos. Neste caso, esse fenômeno envolve uma célula doadora que contribui com uma parte de seu genoma, e uma célula receptora, que pode ser de espécie ou até gêneros diferentes (BAUMAN, 2009).

Há três mecanismos pelos quais a transferência gênica horizontal pode ocorrer, são eles: i) a conjugação possibilita a transferência de genes de virulência presentes em uma molécula de DNA extra-cromossomal, denominada plasmídeo, entre duas bactérias através do pili sexual (THOMAS; NIELSEN, 2005); ii) a transformação, ocorre pela captação de DNA extracelular, proveniente de cromossomos, plasmídeos ou fagos, dispersos no ambiente, por uma bactéria no processo de recombinação (BRIGULLA; WACKERNAGEL, 2010); iii) a transdução

cujo o mecanismo de transferência gênica ocorre entre bactérias, mas é mediado por vírus bacterianos, denominados de bacteriófagos (fagos) (TENOVER, 2006).

Considerando os mecanismos de aquisição de genes os quais são fundamentais na aquisição dos fatores de virulência é que uma *E. coli* comensal pode torna-se patogênica podendo causar infecção tanto intestinal como extraintestinal.

1.2 *E. coli* patogênica

1.2.1 *E. coli* Extraintestinal (ExPEC)

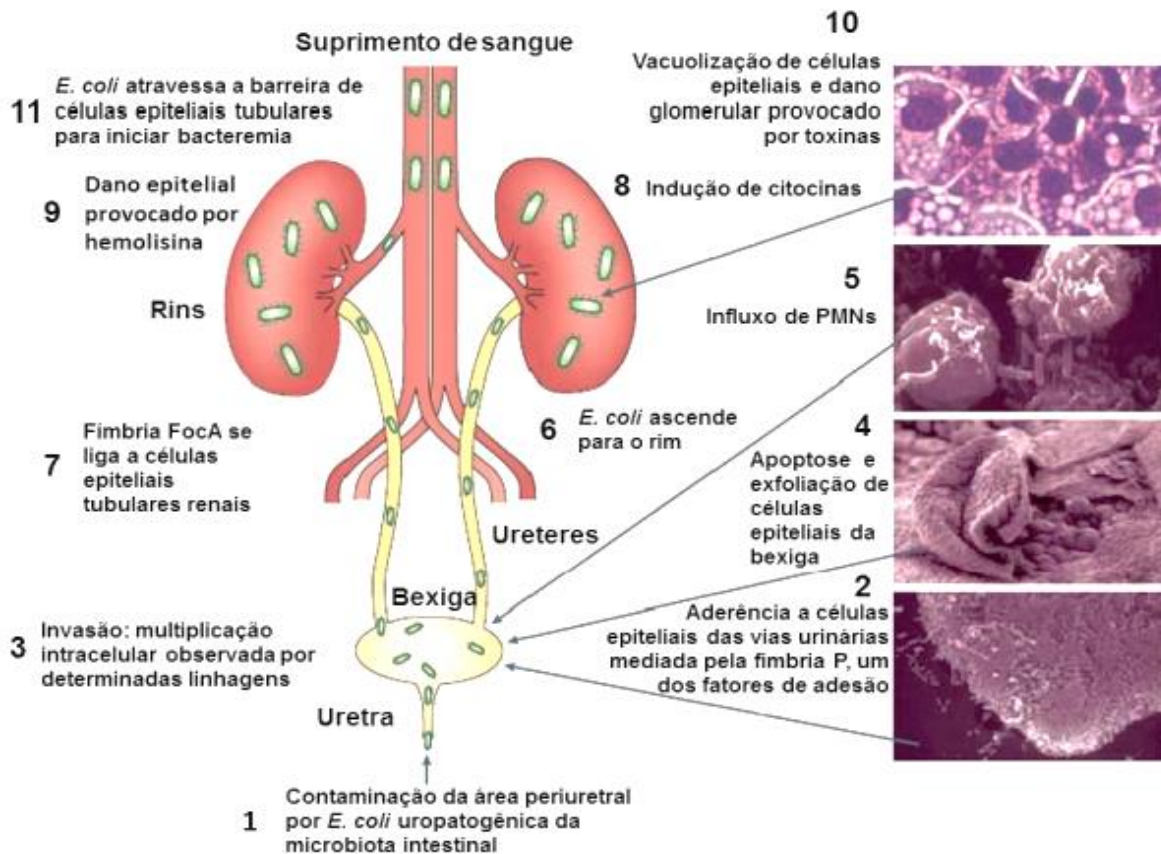
São denominadas de ExPECs (Extraintestinal Pathogenic *E. coli*) as bactérias que podem causar infecção extraintestinal como a infecção urinária (ITU), meningite e septicemia (KÖHLER; *et al.*, 2011). Entre as ExPECs a *E. coli* uropatogênica (UPEC) responsável pela infecção urinária é a mais frequente.

As UPECs possuem fatores de virulência que facilitam seu crescimento e persistência dentro do ambiente adverso do trato urinário (figura 1) sendo que a severidade da infecção é determinada pelos fatores de virulência e pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (KAPER *et al.*, 2004).

Os fatores de virulência de UPEC incluem adesinas, sideróforos, antígenos polissacarídicos/capsulares e toxinas. A presença desses fatores possibilita a bactéria se ligar e lesar as células e os tecidos do hospedeiro fora do trato intestinal. Uma vez no trato urinário, subvertem os mecanismos de defesa e estimulam a resposta inflamatória no hospedeiro (GUYER *et al.*, 2000).

As UPECs são conhecidas por expressarem várias classes de adesinas que auxiliam na ligação aos receptores específicos de células epiteliais do trato urinário. As adesinas, por exemplo, do grupo fímbria P e fímbria tipo 1 participam na colonização e desempenham um papel de extrema importância no desenvolvimento de ITU (FLORES-MIRELES, 2015).

Figura 1 - Patogênese da infecção do trato urinário por *E. coli* uropatogênica. (PMNs – Polimorfonucleares)



Fonte: Adaptado de KAPER *et al.*, 2004.

As fimbrias do tipo 1 contém a adesina FimH que medeia a ligação da bactéria à uroplaquina da célula epitelial da bexiga. Por outro lado, a glicoproteína Tamm-Horsfall, presente na urina do hospedeiro, inibe a aderência bacteriana ao trato urinário, pois é capaz de se ligar a fimbria tipo 1 e inibir sua ligação aos receptores de uroplaquina. Já a fimbria P é conhecida por estabelecer ligações com o antígeno do grupo sanguíneo P, um glicosíngolípido expresso na superfície de células epiteliais dos rins. Cepas de UPEC com fimbrias P promovem bacteriúria mais rapidamente e induzem uma resposta inflamatória mais intensa (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015; WULLT *et al.*, 2003; MARRS *et al.*, 2005; PAK *et al.*, 2001).

1.2.2 *E. coli* diarreinogênica (DEC)

E. coli diarreinogênicas (DEC) é a denominação das cepas de *E. coli* responsáveis pelas infecções intestinais, causando danos tanto na mucosa dos homens, como dos animais. As DEC são divididas em diferentes categorias ou patotipos que foram definidos com base: no padrão de adesão da bactéria às células epiteliais de linhagens (células HEP-2 ou HeLa), na presença de determinados marcadores de virulência, como adesinas, toxinas e invasinas e na clínica induzida na infecção. As DEC foram classificadas em seis categorias que são: *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Escherichia coli* com padrão de adesão difusa (DAEC), *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) está a primeira descrita como categoria de DEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; CROXEN et al., 2013).

1.2.2.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

EPEC é causadora de uma das infecções mais comuns de diarreia em crianças de países em desenvolvimento (OCHOA; CONTRERAS, 2011). O mecanismo de patogenicidade é denominado de lesão A/E (*attaching and effacing*). Essa lesão se caracteriza pela desestruturação das microvilosidades intestinais, e forte adesão entre a bactéria e o enterócito, resultando na formação de uma estrutura semelhante a um pedestal com acúmulo de actina e outros componentes do citoesqueleto (KAPER, 1996; ROCHA et al., 2017).

As principais proteínas efetoras responsáveis pelo desencadeamento da adesão íntima e lesão A/E são a intimina e seu receptor Tir. A interação intimina-Tir permite a ancoragem da EPEC na superfície da célula hospedeira, inicia processos de sinalização celular e reorganiza os componentes do citoesqueleto para formar o pedestal (GOOSNEY et al., 2000; BUERIS et al., 2008).

Em 1995, as EPECs foram classificadas em típicas e atípicas. As cepas que possuem o plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*) são chamadas de EPEC típicas (tEPEC) e apresentam sempre o padrão de adesão localizada ou LA (*localized adhesion*), enquanto as atípicas (aEPEC) além da ausência do plasmídeo,

podem apresentar padrões de adesão diversos como adesão localizada-*like* (LAL), difuso (AD) e agregativo (AA) este característico das EAECs (HU; TORRES, 2015).

1.3 Toxinas Bacterianas

As toxinas bacterianas são substâncias capazes de causar danos ao organismo do hospedeiro. As toxinas são definidas como substâncias solúveis, usualmente de natureza proteica, que alteram o metabolismo normal da célula ou do tecido do hospedeiro levando a efeitos deletérios variáveis. As toxinas foram inicialmente classificadas como endotoxinas e exotoxinas.

1.3.1 Endotoxinas

As endotoxinas são também denominadas de lipopolissacarídeos (LPS) e estão associadas à membrana externa de bactérias Gram-negativas. O LPS é responsável pela estabilidade e organização da membrana. Em geral, os lipopolissacarídeos apresentam estrutura anfifílica composta de uma cabeça polar heteropolissacarídica e uma cauda apolar (lipídeo) (PIAZZA et al., 2015)

Na maioria das espécies o LPS é constituído por três regiões distintas: a região do Antígeno O, lipídeo A e o cerne. O antígeno O consiste em uma variedade de resíduos oligossacarídicos. Além disso, o Ag O é variável e define a sorologia e identidade da bactéria (PIAZZA et al., 2015).

O lipídeo A é um glicolípido composto de dissacarídeos, que é composto por ácidos graxos de cadeia longa com grupamentos amida e éster, sendo esta parte a responsável pela maioria das atividades biológicas da molécula, ou seja, sua ação tóxica. O cerne consiste de um pequeno número de açúcares comum a praticamente todas as enterobactérias (PIAZZA et al., 2015, RAETZ, 1990).

1.3.2 Exotoxinas

As exotoxinas podem ser polipeptídeos únicos ou complexos de proteínas heteroméricas que atuam em diferentes partes das células. Na superfície celular, eles podem se inserir à membrana e abrir um poro, se ligar à receptores para iniciar

sua captação ou facilitar interações com outros tipos de células. Já nas atividades intracelulares, as exotoxinas precisam ser translocadas para dentro da célula (SASTALLA *et al.*, 2016).

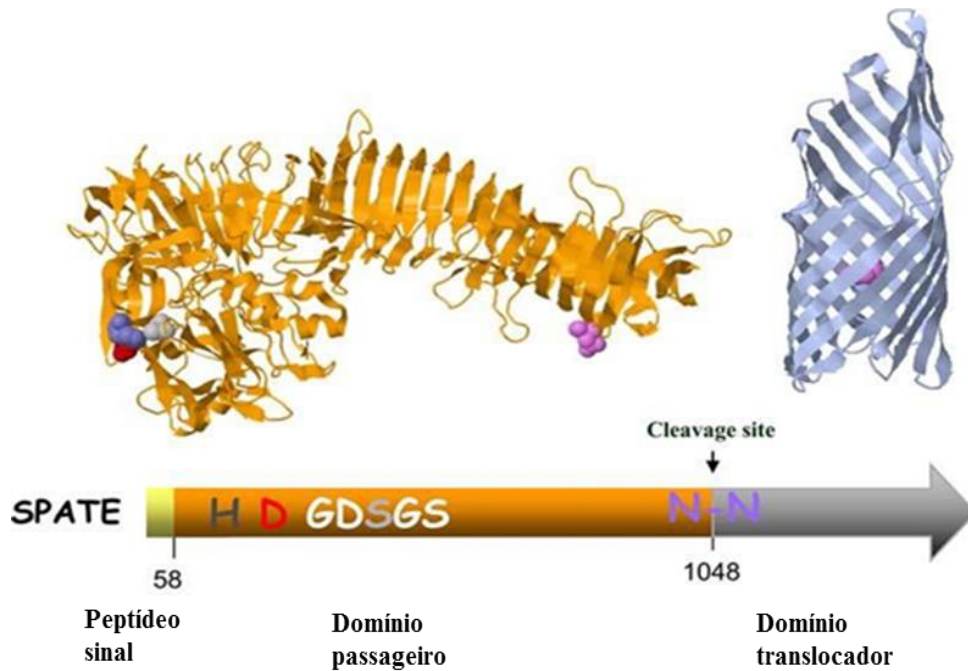
As exotoxinas podem ser classificadas de acordo com diferentes parâmetros, como pelo organismo produtor, pela estrutura, por exemplo, A, B, C.

Atualmente as exotoxinas que podem ser classificadas como: do tipo I, que correspondem aos superantígenos e as toxinas da família ST; do tipo II, sendo estas formadoras de poros, ocasionando a morte e lise das células eucarióticas; e como do tipo III que são toxinas cuja ação é intracelular, ou seja, possuem habilidade de entrar no citoplasma da célula alvo, onde pode exercer diferentes efeitos (PIAZZA *et al.*, 2015). Contudo, um grupo de exotoxinas da família das serino-proteases autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATE) vem sendo alvo de vários estudos em cepas bacterianas com diferentes especificidades.

1.3.3 Serino-Proteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs)

As proteínas pertencentes à família SPATE exibem as características típicas das autotransportadoras, assim como mostrado na figura 2, elas são compostas por três domínios: um peptídeo sinal N-terminal, um domínio passageiro (efetor) e um domínio C-terminal. Durante a translocação as ATs são transportadas através da membrana interna mediante o Sec-translocon, uma vez no periplasma, o domínio C-terminal se dobra como um β -barril na membrana externa, formando um poro. O domínio passageiro é então translocado através da membrana externa, clivando assim o β -barril e sendo liberado no meio extracelular, onde então cumprira sua função, que normalmente está relacionada à virulência (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

Figura 2 – Esquema da estrutura das proteínas autotransportadoras.

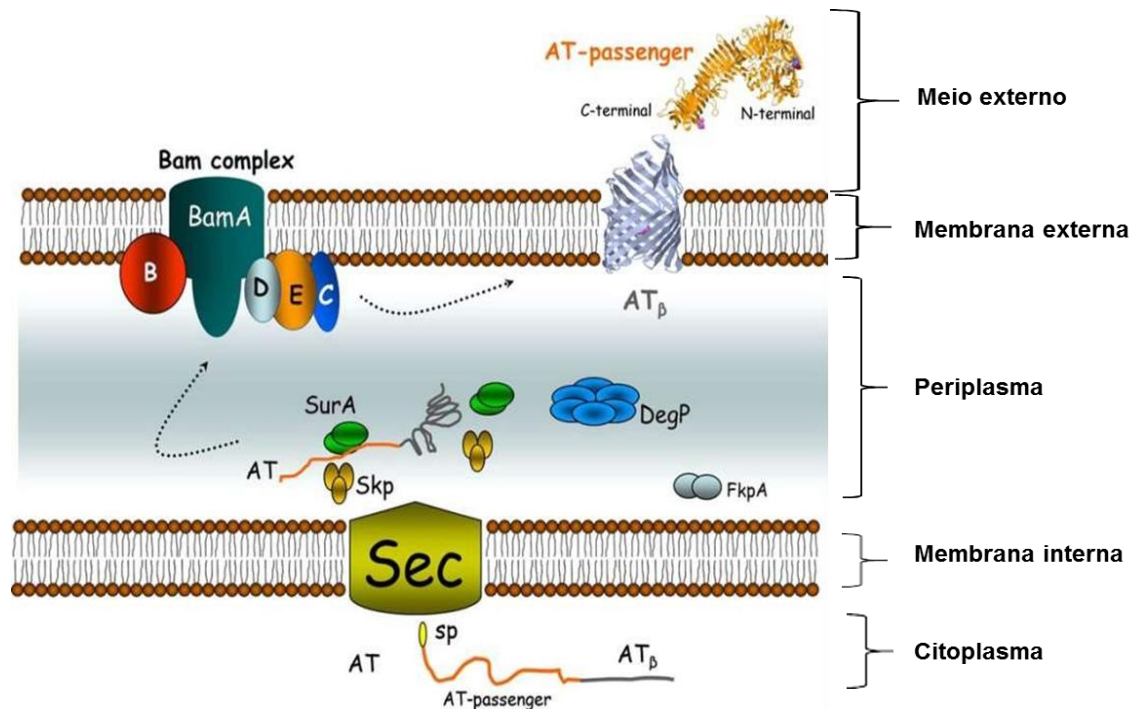


Esquema da estrutura das proteínas autotransportadoras. Peptídeo sinal (amarelo), domínio passageiro (laranja) e domínio translocador (cinza).

Fonte: Ruiz-Perez; Nataro, 2014.

As SPATEs compreendem um grupo diversificado de proteínas autotransportadoras que contribuem para a virulência das bactérias. O termo "autotransportadoras" (ATs) é dado porque essas proteínas são secretadas pelo sistema de secreção do tipo Va de bactérias gram-negativas como mostra a figura 3. As autotransportadoras possuem diversas funções, contudo supõe-se que elas compartilham um mesmo mecanismo de exportação (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011)

Figura 3 – Sistema de secreção tipo V em bactérias Gram-negativas.



Sistema de secreção tipo V em bactérias Gram-negativas. A proteína formada no citoplasma liga-se ao sistema Sec na membrana interna pelo peptídeo sinal. A proteína é translocada para o periplasma e chaperonas, como SurA, Skp, DegP e FkpA, ligam-se à proteína para estabilizá-la. O domínio translocador insere-se na membrana externa, catalisada pelas proteínas do complexo Bam, formando um poro, por onde o domínio passageiro é transferido para o meio externo.

Fonte: Ruiz-Perez; Nataro, 2014.

A família das SPATEs apresenta como sítio ativo uma tríade catalítica (Ser/His/Asp), a qual induz a atividade proteolítica, esta família inclui mais de 25 proteases com substratos diferentes, distribuídos em diversos organismos, e são divididas em duas classes (de classe I ou II), com base na filogenética, podendo apresentar duas distintas sequências de aminoácidos no domínio passageiro ou no domínio alfa, região que apresenta características funcionais da proteína (JAIN *et al.*, 2006; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

As SPATEs de classe I são aquelas cujo genes codificadores de proteínas demonstram citotoxicidade *in vitro* e atividade enterotoxigênica em tecidos animais com alvos intracelulares, dentre elas temos duas toxinas bastante estudadas: Sat - toxina autotransportadora secretada (GUYER *et al.*, 2000) e Pet - toxina codificada por plasmídeo (ESLAVA *et al.*, 1998).

As de classe II são conhecidas como imunomoduladoras, apresentando atividade proteolítica, como mucinase, e habilidade de aderir à glicoproteínas, os principais alvos estão presentes no compartimento extracelular e incluem as toxinas: Pic - proteína envolvida na colonização (HENDERSON *et al.*, 1999) e Vat - toxina autotransportadora vacuolização (SALVADORI *et al.*, 2001), dentre outras.

Dentre as SPATEs a toxina Vat tem se destacado bastante nos últimos anos devido a presença de isolados em amostras clínicas de UPEC, sendo ela conhecida por contribuir para a adequação deste patótipo em infecções por sepse em murinos (NICHOLS *et al.*, 2016).

1.3.3.1 Vat (vacuolating autotransporter toxin)

O gene *vat* foi originalmente identificado em uma ilha de patogenicidade (PAI) designada como VAT-PAI da cepa de *E. coli* patogênica aviária (APEC) sendo esta responsável por colibacilose em aves, tendo como característica a formação de lesões fibrinosas em órgãos internos associados a septicemia. A proteína Vat tem tamanho de 140 kDa e é processada durante a translocação para liberar um domínio passageiro de ~ 111 kDa no meio extracelular (ARAGÃO, 2010; ANDRADE, 2005; EWERS *et al.*, 2007; NICHOLS *et al.*, 2016).

A similaridade genética entre APEC e UPEC sugere uma origem ancestral comum (CROXEN; FINLAY, 2010; JOHNSON *et al.*, 2007). Alguns estudos mostraram relação positiva entre APEC e ExPEC, principalmente UPEC e *E. coli* causadora de meningite recém-nascida (NMEC), sugerindo que algumas cepas de APEC podem ser consideradas potenciais agentes zoonóticos (EWERS *et al.*, 2007; MOULIN-SCHOULEUR *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2008).

Diante dados que demonstram a alta frequência do gene *vat* em amostras bacterianas isoladas de diferentes nichos de infecção, faz-se necessário ampliar os estudos a fim de investigar o papel de Vat em patótipos diferentes de APEC.

2. OBJETIVOS

2.2 Objetivo geral

Contribuir para o projeto intitulado: Estudo da expressão e função da toxina Vat em cepas bacterianas não APECs (Avian Pathogenic *Escherichia coli*).

2.3 Objetivos específicos

- Identificar cepas de UPEC e EPEC com potencial de secreção de Vat;
- Padronizar as melhores condições de cultivo bacteriano e obtenção do sobrenadante do cultivo;
- Obter material para a identificação de Vat por espectrometria de massa no laboratório de toxinologia do Instituto Butantan.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas Bacterinas

Todas as amostras bacterianas foram mantidas em caldo tripticaseína de soja (TSB) acrescidas de glicerol a 20%. O cultivo bacteriano foi realizado em caldo Luria Bertani (LB) a 37°C, no período de 18h. Em seguida, algumas amostras foram semeadas em ágar MacConkey, para determinação da pureza e exclusão de contaminantes e incubadas por 18h à 37°C. Após a confirmação, uma colônia isolada era novamente cultivada em caldo LB para ser utilizada nos experimentos. Todas as cepas utilizadas como controle e para os testes são mostradas na tabela 1.

Tabela 1 - Amostras de *Escherichia coli* utilizados para realização do trabalho.

EXPERIMENTAL			CONTROLE		
Patótipo	Identificação	Sorotipo	Patótipo	Identificação	Sorotipo
UPEC	DV33	ONT:H31	NMEC	RS218	O18:H7:K1
EPEC	BA1250	ONT:H6	APEC	01	01:K1:H7
EPEC	BA289	O119:H15	EAEC	042	O127:H18
EPEC	BA1244	O55:H7	<i>E. coli</i>	HB101	Comensal
EPEC	E2348/69	O127:H6			

3.2 Lisado bacteriano

1 mL de cultura bacteriana crescidas *overnight* em meio TSB foram centrifugadas à 7.000 rpm, durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 100 uL de H₂O Milli Q estéril. As amostras foram homogeneizadas no vortex (Fisher Vortex Genie 2™) e levadas ao banho seco à 100°C, por 15 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado à 7.000 rpm durante

2 minutos. Ao fim deste processo o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril de 0,6 mL, identificado e estocado à - 20°C para posterior uso.

3.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

O PCR foi realizado para a identificação dos genes *vat* e *pet*. A sequência dos iniciadores específicos utilizados e os respectivos ciclos de amplificação estão mostrados na tabela. Para cada reação foram utilizadas 0,2 µM de cada um dos iniciadores específicos F (*forward*) e R (*reverse*), 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5 mM de MgCl₂, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen) e água Milli-Q estéril para o volume final de 25 µL ou 50 µL.

Tabela 2 - Condições de amplificação dos genes.

Gene	Sequência dos Iniciadores 5' 3'	Ciclo de amplificação	Produto (pb)	Temperatura de Anelamento	Controle (+)	Referência
<i>Vat</i>	AACGGTTGGTGGCAACAATCC AGCCCTGTAGAATGGCGAGTA	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 59°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	420	59°C	RS2018	Restieri <i>et al.</i> (2007)
<i>Pet</i>	GGCACAGAATAAAGGGGTGTTTT CCTCTTGTTCCACGACATAC	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 58°C 1' 72° C) e 7' 72°C	302	55°C	EAEC 042	Restieri <i>et al.</i> (2007)
<i>Pic</i>	CCGGTGACAACCTGCATAA CATAATTCCTGTTCCGTCA	5' 94°C; 30 x(1' 94°C, 1' 60°C, 1' 72°C) e 7' 72°C	978	60°C	EAEC 042	Abreu <i>et al.</i> (2016)

3.4 Eletroforese em Gel de Agarose

Para o preparo dos géis foi dissolvido 3 g de agarose em tampão TAE 1 X (Tris – base 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM), sendo o volume final de 30 mL, esta solução foi fundida por aquecimento no micro-ondas até homogeneização, evitando a fervura. Após o resfriamento, antes da solidificação foi adicionado 2 µL do corante Unisafe Dye ® (20.000x) para uma pré-coloração na eletroforese. Foi adicionado aos produtos amplificados do PCR 1 µL de tampão de amostra (0,25%

azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 30% glicerol). Para estimativa do tamanho dos fragmentos de DNA foi utilizado o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram submetidos a uma corrente constante de 70 V imersos em tampão TAE 1X, com duração de 1h30 min. de corrida. Para visualização das bandas, os géis foram observados no transiluminador de luz ultravioleta (UVITEC Cambridge) e a imagem foi registrada por fotografia digital.

3.5 Cinética de Bactérias

As amostras bacterianas foram cultivadas em 3 mL de meio LB ou meio DMEM + 1% de Triptona, mantidas na estufa, com 5% de CO₂. Em seguida, foi inoculado 200 uL de uma cultura bacteriana crescida à 37°C overnight à um Erlenmeyer contendo 20 mL de meio LB ou meio DMEM + 1% de Triptona. Os Erlenmeyers foram mantidos sobre agitação (200 rpm) por 30 minutos à 37°C. A D.O (densidade óptica) foi determinada em 600 nm a cada 30 minutos de cultivo ao longo de 5 horas

3.6 Precipitação das proteínas do sobrenadante do cultivo bacteriano

O sobrenadante das culturas bacterianas foram precipitados por VivaSpin 20 (GE healthcare) com membrana de corte de 50 kDa ou por foram Ácido Tricloacético. No segundo caso à 1 mL da cultura bacteriana foram adicionados 200 µL de Ácido Tricloacético. Essa mistura foi incubada por 1 hora. Ao final desse período, as culturas foram centrifugadas a 16.900 x g, a 4°C por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, 500 uL de acetona fria foram adicionados ao precipitado e nova centrifugação foi realizada (16.900 x g, 4°C por 10 minutos). Após essa precipitação, o sobrenadante foi descartado e o mesmo procedimento repetido mais uma vez. As amostras foram secas em temperatura ambiente e mantidas posteriormente no Freezer à - 20°C.

3.7 Dosagem de proteínas

A quantificação da proteína foi determinada utilizando-se o Kit Pierce® BCA Protein, conforme as instruções do fabricante. A leitura foi realizada no leitor de Elisa (Uniscience), a 550 nm e as concentrações das amostras foram obtidas de acordo com a curva padrão de BSA (soro albumina bovina).

3.8 Gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A solução contendo a proteína precipitada foi submetida ao SDS-PAGE 12 %, com 1.5 mm de espessura em condições desnaturantes, seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram misturadas ao tampão (tris-(hidroximetil) aminometano hidrocloreto 0,25 M; dodecil sulfato de sódio 8 %; glicerol 80 %; azul de bromofenol 0,04 %; pH 6,8) acrescido de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) na proporção de 1:20. A eletroforese foi realizada nas seguintes condições: 100 V utilizando cuba de eletroforese vertical e fonte (Bio-Rad, EUA) contendo tampão Tris-Glicina (tris (hidroximetil) aminometano 3 %, glicina 14 %, dodecil sulfato de sódio 1 %) (Merck Darmstadt, Germany). O padrão de massa molecular utilizado foi o *Precision Plus Protein™ Standards*, com bandas de 10 a 250 kDa (Cat. nº 161-0375) (BioRad, EUA).

3.9 Coloração do gel

Na coloração por *Comassie*, o gel foi submerso no corante *Comassie Brilliant Blue* (Bio-Rad, EUA) por 1 h, com agitação leve, e descorado por metanol 45 % (Merck): ácido acético glacial 10% (Merck), com agitação de 25 rpm no agitador orbital (Lab-Line, modelo 4631, EUA), até que as bandas fossem visualizadas.

Na coloração por nitrato de prata, o gel foi fixado *overnight* com solução contendo 40 % de etanol: 10 % de ácido acético (Merck). Em seguida, foi lavado 2 vezes com etanol a 30 % (Merck) e 1 vez com água Milli-Q por cerca de 20 minutos cada lavagem. Após a lavagem, o gel foi tratado com solução de tiosulfato de sódio a 0,02% (Merck) por 1 min., seguido de 3 lavagens com água Milli-Q, 1 min. cada. Em seguida, o gel foi submerso em solução (nitrato de prata 0,2 %; formaldeído 0,02

%) por 20 min. Após 3 lavagens em água Milli-Q de 1 min cada, o gel foi submerso na solução de revelação (3 % carbonato de sódio, 0,0005 % tiossulfato de sódio, 0,05 % formaldeído) (Merck). No momento em que bandas de proteínas foram visualizadas, o gel foi submerso na solução de bloqueio (50% etanol:12% ácido acético) (Merck), por no mínimo 15 min. A solução de preservação (ácido acético a 1%) (Merck) foi utilizada para o armazenamento do gel.

3.10 Western blotting

Após a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, o gel foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose e o sistema úmido foi montado dispondo o gel entre duas camadas de papel de filtro, em um suporte para transferência (Bio-Rad, EUA). Este conjunto foi umedecido com tampão de transferência (48 mM Tris-base, 39 mM glicina, 20% metanol e 0,037% SDS pH 8,3) (Merck). A transferência foi realizada a 300 mA, por 60 min.

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com a solução PBS (tampão fosfato-salino) + 1 % de BSA, por 18 horas, e lavada 3 vezes com PBS Tween 0,05%. O anticorpo primário (anti-Pic ou anti-Pet) foi adicionado à solução diluente de 10 mL de PBS + 1% de BSA na diluição de 1:1.000 e incubado por 2 horas, em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBS Tween 0,05 % e, em seguida, o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich) foi adicionado na diluição 1:10.000 em PBS + 1 % BSA, incubando-se por 1 hora.

A membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBS + Tween 0,05% e revelada com solução de DAB-Diaminobenzidina (10 mg DAB + 15 mL tris 0,05 M pH 7,6 + 12 µL H₂O₂) (Sigma). Logo após a visualização de bandas, a reação foi bloqueada adicionando-se água purificada.

4. RESULTADOS / DISCUSSÃO

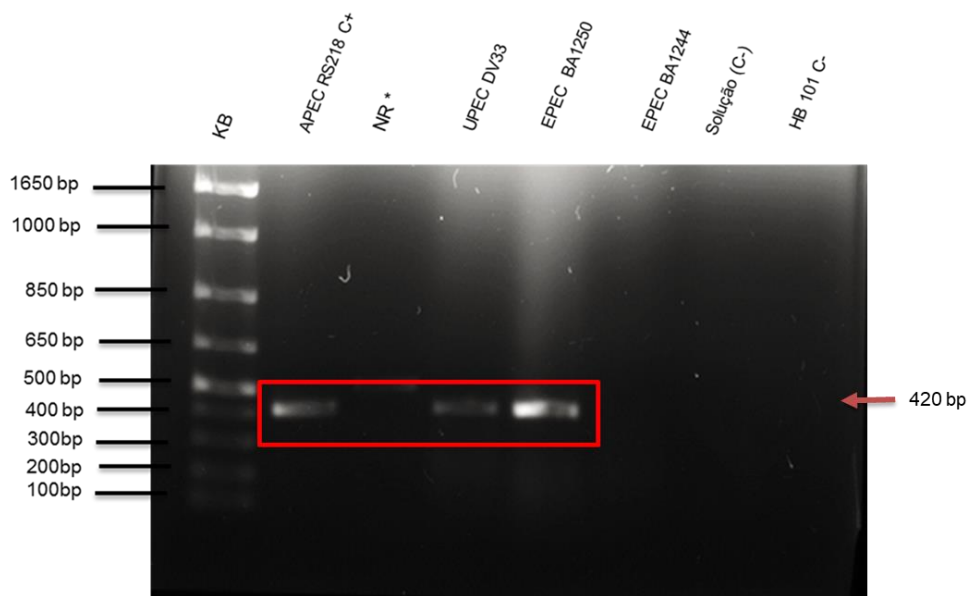
4.1 Caracterização das cepas bacterianas

4.1.1 Pesquisa do gene *vat*

O nosso grupo identificou em 2012 a presença do gene *vat* em duas amostras de EPEC (BA 1250 e BA 1244) e em 2014 em uma de UPEC (DV33). Estudos como os Parham *et al.* (2005) constataram a presença do gene *vat* nos mesmos patótipos. Com o interesse de iniciarmos os estudos com a toxina Vat, estas três cepas foram inicialmente reavaliadas quanto à presença do gene *vat* por PCR. Como controles foram utilizados uma cepa APEC RS218 (controle positivo) e a cepa HB101 (controle negativo).

Um produto de amplificação de 420 pb que corresponde ao fragmento do gene *vat* foi identificado na cepa de UPEC DV33 e EPEC BA 1250 como mostra a figura 4, mas não na cepa EPEC BA 1244 que provavelmente deve ter expelido ou perdido o plasmídeo que continha esse gene.

Figura 4 – Fragmento do gene *vat* das cepas BA1250 (EPEC) e DV33 (UPEC) amplificado por PCR



Fonte: Costa, Carolaine.

Peso molecular: KB – 1 Kb Plus DNA Ladder, NR* - Não relacionado.

Desta forma, a cepa BA 1244 foi excluída do projeto dando continuidade cepas gene *vat* + (BA1250 e DV33) . Ambas as cepas foram submetidas a novos experimentos para avaliar inicialmente a presença de outras proteínas da família SPATE .

Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo verificaram a ausência dos genes *sat* e *sigA* que codificam outras duas importantes proteínas da família SPATE, nas cepas BA 1250 e DV33. No entanto, a presença das SPATEs, *Pic* e *Pet*, não haviam sido investigadas.

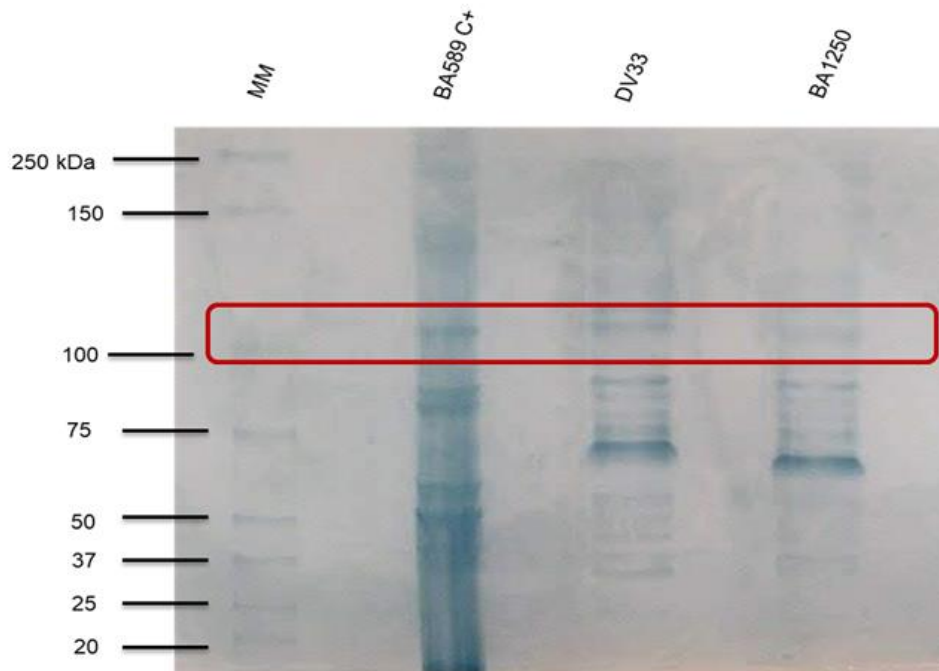
4.1.2 Pesquisa de Pic

A presença da proteína Pic foi investigada nas cepas BA 1250 e DV33 foram investigadas por *Western blotting*, visto que dispúnhamos do anticorpo anti-Pic. Dessa forma, o sobrenadante da cultura das cepas BA 1250 e DV33 foram precipitados por ácido tricloacético e, em seguida, submetidos ao *Blotting*.

Na figura 5 que corresponde ao SDS-PAGE, bandas pouco acima de 100 kDa, que equivale as SPATEs, são visualizadas no sobrenadante do cultivo de ambas cepas. No entanto, o blotting revelado com anti-Pic demonstra que apenas a cepa DV33 expressa Pic (figura 6).

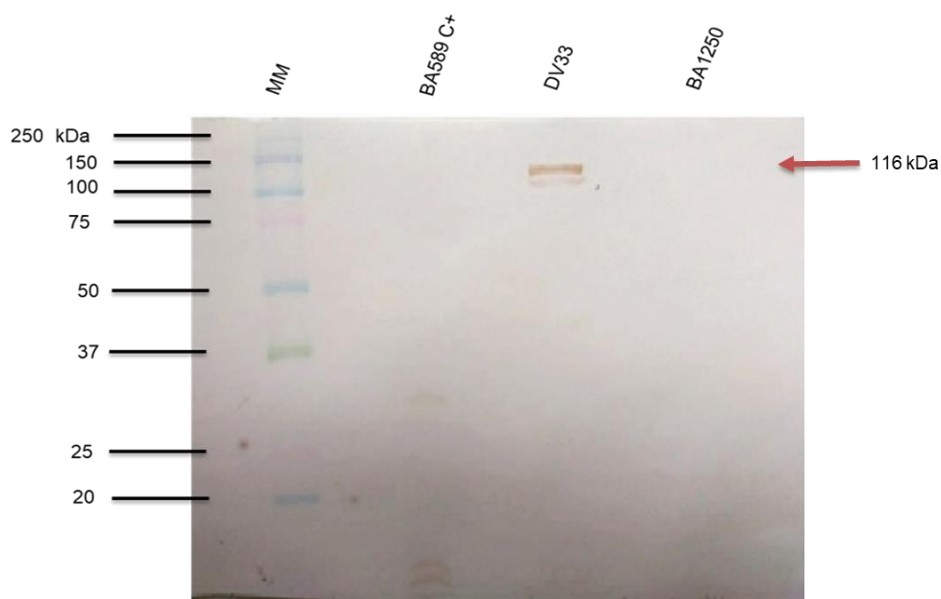
Dada a proximidade da massa molecular de Vat (111 kDa) e Pic (116 kDa), a presença de Pic interferiria na obtenção de Vat no sobrenadante do cultivo bacteriano, então por isso a amostra DV33 foi também excluída deste estudo. Embora a banda correspondente a Pic da cepa BA589, utilizada como controle positivo, não esteja visível, no papel de nitrocelulose foi possível visualizá-la fracamente.

Como a cepa BA 1250 não foi expressa Pic, o estudo prosseguiu com ela, desta forma o passo seguinte foi pesquisar a presença de *pet* na cepa BA 1250.

FIGURA 5 – Proteínas obtidas no sobrenadante do cultivo

Fonte: Costa, Carolaine.

O Sobrenadante de cultivo bacteriano das cepas BA 1250 e DV 33 foi concentrado, submetido ao SDS-PAGE e corado com *Coomassie blue*. Massa molecular (Precision Plus Protein Standards).

Figura 6 – Investigação da presença de Pic.

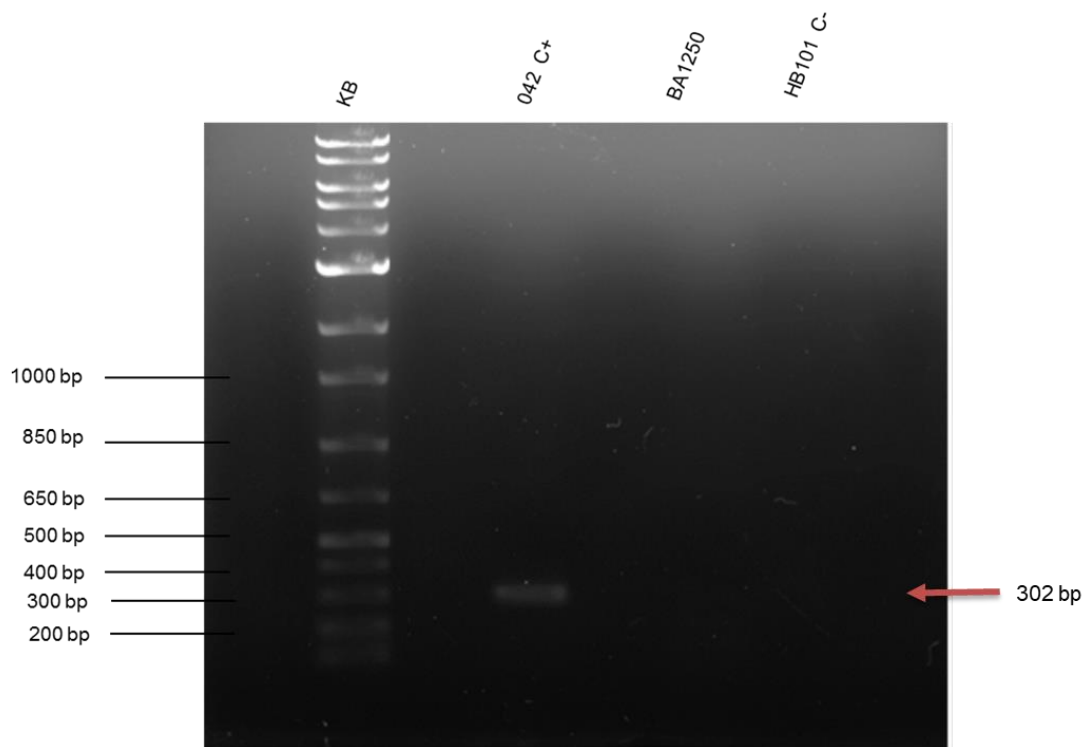
Fonte: Costa, Carolaine.

O Sobrenadante de cultivo bacteriano das cepas BA1250 e DV 33 concentrado foi submetido ao *Western Blotting* e revelado com anti-Pic. MM – Massa molecular (Precision Plus Protein Standards)

4.1.3 Investigação da presença de *pet*

A presença do gene *pet* na cepa BA 1250 foi investigada por PCR. A cepa EAEC 042 foi utilizada como controle positivo. Conforme mostra a figura 7 apenas na cepa EAEC 042 (controle positivo) o fragmento correspondente a parte do gene *pet* (320 pb) foi amplificado, indicando que a cepa BA 1250 não possui *pet*.

Figura 7 – Investigação da presença do gene *pet* na cepa BA1250 por PCR.

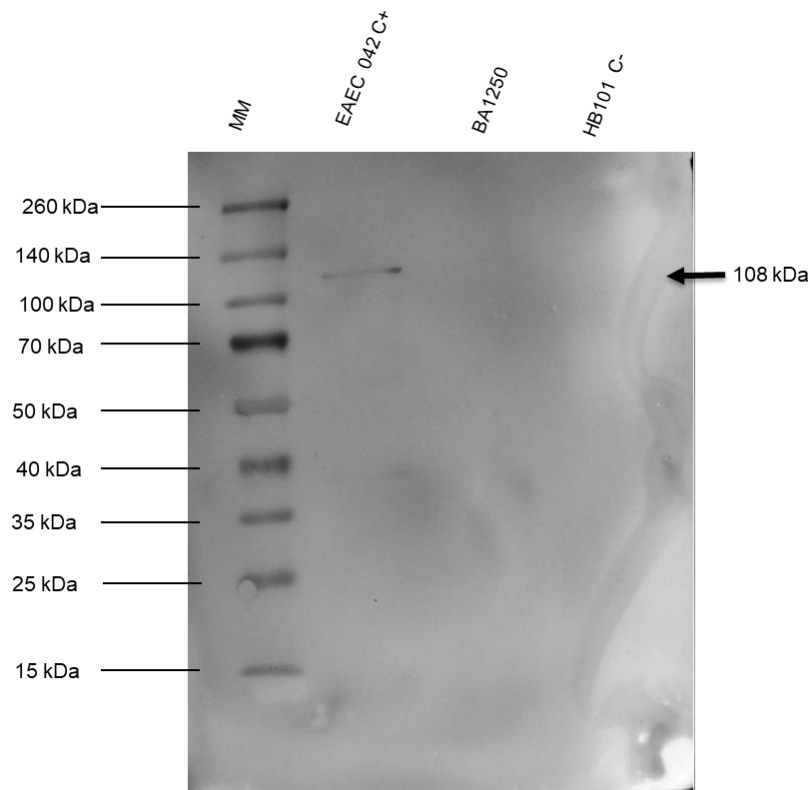


Fonte: Costa, Carolaine.

Peso molecular : KB – 1 Kb Plus DNA Ladder.

Ainda assim para confirmar a ausência desta proteína, o sobrenadante do cultivo da cepa BA 1250 (ONT:H6) foi submetido ao *Western Blotting* que foi revelado com anti-Pet confirmando a ausência da secreção de Pet pela amostra BA 1250, conforme mostra a figura 8.

Figura 8 – Confirmação da ausência da secreção de Pet pela cepa BA1250



Fonte: Costa, Carolaine.

O Sobrenadante de cultivo bacteriano da cepa BA1250 concentrado foi submetido ao *Western Blotting* e revelado com anti-Pet. Controles EAEC 042 (controle positivo) e cepa HB101 (controle negativo). MM – Massa molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific)).

4.2 Padronização das condições para obtenção do sobrenadante de cultivo bacteriano para identificação de Vat

Para a identificação de uma proteína por espectrometria de massa é necessário à obtenção de um gel de SDS-PAGE contendo a banda com peso molecular, correspondente à proteína de interesse, bem visível e bem delimitada (ANHALT et al., 1975; ASSIS et al., 2011). Para isso, tanto as condições do cultivo bacteriano como as condições de precipitação das proteínas presentes no sobrenadante do cultivo bacteriano devem ser padronizadas.

Nesta etapa, o objetivo foi obter um SDS-PAGE com uma banda bem definida, de aproximadamente 111,8 kDa que corresponde a massa molecular de Vat secretada (sem a porção correspondente ao β barril e peptídeo sinal) (NICHOLS *et al.*, 2016).

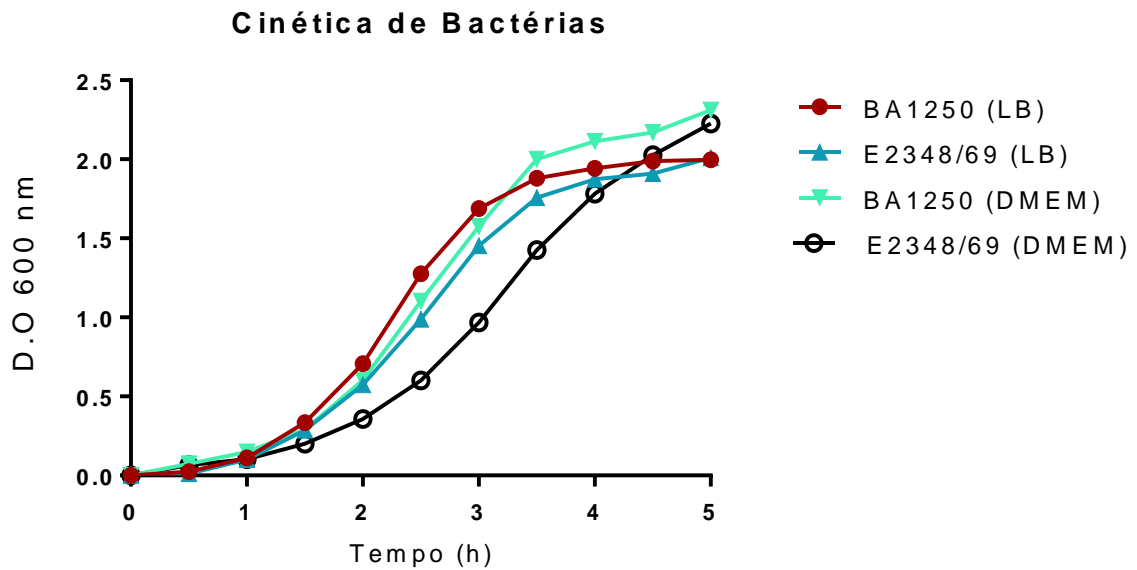
Abaixo segue a descrição das etapas ensaiadas para a obtenção do material adequado ao envio para identificação por espectrometria de massa.

4.2.1 Estabelecimento do tempo de cultivo bacteriano

Sabendo-se que a fase logarítmica do cultivo bacteriana segundo Tortora et al. (2012) é a melhor para a obtenção de proteínas secretadas, a cinética do crescimento da cepa BA 1250 foi estabelecida em dois meios de cultivo, meio LB específico para o crescimento bacteriano e meio DMEM, específico para o cultivo de células eucariontes, mas que quando acrescido de 1% de triptona, contribui no crescimento bacteriano

A partir do estabelecimento da cinética de crescimento (Figura 9) o tempo de cultivo de 2,5 h em DMEM contendo triptona, que corresponde à metade da fase logarítmica, onde as bactérias estão metabolicamente em melhores condições foi o escolhido para o cultivo e obtenção do sobrenadante.

Figura 9 – Cinética do crescimento bacteriano.



Fonte: Costa, Carolaine.

Cinética de crescimento das cepas BA1250 (EPEC), E2348/69 (EPEC protótipo). As cepas foram cultivadas em meio DMEM + 1% de triptona e meio LB a 37°C sob agitação de 200rpm. A D.O (600nm) foi determinada a cada 30 min. ao longo das 5 horas.

4.2.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína do sobrenadante do cultivo da cepa BA1250 cultivada em DMEM com 1% de triptona, precipitada por VivaSpin 20 (GE healthcare) com membrana de corte de 50 kDa ou ácido tricloacético foram estabelecidas.

Para realizar a quantificação das proteínas totais foi utilizado o método de Bradford, com o uso do Kit Pierce® BCA Protein.

Tabela 3 - Dosagem de proteínas totais presentes no sobrenadante do cultivo da cepa EPEC BA1250 obtido por dois métodos de precipitação.

Cepa	Método de precipitação	
	Ácido tricloroacético µg/mL	Vivaspin µg/mL
BA1250	303	715,65
RS218	521,5	NR*
HB101	189	NR*

Fonte: Costa, Carolaine.

NR* Não realizado

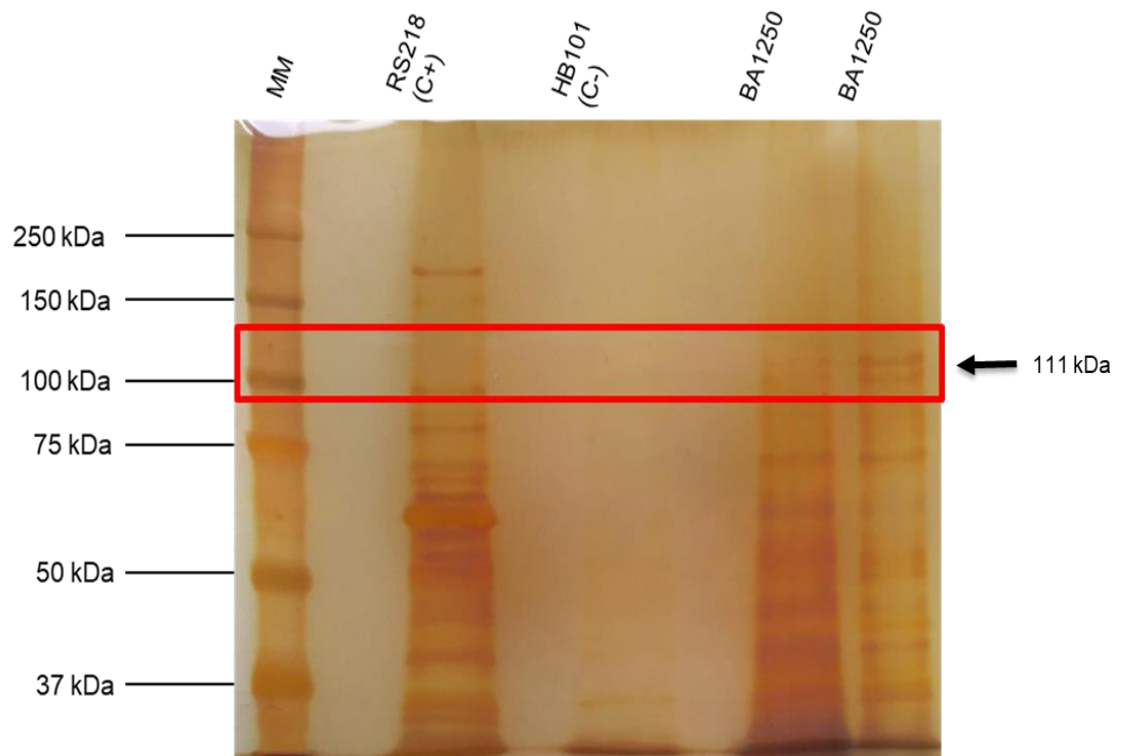
4.3 Obtenção do material para análise por espectrometria de massa

O sobrenadante de cultivo de bactérias cultivadas por 2,5 h em meio DMEM 1% de triptona, precipitado por ácido tricloroacético foi submetido ao SDS-PAGE (corado por nitrato de prata) para a obtenção de uma banda correspondente a massa molecular de 111 kDa (massa molecular da Vat secretada). A cepa bacteriana APEC RS218, secretora de Vat, foi submetida às mesmas condições e utilizada como controle positivo e a HB101 (*E. coli* comensal) foi utilizada como controle negativo.

Conforme mostra a Figura 10 no sobrenadante da cepa BA 1250 foi visualizada uma banda com a massa molecular equivalente a 111 kDa, como visualizado fracamente no controle positivo. Bandas com diferentes pesos moleculares também foram visualizadas devido à presença de outras proteínas no sobrenadante. Nota-se que no caso da cepa BA 1250 há a presença de duas bandas muito próximas.

Novo SDS-PAGE está sendo realizado, a fim de se obter bandas mais nítidas e bem delimitadas facilitando a extrusão. Tanto a banda superior, como a inferior serão enviadas para a análise por espectrometria de massa.

Figura 10 - Gel de SDS-PAGE para obtenção de uma banda com massa molecular de 111 kDa que corresponde a massa de Vat.



Fonte: Costa, Carolaine.

MM – Massa molecular (Padrão: Precision Plus Protein Standards) Gel corado com Nitrato de prata.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, cujo objetivo principal foi obter no SDS-PAGE uma banda de 111 kDa que correspondesse a massa molecular da toxina Vat para o envio e identificação por espectrometria de massa, conseguiu-se das três cepas (duas EPECs e uma UPEC), identificar que a cepa BA 1250 (EPEC) apresenta potencial para obtenção desta proteína, visto que esta cepa não apresenta outra SPATE, além da Vat.

As melhores condições de cultivo e precipitação das proteínas do sobrenadante foram padronizadas conseguindo a visualização de uma proteína com a massa molecular de interesse. Uma nova corrida eletroforética será realizada a fim de se obter uma banda mais forte e bem delimitada que possibilite a extrusão e o envio para a identificação no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan.

6. OUTRAS ATIVIDADES INCLUSAS NO TREINAMENTO DURANTE O PERÍODO DA ESPECIALIZAÇÃO

Além das técnicas realizadas no estudo proposto, incluso no item 4.0, outras atividades práticas realizadas no laboratório foram executadas ampliando a formação oferecida.

As atividades encontram-se relacionadas abaixo e foram subdivididas em treinamento geral que inclui o conhecimento importante para o bom funcionamento do laboratório e treinamento específico aonde técnicas importantes para responder diferentes perguntas não relacionadas ao projeto proposto, foram também realizadas ou acompanhadas.

6.1 Treinamento geral

- Noções de esterilização;
- Preparo de materiais para esterilização;
- Preparo de soluções;
- Funcionamento do biotério;
- Métodos de coloração e identificação bacteriana;
- Participação dos seminários oferecidos semanalmente no laboratório (duração de 1h).

6.2 Treinamento específico

- Manutenção de culturas de diferentes linhagens celulares;
- Coloração celular;
- Ensaio de Microbicidade;
- Purificação de toxina;
- Ensaio de citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. L. **Histopatologia e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte**. 2005. 62f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ.

ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 47, p. 219–225, 1975.

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de micro-organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 344-355, 2011.

BAUMAN, A. Z. B. **Vat (vacuolating autotransporter toxin) produzida por APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*) efeitos intracelulares e distribuição filogenética**. 2010. 57f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.

BRIGULLA, M.; WACKERNAGE, W. Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.89, p. 1027–1041, 2010.

BUERIS, V. **Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica que apresenta o padrão de adesão localizada-like com a célula epitelial in vitro**. 2008. 45f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CROXEN, M, A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 26-38, 2010.

ELIAS, W. P.; GOMES, T. A. T. *Escherichia coli* enteroagragative. In: TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015, p.317-322.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCIA, F.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroagregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3155-3163, 1998.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ALT, K.; ANTÁO, E. M., LATURNUS, C. DIEHL, I.; GLODDE, S. HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜCK, H.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **Int. J. Med. Microbiol.** v. 297, p. 163-176, 2007.

FERREIRA, E. O; LIMA, R. N. S. Genética da virulência. In: TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu, p.161-168, 2015.

FLORES-MIRELES, A. L.; WALKER, J. N.; CAPARON, M.; HULTGREN, S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews microbiology**, v.13, p. 269-284, 2015.

GOOSNEY, D. L.; DeVINNEY, R. PFUETZNER, R. A.; FREY, E. A.; STRAYNADKA, N. C.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic E. coli translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with α -actinin. **Current Biology**, v.10, p.735-738, 2000.

GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 53-66, 2000.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends in microbiology**. v. 6, p. 370-378, 1998.

HENDERSON, I. R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HU, J.; TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? **Clinical Microbiology and Infection**, v.21, p. 729-734, 2015.

JAIN, S.; ULSEN, P.; BENZ, I.; SCHMIDT, M. A.; FERNANDEZ, R.; TOMMASSEN, J.; GOLDBERG, M. B. Polar Localization of the Autotransporter Family of Large Bacterial Virulence Proteins. **Journal of Bacteriology**. v. 188, p. 4841-4850, 2006.

JOHNSON, T. J.; KARIYAWASAM, S.; WANNEMUEHLER, Y.; MANGIAMELE, P.; JOHNSON, S.J.; DOETKOTT, C. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human ExPEC genomes. **Journal Bacteriological**. v. 189, p.3228–3236, 2007.

JOHNSON T. J., WANNEMUEHLER Y.; JOHNSON S. J.; STELL A. L.; DOETKOTT C.; JOHNSON J. R., KIM K. S., SPANJAARD L.; NOLAN L. K. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Appl. Environ. Microbiol.** v.74, p.7043-7050, 2008.

KAPER, J. P. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v.27, p. 130-133, 1996.

KAPER, J. B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Ver. Microbiol.**, v. 2, p.123-140, 2004.

KÖHLER, C-D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**. v.301, p. 642-647, 2011.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 107-117, 2000.

MARRS, C. F. et al. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? **FEMS Microbiology Letters**. v. 252, p. 183-190, 2005.

MOULIN-SCHOULEUR M.; RÉPÉRANT M.; LAURENT S.; BRÉE A.; MIGNON-GRASTEAU S.; GERMON P.; RASSCHAERT D.; SCHOULER C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **J. Clin. Microbiol.** v.45, p. 3366-3376, 2007.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, v. 2, n. 1, 2011.

NICHOLS, K. B., TOTSIKA, M., MORIEL, D. G., LO, A.W., YANG, J., WURPEL, D. J., ROSSITER, A. E., STRUGNELL, R. A., HENDERSON, I. R., ULETT, G. C., BEATSON, S. A., SCHEMBRI, M. Molecular characterization of the vacuolating autotransporter toxin in uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 198, n. 10, 2016.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.11, p.478-483, 2011.

PAK, J.; PU, Y.; ZHANG, Z. T.; HASTY, D. L.; WU, X. R. Tam-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from to uroplakin Ia and Ib receptors. **Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 9924- 9930, 2001.

PARHAM, N. J.; POLLARD, S. J.; DESVAUX, M.; SCOTT-TUCKER, A.; LIU, C.; FIVIAN, A.; HENDERSON, I. R. Distribution of the serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae* among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. **Journal of clinical microbiology**, v.43, p.4076-4082, 2005.

PATERSON, D. L. Infections Due to Other Members of the *Enterobacteriaceae*, Including Management of Multidrug-Resistant Strains. **Goldman's Cecil Medicine**, v. 2, p. 1874–1877, 2012.

PIAZZA, R. M. F; ROCHA. L. B.; HORTON, D. S. P. Q. Fatores de virulência II: Toxinas. In: TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015, p.147-154.

RESTIERI, C.; GARISS, G.; LOCAS, M-C.; DOZOIS, C. M. Autotransporter-Encoding Sequences are Phylogenetically Distributed among *Escherichia coli* Clinical Isolates and Reference Strains. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, p. 1553-1562, 2007.

RAETZ, C. R. H. BIOCHEMISTRY OF ENDOTOXINS. **Annu. Rev. Biochem.** v.59, p. 129-170, 1990.

ROCHA, D. C. C, M.; ANDERSON, N. R.; SANTOS, S. D.; LOUREIRO, E. C. B. Caracterização molecular de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica em animais silvestres capturados na Região Amazônica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**,v. 8, p. 9-16, 2017.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway : classification, specificity, and role in virulence. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.71, p. 745-770, 2014.

SALVADORI, M. R.; YANO, T.; CARVALHO, H. F.; PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Diseases**. v. 45, p. 43-51, 2001.

SASTALLA, I.; MONACK, D. M.; KUBATZKY, K. F. Bacterial Exotoxins: How Bacteria Fight the Immune System. **Frontiers in immunology**, v.7, p. 300, 2016.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**. v.119, 3-10, 2006.

THOMAS C. M; NIELSEN K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nat. Rev. Microbiol**, v.3, p. 711–721, 2005.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2012.

WULLT, B. The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 21, p. 605-621, 2003.